

Physiologie, Genetik und Isolierung Propionat
bildender Bakterien aus dem Phylum
Bacteroidota

Dissertation

Zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von

Carolin Döring

Geboren am 12.06.1993 in Rostock

Hanse- und Universitätsstadt Rostock

Gutachter: **Prof. Dr. Mirko Basen**

Universität Rostock

Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Univ.-Prof. i. R. Dr.-Ing. Jochen Büchs

RWTH Aachen

Aachener Verfahrenstechnik, Bioverfahrenstechnik

Datum der Einreichung: 17.07.2025

Datum der Verteidigung: 12.12.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 <i>Bacteroidota</i> als Teil des menschlichen Mikrobioms	3
2.2 Abbau von Polysacchariden durch <i>Bacteroidia</i>	5
2.3 Der Stoffwechsel der <i>Bacteroidia</i>	6
2.4 Propionsäure in der Industrie	8
2.5 Mikrobielle Propionatproduktion.....	10
2.6 Gegenwertiger Stand der biotechnologischen Propionatproduktion.....	11
2.7 Zielsetzung.....	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Organismen	14
3.1.1 Stammauswahl.....	14
3.1.2 Organismenliste	14
3.2 Kulturmedien und Lösungen.....	14
3.2.1 Medium-Zusätze und Stammlösungen	14
3.2.2 Herstellung der Kulturmedien	16
3.2.3 Luria-Bertani-Medium (LB).....	17
3.2.4 10 x Phosphat-gepufferte-Saline (PBS).....	17
3.2.5 Pepton-Hefe-Glucose-Medium (PYG)	17
3.2.6 Definiertes Mineralmedium mit Glucose (DMMG)	18
3.2.7 DMMG mit Hefeextrakt (DMMG-H).....	19
3.2.8 Pepton-Hefe-Hämin-Vitamin-Glucose-Medium (PYHVG)	19
3.3 Kultivierungsbedingungen.....	20
3.3.1 Anoxische Arbeiten.....	20
3.3.1 Gefrierkonservierung.....	20
3.3.2 Kultivierungsbedingungen für <i>Bacteroidia</i>	21
3.3.3 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
3.4 Analysemethoden.....	21
3.4.1 Bestimmung des bakteriellen Wachstums	21

3.4.2 Bestimmung des pH.....	21
3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	21
3.4.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie.....	22
3.4.5 Gaschromatografie (GC)	22
3.4.1 Optisch-Enzymatische Glucosebestimmung	23
3.4.2 Bestimmung intrazellulärer Polysaccharide (IPS).....	24
3.4.3 Trockengewichtbestimmung.....	24
3.4.4 Elementaranalyse.....	25
3.5 Physiologische Untersuchung der <i>Bacteroidia</i>	25
3.5.1 Wachstumsversuche im Plattenlesegerät	25
3.5.2 Untersuchung der CO ₂ -Abhängigkeit.....	26
3.5.3 Kultivierung als pH-kontrollierte Fed-Batch.....	26
3.5.4 Herstellung ruhender Zellen	27
3.5.5 Stoffwechselbilanz wachsender Zellen.....	28
3.6 Genomanalyse.....	28
3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren	29
3.7.1 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus <i>Phocaeicola vulgatus</i>	29
3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>P. vulgatus</i>	29
3.7.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	29
3.7.4 Agarose Gelelektrophorese.....	29
3.7.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	30
3.7.6 PCR-Aufreinigung.....	30
3.7.7 Sequenzierung von DNA.....	31
3.7.8 Isolierung von RNA.....	31
3.7.9 cDNA-Synthese und quantitative PCR.....	31
3.8 Generierung des Stammes <i>P. vulgatus</i> pG106_np_mutA_scpA	32
3.8.1 Herstellung rekombinanter Plasmide.....	32
3.8.2 Transformation.....	32
3.8.3 Kolonie-PCR	33
3.8.4 Konjugation	33
3.9 Anreicherung und Isolierung von Polymer abbauenden <i>Bacteroidota</i>	34
3.9.1 Anreicherungsmedium (AM).....	34
3.9.2 Probematerialien	34

3.9.3 Anreicherung	35
3.9.4 Isolierung	35
3.9.5 Identifizierung der Isolate	35
3.9.6 Amplicon-Sequenzierung	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Stammauswahl	37
4.2 Bestimmung geeigneter Kultivierungsbedingungen	37
4.2.1 Wachstum in Komplexmedium	37
4.2.2 Wachstum in definiertem Medium	38
4.2.3 Einfluss der Vitamin- und Glucosekonzentration auf das Wachstum im Mineralmedium ..	39
4.3 Propionatbildung der <i>Bacteroidia</i>	42
4.4 Einfluss von Kohlenstoffdioxid auf Wachstum und Produktbildung	46
4.5 Untersuchung des Stoffwechsels	48
4.5.1 Genetische Ausstattung ausgewählter <i>Bacteroidota</i>	48
4.5.2 Untersuchung der Wasserstoffbildung	52
4.5.3 Stoffwechselbilanz ruhender Zellen	53
4.5.4 Stoffwechselbilanz wachsender Zellen	55
4.6 pH-kontrollierte Kultivierung	60
4.7 Etablierung genetischer Methoden	62
4.7.1 Erstellung des Plasmids pG106_np_mutA_scpA	62
4.7.2 Physiologische Charakterisierung des Stammes <i>P. vulgatus</i> pG106_np_mutA_scpA	66
4.7.3 Nachweis der Überproduktion	68
4.8 Isolierung und Charakterisierung von <i>Bacteroidota</i>	69
4.8.1 Etablierung einer Anreicherungs-methode	69
4.8.2 Produktbildung der Isolate	71
4.8.3 Wachstum und Produktbildung des Isolats BGG-A1	72
4.8.4 Stoffwechselbilanz des Isolats BGG-A1	72
5 Diskussion	75
5.1 Auswahl geeigneter <i>Bacteroidota</i>	75
5.2 Anforderung der <i>Bacteroidia</i> zur Propionatproduktion	76
5.3 Vergleich der Propionatproduktion der <i>Bacteroidia</i>	79
5.4 Physiologie von <i>B. graminisolvens</i> und <i>B. propionificiens</i>	82
5.4.1 Abhängigkeit Produktbildung von der CO ₂ -Konzentration	82

5.4.2	Rekonstruktion des Stoffwechsels	83
5.4.3	Bilanzierung des Stoffwechsels	90
5.4.4	Upscaling der Propionatproduktion	93
5.5	Genetische Methoden zur Verbesserung der Propionatproduktion	94
5.6	Nutzung neuer Isolate als Propionatproduzenten.....	97
5.6.1	Isolierung neuer <i>Bacteroidia</i> zur Propionatproduktion	97
5.6.2	Physiologische Untersuchungen des Isolats BGG-A1.....	98
5.7	<i>Bacteroidota</i> als Propionatproduzenten in der Industrie.....	99
6	Literaturverzeichnis	101
Anhang		122
Selbständigkeitserklärung		147
Danksagung		148

Abkürzungsverzeichnis

μNa^+	Elektrochemisches Na-Ionen Potential
<i>Ad.</i>	Auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Anreicherungsmedium
ATP	Adenosintriphosphat
Bg0	Biogasanlage Groß Babelin ohne Anreicherung
BgI	Biogasanlage Groß Babelin
BgII	Biogasanlage Güstow
Blast	Basic logical alignment search tool
Bm	Biomüll
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CMC	Carboxymethylcellulose
CoA	Coenzym A
Cpm	Zyklen pro Minute
DH	Dehydrogenase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMM	Definiertes Mineralmedium
DMMG	Definiertes Mineralmedium mit Glucose
DMMG-H	Definiertes Mineralmedium mit Glucose und 0,5 g/l Hefeextrakt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
F6P	Fructose-6-Phosphat
Fd _{ox.} /Fd _{red.}	Ferredoxin oxidiert/reduziert
FID	Flammenionisationsdetektor
x g	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
G6P	Glucose-6-Phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC	Gaschromatografie
GIT	Gastrointestinaler Trakt
GTP	Guanidintriphosphat
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
IAP	Institut für angewandte Polymerforschung
IPS	Intrazelluläre Polysaccharide
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MeOH	Methanol
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<i>mutA</i>	Gen der Methylmalonyl-CoA-Mutase kleine Untereinheit
MW	Mittelwert
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamadenindinukleotid oxidiert/reduziert

NADP ⁺ /NADPH	Nikotinaminadenin dinukleotidphosphat oxidiert/reduziert
NaOH	Natronhydroxid
Np	nativer Promoter
Nqr	Na ⁺ -translozierende NADH-Chinon-Reduktase
Nuo	NADH-Chinon-Oxidoreductase
OxAc	Oxalacetat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OD _{max}	maximale optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEP-CK	PEP-Carboxykinase
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase
PFOR	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
pH	Potential des Wasserstoffs
PPP	Pentosephosphatweg
P/A	Propionat/Acetat-Verhältnis
PS/A	Propionat+Succinat/Acetat-Verhältnis
P/S	Propionat/Succinat-Verhältnis
PYG	Peptone-Yeast-Glucose
PYHVG	Peptone-Yeast-Hemin-Vitamin-Glucose
RID	<i>refractive index detector</i> , Brechungsindexdetector
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	Ferredoxin:NAD-Oxidoreduktase
rpm	<i>revolution per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
<i>scpA</i>	Gen der Methylmalonyl-CoA-Mutase große Untereinheit
SOC	Superoptimales Medium mit katabolischem Repressor
T _a	Anlagerungstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Tricarbonsäurezyklus, Citratzyklus
TCD	<i>Thermal conductivity sensor</i> , Wärmeleitfähigkeitssensor
T _m	Schmelztemperatur
TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Vis	Ultraviolettes-sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
Van	Vancomycin
VF	Verdünnungsfaktor
w/v	Gewichtsprozent
Xo	Xylooligosaccharide
Xu5P	Xylulose-5-Phosphat

1 Zusammenfassung

Bakterien des Phylums *Bacteroidota* sind in vielen Lebensräumen zu finden. Als Teil der Darm-Mikrobiota vieler Lebewesen spielen sie eine wichtige Rolle für die Gesundheit, denn sie haben die Fähigkeit, komplexe Pflanzenpolymere zu nutzen und daraus gesundheitsfördernde Substanzen wie Acetat oder Propionat zu produzieren. Propionat ist aber auch von wirtschaftlicher Bedeutung, da es für eine Vielzahl von Anwendungen insbesondere in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie benötigt wird. Die derzeitige industrielle Produktion erfolgt jedoch über petrochemische Prozesse. Obwohl Propionat von einer Reihe von Bakterien gebildet wird, gibt es noch keine konkurrenzfähige Alternative zur petrochemischen Produktion. *Bacteroidota* waren jedoch noch nicht Fokus der Forschung auf diesem Gebiet. Sie können jedoch eine spannende Alternative zu den bereits etablierten Propionatproduzenten darstellen. In dieser Arbeit sollte daher die Propionatbildung der *Bacteroidota* unter physiologischen und genetischen Gesichtspunkten untersucht werden.

Eine Literaturrecherche nach Propionatproduzenten ergab 30 Spezies (Klasse *Bacteroidia*). Quellen waren der Verdauungstrakt von Menschen und Tieren, methanogene Bioreaktoren, Reisfelder und Abwasser einer Papiermühle. Sie nutzten Substrate wie Stärke, Cellulose, Xylan und Pektin. 10 Stämme wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zwei der Spezies wurden beispielhaft ausgewählt, um zunächst die Kultivierungsbedingungen zugunsten von Propionat zu optimieren. Die Steigerung der B₁₂-Konzentration im definierten Medium wirkte bei *P. johnsonii* wachstumsfördernd, bei *B. graminisolvens* fördernd auf die Propionatproduktion. Eine Glucosekonzentration oberhalb von 15 mM führte zu einer Verschiebung des Produktspektrums hin zu Lactat. Schließlich wurden Wachstumsversuche aller 10 Stämme im Plattenlesegerät mit 15 mM Glucose durchgeführt. Dabei erzielten *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* die höchsten Propionat-Titer (12,7 mM bzw. 8,0 mM). *B. graminisolvens* zeigte außerdem ein unerwartet hohes Propionat + Succinat/Acetat-Verhältnis (3,7 mol_{PS}/mol_A). Daher wurden diese zwei Spezies für weitere Tests ausgewählt. In Untersuchungen der CO₂-Abhängigkeit konnten bei *B. propionificiens* in Medium ohne CO₂ kaum Wachstumseinschränkungen oder Veränderungen des Produktspektrums festgestellt werden. *B. graminisolvens* benötigte hingegen mindestens 5 mM NaHCO₃ und produzierte bei niedrigen NaHCO₃-Konzentrationen vermehrt Lactat. Die genetische Ausstattung im Hinblick auf die zentralen Gene kataboler Stoffwechselwege der beiden Stämme war annähernd gleich. *P. propionificiens* fehlten Gene für die Aldolase, die Succinyl-CoA-Ligase und NADH-Chinon-Oxidoreduktase. Beide Spezies produzierten keinen Wasserstoff. Die Redoxbilanz von *B. propionificiens* war geschlossen (102,6 %) unter der Annahme, dass 32,8 % der Glucose über den oxidativen Pentosephosphatweg (oxPPP) verstoffwechselt wurde. *B. graminisolvens* verstoffwechselte vermutlich sogar 67,9 % der Glucose über den oxPPP. In pH-kontrollierter Fed-Batch-Kultivierung wuchs *B. propionificiens* zu einer OD₆₀₀ von 8,1 und erzielte Propionat-Titer von 119 mM. *B. graminisolvens* wuchs bis auf eine OD₆₀₀ von 9,8 und produzierte 33 mM Propionat. Es bildete vermehrt Succinat, Lactat und Pyruvat. Weiterhin wurde eine gentechnische Methode zur Überproduktion der nativen Methylmalonyl-CoA-Mutase in *P. vulgatus* getestet. Die Transkriptabundanz war erhöht, der Stamm zeigte aber keine Steigerung der Propionatproduktion in DMMG-Medium und eine Verringerung zugunsten von Succinat im PYG-Medium.

Durch Anreicherungen von Bakterien aus Kompost, Biogasanlage und Klärwerk wurden 21 Propionat produzierende Isolate identifiziert. Das Isolat BGG-A1, welches hohe Sequenzübereinstimmung mit *Dysgonomonas gadei* zeigte (16S-rRNA), produzierte im kleinen Maßstab (0,5-ml-Kulturen) 5,4 mM Propionat. Die Redoxbilanz war zu 95 % ausgeglichen, unter der Voraussetzung, dass Glucose zu 60 % über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt wurde. Weitere Untersuchungen des Stoffwechsels des Isolats stehen aus.

Die Untersuchungen zeigten, dass *Bacteroidota*-Bakterien das Potenzial zur Bildung von Propionat besitzen und auch hohe Titer bei den richtigen Kultivierungsbedingungen möglich sind. Jedoch fehlen weitreichende Erkenntnisse zu Enzymfunktionen und Regulationsmechanismen, um gezielte genetische Modifikationen des Stoffwechsels vorzunehmen. Auch die Prozessoptimierung kann genutzt werden, um die Produktion von Propionat durch *Bacteroidota* zu steigern und somit die biotechnologische Propionatproduktion zu ermöglichen.

2 Einleitung

2.1 *Bacteroidota* als Teil des menschlichen Mikrobioms

Der Mensch ist nicht allein mit seinem Körper. Eine Schätzung der Zellzusammensetzung gibt an, dass wir etwa so viele bakterielle wie menschliche Zellen beherbergen (Sender *et al.*, 2016). Besonders deutlich wird das bei der mikrobiellen Zusammensetzung im Gastrointestinaltrakt (GIT). Hier machen Bakterien den weit größten Anteil der mikrobiellen Gemeinschaft aus (Qin *et al.*, 2010). Allein im Colon wird die Zahl der Bakterien beispielsweise auf bis zu 1×10^{11} Zellen pro ml Darminhalt geschätzt (Sender *et al.*, 2016). Die Funktionen der Bakterien im GIT sind ebenfalls vielfältig. Indem sie die Darmoberflächen besiedeln, antimikrobielle Substanzen produzieren und das Immunsystem regulieren, sorgen sie für eine Kolonisierungsresistenz gegenüber Pathogenen (Mills *et al.*, 2019). Obwohl die Zusammensetzung der Darmbakterien auf dem Spezieslevel hoch individuell ist, sind zwei Phyla besonders abundant: *Bacillota* (ehemals *Firmicutes* (Oren und Garrity, 2021)) und *Bacteroidota* (Jandhyala *et al.*, 2015). Sie machen bis zu 90 % des Darmmikrobiomes aus (Eckburg *et al.*, 2005). Das Phylum *Bacteroidota* ist dabei hoch divers und seine Mitglieder in allen möglichen Lebensräumen zu finden. Ursprünglich unter dem Namen *Bacteroidetes* bekannt (Oren und Garrity, 2021), beherbergt diese Gruppe eine Vielzahl von Organismen, die in die Klassen *Flavobacteria*, *Chitinophagia*, *Cytophagia*, *Saproisira*, *Sphingobacteria* und *Bacteroidia* eingeteilt werden (Hahnke *et al.*, 2016a). Charakteristisch für *Bacteroidota* ist deren große Kapazität, pflanzliche Polymere abzubauen und in vielfältige Substanzen umzuwandeln (Thomas *et al.*, 2011). Außerdem sind sie Gram-negativ und bilden keine Endosporen (Krieg *et al.*, 2010). Darüber hinaus ist das Phylum aber hoch divers. *Flavobacteria* beispielsweise werden häufig aus Erde, Frisch- oder Meerwasser isoliert und haben meist einen aeroben Stoffwechsel (Bernadet, 2010). Die Klasse *Cytophagia* beherbergt auch psychrophile und thermophile Organismen (Nakagawa, 2010). Unter den darmassoziierten *Bacteroidota* finden sich besonders häufig die Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Parabacteroides* (Falony *et al.*, 2016), die mit weiteren Genera in der Klasse der *Bacteroidia* zusammengefasst werden (Abbildung 2.1). Diese Organismen zeichnen sich durch einen meist anaeroben und saccharolytischen Stoffwechsel aus (Krieg, 2010). Sie sind nicht nur Teil der Mikrobiota von Menschen sondern auch von Hunden, Schweinen, Mäusen, Wiederkäuern, verschiedenen Vögeln, Termiten und Stachelhäutern (Thomas *et al.*, 2011).

Besonders Bakterien der Gattung *Bacteroides* sind wegen ihrer Rolle für die Gesundheit in den Fokus der Forschung gerückt. Beispielsweise verringern sie entzündliche Reaktionen im Darm (Tan *et al.*, 2019b), modulieren die Cytokinausschüttung und die Proliferation der Darmmukosa und unterdrücken die Kolonisation des Darmes mit Pathogenen (Cheng *et al.*, 2022). Ein Isolat von *B. xylanisolvens* zeigte beispielsweise positive Auswirkungen auf Colitiszeichen und Dysbiosen in Mäusen (Fu *et al.*, 2023). Daher werden *Bacteroides* als Kandidaten für neue Probiotika diskutiert (Tan *et al.*, 2019a) und es gibt bereits klinische Studien, die die Unbedenklichkeit von pasteurisierten Zellen von *B. xylanisolvens* DSM 23964 für den Menschen bestätigten (Ulsemer *et al.*, 2012a).

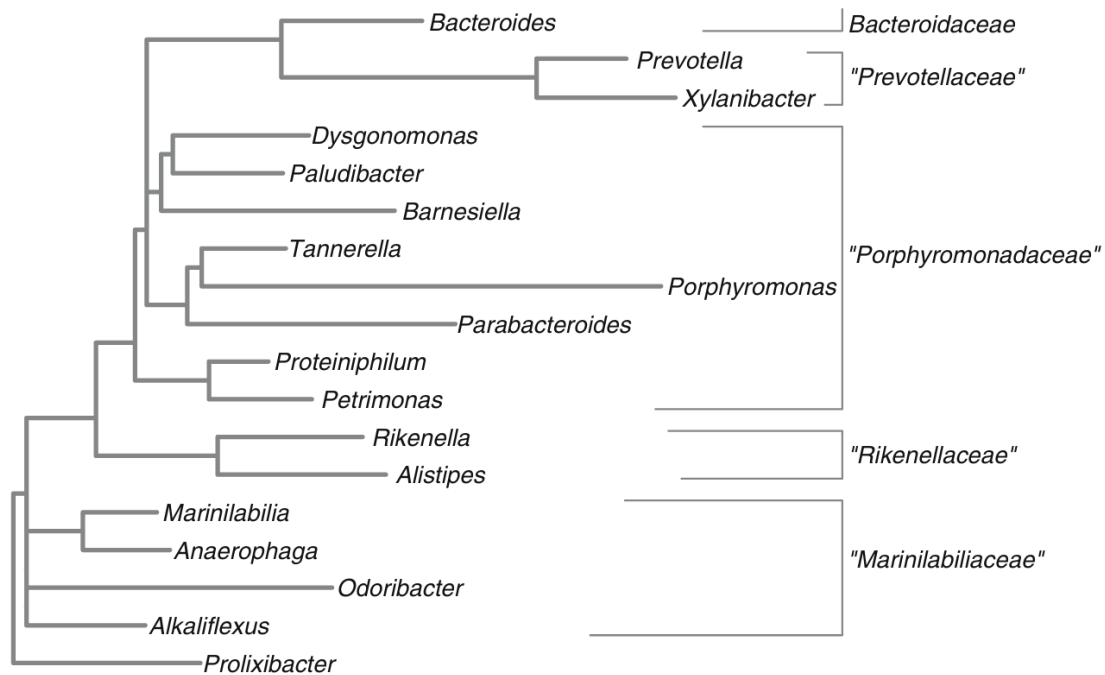


Abbildung 2.1: Genera der Klasse *Bacteroidia* (Ludwig *et al.*, 2010).

Bacteroides sind jedoch nicht ausschließlich gesundheitsförderlich. Gelangen die Bakterien in andere Gebiete des Körpers, können sie Entzündungen hervorrufen (Polk und Kasper, 1977). Auch in der Darmgesundheit können sie eine nachteilige Rolle spielen. Einige Stämme von *B. fragilis* bilden Toxine, die entzündliche Darmerkrankungen begünstigen und damit zur Ausbildung von Krebs beitragen (Chung *et al.*, 2018). Das ebenfalls von *B. fragilis* produzierte kapsuläre Polysaccharid PSA hat sowohl gesundheitsfördernde immunmodulierende Wirkung, kann aber auch die Bildung von Abszessen begünstigen (Surana und Kasper, 2012). Der Einfluss auf die Gesundheit des Wirts ist daher nicht immer eindeutig und stammspezifisch. Aus diesem Grund fällt ein Großteil der gut untersuchten *Bacteroides* wie *B. fragilis* und *B. thetaiotaomicron* in Deutschland in die Sicherheitskategorie 2 nach den Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) (Technischer Arbeitsschutz - TRBA 466, 2015). Auch bei dem nahe verwandten Bakterium *Segatella copri* sind sowohl hohe als auch niedrige Abundanzen mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (Abdelsalam *et al.*, 2023). Die Rolle der *Bacteroidia* für die menschliche Gesundheit ist daher nicht immer eindeutig. Trotzdem sind sie allein wegen ihrer Abundanz im Verdauungstrakt vieler Lebewesen von großer Bedeutung für den Körper. Dies verdanken sie ihrer Fähigkeit, Pflanzenpolymere aus der Nahrung abzubauen. Zu den verwerteten Verbindungen gehören beispielsweise Stärke, Fructane, Pektine und Hemicellulose (Pudlo *et al.*, 2022), medizinische Polysaccharide (Qu *et al.*, 2025), aber auch Alginat (Fu *et al.*, 2023) und Chitin (Fernandez-Julia *et al.*, 2021). Einige Stämme wie *B. thetaiotaomicron* und *B. fragilis* verwerten aber auch wirtseigene Polymere, beispielsweise Mucine (Pudlo *et al.*, 2022).

2.2 Abbau von Polysacchariden durch *Bacteroidia*

Für den Abbau von Polysacchariden besitzen die *Bacteroidia* komplexe Enzymsysteme (Abbildung 2.2). Sie sind im Genom der Zellen in PULs (*Polysaccharide utilization locus*) organisiert (Bjursell *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich um distinkte Genomabschnitte, auf denen die beteiligten Gene clusterartig angeordnet sind. Diese Gene codieren für Enzyme, die an der Bindung, Detektion, Transport und Hydrolyse bestimmter Polysaccharide beteiligt sind (Grondin *et al.*, 2017). Das System wurde zuerst in *B. thetaiotaomicron* für den Abbau von Stärke entdeckt und daher Sus (*Starch utilisation system*) genannt (Tancula *et al.*, 1992; Shipman *et al.*, 1999). Seither wurden jedoch noch viele weitere PULs entdeckt, die am Abbau anderer Polymere beteiligt sind, jedoch nach dem gleichen Prinzip funktionieren (Despres *et al.*, 2016). Das Sus-System besteht aus den Proteinen SusA-G und dem regulatorischen Protein SusR. SusE und F sind in der äußeren Membran verankert und binden Stärke. SusG ist ebenfalls an der Membran gebunden und spaltet Stärke in Oligosaccharide. Diese werden dann durch SusC und SusD ins Periplasma transportiert, wo sie durch weitere Hydrolasen (SusA, SusB) in Di- und Monosaccharide gespalten werden. Das regulatorische Protein SusR ist in der inneren Membran verankert und kann die Expression der Sus-Gene induzieren, wenn Stärke detektiert wird. (McKee *et al.*, 2021). Wie groß die Kapazität der Darm-*Bacteroides* zum Abbau von Polymeren ist, zeigt eine Vorhersage von PULs verschiedener Spezies. So wurden in *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* und *B. xylanisolvens* jeweils 90, 188 und 100 mögliche PULs identifiziert (McKee *et al.*, 2021).

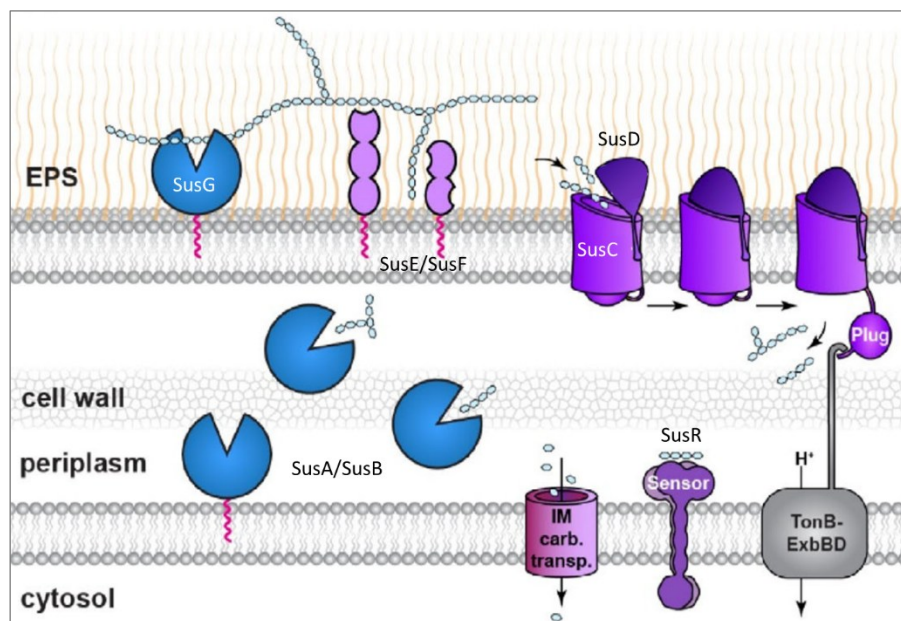


Abbildung 2.2: Genereller Mechanismus des Stärkeabbaus in vielen *Bacteroidota*-Spezies. SusE und SusF sind in der äußeren Membran verankerte Proteine, die Stärkemoleküle binden. SusG spaltet sie in Oligosaccharide, die mittels SusC/SusD ins Periplasma transportiert werden. Durch die periplasmatischen Enzyme SusA und SusB werden die Oligosaccharide weiter gespalten. Schließlich können Monomere in die Zelle aufgenommen werden. Das Regulatorprotein SusR kann die Expression der Gene je nach Substratverfügbarkeit anpassen. Modifiziert nach (McKee *et al.*, 2021).

2.3 Der Stoffwechsel der *Bacteroidia*

Nachdem die Polysaccharide in Monosaccharide gespalten wurden, werden sie durch den Stoffwechsel der *Bacteroidia* in verschiedene organische Säuren umgewandelt dazu zählen Propionat, Succinat, Acetat, Lactat und Formiat. Der Stoffwechselweg von Glucose in *Bacteroides fragilis* wurde bereits Ende der 70er-Jahre beschrieben (Macy *et al.*, 1978). Auch *Segatella copri* (ehemals *Prevotella*) zeigte ähnliche Stoffwechselabläufe (Franke, 2020), die in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt sind. In beiden Untersuchungen nutzen die Organismen die Glykolyse, in der aus einem Mol Glucose zwei Mol Phosphoenolpyruvat (PEP) entstehen. Dies kann dann entweder zu Pyruvat oder durch Carboxylierung zu Oxalacetat (OxAc) umgewandelt werden. Bei beiden Reaktionen wird chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) konserviert. Ebenso werden im Laufe der PEP-Produktion Elektronen freigesetzt, die auf oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) übertragen werden, wobei die reduzierte Form des Elektronenüberträgers (NADH) entsteht. NADH muss von der Zelle durch Oxidation regeneriert werden, da sonst der NAD^+ -Pool aufgebraucht wird, was den Stillstand des zellulären Stoffwechsels zur Folge hätte. Viele Organismen nutzen für diese Regeneration Atmungsketten, bei denen über mehrere Schritte Elektronen vom NADH auf Chinon und schließlich einen terminalen Elektronenakzeptor wie beispielsweise O_2 , Nitrat oder Fumarat übertragen werden. Diese Reaktionen können häufig zur Energiekonservierung genutzt werden, indem ein Protonen- oder Ionengradient aufgebaut wird, der eine ATP-Synthase antreibt. Eine weitere Möglichkeit NADH zu regenerieren ist die Fermentation. Hierbei wird die Oxidation von NADH direkt an die Reduktion von Stoffwechselintermediaten gekoppelt. Indem die Fermentationsprodukte an die Umgebung abgegeben werden, entledigt sich die Zelle der Elektronen.

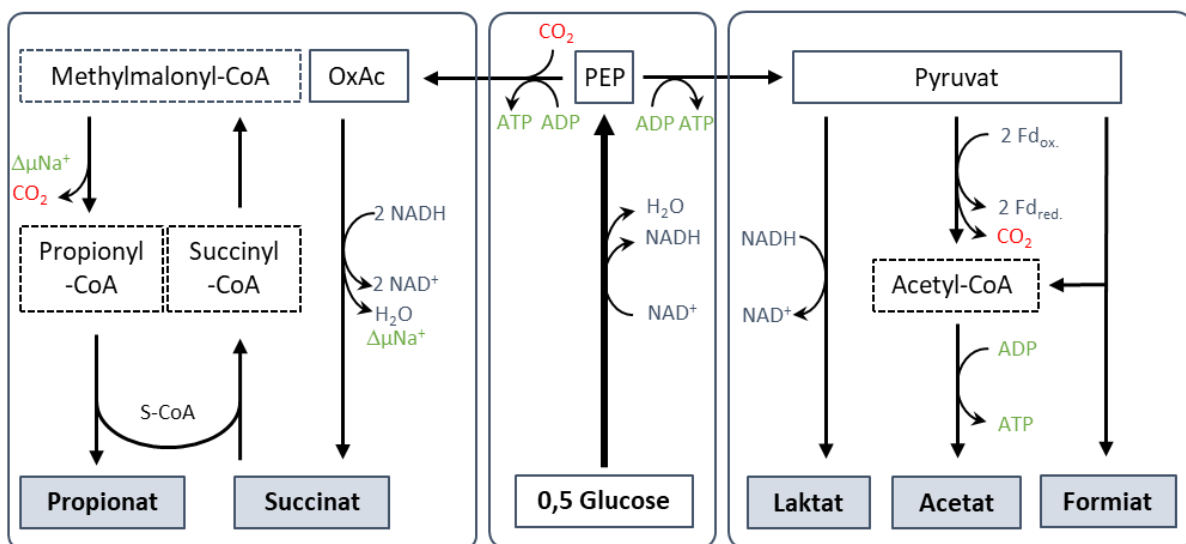
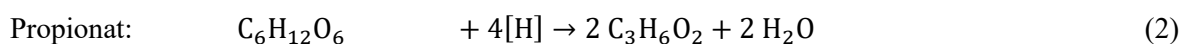
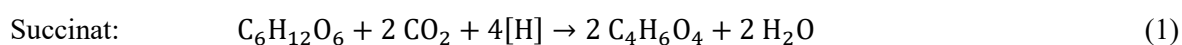
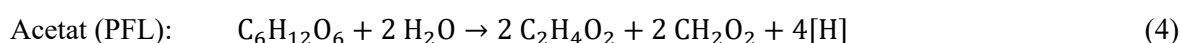
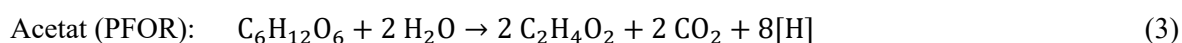


Abbildung 2.3: Bildung organischer Säuren aus Glucose durch Mitglieder der *Bacteroidia*. PEP, Phosphoenolpyruvat; OxAc, Oxalacetat; NAD^+/NADH , Nicotinadenindinucleotid oxidiert/reduziert; ATP, Adenosintriphosphat; $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}}$, Ferredoxin oxidiert/reduziert; $\Delta\mu\text{Na}$, Bildung eines elektrochemischen Potentials. (Döring und Basen, 2024)

Im Fall von *Bacteroidia* gibt es mehrere Möglichkeiten, die Elektronenüberträger zu regenerieren. Im Laufe der Glykolyse entsteht Phosphoenolpyruvat (PEP), welches zu Oxalacetat (OxAc) carboxyliert wird. Im reversen Citratzyklus (TCA) wird dann zunächst Oxalacetat zu Malat reduziert, welches durch Abspaltung von H₂O zu Fumarat umgewandelt wird. Durch die anschließende Reduktion von Fumarat entsteht Succinat. Obwohl durch diesen Reaktionsweg ausgehend von OxAc bereits 2 Mol NADH oxidiert werden, können viele der *Bacteroidia* Succinat weiterverarbeiten. Im sogenannten Succinat-Weg wird zunächst Succinyl-CoA gebildet, welches durch eine Mutase-Reaktion zu (S)-Methylmalonyl-CoA umgewandelt wird. Durch eine Epimerase wird dieses dann zu (R)-Methylmalonyl-CoA und über die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase zu Propionyl-CoA umgewandelt. Der CoA-Rest wird wieder auf Succinat übertragen, wodurch Propionat freigesetzt wird. Für die reine Bildung von Succinat bzw. Propionat aus Glucose ergeben sich somit folgende Reaktionsgleichungen:

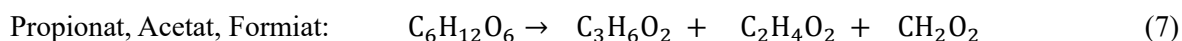
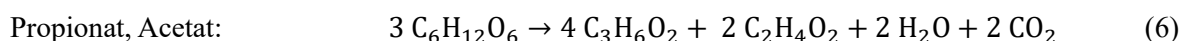


Obwohl die Umwandlung von Succinat zu Propionat keinen Einfluss auf den Redoxhaushalt der Zelle hat, ergeben sich zwei Vorteile: Erstens wird das bei der Carboxylierung von PEP genutzte CO₂ wieder freigesetzt, wodurch der netto CO₂-Verbrauch null ist. Zweitens kann die bei der Decarboxylierung freigesetzte Energie durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase in einen chemischen Na⁺-Konzentrationsgradienten umgewandelt werden. Mittels Na⁺-abhängiger ATP-Synthese hat die Zelle so die Möglichkeit, zusätzlich ATP zu generieren (Hilpert und Dimroth, 1982; Dimroth, 1997). Dieser Mechanismus ist vor allem für *Veillonella parvula* und *Propionigenium modestum* bekannt, könnte aber auch in *Bacteroides* vorkommen (Reichardt *et al.*, 2014; Hilpert *et al.*, 1984). Neben Succinat und Propionat können die Zellen weitere organische Säuren bilden. Diese entstehen aus Pyruvat, welches über die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in Acetyl-CoA und dann Acetyl-Phosphat umgewandelt wird. Die energiereiche Phosphat-Verbindung ermöglicht die Bildung eines weiteren ATP-Moleküls über Substratkettenphosphorylierung. Gleichzeitig entsteht reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}), dessen Elektronen über den Rnf-Komplex auf NAD⁺ übertragen werden können (Zhang *et al.*, 2023). Alternativ könnte auch die sogenannte „kopfloze“ Variante der NADH-Dehydrogenase (Nuo bzw. NdhI) an der Reoxidation von Fd_{red} beteiligt sein. Diesem in *P. copri* gefundenem Enzym fehlen die Untereinheiten E-G und es wird spekuliert, ob es Fd_{red} anstelle von NADH als Elektronendonator nutzt (Franke und Deppenmeier, 2018). Im Gegensatz dazu ist auch die Bildung von Wasserstoff (H₂) eine unter den *Bacteroides* weit verbreitete Strategie, um Fd_{red} zu reoxidieren und Elektronen abzugeben (Welsh *et al.*, 2024). Hingegen kann die Bildung von Fd_{red} auch gänzlich umgangen werden, denn Acetyl-CoA kann ebenso aus der Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase entstehen (PFL), wobei Formiat freigesetzt wird. CO₂ und Fd_{red} entstehen dabei jedoch nicht (Knappe und Sawers, 1990). Eine dritte Möglichkeit ist die Produktion von Lactat aus Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase, wobei NADH oxidiert wird, sodass die Redoxbilanz von Glucose zu 2 Lactat ausgeglichen ist.





Da die Reaktionsgleichungen je nach Stoffwechselprodukt unterschiedlich ausfallen, müssen sich auch die Produktverhältnisse verändern, damit die Elektronenbilanz geschlossen ist. Wenn Glucose vollständig zu Propionat und Acetat umgewandelt wird, ergibt sich daher ein mögliches Produktverhältnis von Propionat zu Acetat von 2:1. Wenn Acetyl-CoA jedoch vollständig über die Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase produziert wird, kann ein Verhältnis von 1:1:1 für alle der drei Produkte erwartet werden (Gleichungen 6 und 7) (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a).



Auch die Fermentationsprodukte Acetat und Propionat haben gesundheitsfördernde Wirkungen. Beispielsweise wirken sie antiinflammatorisch und haben antikanzerogene Wirkung an den Enterozyten (Blaak *et al.*, 2020). Auch spielen sie eine positive Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, indem sie den Blutdruck und das Arteriosklerose-Risiko senken (Xiong *et al.*, 2022). Speziell Propionat wird eine positive Rolle im Lipidstoffwechsels des Körpers zugeschrieben, denn es hemmt die Lipogenese und Cholesterogenese und verringert die Bildung von viszeralem Fett (Morrison und Preston, 2016). Außerdem kann es die Verweildauer der Nahrung im Magen verlängern und dadurch die Sättigung fördern, weswegen es bei Übergewicht hilfreich sein kann (Arora *et al.*, 2011).

2.4 Propionsäure in der Industrie

Die Produktion von organischen Säuren durch *Bacteroidia* ist nicht nur für die Gesundheit von Bedeutung. Propionsäure und deren Salze sind wichtige Inhaltsstoffe in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie und dienen als Plattformchemikalien für eine Reihe anderer Stoffe. Während Propionsäure einen stechenden Geruch hat, sind deren Salze farb- und geruchslos (Samel *et al.*, 2018). Sie haben bakterizide (Antone *et al.*, 2023) und fungizide (Razavi-Rohani und Griffiths, 1999) Eigenschaften, weswegen ihre Hauptfunktion in der Tierfutterindustrie liegt, beispielsweise als Konservierungsmittel für Getreide (Rutenberg *et al.*, 2018). Als Silage-Zusatz wiederum verringert Kalzium-Propionat das Wachstum von Schimmel und kann dadurch die Gesundheit von Kühen verbessern und deren Milchproduktion steigern (Zhang *et al.*, 2020). Natürlicherweise ist von Proionibakterien produziertes Propionat Teil des charakteristischen Geschmacks von Emmentaler Käse (Fröhlich-Wyder und Bachmann, 2004). Darüber hinaus ist auch der Zusatz von Propionsäure und dessen Natrium- Kalzium- oder Kaliumsalzen von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit zugelassen (EFSA ANS Panel, 2014), beispielsweise als Konservierungsmittel für Backwaren (Debonne *et al.*, 2023). Verschiedene Propionat-Ester werden häufig auch als Aromen eingesetzt (Samel *et al.*, 2018). Unabhängig von dessen Nutzen in der Nahrungsmittelindustrie fungiert Propionat auch als Plattformchemikalie (Abbildung 2.4). Zusammen mit pflanzlichen Abfallprodukten wie Stroh oder Zuckerrohrbargasse können die Zelluloseester Zellulose-Propionat und Zellulose-Acetat-Propionat hergestellt werden (El Nemr *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2011), Diese können wiederum in einer Vielzahl von Produkten eingesetzt werden, beispielsweise Zahnbürsten- und Werkzeuggriffe, Farben, Lacke,

spezielle Beschichtungen und auch Membranen zur Wasserfiltration (Li *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2011). Wegen seiner vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten wird daher vorausgesagt, dass der Marktanteil von Propionat bis 2030 von 463.000 t auf rund 600.000 t steigen wird (AgileIntel Research (ChemIntel360), 2022). Die reine Propionsäure hat dabei einen relativ geringen Marktwert von ca. 1-2 € pro Kg, wohingegen seine Derivate deutlich höhere Preise von bis zu 600 € pro Kg erzielen (Ranaei *et al.*, 2020).

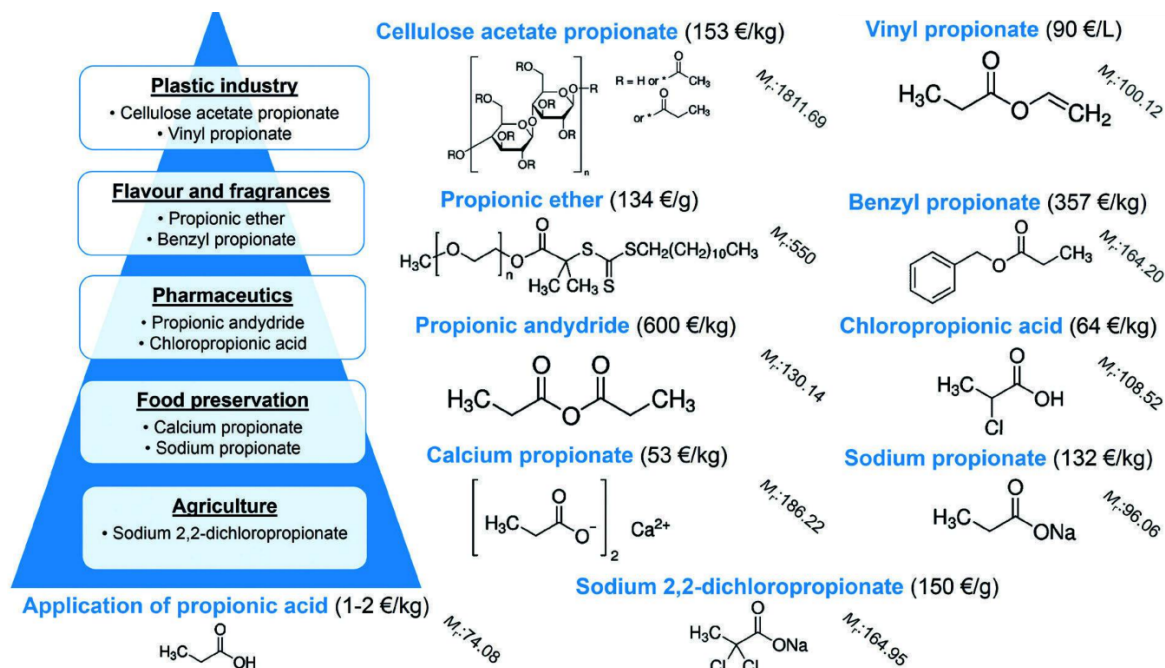


Abbildung 2.4: Propionat-Derivate und deren Nutzen in der Industrie (Ranaei *et al.*, 2020).

Die industrielle Produktion von Propionat erfolgt hauptsächlich auf 2 Wegen, die beide auf fossilen Rohstoffen basieren. Im Reppe oder BASF-Prozess wird Ethylen zusammen mit Kohlenmonoxid und H_2O bei hohem Druck carbonyliert. Der zweite Prozess besteht aus der Produktion von Propanal aus Ethylen, welches dann zu Propionsäure oxidiert wird. Beide Prozesse sind charakterisiert durch ihre geringen Rohstoff-Kosten, eine hohe Ausbeute und implementierte industrielle Maßstäbe (Samel *et al.*, 2018), jedoch benötigen sie hohe Temperaturen und Druck oder teure und giftige Metallkatalysatoren. Dementsprechend werden die steigenden Preise für Energie und fossile Rohstoffe auch die Produktionspreise von Propionsäure beeinflussen (Cherubini *et al.*, 2009). Auch steigt die Nachfrage nach nachhaltig produzierten Rohstoffen (Baumann und Westermann, 2016). Aus diesem Grund wird schon lange nach alternativen Produktionstechniken mittels mikrobieller Fermentation gesucht. Um mit derzeitigen petrochemischen Produktionsmethoden mithalten zu können, muss eine biotechnologische Propionatproduktion bestimmte Richtwerte erreichen. Dazu gehört eine Ausbeute von 0,55 g Propionat pro g Glucose (gP/gG) und eine Produktivität von 1 g/l*h (Rodriguez *et al.*, 2014). Eine andere Publikation setzt die Grenze bei 0,6 gP/gG und einer Konzentration (Titer) von annähernd 100 g/l (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a).

2.5 Mikrobielle Propionatproduktion

Mikrobielle Propionatproduktion findet auf den unterschiedlichsten Wegen in einer Vielzahl von Bakterienspezies statt, beispielsweise aus Aminosäuren, biosynthetisch oder fermentativ (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Fermentationsprozesse haben jedoch das größte Potential zur biotechnologischen Nutzung, da sie für den Organismus Energie generieren und die Regeneration von Elektronenüberträgern ermöglichen (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Neben dem Succinat-Weg gibt weitere Fermentationsmechanismen (Abbildung 2.5): Den Acrylat-Weg, bei dem Propionat aus Lactat über Acryloyl-CoA produziert wird, und den Propandiol-Weg ausgehend von 1,2-Propandiol (Reichardt *et al.*, 2014). Propionibakterien nutzen eine Sonderform des Succinat-Wegs, den Wood-Werkman Zyklus (Thierry *et al.*, 2011). Auch der Succinat-Weg kommt nicht nur in Propionat-produzierenden *Bacteroidia* vor, sondern auch in anderen Spezies wie *Veillonella parvula* und *Propionigenium modestum* (Hilpert und Dimroth, 1991).

Über den Acrylat-Weg, der in *Clostridium propionicum* entdeckt wurde, werden Alanin, Serin und Lactat fermentiert (Cardon und Barker, 1946). Sie werden zu Pyruvat umgewandelt, aus dem energiebringenden Acetat entsteht. Die Bildung von Propionat dient der Regeneration der Elektronenüberträger. Dafür wird Pyruvat zu D-Lactat reduziert, aus dem dann über Lactoyl-CoA, Acryloyl-CoA gebildet wird. Als nächstes folgt eine weitere Reduktion zu Propionyl-CoA und schließlich die Umwandlung zu Propionat (Hetzl *et al.*, 2003). Neben *C. propionicum* wurde dieser Weg auch bei anderen Bakterien des Phylums *Bacillota* entdeckt beispielsweise bei der Lactatfermentation von *Megasphaera elsdenii* (Hino und Kuroda, 1993). In *Coprococcus catus* wurde das Gen für das Schlüsselenzym, die Lactoyl-CoA-Dehydratase, nachgewiesen (Reichardt *et al.*, 2014). Hinweise auf diesen Weg wurden aber auch in dem *Bacteroidia*-Bakterium *Prevotella ruminicola* Stamm 23 nachgewiesen, welches Propionat aus Acrylat bilden kann (Strobel, 1992). Beim Wachstum auf Glucose wird jedoch der Succinat-Weg genutzt.

1,2-Propandiol wird von vielen Bakterien auf unterschiedliche Weise gebildet. Ausgehend von desoxy-Zuckern wie Rhamnose und Fucose wurde die Bildung in *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella enterica* beschrieben (Turner und Roberton, 1979; Boronat und Aguilar, 1981; Badía *et al.*, 1985). Auch in den *Bacteroidia*-Bakterien *Prevotella ruminicola* und *Phocaeicola vulgatus* wurde die Bildung von Propandiol beim Wachstum auf Rhamnose gezeigt (Turner und Roberton, 1979; Clausen *et al.*, 2024). Andere Arten wie *Clostridium sphenoides* oder *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* produzierten 1,2-Propandiol auch aus Glucose und weiteren Zuckern (Tran-Din und Gottschalk, 1985; Cameron und Cooney, 1986). Verschiedene *Lactobacilli* nutzen hingegen Lactat als Substrat (Saxena *et al.*, 2010). In Co-Kultur kann sogar Propionat entstehen, da *L. diolivorans* das durch *L. buchneri* produzierte Propandiol zur Produktion von Propanol und Propionat verwendet (Zhang *et al.*, 2010). *Salmonella enterica* produziert Propionat hingegen selbstständig, denn das aus Rhamnose gebildete Propandiol wird über die Intermediate Propionaldehyd und Propionyl-CoA weiterverarbeitet. (Reichardt *et al.*, 2014). Auch das Bakterium *Roseburia inulinivorans* produziert Propionat beim Wachstum mit Rhamnose auf diesem Wege (Scott *et al.*, 2006). Bakterien der Genera *Propionibacterium* und *Acidipropionibacterium* (Propionibakterien) nutzen den Wood-Werkman-Zyklus. Dieser Stoffwechselweg ähnelt mit seinen Intermediaten denen des Succinat-Weges. Glucose wird dabei

zunächst in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt. Dieses wird zu Oxalacetat carboxyliert, wobei die für die Propionibakterien charakteristische Methylmalonyl-CoA Transcarboxylase verwendet wird (Thierry *et al.*, 2011). Diese verknüpft die Carboxylierung von Pyruvat mit der Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA und erhöht so die energetische Ausbeute des Stoffwechselweges (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a).

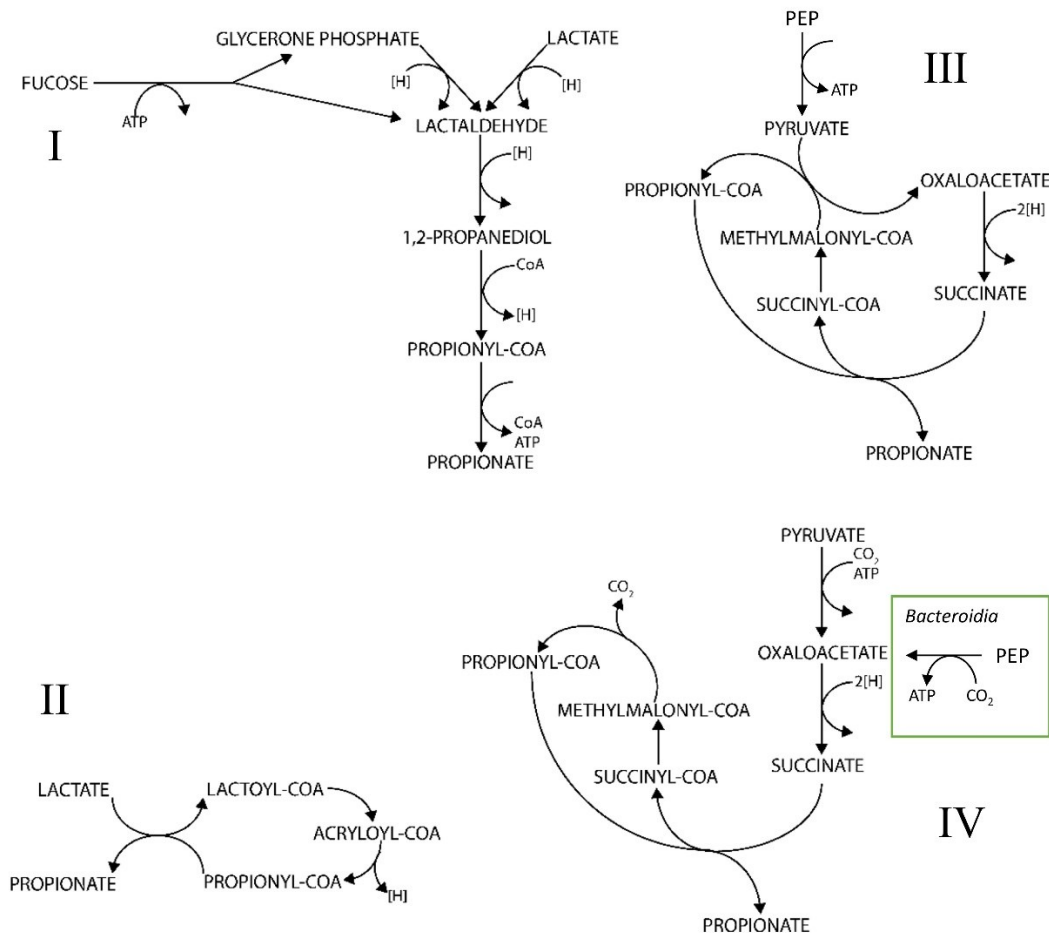


Abbildung 2.5: Fermentative Stoffwechselwege zur Bildung von Propionat. I, Propandiol-Weg; II, Acrylat-Weg; III, Wood-Werkman-Zyklus; IV, Succinat-Weg. PEP, Phosphoenolpyruvat. Modifiziert nach (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a).

2.6 Gegenwertiger Stand der biotechnologischen Propionatproduktion

Die mikrobielle Produktion von Propionat im industriellen Maßstab stellt eine große Herausforderung dar. Um die Redoxbilanz der Zelle auszugleichen und Energie zu generieren, werden Nebenprodukte wie Acetat produziert, die die Propionatausbeute verringern und im Aufreinigungsprozess zusätzliche Kosten verursachen (Rodriguez *et al.*, 2014). Auch die Produktion von Propionat selbst hat negative Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. So bewirken hohe Propionatkonzentrationen eine Hemmung des Wachstums und Zunahme von Nebenprodukten (Gu *et al.*, 1998; Blanc und Goma, 1987). Um eine industrielle Produktion zu ermöglichen, muss der Produktionsprozess daher optimiert werden. Das Forschungsinteresse in diesem Gebiet lag bisher deutlich bei den Propionibakterien, was sich an der

Studienlage bemerkbar macht. Zwei Reviews, die 2020 und 2021 publiziert wurden, listen jeweils 23 Beispiele für die Propionatproduktion mit verschiedenen Propionibakterien auf, jedoch nur vereinzelt Beispiele von anderen Spezies (Ranaei *et al.*, 2020; Ammar und Philippidis, 2021). Insbesondere das Bakterium *Acidipropionibacterium acidipropionici* wird als eines der vielversprechendsten Kandidaten zur mikrobiellen Propionatproduktion angesehen, denn es zeichnet sich durch hohe Propionat-Titer und eine große Säuretoleranz aus (Ammar und Philippidis, 2021). Der Organismus ist jedoch für gezielte genetische Modifikationen schwer zugänglich, weswegen randomisierte Mutation, beispielsweise durch *genome shuffling*, zur weiteren Verbesserung der Propionatproduktion genutzt wird (Guan *et al.*, 2012; Ammar und Philippidis, 2021). Ein ebenfalls vielfach untersuchter Produktionsstamm ist *P. freudenreichii*. Mittels gentechnischer Methoden wurden verschiedene Versuche zur Steigerung der Propionatproduktion über Modulation des Stoffwechsels unternommen (Ammar *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2015a). Darüber hinaus wurden auch andere Ansätze verfolgt. Glycerol ist ein günstiges Abfallprodukt in der Biodiesel Produktion und wird häufig als Substrat oder Co-Substrat bei der Fermentation mit Propionibakterien eingesetzt. Da es reduzierter ist als Glucose wird so die theoretische Propionatausbeute gesteigert (Zhang und Yang, 2009). Auch Prozessoptimierung spielt eine Rolle. Immobilisierte Zellen von *A. acidipropionici* zeigten eine gesteigerte Produktivität im Vergleich zu freien Zellen und die Nutzung von Fed-Batch Kultivierung steigerte die Propionatausbeute (Jiang *et al.*, 2015). Auch außerhalb von den Propionibakterien wurden Propionat-Produktionsprozesse untersucht. Gentechnisch veränderte *E. coli*-Stämme werden als mögliche Propionatproduzenten diskutiert, da sie geringe Anforderungen an ihr Kulturmedium haben und eine Vielzahl von gentechnischen Methoden existiert, um den Metabolismus gezielt zu manipulieren (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2020). Obwohl der Organismus kein natürlicher Propionatproduzent ist, konnte das native aber inaktive *sbm*-Operon exprimiert werden, was den Organismus zur Bildung dieser Säure über den Succinat-Weg befähigte (Li *et al.*, 2017). Es wurde jedoch angezweifelt, ob das Operon überhaupt funktionsfähig ist, da es keine Methylmalonyl-CoA Epimerase enthält. Anstelle von Propionat wurde eine andere Substanz gemessen, die zur gleichen Zeit eluierte und nur im Komplexmedium entstand (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017b). Durch Optimierung der metabolischen Ströme dieses Organismus und Kultivierung in pH-kontrollierter Fed-batch Kultur, konnten jedoch Propionat-Titer von 30,9 g/l erreicht werden (Miscevic *et al.*, 2020). Propionatproduktion durch heterologe Expression der Enzyme aus *A. acidipropionici* wurde ebenfalls getestet, erreichte aber geringere Titer (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2020). Auch das Bakterium *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, das die Fähigkeit zu Hydrolyse komplexer Substrate besitzt und bereits als Produktionsstamm für Butanol etabliert ist, wurde als Propionatproduzent untersucht. Über einen synthetischen Acrylat-Weg produzierte es etwa 3 mM Propionat (Baur *et al.*, 2022). Die Nutzung von verschiedenen mikrobiellen Konsortien zur Produktion von Propionat aus Nahrungsabfall wurde auch bereits getestet (Wu *et al.*, 2023). Durch die Komplexität der bakteriellen Zusammensetzung lassen sich diese Fermentationsprozesse jedoch schwer verstehen und gezielt verbessern.

2.7 Zielsetzung

Trotz der langjährigen Forschung zur mikrobiellen Propionatproduktion wurde noch kein Prozess entwickelt, bei dem alle Kriterien für eine konkurrenzfähige Fermentation erreicht werden, da ein hoher Titer meist mit einer geringen Produktivität einhergeht und umgekehrt (Ranaei *et al.*, 2020). Die

Zielwerte wurden jedoch mit Glucose als Substrat berechnet. Das Substrat stellt dabei einen der größten Kostenfaktoren dar, und ist entscheidend für die Rentabilität des Prozesses (Rodriguez *et al.*, 2014). Gleichzeitig entstehen weltweit bis zu 1,6 Milliarden Tonnen Nahrungsabfall, dessen Entsorgung Ressourcen verbraucht und zur Produktion von CO₂ beiträgt (Pour und Makkawi, 2021). Auch spielen Faktoren wie die lokale Verfügbarkeit eine Rolle, da lange Transportwege zusätzliche Kosten verursachen (Baumann und Westermann, 2016). Pflanzliche Abfälle fallen hingegen überall an. *Bacteroidia* können eine Vielzahl von Polysacchariden verwenden und daraus organische Säuren wie Propionat produzieren. Mit dieser Fähigkeit könnten sie Grundlage für die Propionatproduktion basierend auf pflanzlichen Polymeren aus Nahrungsabfällen und landwirtschaftlichen Nebenprodukten werden. Zwar gibt es bereits Untersuchungen zur Propionatproduktion von Propionibakterien auf vorbehandelten Substraten wie Maiskolbenmolasse oder hydrolysiertem Mehl (Liu *et al.*, 2012; Kagliwal *et al.*, 2013), die Nutzung von komplexen Substraten wie Xylan wurde für diese Gruppe aber noch nicht beschrieben und die Vorbehandlung der Substrate stellt wieder einen Kostenfaktor dar (Ammar und Philippidis, 2021). *B. xylanisolvens* kann Xylan hingegen direkt zur Propionatproduktion nutzen (Chassard *et al.*, 2008) und *B. luti* produzierte geringe Mengen Propionat aus Xylan und Zellulose (Hatamoto *et al.*, 2014). *Bacteroidia* haben noch weitere Vorteile gegenüber Propionibakterien. Durch ihren hohen GC-Gehalt, eine dicke Zellwand, effektive Restriktionssysteme und wenige verfügbare Vektoren gestaltet sich die genetische Modifikation der *Propionibacteria* als schwierig (Ranaei *et al.*, 2020). Für *Bacteroidia* wurden in den letzten Jahren jedoch zahlreiche genetische Methoden entwickelt darunter ein System zur markerlosen Deletion (Neff *et al.*, 2023) und ein CRISPR/Cas-System (Zheng *et al.*, 2022). So wurde die Succinatproduktion von *P. vulgatus* bereits mittels gentechnischer Methoden gesteigert (Gindt *et al.*, 2024). Trotz ihres großen Potentials wurden *Bacteroidia* bisher meist nur im Kontext der Darmgesundheit untersucht. Das tiefere Verständnis, welche Enzyme am Stoffwechselweg zur Bildung von Propionat beteiligt sind und welche Faktoren die Propionatproduktion beeinflussen, fehlt jedoch. Dazu kommt, dass diejenigen Organismen dieser Klasse, die in der Forschung am besten beschrieben sind, wie *B. thetaiotaomicron* und *B. fragilis* in Deutschland der Sicherheitskategorie 2 zugeordnet sind. Diese Arten eignen sich nur schlecht als Produktionsstämme von industriellen Prozessen, da bürokratische Hürden und strengere Sicherheitsanforderungen hinzukommen. Dies erschwert die Möglichkeit, einen im Labormaßstab etablierten Prozess auf industrielle Größe zu skalieren und sorgt für größere Investitionskosten. In den letzten Jahren wurden jedoch viele neue *Bacteroidia* entdeckt, die in die Sicherheitskategorie 1 fallen und für die eine Propionatproduktion festgestellt wurde (Nishiyama *et al.*, 2009; Ueki *et al.*, 2008; Ueki *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2007). Viele von ihnen sind jedoch noch wenig charakterisiert. Auch gibt es keine vergleichenden Daten zur Propionatproduktion dieser Stämme.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Propionatproduktion der *Bacteroidia* näher zu untersuchen. Zunächst wurden dazu diejenigen Spezies identifiziert, für die eine Propionatproduktion bereits beschrieben wurde. Dann sollte die Propionatproduktion der Spezies verglichen werden. Besonders gute Propionatproduzenten wurden näher untersucht, um die Mechanismen in *Bacteroidia* besser zu verstehen. Auch ein gentechnischer Ansatz wurde verfolgt, um zu überprüfen, ob gentechnische Methoden die Produktion gezielt verbessern können. Schließlich wurden neue Stämme aus Umweltproben isoliert, um zu sehen, ob so effektive Propionatproduzenten gewonnen werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen

3.1.1 Stammauswahl

Das Ziel der Arbeit war es, die Propionatbildung ausgewählter Organismen des Phylums *Bacteroidota* zu untersuchen. Diese Gruppe, zuvor bekannt als *Bacteroidetes* (Oren und Garrity, 2021), umfasst eine Vielzahl von Spezies, weswegen zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt wurde. Dazu wurde die Plattform „Pubmed“ verwendet (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Suche des Stichwortes „*Bacteroides*“ oder „*Bacteroidetes*“ in Kombination mit „*propionate*“ oder „*propionic acid*“, ergab 656 Einträge (Abruf am 10.03.2024). Zusätzlich wurden auch Querverweise der Publikationen („Zitiert durch“ und „Ähnliche Artikel“) durchsucht. Anhand der Titel und Zusammenfassungen konnten relevante Texte herausgesucht werden, wobei der Fokus auf Informationen zur Produktbildung einzelner *Bacteroidetes* gelegt wurde, beispielsweise in Erstbeschreibungen neuer Spezies. Extremophile Organismen wurden nicht berücksichtigt. Aus den Ergebnissen wurde eine Übersichtstabelle erstellt. Zehn dieser Stämme wurden anhand von verschiedenen Kriterien selektiert. Dazu zählten die Verfügbarkeit der Stämme über Stammsammlungen und Einstufung in die Sicherheitsstufe S1 anhand der technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (Technischer Arbeitsschutz - TRBA 466, 2015). Außerdem wurde nach biotechnologisch interessanten Eigenschaften ausgewählt, wie eine hohe Propionat-Produktion, besonders effektive Nutzung von Polymeren oder ein großes Substratspektrum.

3.1.2 Organismenliste

Die Beschaffung der in dieser Arbeit verwendeten Stämme erfolgte über die DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). Weiterhin wurden einige Stämme vom Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Arbeitsgruppe Uwe Deppenmeier, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Stämme, Vektoren und Oligonukleotide sind in Tabelle A1 - Tabelle A3 zusammengefasst.

3.2 Kulturmedien und Lösungen

3.2.1 Medium-Zusätze und Stammlösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Hersteller sind in der Tabelle A7 aufgeführt. Den Grundmedien wurden verschiedenste Zusätze aus Stammlösungen hinzugefügt (Tabelle 3.1). Soweit nicht anders angegeben wurden sie in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst. Autoklavierbare anoxische Lösungen wie die Glucose-Lösung und die L-Cystein-Lösung wurden in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt. Dann wurden sie unter Begasung (100 % N_2) luftdicht verschlossen. Anschließend wurden sie bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die hitzelabilen Vitamin- und Antibiotika-Stammlösungen wurden unter Zuhilfenahme von Einweg-Sterilfiltern (Porengröße 0,2 μm , Sarstedt) sterilisiert. Für anoxische Zusätze wurden dabei zunächst mit N_2 befüllte und autoklavierte Müller-Krempel-Flaschen bzw. Serumflaschen vorbereitet. Die Lösungen wurden dann mit sterilen Spritzen und Kanülen durch den Filter in die Flaschen gedrückt. Eine zweite Kanüle sorgte für den Druckausgleich.

Tabelle 3.1: Herstellung und Zugabemenge der Stammlösungen.

Stammlösung (Konzentration)	Zugabemenge bzw. Endkonzentration	Herstellung
Glucose (1,5 M)	10 ml/l (DMMG, PYG) 13 ml/l (PYHVG)	Anoxisch, autoklaviert
L-Cystein HCl x 1 H ₂ O (2 M)	1,4 ml/l (pH kontrollierte Fed Batch)	Anoxisch, autoklaviert
Hämin Lösung	2 ml/l (alle anoxischen Medien)	50 mg Hämin in 1 ml NaOH (1 M) <i>ad.</i> 100 ml H ₂ O _{dest.} , anoxisch, sterilfiltriert
Vitamin K ₁ -Lösung	0,2 ml/l (alle anoxischen Medien)	0,1 ml Vitamin K ₁ <i>ad.</i> 20 ml Ethanol (95 %, v/v), anoxisch, sterilfiltriert
10 x Wolin Lösung	1 ml/l (DMMG)	Anoxisch, sterilfiltriert
5 x Wolin-Lösung mit B ₁₂	2 ml/l (DMMG, PYG)	Anoxisch, sterilfiltriert
10 x B-Vitamin-Lösung	1 ml/l (PYHVG)	Anoxisch, sterilfiltriert
Erythromycin (50 mg/ml)	300 mg/l in Festmedien 100 mg/l in Flüssigmedien und Konjugationsplatten	in Ethanol (95 %, v/v)
Gentamycin (50 mg/ml)	100 mg/l in Konjugationsplatten	Sterilfiltriert
Vancomycin (0,75 mg/ml); Kanamycin (10 mg/ml)	7,5 mg/l; 100 mg/l	Sterilfiltriert

10 x Wolin-Lösung

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der 10 x Wolin-Lösung

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Thiamin x HCl	50 mg
Na-Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B ₁₂	1 mg
<i>p</i> -Aminobenzoat	50 mg
α -Liponsäure	50 mg

5 x Wolin-Lösung mit B₁₂

Die 5 x Wolin-Lösung mit B₁₂ enthielt die gleichen Komponenten, der 10 x Wolin-Lösung, jedoch in halber Konzentration. Zusätzlich beinhaltete sie 10 mg/l Cyanocobalamin (B₁₂), wodurch im Medium eine B₁₂ Konzentration von 21 ng/ml erreicht wurde.

10 x B-Vitamin-Lösung (Ueki *et al.*, 2006a)

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der 10 x B-Vitamin-Lösung

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Biotin	10 mg
Vitamin B ₁₂	10 mg
p-Aminobenzoe Säure	30 mg
Folsäure	50 mg
Thiamin Hydrochlorid	50 mg
Pyridoxine Hydrochlorid	150 mg

3.2.2 Herstellung der Kulturmedien

Es wurden Medien für aerobe und anaerobe Organismen verwendet. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle A7 aufgeführt. Die Medien wurden durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C (DX-65, Systec, Linden, Deutschland) sterilisiert. Die anoxischen Flüssigmedien Pepton-Hefe-Glucose-Medium (*peptone-yeast-glucose*, PYG), definiertes Minimalmedium mit Glucose (DMMG), Pepton-Hefe-Hämin-Vitamin-Glucose-Medium (*peptone-yeast-hemin-vitamin-glucose*, PYHVG) sowie davon abgeleitete Medien wurden i.d.R. mit L-Cystein-HCl und dem Sauerstoffindikator Resazurin hergestellt. Dazu wurden zunächst alle angegebenen Komponenten in H₂O_{dest.} gelöst und der pH eingestellt (SevenEasy, Mettler Toledo, Columbus, USA). Dann wurden die Medien mit einem Gasgemisch (80 % N₂/20 % CO₂) durchströmt. L-Cystein-HCl x 1 H₂O sorgte für eine Reduzierung des vorhandenen Sauerstoffs, wodurch ein Farbumschlag des Resazurin von Blau zu Pink und schließlich farblos beobachtet wurde. Sobald das Medium deutlich rosa gefärbt war, wurde das Medium auf ebenfalls begaste Kulturgefäße verteilt, die direkt im Anschluss mit Gummistopfen luftdicht verschlossen und autoklaviert wurden. Die Zugabe von Glucose und weiteren Zusätzen sowie Inokulation erfolgte im Anschluss mit sterilen Spritzen und Kanülen, wobei die Stopfen vorher mit 96 % vergälltem Ethanol abgeflammt wurden. Festmedien für Agar-Platten wurden zusätzlich 15 g/l Agar hinzugefügt (Agar Kobe I, AppliChem GmbH, Darmstadt). Sie wurden nicht begast und enthielten kein L-Cystein. Die Zusätze wurden hinzugegeben, sobald das Medium auf ca. 60 °C abgekühlt war. Zur Anaerobisierung wurden sie 1-2 Tage vor Nutzung in das anoxische Zelt gestellt (3.3.1). Für die Vereinzelung von Anreicherungskulturen wurden Gussplatten verwendet. Sie enthielten L-Cystein in gleicher Konzentration wie die Flüssigmedien und pro l Medium 6,6 g Agar. Sie wurden am Tag ihrer Verwendung frisch hergestellt und nach dem Autoklavieren bei 55 °C flüssig gehalten. Kurz vor Inokulation wurden die Mediumzusätze hinzugegeben. Die Kulturen wurden in Phosphat gepufferter Saline (PBS) verdünnt. Davon wurden je 100 µl unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegeben und

sofort leicht geschwenkt. Nachdem der Agar ausgehärtet war, wurden die Platten in das Anaerobenzelt eingeschleust.

3.2.3 Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des LB-Mediums

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g

3.2.4 10 x Phosphat-gepufferte-Saline (PBS)

Tabelle 3.5: Zusammensetzung 10 x PBS

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
NaCl	80 g
KCL	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,8 g
NaH ₂ PO ₄	2,4 g

Der pH der Lösung wurde mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt. Die einfach konzentrierte Arbeitslösung wurde durch 10-fache Verdünnung mit H₂O_{dest.} hergestellt.

3.2.5 Pepton-Hefe-Glucose-Medium (PYG)

Das Komplexmedium PYG wurde zur Stammhaltung und Reaktivierung aus Kryokulturen sowie für Vorkulturen verwendet. Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren 1,5 M Glucose, 2 ml/l Hämin, 0,2 ml/l Vitamin K₁ und 2 ml/l 5 x Wolin-Lösung hinzugefügt. Der pH wurde vor der Begasung mit KOH auf 8 eingestellt.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des PYG-Mediums

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Trypton	5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
NaHCO ₃	0,4 g
L-Cystein HCl x 1 H ₂ O	0,5 g
Resazurin 0,1 %	1 ml
PYG-Salzlösung I	40 ml
PYG-Salzlösung II	40 ml

Tabelle 3.7: Zusammensetzung PYG-Salzlösung I

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
K ₂ HPO ₄	51 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaCl	2 g

Tabelle 3.8: Zusammensetzung PYG-Salzlösung II

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g

3.2.6 Definiertes Mineralmedium mit Glucose (DMMG)

Im definierten Minimalmedium (DMMG) wurden Versuche zur Medienzusammensetzung, zur CO₂-Konzentration und zur Stoffwechselbilanz durchgeführt. Außerdem bildete es die Grundlage für das Anreicherungsmedium (AM, 3.9.1) und das Medium für die pH-kontrollierte Kultivierung (3.5.3). Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren 1,5 M Glucose, 2 ml/l Hämin, 0,2 ml/l Vitamin K₁ und 2 ml/l 5 x Wolin-Lösung hinzugefügt. Der pH wurde vor der Begasung mit KOH auf 8 eingestellt. Darüber hinaus wurde das Medium für verschiedenste Versuche abgewandelt. Zur Untersuchung der Medienzusammensetzung wurde zunächst DMMG mit 10 x Wolin-Lösung verwendet, sodass eine B₁₂-Konzentration von 1 ng/ml erreicht wurde. Durch Zugabe einer 4 µg/ml B₁₂ Stammlösung in H₂O_{dest.}, die wie in Abschnitt 3.2.1 hergestellt wurde, wurde die B₁₂-Konzentration auf 21 ng/ml erhöht. Bei der Untersuchung des Wachstums und der Produktbildung aller Stämme und allen nachfolgenden Kultivierungen wurde DMMG mit 5 x Wolin-Lösung verwendet, welches bereits die angepasste B₁₂-Menge enthielt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung DMMG

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
NaHCO ₃	4 g
L-Cystein HCl x 1 H ₂ O	0,5 g
DMM-Salzlösung I	100 ml
DMM-Salzlösung II	100 ml
FeSO ₄ -Lsg.	1 ml
SL-6	2 ml
Resazurin 0,1 %	1 ml

Tabelle 3.10: Zusammensetzung DMMG-Salzlösung I

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
KH ₂ PO ₄	17 g
K ₂ HPO ₄	22 g
NaCl	9 g
NH ₄ Cl	7,5 g

Tabelle 3.11: Zusammensetzung DMMG-Salzlösung II

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	260 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 g

FeSO₄-Lösung

Für die Eisenlösung wurden zunächst 0,278 g FeSO₄ x 7 H₂O_{dest.} in zwei Tropfen konzentrierter Salzsäure gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 ml H₂O_{dest.}

SL-6-Spurenelementelösung

Tabelle 3.12: Zusammensetzung SL-6-Spurenelementelösung

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg

3.2.7 DMMG mit Hefeextrakt (DMMG-H)

Nach ersten Versuchen fiel auf, dass einige Stämme, wie beispielsweise *B. propionificiens* deutlich besser wachsen, wenn geringe Mengen komplexer Bestandteile im Medium vorhanden sind. *B. propionificiens* wurde daher regelmäßig im DMMG-H kultiviert, welches aus DMMG mit 0,5 g/l Hefeextrakt bestand. Hefeextrakt wurde dabei entweder vor dem Autoklavieren eingewogen und zum Nährmedium hinzugegeben, oder anschließend aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 g/l hinzugefügt.

3.2.8 Pepton-Hefe-Hämin-Vitamin-Glucose-Medium (PYHVG) (Ueki *et al.*, 2008)

PYHVG wurde mit 1 ml/l 10 x B-Vitamin Lösung hergestellt und enthielt insgesamt 19,5 mM Glucose. Weiterhin wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 2 ml/l Hämin und 0,2 ml/l Vitamin K₁ hinzugefügt. Das Medium diente der initialen Messung der Produktbildung der Isolate und Typstämme.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung PYHVG-Medium

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Trypticase Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Na ₂ CO ₃	0,2 g
L-Cystein-HCl x H ₂ O	0,3 g
Salzlösung I (6 g/l K ₂ HPO ₄)	75 ml
Salzlösung II	75 ml
Resazurin 0,1 %	1 ml

Tabelle 3.14: Zusammensetzung PYHVG-Salzlösung II

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
KH ₂ PO ₄	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12 g
NaCl	12 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 g
CaCl ₂	1,2 g

3.3 Kultivierungsbedingungen

3.3.1 Anoxische Arbeiten

Flüssigkulturen wurden in gasdicht verschlossenen Hungate-Röhrchen oder Serumflaschen im Wasserbad wachsen gelassen. Die Inkubation von Festkulturen und Wachstumsversuche im Plattenleser wurden in einem Vinyl-Anaeroben-Zelt durchgeführt. Das Zelt und die darin verwendeten Geräte stammten von der Firma Coy Laboratory Products Inc. (Grass Lake, USA). Es wurde mit einem Gasmischung aus 80 % N₂ und 20 % CO₂ betrieben. Zusätzlich wurde manuell H₂ bis zu einer Konzentration von 4 % zugesetzt. Mittels zweier Palladiumkatalysatoren wurde so der Restsauerstoff eliminiert. Ein Gas-Messgerät (Anaerobic Monitor CAM-12) diente der Kontrolle des Sauerstoff- und H₂-Gehalts und die Luftfeuchtigkeit wurde mit Hilfe von Silica-Granulat verringert. Im Anaeroben-Zelt befand sich ein Inkubator (Modell 2000 für Vinyl-Kammern) zur Kultivierung auf Festmedien sowie ein Plattenlesegerät (Epoch™ 2 Mikroplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) für Wachstumsversuche.

3.3.1 Gefrierkonservierung

Zur Konservierung der *Bacteroidota*-Stämme wurde eine anaerobe PYG-Glycerin-Mischung aus je 2,5 ml PYG und Glycerin (99,5 %) hergestellt, die dann mit 5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur vermischt wurde. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C. Zusätzlich wurden Kulturen konserviert, die Ausgangspunkt für die Inokulation der Vorkulturen für die Experimente waren. Diese Arbeitskonserven wurden aus derselben Kultur wie die Stammkonserve hergestellt und bestanden aus jeweils 250 µl Glycerin-PYG-Mischung und 250 µl Kultur. Sie wurden aerob in Schraubdeckelröhrchen pipettiert und sofort eingefroren. Die Reaktivierung der Arbeitskonserven erfolgte, indem 250 µl in 5 ml PYG-

Medium überführt wurden. L-Cystein in den Medien sorgte dabei für eine schnelle Reduktion des eingebrachten Sauerstoffs. Nachdem Wachstum erkennbar war, wurden die Kulturen erneut in PYG überführt. Diese Kulturen konnten dann für mindestens 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden und dienten der Inokulation von Vorkulturen. Zur Konservierung der *E. coli* Stämme wurde LB-Medium anstelle von PYG-Medium verwendet.

3.3.2 Kultivierungsbedingungen für *Bacteroidia*

Bacteroidia-Stämme wurden in Volumina von 5 – 500 ml kultiviert und, sofern nicht anders angegeben, mit je 1 % des Kulturvolumens aus Vorkulturen inokuliert. In der Regel erhielten die Vorkulturen dasselbe Medium und Substrat, wie die Kulturen mit denen die Experimente durchgeführt wurden. Die Inkubation von *B. propionificiens* und *P. paurosaccharolyticus* erfolgte jeweils bei 30 °C, die aller anderen Stämme bei 37 °C im Wasserbad (WTB, Memmert, Schwabach, Deutschland). Für die Kultivierung auf Minimalmedium wurde zunächst in DMMG mit 1 m/l der 10 x Wolin-Lösung verwendet. Dieses Medium minderte jedoch das Wachstum einiger Stämme, weswegen Versuche zur Optimierung des Mineralmediums durchgeführt wurden. Aufgrund der dabei erhaltenen Ergebnisse enthielt das Medium in den nachfolgenden Versuchen die 5 x Wolin-Lösung mit gesteigerter B₁₂-Konzentration. Diese wurde ebenfalls im PYG-Medium eingesetzt.

3.3.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

Das bei gentechnischen Arbeiten eingesetzte Bakterium *E. coli* wurde in LB-Medium aerob bei 37 °C in einem Inkubator (Innova 4239, New Brunswick, Kanada) kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 150 rpm geschüttelt.

3.4 Analysemethoden

3.4.1 Bestimmung des bakteriellen Wachstums

Die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) diene als Maß für die Bakterienbiomasse einer Kultur. Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert des gleichen Mediums in einem Spektrophotometer. Gemessen wurde entweder direkt in Hungate-Röhrchen (OD600 DiluPhotometer, Implen, München) oder in Plastikkuvetten mit der Schichtdicke 1 cm (Biowave II, WPA, Cambridge, UK). Letzterem ging eine Verdünnung der Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,3 voraus.

3.4.2 Bestimmung des pH

1,5 ml Kultur wurden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (6000 x g, 4 °C, 20 min). Dann wurde der pH des Überstandes mit einem Messgerät (SevenEasy, Mettler Toledo, Columbus, USA) ermittelt. Es wurde darauf geachtet, dass sich ein konstanter Wert eingestellt hatte, bevor der Wert aufgeschrieben wurde.

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in Zellkulturen wurde regelmäßig mit einer Biuret-Reaktion bestimmt (Schmidt *et al.*, 1963). Als Ausgangsmaterial dienten Zellpellets von 0,5 – 2 ml Kultur, die bei 6000 x g,

4 °C und 20 Minuten sedimentiert worden waren (5427 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Zellmasse wurden 1 ml H₂O_{dest.} sowie 125 µl einer 4 M NaOH Lösung hinzugefügt. Danach folgte die Lyse bei 99 °C für 10 Minuten. Die Proben wurden auf Eis gekühlt, bevor jeweils 400 µl Biuret-Lösung hinzugegeben wurden. Nachdem die Proben 30 Minuten lang bei 37 °C inkubierten und nochmals für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert worden waren, wurde die Absorption des Überstands bei 546 nm gegen H₂O_{dest.} gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit 1 mg/l BSA in H₂O_{dest.} hergestellt, Als Blindwert diente 1 ml H₂O_{dest.} Zu den Ansätzen wurden direkt 125 µl NaOH hinzugegeben. Sie wurden dann auf die gleiche Weise bearbeitet, wie die Proben.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung der Biuret-Lösung

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Kaliumnatriumtartrat	16,92 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,5 g
Kaliumiodid	6,24 g
NaOH	10 g

Bei der Herstellung wurde darauf geachtet, dass die Substanzen einzeln gelöst und in oben angegebener Reihenfolge miteinander vermischt wurden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.4.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) wurde in dieser Arbeit regelmäßig zur Bestimmung der Produkt- und Glucosekonzentration von Flüssigkeiten eingesetzt. Für die HPLC-Proben wurden ca. 400 µl Kultur, bei 6000 x g (4 °C, 20 min) sedimentiert. Zu je 250 µl Überstand wurden 10 µl 50%iger Schwefelsäure (v/v) gegeben. Die Mischung wurde dann erneut bei 4 °C und 13.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das zur Analyse verwendete Shimadzu HPLC-System (Kyoto, Japan) bestand aus einem automatischen Probennehmer (SIL-20AC), einem Pumpensystem (LC-20AD) und einem Ofen (CTO-20AC). Die Signalerfassung erfolgte mit Hilfe eines UV-Vis-Detektors, der Licht mit 210 nm Wellenlänge emittierte und eines Brechungsindexdetektors (*refractive index detector*, RID). Pro Messung wurden 10 µl Probe mit 5 mM Schwefelsäure für 30 Minuten bei 30 °C und einem Volumenstrom von 6 ml/min über eine organic-acid-resin-Säule eluiert (300 x 8 mm, Chromatografie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland). Zur Konzentrationsberechnung wurden i. d. R. die Messwerte des RID-Detektors verwendet. Die Daten des UV-Vis-Detektors wurden genutzt, wenn die Konzentration unter dem Detektionslimit im RID lagen. 100 bis 0,5 mM Standardlösungen dienten der Quantifizierung der Substanzen. Die Auswertung der Läufe und Berechnung der Konzentrationen erfolgten mit dem Firmenprogramm LabSolutionsTM.

3.4.5 Gaschromatografie (GC)

Die Gaschromatografie wurde ebenfalls zur Analyse gelöster Substanzen (Acetat, Succinat, Propionat) im Kulturüberstand genutzt, denn die Methode wies ein niedriges Detektionslimit für Acetat auf. Die Acetatkonzentration wurde daher in der Bilanzberechnung aus den GC-Daten ermittelt. Weiterhin wurde die Zusammensetzung der Gasphase in den Kulturgefäßen analysiert. Für beide Analysemethoden wurde ein 8860 GC-System (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Das Analysematerial für die Säuren-Bestimmung bestand aus 950 µl zellfreiem Kulturüberstand, welcher wie in Punkt 3.4.4 durch

Zentrifugation gewonnen wurde. Anschließend wurde dem Überstand 50 µl 2 M Phosphorsäure hinzugefügt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (13.000 x g, 4 °C, 5 min) und der Überstand vermessen. Es wurde die HayeSep P 60/80 UM Säule (6 ft. 1/8 2 mm, Agilent) verwendet. Jede Messung lief 30 Minuten mit N₂ als Trägergas bei einem Fluss von 300 ml/min. Die Temperatur der Säule wurde während der Messung von 120 °C auf 250 °C erhöht. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), der bei 250 °C betrieben wurde. Zur Bestimmung der Wasserstoffproduktion wurden Kulturen von *B. cellulosilyticus*, *P. copri*, *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* in 20 ml DMMG mit entweder 15 oder 30 mM Glucose bis zur stationären Phase kultiviert. Mit einer gasdichten Spritze wurden dann jeweils 1 ml Gas aus den Flaschen entnommen und direkt in den Injektionspart des GC eingespritzt. Die Trennung erfolgte mit der Säule carboBOND (50 m x 530 µm x 5 µm, Agilent, Santa Clara, USA) und N₂ als Trägergas bei einer Flussrate von 5 ml/min und 50 °C. Über einen Wärmeleitfähigkeitssensor (TCD), der bei 180 °C betrieben wurde, wurden die Gasbestandteile detektiert. Als Referenzgase dienten reiner Stickstoff (100 % N₂), Protadur (80 % N₂/20 % CO₂), Formiergas (95 % N₂/5 % H₂) und Gas aus einer Flasche mit DMMG.

3.4.1 Optisch-Enzymatische Glucosebestimmung

Zusätzlich zur HPLC-Methode wurde die Glucosekonzentration in einzelnen Fällen auch über eine enzymatische Reaktion bestimmt. So konnte während der Fed-Batch-Versuche (3.5.3) entschieden werden, ob eine Glucosegabe notwendig war. Dabei wurde ein Reaktionsansatz aus Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Version 05, Roche, Freiburg, Deutschland) verwendet. Das erste Enzym phosphoryliert dabei ATP abhängig Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G6P), welches durch die Aktivität der G6P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolakton umgewandelt wird. Beim zweiten Schritt wird NADP⁺ zu NADPH + H⁺ reduziert. Letzteres weist ein typisches Absorptionsspektrum mit einem Peak bei 340 nm auf. Die Zunahme der Absorption bei dieser Wellenlänge kann nach dem Labert-Beer'schen Gesetz in die NADPH Konzentration umgerechnet werden, die der Glucosekonzentration entspricht. Als Analysematerial diente zellfreier Kulturüberstand (Zentrifugation 13.000 x g, 4 °C, 5 Min), der entweder unverdünnt eingesetzt oder bis zu 1:10-fach mit H₂O_{dest.} verdünnt wurde. Der Reaktionsansatz wurde in einer Plastik Halbmikroliter Küvette der Schichtdicke 1 cm nach Angaben des Herstellers hergestellt.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Optisch-Enzymatischen Glucosebestimmung

Komponente (Konzentration)	Menge pro Küvette
Tris (0,2 M) mit MgSO ₄ x 7 H ₂ O _{dest.} (2 mM), pH 7,6	900 µl
Na-NADP ⁺ (44 mg/ml)	10 µl
Na ₂ -ATP (96 mg/ml)	10 µl
Proben Überstand	10 µl

Nachdem der Ansatz sorgfältig durchmischt worden war, wurde die Extinktion E₁ bei 340 nm gemessen. Im Anschluss folgte die Zugabe von jeweils 10 µl des Enzymgemischs aus Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut die Extinktion E₂ gemessen. Die Berechnung der Glucosekonzentration in g/l erfolgte nach der folgenden Formel 1.

$$c_{glucose} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{(E2 - E1) * V_{ges} * MW_{glucose}}{\epsilon * d * V_{Probe}} * VF$$

Formel 1: Berechnung der Glucosekonzentration mittels optisch enzymatischer Bestimmung. c, Konzentration; E1/E2; Extinktion bei 340 nm vor und nach Zugabe der Enzymmischung; V_{ges} , Gesamtvolumen; MW; Molekulargewicht von Glucose (180 g/l); ϵ , Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm ($6.300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); d, Küvettendicke (1 cm); V_{Probe} , Probenvolumen; VF, Verdünnungsfaktor)

3.4.2 Bestimmung intrazellulärer Polysaccharide (IPS)

Glykogen ist ein intrazellulärer Speicherstoff aus α -D-Glucose-Einheiten, die über α -(1→4) und α -(1→6) Bindungen verknüpft sind (Cifuentes *et al.*, 2019). Die Bestimmung erfolgt über eine kolorimetrische Methode mit Anthron (Del Don *et al.*, 1994). Dafür wurden jeweils 2,5 - 5 ml Zellkultur sedimentiert ($13.000 \times g$, 4 °C, 20 min) und anschließend in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$ gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 300 μl $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$ resuspendiert und mit 200 μl Na_2SO_4 (2 % w/v) vermischt. Es folgte die Inkubation für 10 Minuten bei 70 °C, mit anschließender Kühlung auf Eis. Nachdem 1 ml Methanol (MeOH) hinzugegeben wurde, wurden die Zellen wiederum zentrifugiert ($12.000 \times g$, 4 °C, 3 min). Das so entstandene Pellet wurde noch einmal mit 1 ml MeOH gewaschen und der Überstand verworfen, bevor 5 ml des Anthron-Reagenzes zum Ansatz gegeben wurden. Nach 15 Minuten Inkubation bei 90 °C folgte eine weitere Kühlung auf Eis. Schließlich wurde die Extinktion der Probe bei 620 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die aus je 300 μl Glykogen-Lösung bestand und zwischen 0 und 800 mg/l Glykogen aus Rinderleber enthielt. Das Anthron-Reagenz wurde vor jeder Bestimmung neu hergestellt. In späteren Versuchen wurde, um den Probendurchsatz zu erhöhen, jeweils nur ein Fünftel der Komponenten eingesetzt.

Tabelle 3.17: Zusammensetzung des Anthron-Reagenzes

Substanz	Menge pro 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$
H_2SO_4 konz.	75 ml
Ethanol, 96 % (v/v)	5 ml
Anthron	0,2 g

Eine weitere Methode der Glykogenbestimmung wurde angewandt, um den Glykogengehalt der Standardsubstanz zu ermitteln (Lanham *et al.*, 2012). Dazu wurden zwischen 0 und 2 mg Glykogen aus Rinderleber in 2-ml-Reaktionsgefäße abgewogen und in 2 ml 0,9 M HCl gelöst. 500 μl dieser Lösung wurden direkt über die HPLC vermessen. Mithilfe einer Glucose-Eichreihe wurde die Menge an Glucose ermittelt, die in dem Glykogen enthalten waren. Dieser zusätzliche Schritt ermöglichte die Umrechnung der Glykogenkonzentration der Anthronbestimmung [g/l] in einen Glucoseäquivalenzwert [mol/l].

3.4.3 Trockengewichtbestimmung

Zur Berechnung der Stoffwechselbilanz wachsender Zellen war eine Trockengewichtbestimmung notwendig. Dafür wurden jeweils 45 – 50 ml Zellkultur in ein 50-ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und

bei 6000 – 8000 x g und 4 °C für 20 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 2-ml Reaktionsröhrchen überführt, dessen Masse zuvor mit einer Feinwaage (Analysewaage XA205, Mettler-Toledo GmbH) bestimmt worden war. Die Trocknung erfolgte für 24 h per Gefriertrocknung (Gefriertrockner VaCol mit Vakuumkonzentrator, Zirbus technology GmbH, Bad Grund). Direkt im Anschluss wurde erneut das Gewicht bestimmt. Aus den Werten wurde die Differenz errechnet, die mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert wurde, um das Trockengewicht in g/l zu erhalten.

3.4.4 Elementaranalyse

Die elementare Zusammensetzung der *Bacteroides*-Stämme erfolgte aus Zellen der späten exponentiellen Phase. Es wurden 1000 ml einer Kultur von *B. propionificiens* in DMMG bei einer OD₆₀₀ von 0,9 geerntet. Von *B. graminisolvens* wurden 500 ml einer Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,4 eingesetzt. Die Zellen wurden bei 8000 x g und 4 °C und 20 Minuten sedimentiert und mit 1/5 des Ausgangsvolumens H₂O_{dest.} gewaschen. Das Pellet wurde dann in ca. 30 ml H₂O_{dest.} resuspendiert, um es in ein 50-ml Falcon Röhrchen zu überführen. Es folgte die Trocknung für 48 h im Gefriertrockner. Danach wurde die Zellmasse mit Mörser und Stößel homogenisiert und 2-mal jeweils 40 mg des Pulvers in Schraubdeckelröhrchen gefüllt. Die Analyse der Zellen erfolgte durch das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP (Potsdam, Deutschland). Es ermittelte den prozentualen Massenanteil von Stickstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff, Schwefel und Sauerstoff der Proben. Der Sauerstoffanteil wurde aus drei technischen Replikaten berechnet, der aller anderen Elemente aus zwei Messungen. Die Berechnung der Summenformel der Zellmasse erfolgte nach Formel 2.

$$\text{Anteil eines Elements an der Summenformel} = \frac{m_x \times M_c}{M_x \times m_c}$$

Formel 2: Berechnung der molaren Anteile der Elemente in der Zellmasse. m_x , Masse des Elements pro mg Trockengewicht; M_x , molare Masse des Elements; m_c , Masse Kohlenstoff in der Probe pro mg Trockengewicht; M_c , molare Masse Kohlenstoff (12,01 g/mol).

3.5 Physiologische Untersuchung der *Bacteroidia*

3.5.1 Wachstumsversuche im Plattenlesegerät

Für einen erhöhten Probendurchsatz wurden Wachstumsversuche in einem Plattenlesegerät durchgeführt (Epoch™ 2 Mikroplate Spectrophotometer, BioTek Instruments Inc., Winooski, USA), welches sich im Anaeroben-Zelt befand (3.3.1). Die Vorbereitung des Mediums und die Inokulation der Kulturen erfolgten jedoch außerhalb des Zeltes in Hungate-Röhrchen mit jeweils 10 ml Medium. Die Medien wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert und dann innerhalb des Zeltes in Mikrotiterplatten überführt. Die Wells der 24-Well Platten wurden mit jeweils 1000 µl Kultur befüllt und 48-Well Platten mit 500 µl. Die Reste der Ursprungskultur wurden für die Bestimmung der Produktkonzentration zum Startzeitpunkt verwendet und als Kontrollen dienten Wells mit H₂O_{dest.} und Medium. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem klaren Film abgedeckt (Sealing tape sterile, Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) und mit einer sterilen Kanüle zwischen den Wells perforiert, um eine Wölbung der Folie durch Gasproduktion zu verhindern. Um die Kondensatbildung zu unterdrücken, wurde

zwischen der oberen und der unteren Heizplatte ein Gradient von 1° C eingestellt. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C hatte die obere Heizplatte eine Temperatur 37,5 °C und die untere 36,5 °C. Das Messprogramm bestand aus einem Zyklus, welcher sich alle 15 Minuten wiederholte. Es beinhaltete ein 5-minütiges Schüttelintervall (doppelt-orbital) bei 282 Zyklen pro Minute (*cycles per minute*, cpm), gefolgt von 20 s Schütteln (linear) bei jeweils 567 cpm. Schließlich wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Am Ende des Wachstumsversuches wurden Proben zur Produktbestimmung entnommen.

3.5.2 Untersuchung der CO₂-Abhängigkeit

Der Einfluss von CO₂ auf den Stoffwechsel wurde für die zwei Stämme *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* getestet. Da das Gas im DMMG eine Pufferfunktion einnimmt, musste die Zusammensetzung des Mediums modifiziert werden. Es enthielt zusätzlich 50 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) und wurde mit 100 % Stickstoff begast. Die CO₂-Konzentration des Mediums wurde über die Zugabe von 0 – 50 mM NaHCO₃ reguliert, wobei 50 g/l in etwa der Konzentration des herkömmlichen DMMG-Mediums entsprechen. Es wurden jeweils 10 ml Medium in Hungate-Röhrchen mit einer OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert. Das Medium zur Kultivierung von *B. propionificiens* enthielt zusätzlich 0,5 g/l Hefeextrakt.

3.5.3 Kultivierung als pH-kontrollierte Fed-Batch

Das Medium für den Versuch basierte auf DMMG, aber jeweils mit der doppelten Konzentration Ammoniumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Eisenlösung, SL-6-Spurenelemente-Lösung sowie Hämin, Vitamin K₁ und 5 x Wolin-Lösung. Außerdem wurden 1 g/l Hefeextrakt hinzugefügt (Hersteller siehe Tabelle A7). Dies sollte eine Limitation des Zellwachstums verhindern. L-Cystein HCl x 1 H₂O wurde dem Medium erst nach dem Autoklavieren aus einer anaeroben 2,5 M Stocklösung hinzugefügt, sodass eine Konzentration von 0,5 g/l erreicht wurde. Der Aufbau des Reaktors ist in Abbildung 3.1 gezeigt. 1,5 l des Mediums wurden in einem Kulturgefäß vorbereitet und zusammen mit einer autoklavierbaren pH-Elektrode (EasyFerm Plus PHI K8 200, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) autoklaviert. Eine Begasung mit 80 % N₂/20 % CO₂ (v/v) wurde erst im Anschluss vorgenommen, wobei die Gaszufuhr durch Einwegfilter (0,2 µm Porengröße) sterilisiert wurde. Die Gaszufuhr lief während der gesamten Kultivierungsdauer bei einem Volumenfluss von 1 l/h. Die Zusätze und Glucose wurden dem Medium, nachdem es bis auf Handwärme abgekühlt war, über einen Animpfstutzen hinzugegeben. Die Kultivierung startete mit einer initialen Glucosekonzentration von 15 mM. Sie wurde regelmäßig über eine optisch-enzymatische Bestimmung überprüft (3.4.1). Sank sie unter einen Wert von 5 mM erfolgte eine erneute Zugabe in Pulsen von 15 - 60 mM. Die Kultur wurde mit 1 % des Ausgangsvolumens aus einer Übernachtskultur im DMMG-H inokuliert. Das Kulturgefäß war an eine Biostat B plus Steuereinheit (Satorius, Göttingen, Deutschland) angeschlossen. Sie steuerte den Rührer, die KOH-Pumpe und konnte die Temperatur über einen Temperaturfühler überprüfen. Die Kultur wurde bei 50 rpm durchmischt und der Wassermantel um das Gefäß mit einem Thermostat (RM6, Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) beheizt. Durch die konstante pH-Messung erfolgte die automatische Zugabe einer 2 M KOH-Lösung, sobald der pH unter 7 fiel. Ein Probennehmer ermöglichte die sterile Entnahme von Kultur und damit die regelmäßige Bestimmung von OD₆₀₀, Glucose- und Produktkonzentration. Bei der Probennahme wurde darauf geachtet, dass das Reservoir mindestens zweimal gespült wurde, bevor Proben zur Messung entnommen wurden.

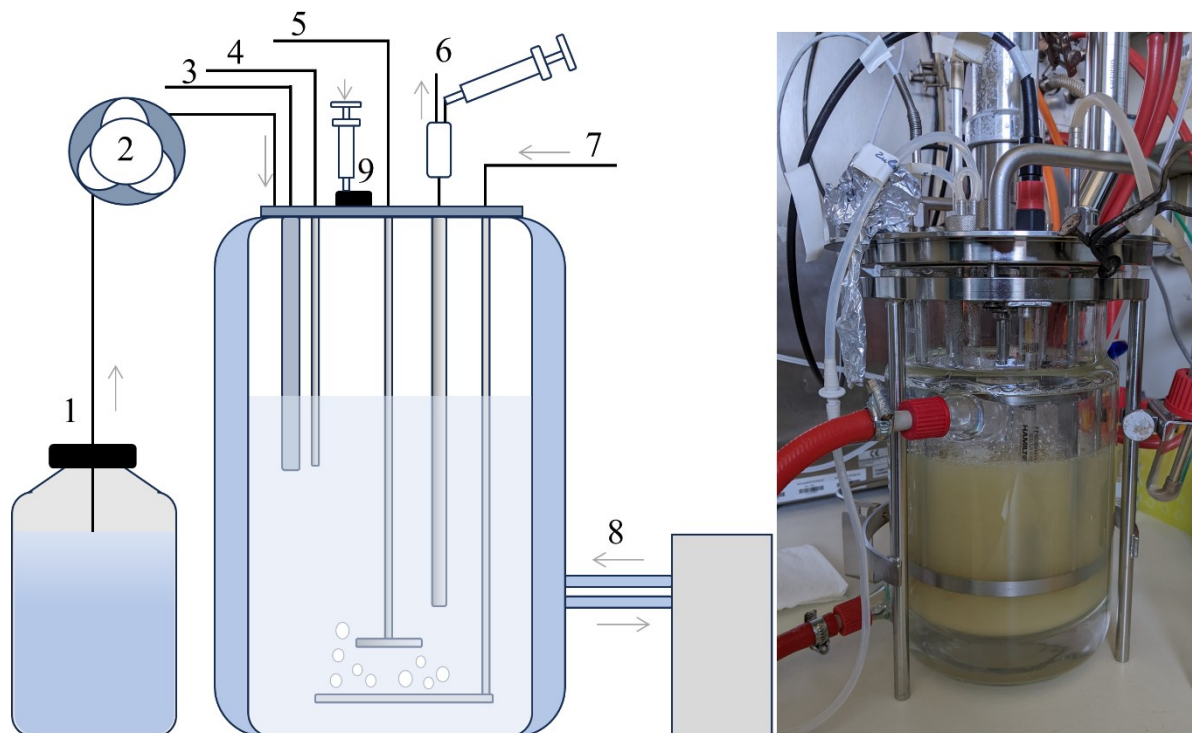


Abbildung 3.1: Aufbau der pH-kontrollierten Fed-Batch-Kultivierung. Graue Pfeile zeigen die Flussrichtung von Flüssigkeiten und Gasen. 1, 2 M KOH-Vorratslösung; 2, Pumpe der Steuerungseinheit; 3, pH-Elektrode; 4, Temperaturfühler; 5, Rührgerät bei 50 rpm; 6, Probennehmer mit Reservoir; 7, Gaszufuhr bei 1 l/h; 8, Wassermantel und Thermostat, 9, Animpfstutzen zur Zugabe von Glucose und Medienzusätzen.

3.5.4 Herstellung ruhender Zellen

Zur Herstellung von ruhenden Zellen wurden jeweils 1000 ml DMMG bzw. 3000 ml DMMG-H mit *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* Vorkulturen inokuliert. Am Ende der exponentiellen Phase wurden die Bakterien anoxisch geerntet. Dabei wurden die Kulturen innerhalb des Anaerobenzeltes in luftdicht verschließbare Zentrifugenbecher verteilt und bei 6000 – 8000 x g und 4 °C für 10 - 20 Minuten sedimentiert (Sorvall RC 6, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 1/5 des Ausgangsvolumens in Resting-Cells-Buffer (RCB, Tabelle 3.18) gewaschen und schließlich in 100 µl (*B. graminisolvens*) bzw. 200 µl (*B. propionificiens*) RCB resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in sterile Gefäße pipettiert und luftdicht verschlossen, bevor sie wieder aus dem Anaerobenzelt geschleust wurde. Um den Wasserstoff aus den Kulturgefäßen zu spülen, wurde der Luftraum in den Gefäßen mit sterilen Kanülen und Filtern (0,2 µm Porengröße) für 5 Minuten mit 80 % N₂/20 % CO₂ (v/v) ausgetauscht. Anschließend wurden die Kulturen für 30 Minuten bei ihren entsprechenden Inkubationstemperaturen ausgehungert. Vor dem Start der Messung erfolgte die Gabe 15 mM Glucose. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen bis zu 120 h weiter inkubiert und regelmäßig Proben zur Bestimmung der Produktkonzentration entnommen. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts am Anfang der Inkubation und nach 4 bzw. 8 h.

Resting Cells Buffer (RCB)

RCB wurde hergestellt wie DMMG. Seine Zusammensetzung ist in Tabelle 3.18 aufgeführt. Es bestand aber ausschließlich aus dessen Puffersubstanzen und NaCl. Weiterhin enthielt der Puffer keine Vitamine oder Hämin. Lediglich Glucose wurde direkt vor dem Start der Produktmessung zu einer Endkonzentration von 15 mM hinzugefügt. Der pH wurde vor dem Begasen mit KOH auf pH 8 eingestellt.

Tabelle 3.18: Zusammensetzung RCB

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
NaCl	0,9 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄	2,2 g
L-Cystein HCl x 1 H ₂ O	0.5 g
Resazurin 0,1 %	1 ml

3.5.5 Stoffwechselbilanz wachsender Zellen

Für die Untersuchung der Stoffwechselbilanz wurden Wachstumsversuche von *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* mit je drei 500-ml-Kulturen durchgeführt. Es wurden in regelmäßigem Abständen Proben entnommen zur Bestimmung von OD₆₀₀, Proteingehalt und Produktkonzentrationen entnommen. 18 weitere 50-ml-Kulturen wurden parallel inkubiert. Von diesen Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten OD₆₀₀, Proteingehalt und Trockengewicht bestimmt.

3.6 Genomanalyse

Das Vorhandensein der Gene für Enzyme der zentralen Stoffwechselwege wurde mit dem Programm Blast® (<https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft. Zunächst mussten dafür Aminosäuresequenzen relevanter Enzyme gefunden werden, die als Referenz für die Suche dienten. Diese wurden über die Datenbanken UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (The UniProt Consortium, 2025) und Protein Data Bank in Europe (PDB; <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>) bezogen. Da nur wenige Enzyme aus *Bacteroidia*-Bakterien charakterisiert sind, wurden homologe Enzyme aus anderen Bakterien als Referenz verwendet. Die entsprechenden Referenznummern sind in Tabelle A12 aufgeführt. Mit den Sequenzen wurde ein Vergleich vom BlastP-Algorithmus durchgeführt. Es wurde die „nicht redundante Proteinsequenzen“-Datenbank durchsucht. Die Suche wurde auf die 11 *Bacteroidota*-Spezies beschränkt, war jedoch nicht stammspezifisch. Wenn keine signifikante Übereinstimmung für einen Organismus gefunden wurde, wurde eine weitere Suche durchgeführt, jedoch mit dem BlastN-Algorithmus. Er vergleicht Aminosäuresequenzen mit Gensequenzen. Dadurch konnte die Nukleotid-Datenbank „Whole genome shotgun sequencing“ verwendet werden. Da noch nicht bei allen der Stämme vollständig annotierte und zusammengefügte Genome vorlagen, half dieser Schritt in vielen Fällen Übereinstimmungen zu finden, selbst wenn die erste Suche keine Treffer ergeben hatte. War trotz dessen keine Sequenz auffindbar, wurde das Gen als nicht vorhanden eingestuft. Um stammspezifische Daten zu erhalten, wurde die BlastN-Analyse noch einmal mit zwei vollständigen Genomen der zwei Stämme *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* wiederholt. Dafür wurden pro Stamm zwei

Genome verwendet. Für *B. graminisolvens*, NZ_BAJS01000063.1 und NZ_ATZI01000001.1 und für *B. propionificiens*, NZ_BAJO01000080.1 und NZ_AQWS01000001.1.

3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.7.1 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *Phocaeicola vulgatus*

Als Ausgangsmaterial diente eine 5 ml Übernachtskultur von *P. vulgatus* in PYG-Medium, von der je 2 ml zentrifugiert wurden (13.000 x g, 5 min, 4 °C). Die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Isolierung der DNA wurde das NucleoSpin Microbial DNA Kit von Macherey Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Alle Materialien und Lösungen wurden mitgeliefert und die Isolierung wurde nach Anleitung durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Lyse-Gerät (FastPrep™-24 5^G, MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) bei 6 m/s für 3 x 30 s mit 50 mg Glasperlen (150 -212 µm). Die gDNA wurde mit 2 x 25 µl Elutionspuffer von der Silikat-Säule eluiert. Anschließend folgte die Bestimmung der DNA-Konzentration (3.7.3) und die Prüfung der Qualität mit Gelelektrophorese (3.7.4).

3.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. vulgatus*

E. coli Stämme wurden in 5 ml LB, *P. vulgatus* Stämme in PYG inokuliert. Beide Medien enthielten jeweils 100 mg/l Erythromycin. Die Kulturen wurden über Nacht inkubiert und je 2 ml davon für 5 Minuten bei 6000 x g und 4 °C sedimentiert. Es wurde das NucleoSpin Plasmid Easy Pure Kit von (Macherey Nagel, Düren) verwendet und entsprechend der Anleitung durchgeführt. Eluiert wurde erst mit 20 µl und nochmals mit 10 µl des beiliegenden Elutionspuffers. Anschließend wurde die Konzentration im Spektrophotometer bestimmt und die Qualität durch Gelelektrophorese überprüft.

3.7.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

DNA und RNA haben ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit einem Höhepunkt bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Minimum bei 230 nm (García-Alegria *et al.*, 2020). Dies wird bei der Bestimmung der Nukleotidkonzentration mit Spektrophotometer ausgenutzt. Es wurde das NanoPhotometer® N60/N50 (Implen GmbH, München) genutzt. Vor jeder Messung wurde die Optik mit H₂O_{dest.} gereinigt und ein Leerwert mit Elutionspuffer gemessen. Dann wurde jeweils 1 µl Probe auf den Mess-Punkt aufgetragen. Das Gerät ermittelte die DNA-Konzentration sowie weitere Absorptionsparameter, die die Abschätzung der Qualität zulassen. Ein Absorptionsverhältnis von 260/280 von 1,7 - 2 wurde dabei als Hinweis auf eine gute Reinheit der Probe angesehen, wobei geringere Werte auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenolen zurückzuführen sind und höhere Werte auf einsträngige Nukleinsäuren. Bei dem 260/230 Verhältnis ist hingegen ein Ergebnis von über 1,5 optimal (Bruijns *et al.*, 2022).

3.7.4 Agarose Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 0,8 - 1%ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agar mit 1 x TAE-Puffer gemischt und durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Im Anschluss wurden 60 µl/l des Farbstoffs Midori Green Advance (Nippon

Genetics Europe GmbH, Düren) hinzugefügt. Nach dem Aushärten wurde es in eine Gelkammer gelegt und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die Gele wurden mit 3 µl 1 Kb DNA Ladder oder 1 Kb Plus DNA Ladder (NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main) beladen. 2,5 µl DNA-Probe wurden jeweils mit 0,5 µl 6 x Ladefarbstoff (Gel Loading Dye Purple (6x), NEB) vermischt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Dann wurde für 30 – 45 Minuten über eine Steuereinheit (Biometra, Analytik Jena GmbH+Co. KG, Jena) eine Spannung von 90 V angelegt. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente durch UV-Strahlung einer Fotodokumentationsstation (Geldokumentationsanlage Dark Hood DH+50, Biostep GmbH, Jahnsdorf) sichtbar gemacht und dokumentiert.

Tabelle 3.19: Zusammensetzung des 50 x TAE-Puffers

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
TRIS	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml

Der 1 x TAE-Puffer wurde durch die Verdünnung der 50-fachen Lösung mit H₂O_{dest.} hergestellt.

3.7.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Es wurden zwei verschiedene Polymerasen für die PCR-Reaktionen verwendet. Die Taq-Polymerase (OneTaq Quick-Load 2x Mastermix mit Standard Puffer, NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main) diente der Amplifizierung von DNA-Fragmenten beispielsweise zur Identifizierung von Stämmen mittels 16S-Gen-Sequenz oder Kolonie PCR. DNA-Fragmente für die Klonierung wurden mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main) amplifiziert, die eine geringere Fehlerrate hat. Es wurde meist mit 25 µl Reaktionsansätzen gearbeitet, die jeweils 1 µl DNA-Matrize enthielten und entsprechend der Gebrauchsanleitung vorbereitet wurden. Die Hybridisierungstemperaturen wurden mit Hilfe des NEB Tm calculator (<https://tmcaculator.neb.com/#!/main>) bestimmt. Bei jeder Reaktion wurde zusätzlich ein Ansatz ohne DNA-Template mitgeführt. Primer wurden mit dem Programm ApE (A plasmid editor, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>, (Davis und Jorgensen, 2022)) anhand der Zielsequenz designt. Mit dem online Tool OligoAnalyzer™ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, Integrated DNA Technologies), wurden Primer auf Sekundärstrukturen und heterodimere überprüft und über die Firma Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Der Ablauf der PCR-Reaktionen der beiden Polymerasen ist in der Tabelle A4 zusammengefasst.

3.7.6 PCR-Aufreinigung

Bei bestimmten Anwendungen, wie beispielsweise Sequenzierungen oder Gibson-Assembly, war es notwendig, PCR-Fragmente vor der weiteren Nutzung aufzureinigen. Hierfür wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Elution erfolgte zweimal, zunächst mit 15 µl und dann 10 µl Elutionspuffer, der zuvor auf 70 °C erhitzt worden war. Die Elutionen wurden vereinigt. Im Anschluss erfolgte die Prüfung der Qualität und der DNA-Menge mit Spektrophotometer (3.7.3).

3.7.7 Sequenzierung von DNA

Es wurden jeweils Ansätze mit 12 µl DNA vorbereitet. Lineare DNA wurde mit Nuclease-freiem H₂O_{dest.} auf eine Konzentration von ca. 40 ng/µl verdünnt und Plasmide auf 100 ng/µl. Dann wurden je 2 µl eines 10 µM konzentrierten Primers (Tabelle A3) komplementär zur Zielsequenz hinzugegeben und schließlich zum Sequenzierservice der Firma LGC-Genomics (Berlin, Deutschland) geschickt.

3.7.8 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA aus *P. vulgatus* wurden Zellen des Wildtyps, *P. vulgatus* pG106 sowie pG106_np_muta_scpA jeweils in DMMG und PYG mit der dreifachen Menge der 5 x Wolin-Lösung bis zur mittleren exponentiellen Phase inkubiert (OD₆₀₀ ca. 0,8 bzw. 2,5). Vor der Zellernte wurden die Kultur-Röhrchen für 10 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden jeweils 1 ml Kultur auf Eis in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und sedimentiert (13.000, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und darauf geachtet, dass die Flüssigkeit komplett abgenommen wurde. Dann wurden die Zellen bis zur Weiterverarbeitung bei – 70 °C gelagert. Für die Extraktion der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Es wurden jeweils Zellen aus 2 ml (DMMG) bzw. 1 ml (PYG) Kultur eingesetzt. Die Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um die Kontamination mit DNA zu verringern, wurde zusätzlich eine Säulen-DNase Behandlung mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels Spektrophotometer (3.7.3) und eine Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die Intaktheit der RNA zu bestätigen. Dafür wurden die Proben so behandelt wie im RNA RiboRuler High Range RNA Ladder Protokoll (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) beschrieben. Anschließend wurden sie auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (Punkt 3.7.4). Die restliche RNA wurde bei -70 °C gelagert.

3.7.9 cDNA-Synthese und quantitative PCR

Um das Transkript Level zu bestimmen, wurde eine quantitative-(q)-PCR durchgeführt. Zunächst wurde dafür die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Dafür wurde das cDNA Synthese Kit (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) genutzt. Zu je 20 µl Ansatz wurden 5 µl RNA aus Proben eingesetzt, die in DMMG gewachsen waren und 1 µl RNA aus den Proben mit Wachstum auf PYG. Die cDNA wurde als Matrize für die qPCR verwendet. Hierfür wurden jeweils 10 µl Ansätze mit dem Blue S'Green 2 x Master Mix nach herstellerangaben pipettiert. Als Kontrolle dienten Ansätze mit mRNA, die entsprechend der cDNA-Proben mit Reinstwasser verdünnt worden waren. Die Proben wurden in eine 96-well PCR-Platte (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) pipettiert und die Platte mit einem klaren Film versiegelt (Adhesive Clear PCR Seal, Biozym Scientific GmbH). Dann wurde die Platte kurz zentrifugiert (PlateFuge, Benchmark Scientific, Sayreville, USA). Die Analyse wurde im qTower³ (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Messung des Ct-Wertes erfolgte mit dem Programm qPCR soft 4.1 (Analytik Jena). Im Anschluss folgte die Auswertung der Daten mittels folgender Berechnung:

1. $\Delta Ct = Ct_{\text{gesuchtes Gen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$
2. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Testorganismus}} - \Delta Ct_{\text{Kontrollorganismus}}$
3. $x\text{-fache Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Es wurden zwei Referenzgene getestet und die Transkriptabundanz der zwei Gene für die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mutA* und *scpA*) überprüft. Dafür wurden insgesamt 4 Primer-Paare verwendet, deren Sequenzen in Tabelle A3 aufgeführt sind. Als Referenzgene dienten das Gen für die Gyrase (*gyrA*) und für das ribosomale Protein L23 (*l23*) aus *P. vulgatus*. Kontrollorganismus war der Wildtyp von *P. vulgatus*. Testorganismen waren dementsprechend *P. vulgatus* pG106 und *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA (Abschnitt 3.8)

3.8 Generierung des Stammes *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA

In *P. vulgatus* wurde bereits die Überproduktion der Lactat-Dehydrogenase gezeigt (Lück und Deppenmeier, 2022), indem das korrespondierende Gen inklusive nativen Promoter (np) in einen High-Copy-Vektor kloniert worden war. Diese Technik sollte nun für die Überproduktion der Methylmalonyl-CoA-Mutase angewandt werden. Sie besteht aus zwei Untereinheiten mit je einem korrespondierenden Gen: *mutA* und *scpA*. Es wurde ein DNA-Abschnitt amplifiziert, der diese Gene enthielt zusammen mit einen 238 bp langen Abschnitt davor (np_mutA_scpA). Dieses Fragment wurde dann mittels Gibson Assembly in den Vektor pG106 (Jones *et al.*, 2020) kloniert und zunächst in *E. coli* DH5α Zellen transformiert. Über Kolonie PCR wurden positive Klone ausgewählt, deren Plasmide wiederum isoliert und in Ca-kompetente *E. coli* S17-1 Zellen transformiert wurden. Dann wurde das Plasmid über Konjugation in *P. vulgatus* eingebracht.

3.8.1 Herstellung rekombinanter Plasmide

Zur Rekombination des Fragments np_mutA_scpA in das Plasmid pG106 wurde das Gibson-Assembly genutzt (Gibson *et al.*, 2009). Für den Reaktionsansatz wurde das Kit Gibson Assembly® Master Mix (NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet, welches bereits alle notwendigen Puffer und Enzyme enthielt. Der Reaktionsansatz wurde mit 0,09 pmol DNA sowie H₂O_{dest.} nach Herstellerangaben vorbereitet. Vektor- und Fragment-DNA wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:2 gemischt. Der DNA-Gehalt in pmol wurde nach Formel 3 ermittelt. Zunächst wurde dabei die Stoffmenge in 0,5 µl aufgereinigtem PCR-Produkt bestimmt und dann das benötigte Volumen Plasmid-Isolat berechnet, um die halbe Stoffmenge zu erzielen. Der fertige Ansatz wurde dann für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert und das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

$$n_{DNA} [pmol] = \frac{m * 1000}{Bp \times 650 da}$$

Formel 3: Berechnung der DNA-Konzentration für das Gibson-Assembly. n_{DNA} , Stoffmenge der DNA-Fragmente in pmol; m ; Masse der Nukleinsäuren in ng; 1000, Umrechnungsfaktor; bp, Anzahl der Basenpaare der DNA; 650 da, Umrechnungsfaktor in Dalton

3.8.2 Transformation

Es wurden vorbereitete Kalzium-kompetente Zellen (*E. coli* DH5α und S17-1) verwendet, die zunächst auf Eis aufgetaut und in gekühlten 2-ml-Reaktionsgefäßen mit jeweils 1 µl Plasmid durch leichtes Schnipsen vermischt wurden. Die Zellen inkubierten für 30 Minuten auf Eis und erhielten dann 90 s

lang bei 42 °C einem Hitzeschock, bevor sie wieder 3 – 5 Minuten auf Eis abkühlten. Dann wurden je 500 µl SOC-Medium (37 °C, Tabelle A5) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C und 300 rpm im Thermoblock (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Damit der gesamte Reaktionsansatz ausplattiert werden konnte, wurden er für 2 Minuten bei 11.000 x g und Raumtemperatur sedimentiert und 400 µl des Überstandes verworfen. Die Zellen wurden dann vorsichtig in dem Rest des Mediums resuspendiert und auf LB-Agar mit 300 mg/l Erythromycin ausplattiert. Neben dem Konstrukt np_mutA_scpA wurden auch ein Ansatz ohne Plasmid als Negativkontrolle sowie das Plasmid pG106 als Positivkontrolle mitgeführt. Letzteres wurde nicht aufkonzentriert, sondern mit 1 x PBS jeweils 10-fach auf bis zu 10⁻⁴ verdünnt. Der unverdünnte Ansatz sowie die Verdünnungsstufen 10⁻² und 10⁻⁴ wurden dann ausplattiert. Koloniewachstum war nach 1-1,5 Tagen sichtbar.

3.8.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde genutzt, um die Insertion von DNA-Abschnitten in vielen Kolonien nach der Transformation zu untersuchen. Zum Nachweis der Insertion des DNA-Abschnitts np_mutA_scpa in das Plasmid pG106, wurden die Primer CD07_fw und CD07_rv verwendet (Tabelle A3). Sie sind komplementär zu den Plasmid-Sequenzen, die die Insertionsstelle flankieren, sodass das PCR-Produkt eines positiven Klons etwa 4000 bp länger ist als das des Ursprungsplasmids. Für die Kolonie PCR wurde von den Platten der transformierten Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze Zellmaterial aufgenommen. Es wurde in den Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR eingetaucht und im Anschluss erneut auf LB-Erythromycin-Agar ausgestrichen. Dann wurden je 25 µl OneTaq Quick-Load 2x Mastermix mit Standard Puffer (NEB) mit den Primern hinzugegeben. Die Reaktion lief nach den Schritten in Tabelle A4 ab. Da der Mastermix bereits Ladepuffer enthielt, wurden die Proben im Anschluss direkt auf ein Agarosegel (3.7.4) aufgetragen, um die Länge der Fragmente zu überprüfen. Auf diese Weise wurden jeweils 12 Transformationsansätze mit Gibson-Assembly-Insert, zwei Gibson-Assembly-Ansätze ohne Insert und 2 Kolonien mit pG106 im Transformationsansatz getestet.

3.8.4 Konjugation

10 ml LB mit 100 mg/l Erythromycin wurden mit einer Einzelkolonie des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA inokuliert. Außerdem wurden 5 ml PYG mit 1 % Kulturvolumen aus einer Übernachtskultur von *P. vulgatus* angeimpft. Der Empfängerstamm sollte zu Beginn der Arbeiten eine OD₆₀₀ von 0,1 – 0,2, der Donorstamm von 0,2 - 0,8 erreicht haben. Da *E. coli* schneller wuchs, hatte die Kultur zum Zeitpunkt der Ernte eine OD₆₀₀ von 1,1 erreicht und wurde 1:4 mit PYG verdünnt. Nach Erreichen der Ziel-OD wurden die Zellen mindestens 15 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann wurden jeweils 150 µl *E. coli* mit 850 µl *P. vulgatus* vermischt (Mischverhältnis 1:5). Diese Arbeit erfolgte unter oxischen Bedingungen. Als Kontrolle der Wachstumsfähigkeit der anaeroben Bakterien wurde ein Ansatz ohne Zugabe von *E. coli* mitgeführt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 9000 x g und 4 °C sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde dann in 200 µl PYG resuspendiert und auf eine vorgewärmte PYG-Platte getropft. Diese wurde dann über Nacht unter oxischen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten in das Anaerobenzelt überführt und das gesamte Zellmaterial in 2 ml PYG-Medium aufgenommen. Je 50 und 200 µl dieser Flüssigkeit wurden

dann auf PYG-Agar mit je 100 mg/l Erythromycin und Gentamycin ausplattiert. Sichtbare Kolonien wurden auf dem gleichen Medium im 3-Strich Verfahren vereinzelt.

3.9 Anreicherung und Isolierung von Polymer abbauenden *Bacteroidota*

3.9.1 Anreicherungsmedium (AM)

Bakterien wurden entweder in DMM oder Anreicherungsmedium (AM) kultiviert. AM wurde auf Basis des DMM-Mediums hergestellt, enthielt aber jeweils 1 g/l Hefeextrakt und 1,5 g Pepton. Somit sollte gewährleistet werden, dass auch Stämme mit höherer Nährstoffanforderung angereichert werden. Unlösliche Substrate waren Xylan aus Buchenholz (X), Avicel PH-101 (A), Whatman-Filterpapier (GB003) (W) und Chitin aus Krabbenchalen (C) (Hersteller siehe Tabelle A7). Sie wurden vor dem Autoklavieren in einer Konzentration von 10 g/l zum Medium hinzugegeben. Vom Filterpapier wurde ein ca. 0,5 x 3 cm langer Streifen abgeschnitten und in die Kulturröhrchen gelegt. Xylooligosaccharide (Xo) wurden aus einer anoxischen 1,5 M Stammlösung (Herstellung wie Glucoselösung) in einer Konzentration von 15 mM nach dem Autoklavieren zum Medium hinzugegeben. Zur Anreicherung der *Bacteroidota* enthielten alle Medien Vancomycin (Van) und Kanamycin (Kan) in einer Endkonzentration von jeweils 7,5 µg/ml bzw. 100 µg/ml. Festmedien aus AM konnte zusätzlich vor dem Autoklavieren 12 mg/l des Farbstoffs Bromkresolpurpur zugegeben werden.

3.9.2 Probematerialien

Viele *Bacteroidota* sind darmassoziiert und dafür bekannt, ein reiches Repertoire an polymerabbauenden Enzymen zu besitzen. Dementsprechend wurden die Probequellen ausgewählt. Ein Überblick über die Proben Herkunft ist in Tabelle 3.20 aufgeführt. Sie wurden direkt nach Entnahme in Enghalsflaschen gefüllt, mit Stopfen luftdicht verschlossen und bis zur Weiterbearbeitung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.20: Ursprung der Probenmaterialien zur Isolierung von *Bacteroidota*.

Art der Probe	Ort	Kürzel
Mischung der Kompostmieten B01/2020 und B03/2018 aus Bioabfall	Kompostwerk der Stadtentsorgung Rostock, 18209 Parkentin	Bm
Klärwerk Zulauf (unbearbeitetes Abwasser)	Klärwerk Rostock	Z
Vorschlamm (Probe aus dem Vorklärbecken)	Klärwerk Rostock	V
Primärschlamm (Aus dem Vorklärbecken abgetrennter Klärschlamm)	Klärwerk Rostock	P
Bio-P Becken (Entnahme aus anoxischem Teil)	Klärwerk Rostock	B
Biogasanlage: 30 – 37 °C und 42 °C Fermenter, Schweinegülle, Mais-, Rübenschnitzel	Biogasanlage Groß Bäbelin	Bg0*
Biogasanlage: 30 – 37 °C und 42 °C Fermenter, Schweinegülle, Mais-, Rübenschnitzel	Biogasanlage Groß Bäbelin	BgI
Biogasanlage: Fermenter A, 38 - 40 °C, Mais, Gras	Biogasanlage Güstrow	BgII

*Für die Proben Bg0 entfiel der Anreicherungsprozess. Die Probenlösung wurde direkt verdünnt und ausplattiert.

3.9.3 Anreicherung

Zunächst wurde eine Spatelspitze bzw. 1 ml jeder Probe (Tabelle 3.20) in 20 oder 40 ml DMM-Medium ohne Zusätze gefüllt. Dazu wurden die Serumflaschen unter sterilen Bedingungen geöffnet und das Probenmaterial hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Flaschen wieder gasdicht verschlossen und der Inhalt gut vermischt. Aus der Probenmischung wurden Anreicherungskulturen entweder in DMM oder AM mit unterschiedlichen Substraten inokuliert (1 % des Kulturvolumens) und bei jeweils 30 °C und 37 °C inkubiert (Passage 1, P1). Eine Übersicht über die Kultivierungsbedingungen ist in Tabelle A6 aufgelistet. Da eine Bestimmung der optischen Dichte in den Kulturen mit unlöslichen Substraten unmöglich war, wurde das Wachstum anhand von Gasbildung (Überdruck im Wachstumsgefäß) oder mikroskopischen Bildern überprüft. Sobald eine Kultur Wachstum zeigte, wurde sie erneut transferiert. Zur Kontrolle der Produktbildung wurden HPLC-Proben einzelner Kulturen entnommen. Nach mindestens 3 Passagen folgte die Isolierung der Stämme. Dafür wurden Proben ausgewählt, die eine hohe Konzentration von Propionat aufwiesen. Die Bakterien der Gruppe Bg0 wurden nicht angereichert, sondern direkt isoliert, wie unter Punkt 3.9.4 beschrieben.

3.9.4 Isolierung

Anreicherungskulturen wurden jeweils 1:10 mit PBS bis zu einem Faktor von 10^{-9} verdünnt. Von jeder zweiten Verdünnungsstufe wurden 100 µl auf eine Platte AMX oder AMXo mit 7,5 mg/l Vancomycin und 100 mg/l Kanamycin sowie dem pH-Indikator Bromkresolpurpur ausplattiert oder in Agarplatten eingegossen (3.2.1). Der Farbstoff wurde bereits zur Isolierung von *Bacteroides* Stämmen genutzt (Tan *et al.*, 2018). Durch den Farbumschlag bei pH-Werten zwischen 7 (Violett) und 5 (gelb) sollten Kolonien mit besonders schneller Säurebildung identifiziert werden. Sobald eine Veränderung erkennbar war, wurden Kolonien mittels 3-Strich- Methode auf einer weiteren Platte AMX oder AMXo vereinzelt. Die Reinheitsausstiche wurden noch 2-mal wiederholt. Als nächstes wurden Einzelkolonien in je 200 µl PBS suspendiert. Dieses wurde komplett zur Inokulation von 5 ml Medium (Ursprungsmedium der Passage 3) verwendet. Nach Anwachsen folgte die Inokulation von 5 ml PYHVG. Aus diesen Kulturen wurden HPLC-Proben zur Produktbestimmung entnommen und Gefrierstocks angefertigt. Die Anreicherungen und Isolate wurden anhand des folgenden Schemas benannt: 1. Ursprungskürzel (Tabelle 3.20) 2. Substrat (Xylan, X; Xylooligosaccharide, Xo) 3. Inkubationstemperatur (30 °C oder 37 °C) und 4. Koloniennummer. So wurde beispielsweise das Isolat ZX301 benannt (Z, Zulauf Kläranlage Rostock; X, Xylan; 30, 30 °C Kultivierungstemperatur; 1, Isolat 1).

3.9.5 Identifizierung der Isolate

Um *Bacteroidetes*-Isolate zu identifizieren, wurden die Sequenzen des 16S-rRNA Abschnittes der DNA ermittelt. Dazu wurden zunächst jeweils 1 ml PYHVG-Kultur geerntet (6000 x g, 4 °C, 20 min) und in 1 ml H₂O_{dest.} gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 600 µl H₂O_{dest.} aufgenommen und in ein Schraubdeckelröhrchen mit ca. 50 mg Glasperlen (150 -212 µm) gegeben. Diese wurden einmal für 30 s bei 6 m/s im Lyse-Gerät (FastPrep™-24 5^G, MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) aufgeschlossen. Die flüssigen Bestandteile wurden bei 13.000 x g und 4 °C eine Minute lang sedimentiert. Dann wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Probe für 10 Minuten bei 94 °C inkubiert, um DNAsen zu inaktivieren. Im Anschluss wurden 2 µl als *Template* für die Eubac-PCR mit oneTaq® Polymerase eingesetzt (3.7.5). Es folgte die Kontrolle der DNA-

Qualität über Agarose-Gelelektrophorese. Schließlich wurden die PCR-Ansätze mit dem Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherei Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Im Anschluss folgte die Sequenzierung der PCR-Produkte (3.7.7). Die dabei erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLASTn identifiziert.

3.9.6 Amplicon-Sequenzierung

Um die mikrobielle Zusammensetzung der Anreicherungskulturen zu untersuchen, wurde eine Amplicon-Untersuchung durchgeführt. Dabei wurden hoch variable Bereiche des 16S-rRNA-Gens amplifiziert und sequenziert. Aus erhaltenen Daten wurde dann die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Taxon sowie dessen Abundanz abgeleitet werden (Lundberg *et al.*, 2013). Für die Sequenzierung wurden drei Anreicherungsansätze (BX30, VX30 und ZX30) aus der Passage 4 ausgewählt. Genomische DNA aus jeweils 1 ml der Kulturen wurden mit dem Kit NucleoSpin Tissue (Macherei Nagel, Düren) isoliert. Je 30 µl DNA-Probe wurden für die Analyse durch die Firma Novogene (Cambridge, UK) verwendet. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls durch die Firma.

4 Ergebnisse

4.1 Stammauswahl

1978 wurde der Propionat-Bildungsweg des Bakteriums *Bacteroides fragilis* erstmals beschrieben (Macy *et al.*, 1978). Darüber hinaus ist die Propionatproduktion unter anaeroben Bakterien des Phylums *Bacteroidota* weit verbreitet. Bisher gibt es jedoch kaum vergleichende Untersuchungen zur Ausbeute und Produktivität, zum Bildungsweg und zu den genetischen Grundlagen in diesem Phylum. Um zunächst eine Stammauswahl für experimentelle Studien zu treffen, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle A8 dargestellt sind. Insgesamt wurden 30 Spezies identifiziert, deren Propionatproduktion experimentell nachgewiesen und publiziert wurde. Die meisten der Isolate wurden erstmals zwischen den Jahren 2000 und 2020 beschrieben. Viele stammen aus dem menschlichen Verdauungstrakt, aber auch methanogene Reaktoren, Reisfelder und sogar das Abwasser einer Papiermühle waren Quellen Propionat bildender *Bacteroidota*. Viele der Stämme sind in der Lage, eine große Bandbreite komplexer Substrate zu nutzen, wie Xylan, Stärke, Pektin und weitere. 20 dieser Spezies sind anhand der technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe in der Sicherheitskategorie 1 eingestuft und somit ohne weitere Sicherheitsauflagen kultivierbar. Aus dieser Gruppe wurden wiederum 10 Spezies ausgewählt, die für die vorliegende Fragestellung interessante Eigenschaften aufwiesen (Tabelle A1). *B. cellulosilyticus* und *B. graminisolvens* zeigten beispielsweise ein breites Substratspektrum. Andere Stämme wurden aufgrund von interessanten Fermentationsprodukten ausgewählt, so zum Beispiel *B. propionificiens*. Es wurde in der Erstbeschreibung als vergleichsweise guter Produzent beschrieben.

4.2 Bestimmung geeigneter Kultivierungsbedingungen

4.2.1 Wachstum in Komplexmedium

Die Literaturrecherche hatte gezeigt, dass in den letzten Jahren viele neue Propionat bildende *Bacteroidota* isoliert wurden. Es existiert bisher jedoch noch kein direkter experimenteller Vergleich dieser Stämme unter definierten Bedingungen. Um einen ersten Überblick über die Produktbildung und das Wachstumsverhalten der ausgewählten *Bacteroidia* zu erhalten, wurden OD₆₀₀ sowie Produktbildung der 10 ausgewählten Stämme bei Wachstum in PYHVG-Medium bestimmt. Es bestand große Variabilität zwischen den Stämmen (Abbildung 4.1). Während *P. johnsonii* eine OD₆₀₀ von $1,7 \pm 0,1$ und eine Propionatkonzentration von $11,2 \pm 1,8$ mM aufwies, erreichte *B. propionificiens* nur eine OD₆₀₀ von $0,4 \pm 0,3$ und produzierte $1,8 \pm 1,0$ mM Propionat. Für die weitere Untersuchung der Wachstumsbedingungen wurde daher zunächst *Parabacteroides johnsonii* ausgewählt. Außerdem wurde mit *B. graminisolvens* weitergearbeitet, welches unter diesen Bedingungen zwar eine geringe Zelldichte und Propionatproduktion zeigte, dafür aber das höchste Propionat/Acetat (P/A) -Verhältnis von $1,7 \pm 0,1$.

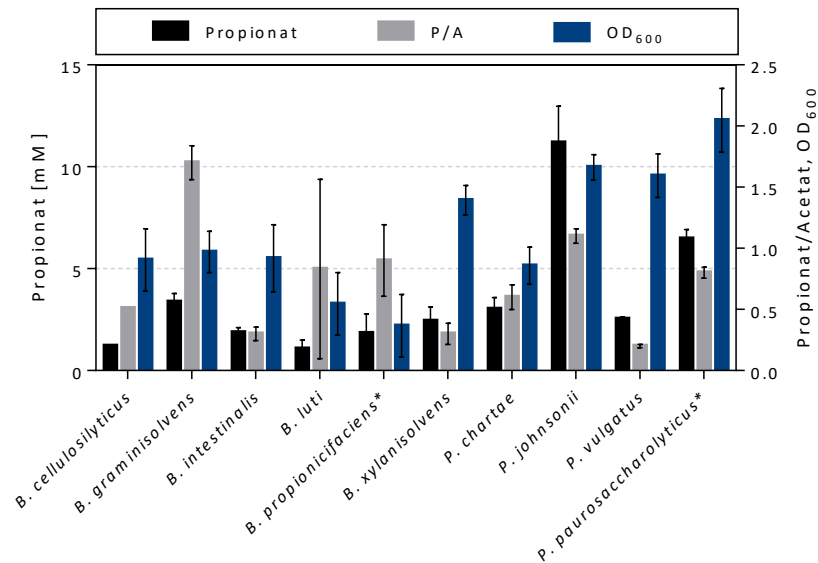


Abbildung 4.1: Wachstum und Propionatproduktion von zehn *Bacteroidota* Stämmen. Die Stämme wurden bis zu 72 h bei 30 °C (*) bzw. 37 °C in 5 ml PYHVG-Medium inkubiert (Gasatmosphäre N₂/CO₂; 80 %/ 20 %; v/v). Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der OD₆₀₀ und der Produktbildung. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. P/A, molares Verhältnis Propionat zu Acetat.

4.2.2 Wachstum in definiertem Medium

Als nächstes wurde das Wachstum im definierten Medium getestet. Im Vergleich zum Wachstum auf PYHVG wuchs *P. johnsonii* innerhalb von 72 h bis zu einer deutlich geringeren OD₆₀₀ von $0,67 \pm 0,14$ (Abbildung 4.2). Zu diesem Zeitpunkt waren noch immer rund 5 mM Glucose nachweisbar, was vermuten lässt, dass andere Parameter oder Nährstoffe limitierend waren. Im Vergleich zum Wachstum auf komplexem Medium produzierte der Stamm deutlich weniger Propionat, sodass ein P/A-Verhältnis von nur 0,45 mol_P/mol_A erzielt wurde, welches im Komplexmedium doppelt so hoch war. *P. johnsonii* produzierte außerdem Succinat in ähnlichen Konzentrationen wie Propionat. Das Wachstum der Art *B. graminisolvens* wurde durch die Zusammensetzung des DMMG-Mediums nicht limitiert, da die Glucose bereits nach 24 h Inkubation vollständig aufgebraucht war und nach diesem Zeitpunkt keine weiteren Änderungen der Produktkonzentrationen erfasst wurden. Das P/A-Verhältnis war aber ebenso deutlich verringert (0,75 mol_P/mol_A). Neben Acetat produzierte das Bakterium Succinat und Formiat in größeren Mengen.

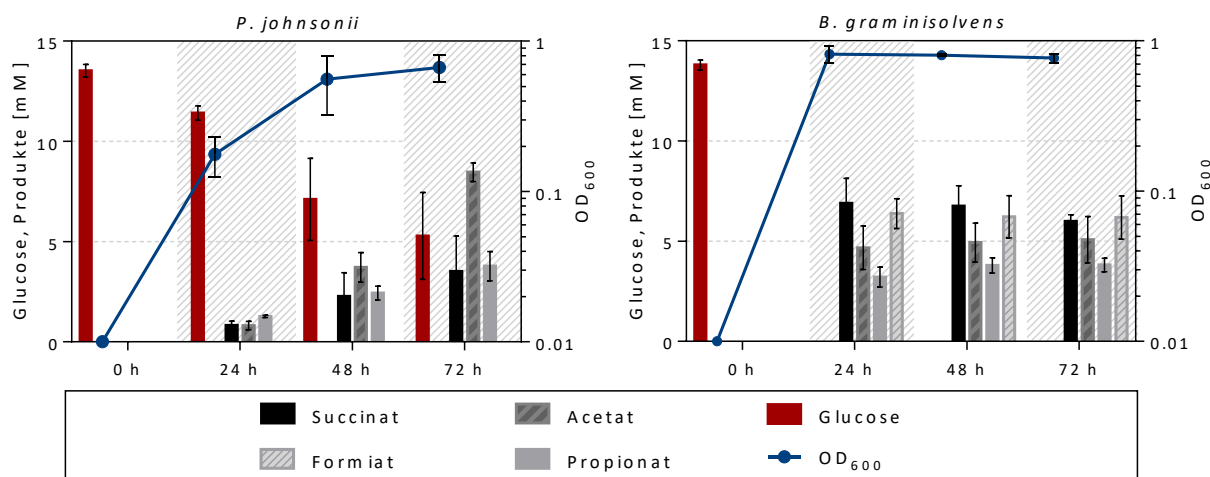


Abbildung 4.2: Wachstum und Produktbildung von *P. johnsonii* und *B. graminisolvans* in DMMG. Die Kulturen (Start OD₆₀₀ = 0,01) wurden in 40 ml DMMG-Medium mit 10 x Wolin-Lösung für 72 h bei 37 °C inkubiert (Gasatmosphäre N₂/CO₂; 80 %/ 20 %; v/v). Alle 24 h erfolgte die Messung der OD₆₀₀ und die Probenahme zur Produktbestimmung mittels HPLC. Mittelwerte und Standardabweichung der OD₆₀₀ und Produktkonzentrationen von 3 biologischen Replikaten sind gezeigt.

4.2.3 Einfluss der Vitamin- und Glucosekonzentration auf das Wachstum im Mineralmedium

Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) ist ein Co-Faktor der Methylmalonyl-CoA-Mutase und hat einen positiven Einfluss auf die Propionatproduktion in *Bacteroidota* (Varel und Bryant, 1974). Um den Einfluss dieses Vitamins auf das Wachstum und die Produktbildung von *P. johnsonii* und *B. graminisolvans* zu testen, wurde ein Wachstumsversuch im 24-Well-Format durchgeführt. Das DMMG-Medium mit der 10 x Wolin-Lösung enthielt bereits 1 ng/ml B₁₂. Durch die Zugabe einer Vitamin-B₁₂-Lösung wurde die Konzentration auf bis zu 41 ng/ml erhöht. Dies hatte auf beide Stämme unterschiedliche Auswirkungen (Abbildung 4.3). In *P. johnsonii*-Kulturen zeigte sich eine deutliche Steigerung der maximalen OD₆₀₀ von $0,34 \pm 0,01$ (1 ng/ml) auf $0,65 \pm 0,06$ (21 ng/ml). Eine weitere Steigerung führte jedoch zu keinem weiteren Unterschied. In Kulturen von *B. graminisolvans* konnte kein Effekt auf das Wachstum beobachtet werden. Die Produktbildung wurde in *P. johnsonii* nur geringfügig beeinflusst. Zwar bewirkte die Erhöhung der B₁₂-Konzentration von 1 auf 5 ng/ml einen Anstieg der Gesamtkonzentration der Produkte (+4,4 mM) und des Propionat/Succinat-(P/S)-Verhältnisses (+0,9 mol_P/mol_S), der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Außerdem fiel der Effekt bei größeren Mengen B₁₂ geringer aus. Die übrigen Produktverhältnisse wurden nicht beeinflusst. In *B. graminisolvans* war eine deutlichere Wirkung erkennbar. Die Gesamtmenge an Produkten lag bei allen Stufen zwischen 24,0 und 22,4 mM. Besonders die P/S-Verhältnisse stiegen ab einer B₁₂-Konzentration von 9 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Mit 21 ng/ml B₁₂ stieg das Verhältnis auf 1,7 mol_P/mol_S. Dies bewirkte auch einen Anstieg des Propionat/Acetat-(P/A)-Quotienten mit zunehmender B₁₂-Konzentration. Auch der Anstieg des Succinat+Propionat/Acetat-(PS/A)-Verhältnisses im Medium mit 41 ng/ml B₁₂ (Anstieg um 1,9 mol_{PS}/mol_A) war signifikant. Der Effekt fiel allerdings geringer aus als bei den anderen Produktverhältnissen und war bei geringeren B₁₂ Konzentrationen nicht signifikant. Die Anwesenheit von B₁₂ hatte also hauptsächlich eine vermehrte

Umwandlung von Succinat zu Propionat zur Folge und einen geringen Effekt auf das Verhältnis zwischen reduzierten und oxidierten Produkten.

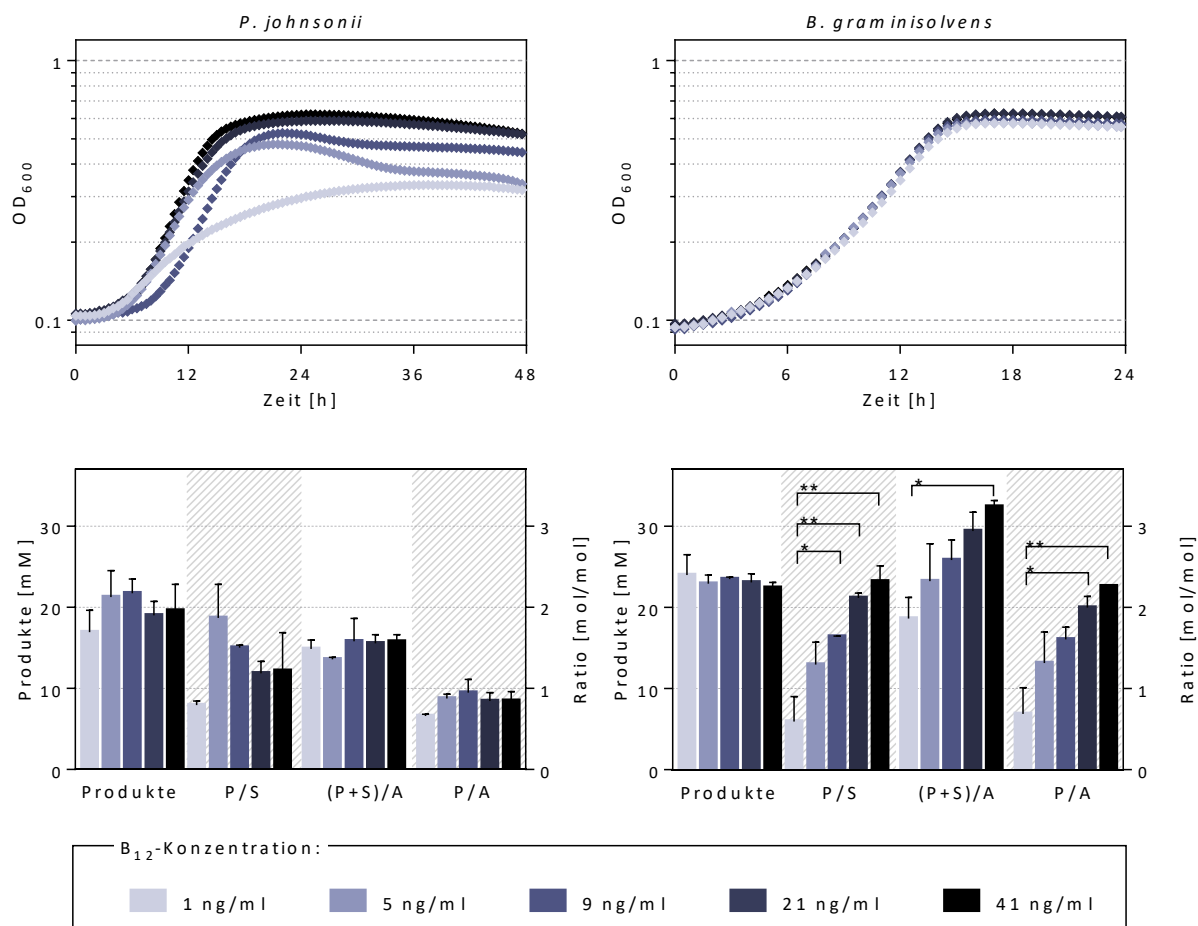


Abbildung 4.3: Einfluss von B₁₂ auf Wachstum und Produktbildung von *P. johnsonii* und *B. graminisolvans*. je 1 ml Kultur (Start OD₆₀₀ 0,02) wurden bei 37 °C in 24-Well-Platten für bis zu 48 h inkubiert (Gasatmosphäre N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Das Medium bestand aus DMMG, dem zusätzlich B₁₂ hinzugefügt wurde. Zum Start und Ende der Messung wurden Produktkonzentrationen mit HPLC bestimmt. Eine repräsentative Kurve sowie Mittelwert und Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten sind dargestellt. A, Acetat; P, Propionat; S, Succinat. Der Signifikanzwert wurde mittels einfaktorieller ANOVA ermittelt (nicht signifikant, $p > 0.05$; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,005$).

Wurde B₁₂ als einziges B-Vitamin in einer Konzentration von 20 ng/ml zum Medium hinzugegeben, war die Propionatproduktion in *B. graminisolvans* verringert, was durch die Verringerung der P+S/A- und P/S-Verhältnisse um 1,2 und 1,9 mol_P/mol_S zu sehen ist (Abbildung A1). Dieser Effekt konnte bei *P. johnsonii* nicht beobachtet werden, was zeigt, dass dieser Stamm entweder einen anderen Nährstoffbedarf hat oder die erforderlichen Co-Faktoren selbst produzieren kann. Das Wachstum wurde jedoch bei beiden Spezies nicht beeinflusst. Weiterhin machte es auch keinen Unterschied, welche der zwei Vitaminlösungen verwendet wurde. Entsprechend der Ergebnisse wurden alle folgenden Kultivierungen in DMMG-Medium mit 5 x Wolin-Lösung und zusätzlichem B₁₂ durchgeführt, sodass dessen Konzentration 21 ng/ml betrug.

Als nächstes sollte getestet werden, wie viel Glucose von den Zellen metabolisiert werden kann, bis beispielsweise ein fallender pH inhibierend wirkt. Dazu wurden Wachstumsversuche beider Stämme mit steigenden Glucosekonzentrationen durchgeführt. In Abbildung 4.4 sind die Produktkonzentrationen gezeigt. Bei *P. johnsonii* ist zu sehen, dass die Glucose in den Kulturen mit initial über 50 mM nicht vollständig konsumiert wurde ($7,6 \pm 1,5$ bzw. $31,7 \pm 1,5$ mM Endkonzentration), was einem Verbrauch von 42,4 und 43,3 mM entspricht. Die Produktkonzentrationen stiegen an, jedoch änderten sich die Verhältnisse. Acetat, Propionat und Succinat waren bei initial 15 und 25 mM Glucose die Hauptprodukte. Bei 15 mM wurden sie in Mengen von 6,1 bis 7,8 mM produziert. Während sich die Konzentrationen von Acetat und Propionat bei 40 mM Glucose auf $19,1 \pm 0,6$ und $20,1 \pm 1,2$ mM erhöhten, stieg Succinat nur auf $12,1 \pm 0,4$ mM. Ab 40 mM Glucose kam es auch zur Lactatproduktion ($19,1 \pm 0,8$ mM).

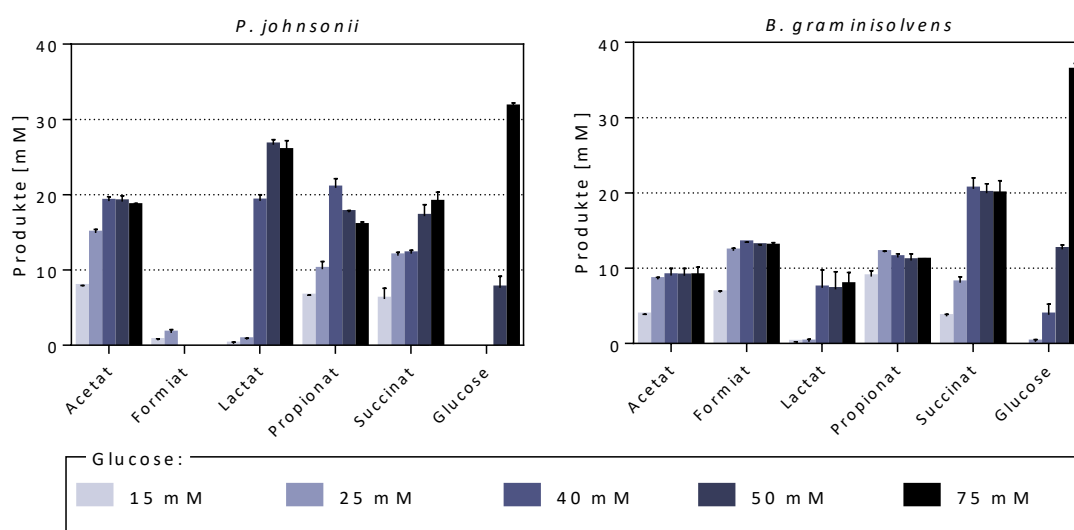


Abbildung 4.4: Produktbildung von *P. johnsonii* und *B. graminisolvans* bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen. Die Zellen wurden im Plattenlesegerät in DMMG mit unterschiedlichen initialen Glucosekonzentrationen bei 37 °C für 48 h (*P. johnsonii*) bzw. 24 h (*B. graminisolvans*) in 24-Well-Platten (je 1 ml Kultur) inkubiert (Gasatmosphäre N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Im Anschluss folgte die Bestimmung der Produkte mit HPLC. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Bei weiterer Steigerung der initialen Glucosekonzentrationen auf 50 mM stieg auch die Lactatkonzentration auf $26,6 \pm 0,6$ mM. *B. graminisolvans* verstoffwechselte weniger. Bereits bei 40 mM blieb Glucose im Medium zurück, sodass der maximale Verbrauch zwischen 36,2 und 38,3 mM betrug. Ebenso ist zu erkennen, dass sich die Produktkonzentrationen ab 40 mM nicht weiter steigern ließen. Interessanter Weise erhöhte sich Propionat auch bei einer Steigerung der initialen Glucosekonzentration von 15 auf 25 mM nur schwach ($8,9 \pm 0,8$ auf $12,1 \pm 0,2$ mM), wohingegen ein deutlicher Anstieg von Succinat und die Produktion von Lactat beobachtet werden konnten. Der pH am Ende der Kultivierung änderte sich mit der initialen Glucosekonzentration (Tabelle A9). In den 15 mM-Kulturen lag er in *P. johnsonii* bei 7,1 und in *B. graminisolvans* bei 7,0. Mit zunehmender Substratverfügbarkeit stieg die Säureproduktion, was zu einem stärkeren Absinken des pH führte. Die Kulturen, die einen Überschuss an Glucose enthielten, erreichten ähnliche Werte. So lagen sie bei

P. johnsonii in den 50- und 75-mM-Ansätzen bei 5,3 und 5,2. Kulturen von *B. graminisolvens* mit 40 mM oder mehr erreichten zwischen 5,0 und 5,1.

Zusammenfassend konnten folgende Erkenntnisse bezüglich optimaler Kultivierungsbedingungen gewonnen werden: Eine B₁₂-Konzentration von 21 ng/ml war ausreichend, um die Propionatproduktion in *B. graminisolvens* gegenüber Succinat und Acetat zu steigern, und hatte in *P. johnsonii* einen wachstumsfördernden Effekt. Die Vitamine, die sowohl in der Wolin- als auch der Vitamin-B-Lösung enthalten waren, hatten einen positiven Effekt auf die Propionatbildung von *B. graminisolvens*. Sie beeinflussten jedoch weder das Wachstum der beiden Spezies noch die Produktbildung von *P. johnsonii*. Eine Steigerung der Glucosekonzentration führte in beiden Stämmen zu inhibitorischen Effekten vermutlich durch den stark fallenden pH. Zusätzlich bildeten beide Stämme dann vermehrt Lactat und die Propionatbildung ließ sich nicht verhältnismäßig steigern. Da die zehn untersuchten Stämme unterschiedliche pH-Minima aufweisen (Tabelle A10), sollte der pH-Abfall während der Kultivierung möglichst geringgehalten werden. Aus diesem Grund wurden für vergleichende Untersuchungen ohne pH-Kontrolle weiterhin 15 mM Glucose eingesetzt. Außerdem wurde dem DMMG-Medium Wolin-Lösung mit zusätzlichem B₁₂ hinzugefügt, sodass eine Konzentration von 21 ng/ml erreicht wurde.

4.3 Propionatbildung der *Bacteroidia*

Wie im Punkt 4.2 gezeigt, können Wachstum und Produktspektren maßgeblich durch die Zusammensetzung des Mediums beeinflusst werden. Dementsprechend sollte ein Vergleich der Propionatbildung mit einheitlichen Kultivierungsbedingungen stattfinden. Um zu verhindern, dass einzelne Stämme durch eine Nährstofflimitierung beeinflusst werden, wurden sie sowohl in definiertem (DMMG) als auch komplexem (DMMG-H) Medium kultiviert. Es wurden Wachstumsversuche aller Stämmen in 48-Well-Platten durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte über 24 Stunden mit Probennahme in der stationären Phase. Lediglich bei den Kulturen von *B. propionificiens* musste die Kultivierungsdauer auf 45 Stunden verlängert werden, da das Wachstum in DMMG bis ca. 38 Stunden andauerte und nach 24 Stunden noch immer fast 11 mM Glucose vorhanden waren (Abbildung A2). Die Wachstumskurven sind in Abbildung 4.5 dargestellt und die Wachstumsparameter in Tabelle A11. Es wurde eine breite Variabilität im Wachstum der Stämme beobachtet. Das schnellste Wachstum sowohl in DMMG als auch DMMG-H zeigte *B. xylanisolvens* ($0,5 \pm 0,08$ bzw. $0,61 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) und die höchste OD_{max} wurde von *P. paurosaccharolyticus* erreicht ($0,90 \pm 0,00$ bzw. $0,92 \pm 0,00$).

Die OD_{max} wurde nur bei *P. johnsonii* und *B. propionificiens* durch die Zugabe von Hefeextrakt beeinflusst, sie erhöhte sich jeweils um 0,08 im Vergleich zu DMMG. Während die Wachstumsraten von *B. graminisolvens* ($0,27 \pm 0,02$ bzw. $0,28 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$) und *B. luti* ($0,16 \pm 0,02$ bzw. $0,16 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) nicht von Medium abhängig waren, waren die Unterschiede bei anderen Stämmen deutlicher. *B. propionificiens*, welches bei beiden Kultivierungsbedingungen die geringste Wachstumsrate zeigte, wuchs in DMMG-H schneller ($0,14 \text{ h}^{-1}$) als in DMMG ($0,09 \text{ h}^{-1}$). Hinzu kam noch eine verlängerte Lag-Phase (Abbildung A2), weswegen die OD_{max} erst ca. 17 h später erreicht wurde.

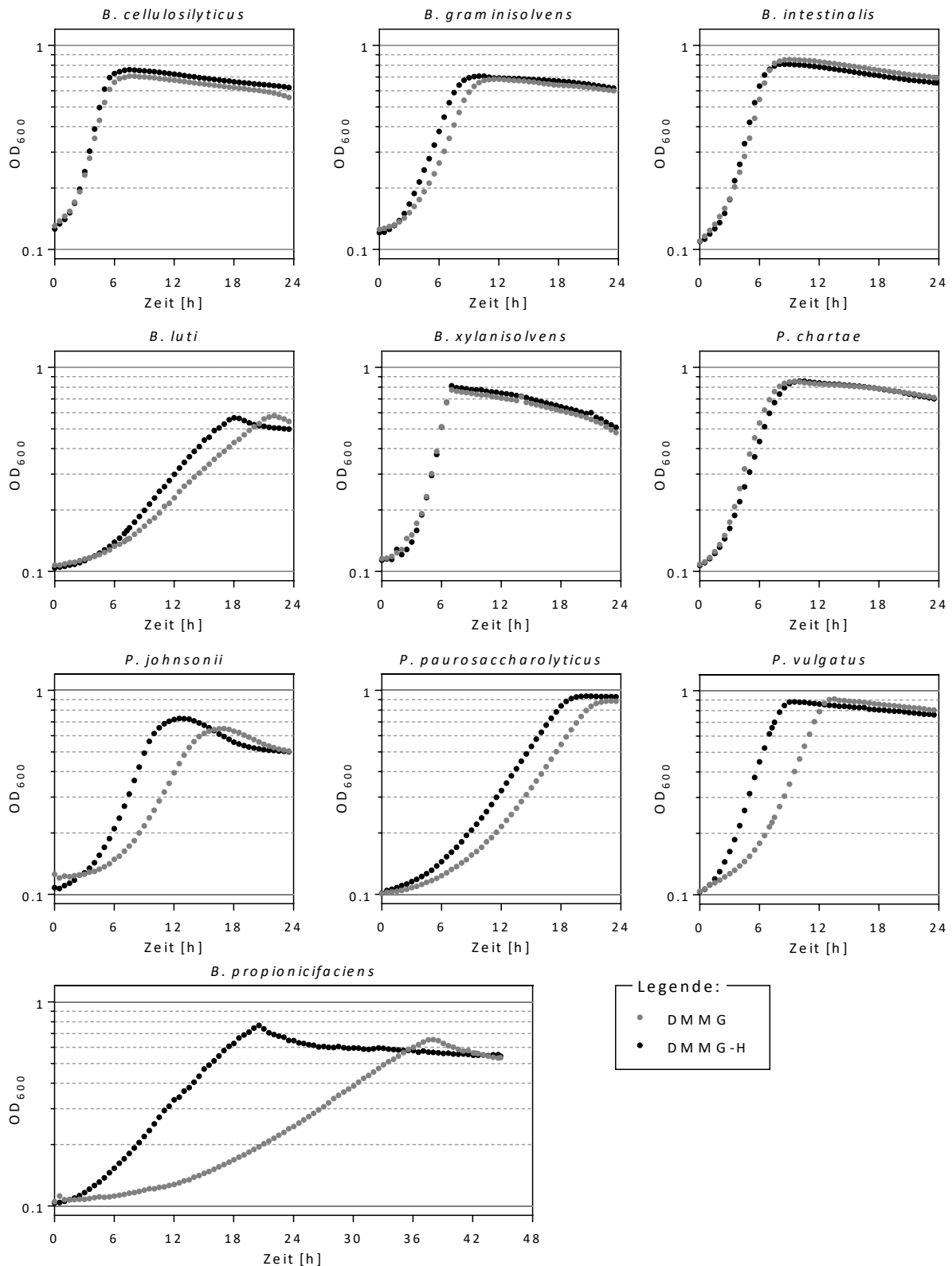


Abbildung 4.5: Wachstum verschiedener *Bacteroidia*-Spezies in DMMG und DMMG-H. Die Bakterien wurden 24 bzw. 45 h (*B. propionificaciens*) in 48-Well-Platten (je 2x 500 µl Kultur, initiale OD₆₀₀ von 0,02) in DMMG oder DMMG-H (+0,5 g/l Hefeextrakt) kultiviert. Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Gezeigt ist je eine repräsentative Wachstumskurve von 3 biologischen Replikaten.

Weiterhin wurden die Produktkonzentrationen am Ende der Kultivierung bestimmt (Tabelle 4.1, Tabelle 4.2). Die Zugabe von Hefeextrakt hatte nur einen geringen Einfluss auf die Produktbildung, da die Differenz zwischen beiden Bedingungen meist unter 1 mM lag. Eine Ausnahme war die Propionatproduktion von *B. propionificiens*, wo der Unterschied 1,1 mM betrug. Es bestand eine größere Variabilität zwischen den Spezies. Die Haupt-Fermentationsprodukte waren Acetat, Propionat und Succinat. Weiterhin wurde fast in allen Kulturen Formiat nachgewiesen. Die Hälfte der Stämme produzierte zusätzlich geringe Mengen Lactat, die außer bei *B. luti*, 1 mM nicht überschritten. *B. propionificiens* war der einzige Stamm, der in DMMG nur Acetat ($6,1 \pm 0,2$ mM) und Propionat ($12,7 \pm 0,5$ mM) bildete. In DMMG-H wurden zusätzlich geringe Mengen Formiat detektiert ($1,0 \pm 0,15$ mM), aber mit $13,8 \pm 0,32$ mM auch die höchste Propionatkonzentration aller getesteten Bakterien. *B. luti* zeigte die geringste Propionatbildung ($2,3 \pm 0,05$ bzw. $2,1 \pm 0,4$ mM) und die höchste Succinatproduktion mit $6,8 \pm 0,2$ mM (DMMG) und $7,8 \pm 0,9$ mM (DMMG-H).

Tabelle 4.1: Fermentationsprodukte verschiedener *Bacteroides* sp.. Die Stämme wurden für 24 h (*B. propionificiens* für 45 h) im 48-Well-Platten (je 2 x 500 µl Kultur, initiale OD₆₀₀ von 0,02) in DMMG (-) bzw. DMMG-H (+) kultiviert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Am Anfang und Ende wurden Produktkonzentrationen mit HPLC bestimmt (n = 3).

Produkte [mM]						
Hefeextrakt [+/-]	<i>B. ce.</i> CRE21	<i>B. gra.</i> XDT-1	<i>B. int.</i> 341	<i>B. luti</i> UasXn-3	<i>B. xylan.</i> XB1A	<i>B. pro.</i> SV434
Propionat						
-	$3,1 \pm 0,09$	$8,0 \pm 0,40$	$3,2 \pm 0,17$	$2,3 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,15$	$12,7 \pm 0,50$
+	$3,6 \pm 0,16$	$8,8 \pm 0,15$	$3,8 \pm 0,16$	$2,1 \pm 0,44$	$2,8 \pm 0,07$	$13,8 \pm 0,32$
Acetat						
-	$8,0 \pm 1,01$	$3,2 \pm 0,12$	$8,4 \pm 0,43$	$10,3 \pm 0,77$	$8,1 \pm 0,41$	$6,1 \pm 0,21$
+	$7,9 \pm 0,33$	$3,5 \pm 0,35$	$8,5 \pm 0,59$	$11,0 \pm 0,71$	$8,4 \pm 0,05$	$6,8 \pm 0,22$
Succinat						
-	$2,7 \pm 0,51$	$3,8 \pm 0,29$	$3,1 \pm 0,16$	$6,8 \pm 0,19$	$4,4 \pm 0,32$	$0,0 \pm 0,00$
+	$3,3 \pm 0,23$	$3,7 \pm 0,31$	$3,2 \pm 0,20$	$7,8 \pm 0,94$	$5,0 \pm 0,14$	$0,0 \pm 0,00$
Lactat						
-	$0,4 \pm 0,57$	$0,0 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,19$	$1,5 \pm 0,46$	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
+	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,2 \pm 0,21$	$0,7 \pm 0,92$	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$
Formiat						
-	$0,2 \pm 0,22$	$5,9 \pm 0,22$	$1,7 \pm 0,96$	$4,7 \pm 0,34$	$0,5 \pm 0,13$	$0,0 \pm 0,00$
+	$0,2 \pm 0,06$	$6,4 \pm 0,59$	$2,0 \pm 0,93$	$5,1 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,31$	$1,0 \pm 0,15$
Ausbeute [gP/gG]						
-	$0,09 \pm 0,00$	$0,23 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,00$
+	$0,10 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,00$	$0,39 \pm 0,01$
Molares Verhältnis P/S [molP/molS]						
-	1,2	2,2	1,1	0,3	0,6	-
+	1,1	2,4	1,2	0,3	0,6	-
Molares Verhältnis (P+S)/A [(mol_P)/mol_A]						
-	0,7	3,7	0,8	0,9	0,8	2,1
+	0,9	3,7	0,8	0,9	0,9	2,0

Das höchste P/S-Verhältnis betrug 2,2 bzw. 2,4 und wurde in *B. graminisolvans* gemessen, welches außerdem in beiden Medien die zweithöchste Propionatkonzentration ($8,0 \pm 0,4$ bzw. $8,8 \pm 0,2$ mM) erreichte. Auffällig war bei diesem Bakterium, dass fast doppelt so viel Formiat ($5,9 \pm 0,2$ bzw. $6,4 \pm 0,6$ mM) wie Acetat gebildet wurde ($3,2 \pm 0,1$ bzw. $3,5 \pm 0,4$ mM). Dieser Stamm erreichte auch das höchste Verhältnis von Propionat und Succinat zu Acetat von jeweils 3,7 in beiden Medien. Obwohl *P. johnsonii* in den ersten Untersuchungen im Komplexmedium die beste Propionatproduktion zeigte, produzierte es im definierten Medium nur $5,0 \pm 0,6$ mM (Tabelle 4.2) und erreichte damit nur die vierthöchste Propionatkonzentration unter den getesteten Bakterien. Auch mit 0,5 g/l Hefeextrakt konnte es maximal $6,4 \pm 0,3$ mM Propionat produzieren. Das weist darauf hin, dass *P. johnsonii* die Aminosäuren aus dem Komplexmedium zu Propionat verstoffwechselt haben könnte. Da es das Ziel dieser Arbeit war Propionatproduzenten zu finden, die die Säure aus Polysacchariden produzieren und nicht aus Aminosäuren, wurde dieser Organismus nicht weiter untersucht.

Tabelle 4.2: Fermentationsprodukte von je zwei *Parabacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies. Die Stämme wurden für 24 h im 48-Well Format in DMMG (-) bzw. DMMG-H (+) kultiviert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Am Anfang und Ende wurden Produktkonzentrationen mittels HPLC bestimmt (n = 3).

Produkte [mM]				
Hefeextrakt [+/-]	<i>P. chartae</i> NS31-3	<i>P. johnsonii</i> M-165	<i>P. paurosaccharolyticus</i> WK042	<i>P. vulgatus</i> ATCC 8482
Propionat				
-	$6,4 \pm 0,31$	$5,0 \pm 0,62$	$4,1 \pm 0,35$	$3,4 \pm 0,40$
+	$4,9 \pm 1,10$	$6,4 \pm 0,24$	$5,0 \pm 0,21$	$4,0 \pm 0,04$
Acetat				
-	$7,7 \pm 0,08$	$6,7 \pm 0,92$	$5,6 \pm 0,47$	$9,9 \pm 0,51$
+	$7,9 \pm 0,14$	$7,5 \pm 0,36$	$6,0 \pm 0,20$	$10,2 \pm 0,37$
Succinat				
-	$3,5 \pm 0,22$	$3,6 \pm 0,60$	$3,7 \pm 0,30$	$3,7 \pm 0,35$
+	$3,7 \pm 0,57$	$3,0 \pm 0,17$	$4,0 \pm 0,35$	$4,2 \pm 0,35$
Lactat				
-	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,5 \pm 0,09$	$0,0 \pm 0,00$
+	$0,2 \pm 0,21$	$0,0 \pm 0,00$	$0,6 \pm 0,05$	$0,0 \pm 0,00$
Formiat				
-	$4,0 \pm 0,46$	$0,3 \pm 0,21$	$0,9 \pm 0,46$	$1,1 \pm 0,14$
+	$4,4 \pm 0,20$	$0,4 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,40$	$1,1 \pm 0,07$
Ausbeute [gP/gG]				
-	$0,16 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,01$
+	$0,13 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,00$	$0,14 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$
Molares Verhältnis P/S [mol_P/mol_S]				
-	1,9	1,4	1,1	0,9
+	1,4	2,2	1,3	0,9
Molares Verhältnis (P+S)/A [(mol_{PS})/mol_A]				
-	1,3	1,3	1,4	0,7
+	1,1	1,3	1,5	0,8

Insgesamt erzielte *B. propionificaciens* die geringste Wachstumsrate, die auch durch Zugabe von Hefeextrakt nur geringfügig gesteigert werden konnte. Trotzdem produzierte es die größte Menge Propionat und vergleichsweise wenig Nebenprodukte. *B. graminisolvens* wuchs deutlich schneller und die Wachstumsrate erreichte im Minimalmedium die gleichen Werte wie in DMMG-H. Dieser Stamm hatte ein besonderes Produktspektrum (Tabelle 4.1). Obwohl er die zweithöchste Propionatkonzentration erreichte, wurden relativ große Mengen anderer Säuren detektiert. Besonders die hohen Formiatkonzentrationen im Vergleich zu Acetat werfen Fragen zum Stoffwechsel dieses Stammes auf. Diese zwei Spezies wurden in der weiteren Arbeit näher untersucht. *P. johnsonii*, welches hohe Propionatkonzentrationen im PYHVG erzeugt hatte (Abschnitt 4.2.1), wurde nicht weiter untersucht, da es in auch mit Zugabe von Hefeextrakt vergleichsweise schlecht wuchs und nur geringe Mengen Propionat produzierte.

4.4 Einfluss von Kohlenstoffdioxid auf Wachstum und Produktbildung

CO₂ ist ein wichtiges Stellglied im Metabolismus Propionat bildender *Bacteroidota*, da es im Laufe des Stoffwechsels assimiliert und wieder freigesetzt wird. Daher sollte überprüft werden, welchen Einfluss CO₂ auf die zwei ausgewählten Spezies hat. Um die CO₂-Konzentration im Kulturgefäß exakt einzustellen, wurde das Medium, welches auf dem DMMG-Medium basierte, nur mit Stickstoff begast und die CO₂-Konzentration über die NaHCO₃-Konzentration eingestellt. HCO₃⁻ und Protonen können Kohlensäure bilden, welche in CO₂ und H₂O dissoziieren kann. Somit stehen HCO₃⁻ und CO₂ in einem chemischen Gleichgewicht (Pines *et al.*, 2016). Um den pH konstant zu halten enthielt das Medium außerdem zusätzlichen Puffer (Abschnitt 3.5.2). Den Kulturen von *B. propionificaciens* wurde außerdem 0,5 g/l Hefeextrakt hinzugefügt, um das Wachstum zu beschleunigen. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Verringerung des CO₂-Gehaltes zu einer Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit in *B. graminisolvens* führte. Während die Wachstumsrate in Medium mit 50 mM NaHCO₃ ($0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$) noch annähernd der in DMMG entsprach ($0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$), verringerte sie sich bereits bei 20 mM NaHCO₃ auf $0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. Mit 5 mM NaHCO₃ lag sie bei $0,04 \pm 0,01$. Ohne NaHCO₃, war kaum ein Anstieg der OD₆₀₀ erkennbar (Wachstumsrate $0,009 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$). Bei allen Kulturen, die die stationäre Phase erreicht hatten, lag die finale OD₆₀₀ zwischen $1,41 \pm 0,03$ und $0,98 \pm 0,04$. Das Wachstum von *B. propionificaciens* wurde von der CO₂-Konzentration schwächer beeinflusst. In DMMG-H und mit 50 mM NaHCO₃ waren die Wachstumsraten fast identisch ($0,20 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ in DMMG-H bzw. $0,17 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ in 50 mM NaHCO₃). Doch auch im Medium ohne NaHCO₃ war die Wachstumsgeschwindigkeit nur geringfügig verringert im Vergleich zum DMMG-H ($0,13 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$). Alle Kulturen erreichten in dem gewählten Zeitraum die stationäre Phase und die finale OD₆₀₀ lag zwischen $0,84 \pm 0,03$ und $0,96 \pm 0,02$.

Auch die Produktbildung von *B. graminisolvens* wurde durch den CO₂-Gehalt des Mediums beeinflusst. Ohne CO₂ waren zum Ende des Versuchs noch immer $11,6 \pm 0,4 \text{ mM}$ von anfänglich $13,9 \pm 0,3 \text{ mM}$ Glucose vorhanden und kaum Produkte entstanden. Auch in den Kulturen mit verringerter NaHCO₃-Zugabe, wurden alle Säuren in geringeren Konzentrationen gemessen. Eine Ausnahme bildete Lactat. Es erreichte seine höchste Konzentration von $10,7 \pm 0,3 \text{ mM}$ in Medium 5 mM mit NaHCO₃ und die geringste ($1,7 \pm 0,1 \text{ mM}$) mit 50 mM NaHCO₃. In DMMG wurde jedoch kein Lactat gebildet. Die Propionatausbeute verringerte sich somit von $0,15 \text{ g/g}_G$ (DMMG) auf $0,11 \text{ g/g}_G$ (5 mM NaHCO₃).

Auffällig waren auch die niedrigen P/S-Werte. Während sie im Plattenleser (Versuch 4.3) bei *B. graminisolvans* 2,2 mol_P/mol_S betrugen, war der höchste erreichte Wert den Hungate-Röhrchen 1,1 mol_P/mol_S (5 mM NaHCO₃). Er verringerte sich mit zunehmendem CO₂-Gehalt noch bis auf 0,7 mol_P/mol_S (50 mM NaHCO₃). Diese Verringerung war signifikant (einfaktorielle ANOVA, $p \leq 0,0005$), was zeigt, dass CO₂ einen Einfluss auf die Konvertierung von Succinat zu Propionat hatte.

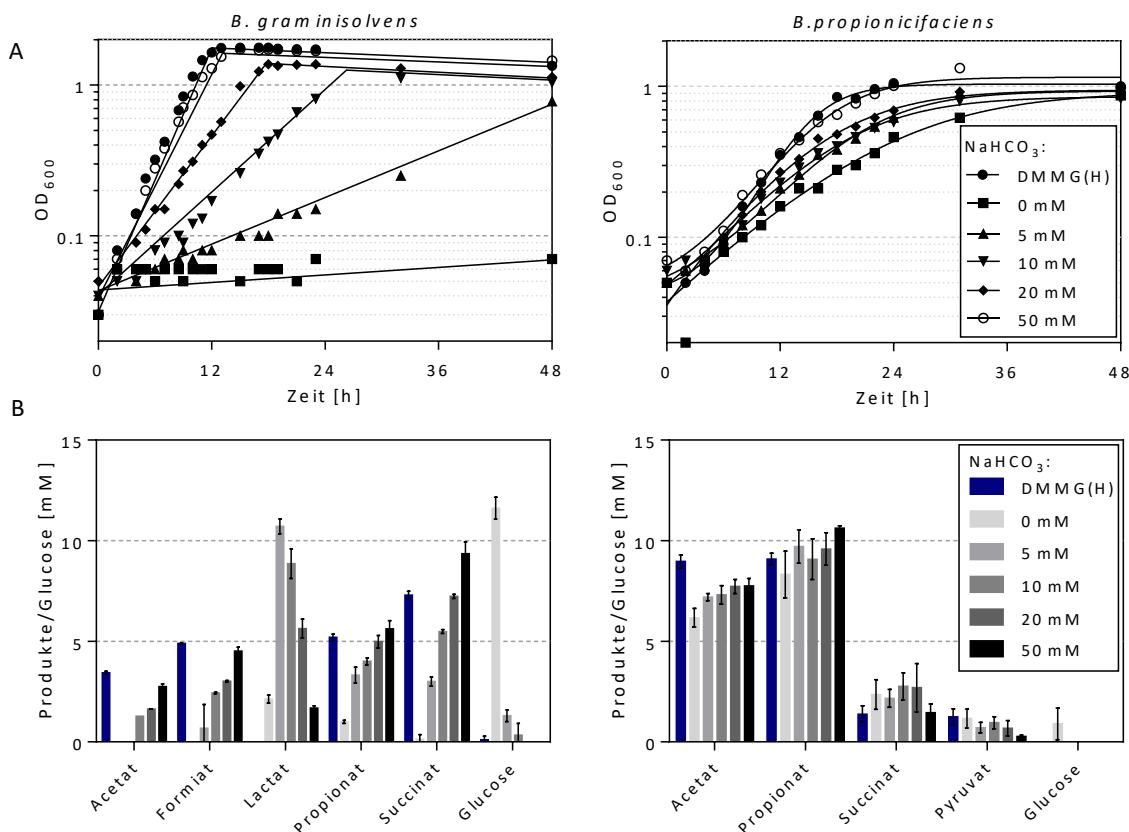


Abbildung 4.6: Einfluss von CO₂ auf Wachstum (A) und Produktbildung (B) von *Bacteroides*. *B. graminisolvans* und *B. propionificaciens* wurden über 48 h in 10 ml DMMG und DMMG mit definierten NaHCO₃-Konzentrationen kultiviert (Gasatmosphäre: N₂, 100 %, zusätzlich 50 mM MOPS-Puffer). Den Kulturen von *B. propionificaciens* wurde zusätzlich 0,5 g/l Hefeextrakt hinzugefügt. Die Produkt- und Substratkonzentrationen wurden am Anfang und Ende des Versuchs über HPLC bestimmt. Gezeigt sind jeweils eine repräsentative Wachstumskurve sowie Mittelwerte der Produktkonzentrationen mit Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

B. propionificaciens produzierte in allen Kultivierungsbedingungen Acetat, Propionat, Succinat und geringe Konzentrationen Pyruvat. Die Kultur ohne CO₂/NaHCO₃ war die einzige, in der Glucose am Ende der Kultivierung festgestellt werden konnte ($0,9 \pm 0,6$ mM). Der Einfluss von CO₂ fiel deutlich geringer aus als bei *B. graminisolvans*. Es gab einen leichten Anstieg von Succinat um 0,7 mM aber eine Verringerung von Propionat um 0,9 mM und Acetat um 0,6 mM im Vergleich von 50 zu 5 mM NaHCO₃, die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA, $p > 0,05$). Insgesamt wurden Propionatausbeuten zwischen 0,25 und 0,31 g_P/g_G erreicht, wobei der höchste Wert im 50 mM Ansatz gemessen wurde und der geringste in DMMG-H. Zwar waren die P/S-Werte bei 50 mM NaHCO₃ gesteigert ($7,6 \pm 1,6$ mol_P/mol_S) im Vergleich zu 5 mM ($4,7 \pm 1,1$ mol_P/mol_S), jedoch war der Effekt

nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA, $p > 0,05$). Im Fall von *B. propionificiens* wurde die Propionatproduktion also durch die CO₂-Zugabe nicht beeinflusst. Deutlicher zeigte dieser Versuch daher die Verringerung des P/S-Verhältnisses in Röhrchen im Vergleich zur offenen Kultivierung im 48-Well Format im Anaerobenzelt (4.3), welche bei beiden Spezies beobachtet werden konnte.

4.5 Untersuchung des Stoffwechsels

4.5.1 Genetische Ausstattung ausgewählter *Bacteroidota*

B. graminisolvens und *B. propionificiens* zeigten deutliche Unterschiede in Nährstoffbedarf und Produktbildung. Eine Suche nach den für die zentralen Stoffwechselenzyme codierenden Genen sollte aufklären, ob diese Unterschiede auf genetischer Ebene verankert sind. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen charakterisierter Enzyme durch Blastn-Analyse mit den Gensequenzen von zwei vollständigen Genomen der zwei Stämme abgeglichen (3.6). Darüber hinaus wurde eine speziesspezifische Suche nach Proteinen (BlastP-Analyse) aller hier untersuchten *Bacteroidia*-Spezies durchgeführt. Die Ergebnisse der Genomanalyse wurden bereits publiziert. Die entsprechenden Rohdaten können in den Tabellen S4 und S5 der Publikation eingesehen werden (Döring und Basen, 2024). Die Ergebnisse der Blastp- und Blastn-Analyse, sowie Informationen zu den genutzten Referenzproteinen sind in Tabelle A12 zusammengefasst. Abbildung 4.7 zeigt die Daten aus der Stammspezifischen Blastn-Analyse. Es sind die Enzymreaktionen gezeigt, die aufgrund des Vorhandenseins ihrer entsprechenden Gene in den Organismen ablaufen können. Dabei wurden Gene für Enzyme, die mit einem orangen Pfeil markiert sind, nur im Genom von *B. graminisolvens* identifiziert.

Beide Spezies besitzen die genetischen Grundlagen für den Ablauf der Glykolyse, in der Glucose über GAP und DHAP zu PEP und dann Pyruvat umgewandelt wird. Weiterhin konnten auch Übereinstimmungen mit allen Genen gefunden werden, die für den oxidativen Anteil des Pentosephosphatwegs (PPP) notwendig sind. Dazu gehören die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*, EC:1.1.1.49), die 6-Phosphogluconolactonase (*pgl*, EC:3.1.1.31) und die Phosphogluconat-Dehydrogenase (*gnd*, EC:1.1.1.44). Durch ihr Zusammenwirken werden pro Mol Glucose-6-Phosphat (G6P), ein Mol CO₂ freigesetzt und zwei Mol NADP⁺ zu NADPH + H⁺ reduziert. Das dabei entstandene Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) kann dann über die Ru5P-Epimerase (*rpe*, EC:5.1.3.1) und Ribose-5-Phosphat-Isomerase (*rpiB*, EC:5.1.3.1) zu Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) und Ribose-5-Phosphat (R5P) umgewandelt werden. Nach weiteren Umformungen unter Beteiligung von Transketolasen (*tkt*, EC:2.2.1.1) und Transaldolasen (*tal*, EC:2.2.1.2) entstehen daraus ein Mol GAP und zwei Mol Fructose-6-Phosphat (F6P), welche wiederum in die Glykolyse eingespeist werden können. *B. graminisolvens* besitzt alle für diese Schritte notwendigen Gene. Interessanterweise konnte in *B. propionificiens* kein Gen für eine Transaldolase identifiziert werden. Dennoch besteht die Möglichkeit eines alternativen Weges des PPP. Dieser wurde kürzlich in dem nahe verwandten Bakterium *S. copri* identifiziert (Garschagen *et al.*, 2021). Dabei wird Seduheptulose-7-Phosphat von einer Pyrophosphat abhängigen F6P-1-Phosphotransferase phosphoryliert (PREVCOP_03899). 1,7-Seduheptulose-Bisphosphat wird dann durch eine Fructose-Aldolase (PREVOCOP_06123) in Erythrose-4-Phosphat (E4P) und DHAP gespalten. Während DHAP in die Glykolyse eingeschleust wird, können E4P und Xu5P durch eine Transketolase zu GAP und F6P umgewandelt werden. In beiden Organismen wurden die entsprechenden

Gene identifiziert (Protein ID: WP_024996790.1; WP_018109477.1; WP_024997536.1; WP_025069472.1). Es ist daher möglich, dass auch *B. propionificiens* die Fähigkeit besitzt Glucose über den PPP zu verstoffwechseln.

Das im Laufe der Glykolyse entstandene PEP kann entweder über die Pyruvat-Kinase (*pykA*, EC:2.7.1.40) zu Pyruvat umgewandelt oder durch die PEP-Carboxykinase (PEP-CK, *pckA*, EC:4.1.1.49) zu Oxalacetat carboxyliert werden. Beide Reaktionen konservieren dabei Energie in Form von ATP. Der Sequenzabgleich mit einer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus *E. coli* (WP_001005586.1, *ppc*, EC:4.1.1.31), die ebenfalls PEP zu Oxalacetat carboxyliert, aber ohne gleichzeitige ATP-Freisetzung, ergab mit keinem der untersuchten Stämme Übereinstimmungen. Es wurden aber auch Gene für die Bildung von Pyruvat aus Oxalacetat (Oxalacetat-Decarboxylase, *oadA* und *oadB*, EC:7.2.4.2) und die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat identifiziert (Pyruvat-Carboxylase, *pyc*, EC:6.4.1.1). Ausgehend von Oxalacetat konnten die den Reaktionen zugrunde liegenden Gene zur Bildung von Fumarat identifiziert werden. Dazu gehören die Malat-Dehydrogenase (*mdh*, EC:1.1.1.37) und die Fumarat-Hydratase (*fumB*, EC:4.2.1.2). Die Reaktion von Fumarat zu Succinat, wird durch das Redoxenzym Fumarat-Reduktase (EC:1.3.5.1) katalysiert. Zwei Gene des Enzyms *frdA* und *frdB*, die für die katalytischen Untereinheiten codieren, wurden in den Genomen der beiden Stämme identifiziert. Mit den Genen *frdC* und *frdD*, die die katalytischen Untereinheiten in der Membran verankern, wurde keine Übereinstimmung in den Genomen gefunden. Es handelt sich hierbei jedoch um sehr kleine Proteine (131 bzw. 119 AS), was den Sequenzabgleich erschwert. Auch die Reaktionen des oxidativen Citratzyklus (TCA) von Oxalacetat über Citrat, Isocitrat zu 2-Oxoglutarat könnten aufgrund der vorhandenen Gene in beiden Spezies ablaufen. In beiden Spezies wurden Übereinstimmungen mit den Genen *korA* und *korB* festgestellt. Diese codieren in *Mycobacterium tuberculosis* für die Ferredoxin abhängige Oxidation von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA. Die Suche nach den Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *E. coli* ergab, dass die E2-Komponente und die Dihydrolipolyl-Dehydrogenase in den meisten der *Bacteroidota* vorkommen. Die E1-Komponente wurde jedoch nur in *B. xylanisolvans* gefunden. Zusätzlich konnten in *B. graminisolvans* Gene identifiziert werden, welche mutmaßlich für die Succinat-CoA-Ligase (*sucC* und *sucD*, EC:6.2.1.4) codieren. Diese wandelt das im TCA entstandene Succinyl-CoA unter Generierung von ATP oder GTP in Succinat um.

Beide Spezies zeigten in bisherigen Wachstumsversuchen deutliche Unterschiede in deren Produktspektren. So bildet *B. propionificiens* unter den meisten Wachstumsbedingungen ausschließlich Acetat und Propionat und nur geringe Mengen Succinat, während *B. graminisolvans* ein breiteres Produktspektrum aufweist und zusätzlich Formiat und Lactat produziert. Trotz dieser Unterschiede haben beide Spezies die gleiche genetische Ausstattung zur Produktion der organischen Säuren. Sie haben beide die Gene, deren Produkte die Umwandlung von Succinat zu Propionat katalysieren. Dazu gehören die Propionyl-CoA:Succinat-CoA-Transferase (*scpc*, EC:2.8.3.-), die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mutA*, *scpA*, EC:5.4.99.2) die Methylmalonyl-CoA-Epimerase (*mce*, EC:5.1.99.1) und die (S)-Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (*mmdA-C*, EC:7.2.4.3). Die Gene *mmdD* und *mmdE* aus *Veillonella parvula* wurden jedoch nicht identifiziert. Gleichzeitig wurden aber auch Gene für die Bildung der Nebenprodukte in den Genomen beider Spezies identifiziert. Dazu gehört die Lactat-Dehydrogenase (*ldh*, EC:1.1.1.27) für die Produktion von Lactat aus Pyruvat.

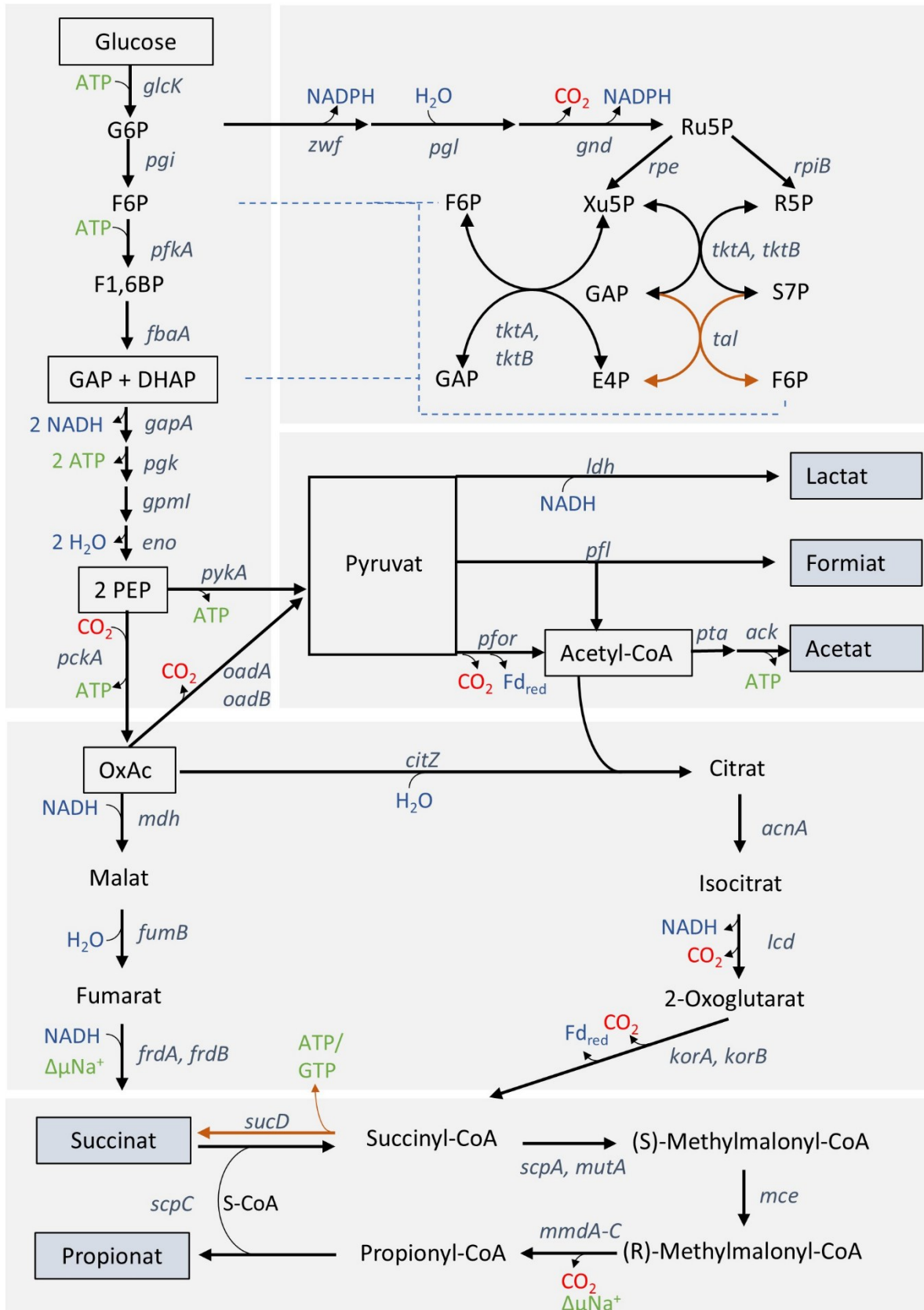


Abbildung 4.7: Genetische Ausstattung der Stämme *B. graminisolvans* XDT-1 und *B. propionificiens* SV434. Das Vorhandensein der Gene codierend für die entsprechenden Enzyme und deren Reaktionswege wurde mittels BLASTn Analyse von je zwei Genom-Sequenzen der beiden Stämme überprüft. Als Referenz dienen Aminosäuresequenzen charakterisierter Enzyme. Gene, die nur in *B. graminisolvans* identifiziert wurden, sind mit

orangen Pfeilen markiert. Abkürzungen: G6P, Glucose-6-Phosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat; F1,6BP, Fructose-1,6-Bisphosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP, Dihydroxyaceton-Phosphat; PEP Phosphoenolpyruvat, OxAc, Oxaloacetat; Ru5P Ribulose-5-Phosphat; Xu5P, Xylulose-5-Phosphat; R5P, Ribose-5-Phosphat; S7P, Seduheptulose-7-Phosphat; E4P, Erythrose-4-Phosphat. Gene: Glucokinase, *glcK*; Glucose-6-Phosphat-Isomerase, *pgi*; 6-Phosphofructokinase, *pfkA*; Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, *fbaA*; G6P-Dehydrogenase, *zwf*; 6-Phosphogluconolactonase, *pgl*; Phosphogluconat-Dehydrogenase, *gnd*; Ribulose 5-Phosphat-Epimerase, *rpe*; Ribose-5-Phosphat-Isomerase, *rpiB*; Transketolase, *tktA*, *tktB*; Transaldolase, *ta*; GAP-Dehydrogenase, *gapA*; Phosphoglycerat-Kinase, *pgk*; Phosphoglycerat-Mutase, *gpmI*; Enolase, *eno*; Pyruvat-Kinase, *pykA*; PEP-Carboxykinase, *pckA*; Oxalacetat-Decarboxylase, *oadA*, *oadB*; Lactat-Dehydrogenase, *ldh*; Pyruvat-Formiat-Lyase, *pfl*; Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase, *pfor*; Phosphat-Acetyltransferase, *pta*; Acetat-Kinase, *ack*; Malat-Dehydrogenase, *mdh*; Fumarat-Hydratase, *fumB*; Fumarat-Reduktase, *frdA*, *frdB*; Citrat-Synthase, *citZ*; Aconitat-Hydratase, *acnA*; Isocitrat-Dehydrogenase, *icd*; 2-Oxoglutarat-Oxidoreductase, *korA*, *korB*; Succinat-CoA-Ligase, *sucD*; Propionyl-CoA:Succinat-CoA-Transferase, *scpC*; Methylmalonyl-CoA-Mutase, *scpA*, *mutA*; Methylmalonyl-CoA-Epimerase, *mce*; (S)-Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, *mmdA-C*.

Sie besitzen beide die Gene für die Produktion der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pfl*, EC:2.3.1.54) und die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreductase (*pfor*, EC:1.2.7.1), die jeweils Pyruvat in Acetyl-CoA umwandeln und dabei Formiat bzw. CO₂ freisetzen. Weiterhin wurden die Gene für die Phosphat-Acetyltransferase (*pta*, EC:2.3.1.8) und Acetat-Kinase (*ack*, EC:2.7.2.1) identifiziert. Beide sind an der Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat beteiligt und letzteres generiert ATP mittels Substratkettenphosphorylierung.

Ein wichtiger Aspekt des Stoffwechsels ist die Regenerierung der Elektronenüberträger. Daher wurde auch das Vorhandensein von typischen Genen für Redox-Enzyme überprüft. Neben der Fumarat-Reduktase, die in der Produktion von Succinat im reduktiven TCA beteiligt ist, wurden weitere Gene identifiziert. Beispielsweise eine Na⁺-translozierende NADH-Chinon-Reduktase (*NqrA-D*, EC:7.2.1.1), außerdem Gene zur Bildung des Rnf-Komplexes (*rnfA-G*, EC 7.2.1.2) welcher reduziertes Ferredoxin über die Reduktion von NAD⁺ regenerieren kann. Auch besitzen beide Spezies die Gene zur Produktion einer Cytochrom-bd-II Ubiquinol-Oxidase (*appB*, *appC*, EC:7.1.1.3), die O₂ als Elektronenakzeptor nutzt. In *B. graminisolvens* konnten außerdem die Gene *nuoA-D* und *nuoH-N* identifiziert werden, welche für die NADH-Chinon-Oxidoreductase (Nuo) codieren. Ebenso wie die Nqr, überträgt sie Elektronen von NADH auf Chinon. Die Gene *nuoE-F* konnten jedoch nicht identifiziert werden. Weiterhin wurde überprüft, ob die beiden Spezies die Fähigkeit besitzen, Elektronenüberträger durch die Produktion von Wasserstoff (H₂) zu regenerieren. Dies wurde für *B. cellulosilyticus* beschrieben. Dieser Stamm besitzt ein Gen mit hoher Sequenzübereinstimmung zu einer Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (E-value: 4 * 10⁻¹³⁰, Query cover: 97 %). Die Hydrogenase oxidiert reduziertes Ferredoxin und setzt die Elektronen in Form von H₂ frei (Peters *et al.*, 1998). Im Genom von *B. propionificiens* wurde keine Übereinstimmung mit dieser Sequenz gefunden, in *B. graminisolvens* konnte nur eine sehr geringe Ähnlichkeit festgestellt werden (E-value von 0,016).

Insgesamt unterscheiden sich die zwei Bakterienspezies nur in wenigen Punkten. Aufgrund der fehlenden Transaldolase müsste *B. propionificiens* einen anderen Weg haben, C5-Körper in die Glykolyse einzuspeisen als *B. graminisolvens*. Außerdem beherbergt das Genom von *B. graminisolvens*

Sequenzen, die für eine Succinyl-CoA-Ligase codieren könnten. Somit könnte Succinat bei diesem Organismus auf einer anderen oder zusätzlichen Route entstehen als bei *B. propionificiens*.

4.5.2 Untersuchung der Wasserstoffbildung

Um zu bestätigen, dass in *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* keine H_2 -Produktion stattfindet, wurden Gasmessungen durchgeführt. Dazu wurden die zwei Spezies in DMMG mit jeweils 15 und 30 mM Glucose bis zur stationären Phase kultiviert. *S. copri* wurde als Negativkontrolle und *B. cellulosilyticus* als Positivkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Der Wasserstoff im Formiergas (95 %/5 % N_2/H_2 , v/v) zeigte sich nach ca. 2,2 Minuten Retentionszeit. Obwohl das Medium mit Protadur (80 %/20 %, N_2/CO_2 , v/v) begast wurde und kein Wasserstoff enthalten sollte, konnte auch in dessen Gasatmosphäre ein Signal nach der gleichen Retentionszeit erfasst werden. Also muss entweder H_2 vom Medium freigesetzt worden sein oder es handelt sich um ein anderes Gas, welches zur gleichen Zeit eluiert. Für *S. copri*, *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* wurden ebenfalls niedrige Ausschläge detektiert, die jedoch deutlich kleiner ausfallen als in der Formiergasprobe. Es könnte daher ebenfalls aus dem Medium freigesetzt worden sein. Der Peak der Kultur von *B. cellulosilyticus* (15 mM Glucose) hingegen entspricht in dessen Ausmaß in etwa dem des Formiergases. Die 30-mM-Kultur übertrifft das Signal deutlich. Es wurde also mit 30 mM Glucose mehr Wasserstoff gebildet. Diese Ergebnisse bestätigen, dass *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* nicht in der Lage sind, H_2 zu produzieren.

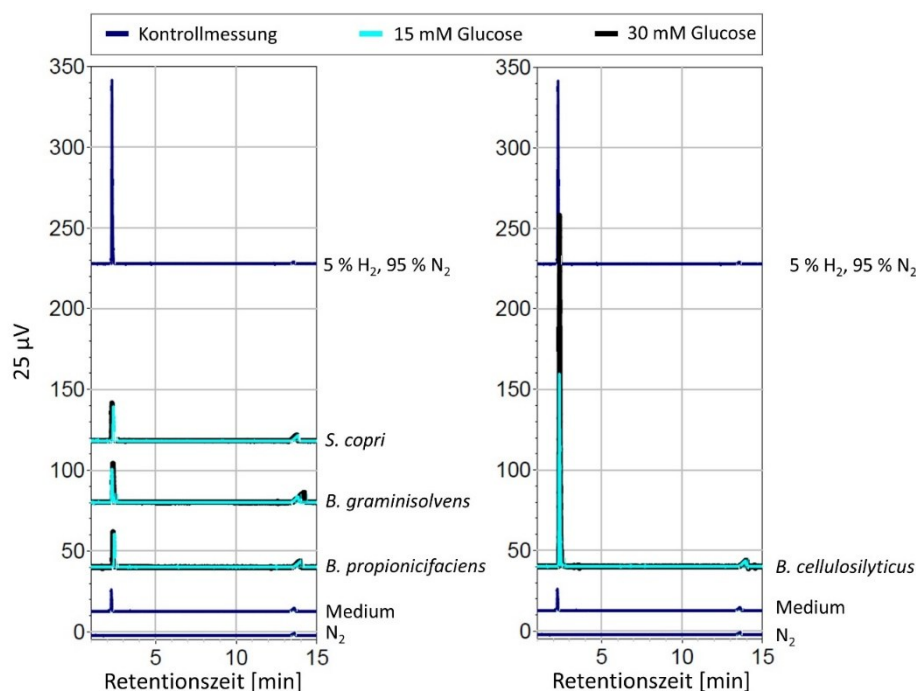


Abbildung 4.8: Wasserstoffproduktion von vier *Bacteroidota*-Spezies. Kulturen von *B. propionificiens*, *B. graminisolvens*, *B. cellulosilyticus* und *S. copri* wurden in 20 ml DMMG mit jeweils 15 mM (türkis) bzw. 30 mM Glucose (schwarz) inokuliert und bis zur stationären Phase inkubiert (Gasatmosphäre: N_2/CO_2 ; 80 %/20 %, v/v). Im Anschluss wurden je 1 ml aus dem Gasraum der Flasche entnommen und mittels GC analysiert. Als Kontrolle (blau) dienten Flaschen gefüllt mit Stickstoff (N_2), Formiergas (N_2/H_2 , 95 %/5 %, v/v) und Gas aus einer Flasche mit Medium (N_2/CO_2 , 80 %/20 %, v/v).

4.5.3 Stoffwechselbilanz ruhender Zellen

Für beide Spezies wurden Zellsuspensionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien zunächst bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert und im Anschluss in einem Puffer aufkonzentriert. Dadurch konnten die Zellen nicht mehr wachsen und die Stoffwechselbilanz konnte unabhängig von der Zunahme der Zellmasse bestimmt werden. Der Proteingehalt der Zellsuspensionen wurde direkt nach Glucosezugabe und nach 24 h ermittelt. Die Differenz betrug durchschnittlich 0,03 mg/ml und war damit zu vernachlässigen. Der Substratumsatz der Kultur von *B. propionificiens* ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Im Verlauf der Messung entstanden aus 16,6 mM Glucose insgesamt $16,7 \pm 0,12$ mM Propionat, $8,3 \pm 0,06$ mM Acetat, $2,4 \pm 0,04$ mM Succinat und $0,9 \pm 0,01$ mM Formiat. Zusätzlich wurden auch bis zu $1,3 \pm 0,03$ mM Pyruvat nachgewiesen, die aber nach weiterer Inkubation wieder aufgenommen wurden. Glucoseaufnahme und Produktfreisetzung folgten zunächst einem linearen Verlauf, sodass das Substrat bereits nach 18 h vollständig verbraucht war. Trotzdem stieg die Propionatkonzentration um weitere 4,3 mM an. Der Gehalt intrazellulärer Polysaccharide (IPS) der Zellen stieg innerhalb von 8 h nach Beginn der Messung auf $99,4 \pm 1,0$ mg/l. Zum nächsten Zeitpunkt war nur noch die Hälfte vorhanden und nach 24 h lag der Wert etwa auf gleicher Höhe wie zum Zeitpunkt t_0 . Zum Ende der Messung konnten noch $2,1 \pm 0,5$ mg/l nachgewiesen werden. Dabei fiel der Anstieg der Propionatkonzentration zwischen 18 und 72 h mit der Abnahme der IPS zusammen. Die Bestimmung der IPS erfolgte zunächst über eine kolorimetrische Methode. Als Standard wurde Glykogen aus Rinderleber verwendet mit einer Reinheit von mindestens 80 %. Da die Bildung der IPS in die Berechnung der Kohlenstoffbilanz der Zelle einbezogen werden muss, musste die Menge an Glucose bestimmt werden, die in den IPS von *B. propionificiens* enthalten war. Dazu wurde eine Standardreihe mit Glykogen angefertigt, welche in Salzsäure zu Glucose hydrolysiert wurde. So konnte ermittelt werden, dass 99,4 mg/l Glykogen einer Konzentration von ca. 0,52 mM Glucose entsprachen (Abbildung A3). Daher machten IPS nur einen kleinen Anteil der nicht in Produkte umgewandelten Glucose aus. Angenommen, dass die Pyruvat Abnahme von 1,7 mM in der Zeit von 18 - 144 h durch die Umwandlung von Pyruvat zu Propionat zustande kam, würden noch immer rund 2 mM Substrat fehlen, um den Anstieg von Propionat nach Verbrauch der Glucose zu erklären.

Als nächstes wurde die Stoffwechselbilanz der Fermentation berechnet. Die Reaktionsgleichungen, die den Berechnungen zugrunde liegen, sind in Tabelle A13 aufgeführt. Es wurden die Daten der Messungen nach 24 h und 144 h verwendet. Sie sind in Tabelle A14 zusammengefasst. Es wurde angenommen, dass aus 1 mM verbrauchter Glucose, 2 mM GAP und wiederum 2 mM PEP entstehen und jeweils 1 mM PEP zu 1 mM Produkt (Propionat, Acetat, Succinat oder Lactat) umgewandelt werden können. So ergab sich eine PEP-Produktion von 33,2 mM und ein PEP-Verbrauch von 24,4 mM nach 24 h Inkubation. Das entspricht 73,6 % der verbrauchten Glucose. Als nächstes wurde auch die Redoxbilanz berechnet. Je nach Produkt oxidiert oder reduziert die Zelle unterschiedliche Mengen an Elektronenüberträgern. Auf dem Weg zu Succinat werden je 2 Mol NADH wieder zu NAD^+ oxidiert. Pro Mol Acetat, welches unter anderem durch die PFOR produziert wird, werden jedoch wieder 1 Mol Elektronenüberträger reduziert. Insgesamt wurden daher zur Bildung der Säuren durch die ruhenden Zellen nach 24 h netto 21,3 mM Elektronenüberträger oxidiert. Dementsprechend betrug die Redox-Bilanz nur 64,2 %. Nach 144 h stiegen die Werte noch leicht an, sodass die Kohlenstoffbilanz 82,5 % betrug und die Redoxbilanz 72,3 %. In diesem Zeitraum muss also noch eine Umwandlung von Metaboliten stattgefunden haben,

der durch die erhobenen Messwerte nicht erfasst wurde, da nach 24 h ein Großteil der IPS abgebaut worden war und diese daher nicht für den Anstieg der Kohlenstoffbilanz verantwortlich sein können.

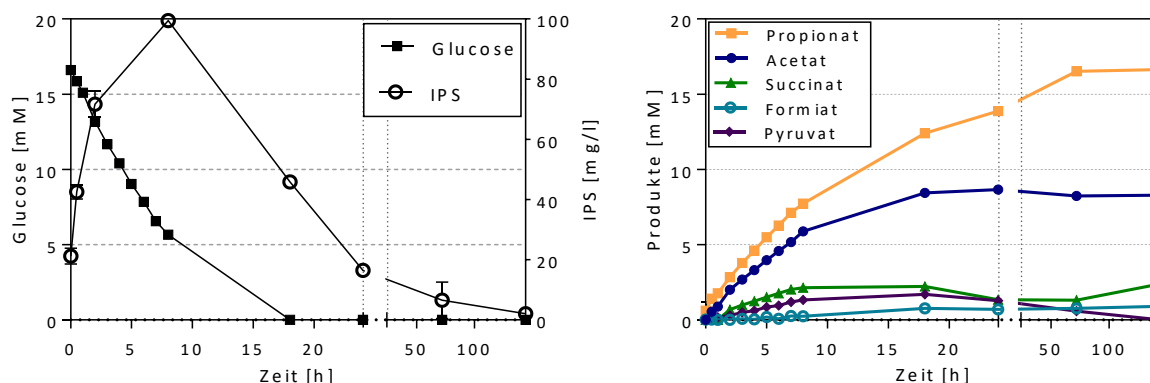


Abbildung 4.9: Produktbildung ruhender Zellen von *B. propionificaciens*. Eine Kultur aus 1000 ml DMMG-H wurde in der exponentiellen Phase geerntet, dann in RCB resuspendiert und aufkonzentriert. Es wurden je 3 x 40 ml Zellsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0.46 mg/ml in Serumflaschen abgefüllt und 15 mM Glucose hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/20 %, v/v). Dann folgte die Messung der Glucose- und Produktkonzentrationen sowie der intrazellulären Polysaccharide. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

Das Experiment wurde analog auch mit *B. graminisolvens* durchgeführt. Das Hauptprodukt der Fermentation war Propionat. Dessen Konzentration nahm zunächst linear zu, flachte dann aber ab und erreichte $8,2 \pm 0,3$ mM nach 4 h. Bis zur nächsten Messung nach 24 h stieg Propionat noch mal auf $14,5 \pm 0,4$ mM. Lactat und Pyruvat zeigten die ersten 4 h einen ähnlichen Verlauf. Zu diesem Zeitpunkt wurden Konzentrationen von jeweils $5,6 \pm 0,3$ bzw. $4,4 \pm 0,3$ mM gemessen. Danach sank die Konzentration beider Säuren jedoch wieder auf $3,0 \pm 0,2$ bzw. $1,0 \pm 0,04$ mM. Somit konnte bei *B. graminisolvens* eine noch deutlichere Verlagerung des Produktspektrums im Vergleich zu den wachsenden Zellen (4.3) festgestellt werden, als bei *B. propionificaciens*. Weiterhin wurden nach 24 h Inkubation $1,8 \pm 0,08$ mM Acetat, $2,3 \pm 0,1$ mM Formiat und $2,4 \pm 0,09$ mM Succinat gemessen (Abbildung 4.10). Entsprechend der gleichen Rechnung ergaben sich für die Messwerte nach 24 h eine Kohlenstoffbilanz von 67,0 % und eine Redoxbilanz von 106,4 % (Tabelle A15). Die Menge an reduzierten Produkten kann also nicht alleine durch die Verstoffwechselung der Glucose über die Glykolyse entstanden sein, zumal das Kohlenstoffdefizit noch größer ist als bei *B. propionificaciens*. Zur Bildung der Produkte werden nur 23,2 mM PEP benötigt. Bei der Bildung dieser Menge PEP über die Glykolyse entstehen aber auch nur 23,2 mM NADH. Es bräuchte aber mindestens 36,8 mM reduzierte Elektronenüberträger zur Bildung der Produkte, wie sie in *B. graminisolvens* gemessen wurden. Das entspräche einer Redoxbilanz von 159 %. Dementsprechend kann der Stoffwechsel nicht alleine über die Glykolyse ablaufen. *B. graminisolvens* muss also einen Stoffwechsel betreiben, bei dem die Glucose stärker oxidiert wird. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise die Verstoffwechselung der Glucose über den oxidativen Pentose-Phosphat-Weg (oxPPP). Wie in Tabelle A13 aufgeführt ist, können 3 Mol Glucose zu 5 Mol Gap umgewandelt werden. Dabei entstehen pro Mol Glucose, die über den oxPPP verstoffwechselt werden, 2 Mol reduziertes NADPH zusätzlich zum NADH, welches durch die Reaktionen von GAP zu PEP frei wird. Außerdem sinkt die Ausbeute an Kohlenstoff, da pro Mol

Glucose jeweils 1 Mol CO₂ freigesetzt wird. Insgesamt bleiben bei den Untersuchungen der ruhenden Zellen aber zu viele Variablen offen, um eine Aussage dazu zu treffen.

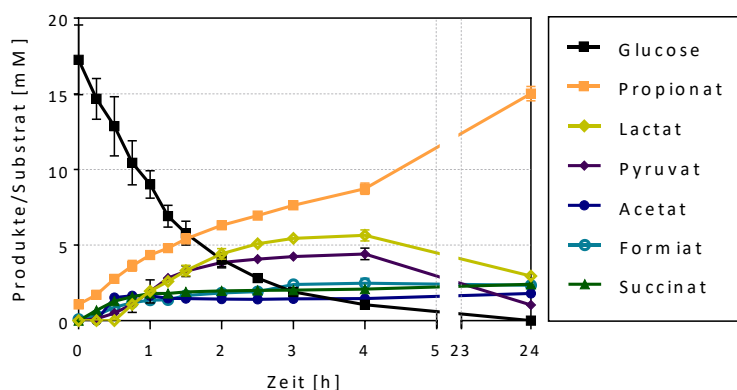


Abbildung 4.10: Produktbildung ruhender Zellen von *B. graminisolvens*. 500 ml Kultur in DMMG wurden in der exponentiellen Phase geerntet, dann in RCB resuspendiert und aufkonzentriert. Es wurden je 3 x 20 ml Zellsuspension mit einer Proteinkonzentration von 0,54 mg/ml in Serumfalschen abgefüllt und 15 mM Glucose hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/20 %, v/v) Dann folgte die Messung der Glucose- und Produktkonzentrationen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

4.5.4 Stoffwechselbilanz wachsender Zellen.

Die mit ruhenden Zellen durchgeführten Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Bilanzen nicht geschlossen werden können. Außerdem unterschied sich der Stoffwechsel besonders bei *B. graminisolvens* deutlich von dem der wachsenden Kulturen, was anhand der Produktverhältnisse erkennbar war (Abschnitt 4.3 und 4.5.3). Daher wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, bei dem die Stoffwechselbilanz wachsender Zellen gebildet werden sollte. Der Versuch und die Berechnungen wurden auf eine ähnliche Weise wie bei *S. copri* durchgeführt (Franke und Deppenmeier, 2018). In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Wachstumsparameter beider Spezies gezeigt. Die 48 h lang inkubierte Kultur erreichte die höchsten Werte in OD₆₀₀ und Zelltrochgewicht (1,16 bzw. 0,66 g/l). Die höchste Proteinkonzentration von 0,24 g/l wurde hingegen in der 64-h-Kultur gemessen. Ähnliche Verhältnisse zeigen sich auch bei *B. graminisolvens*. Die Messungen der OD₆₀₀ und des Trockengewichtes unterscheiden sich kaum zwischen der 16-h-Kultur und der 24-h-Kultur (1,92 und 1,82 bzw. 0,7 und 0,7), während die Proteinkonzentration in der 24 h Probe (0,48 g/l) gegenüber der 16 h Probe leicht erhöht war (0,37 g/l). Es ist erkennbar, dass alle Parameter eine ähnliche Steigung in der exponentiellen Phase aufweisen. Besonders bei den Kulturen von *B. propionificiens* zeigen sich bei der Trockengewicht und Proteinbestimmung jedoch deutliche Abweichungen von den erwarteten Werten, beispielsweise bei den 36 h und 40 h inkubierten Kulturen in der Trockengewichtsbestimmung bzw. bei den 16 h und 24 h inkubierten Kulturen in den Proteinbestimmungen. Da sich diese Abweichungen jeweils nur in einer der beiden Messmethoden zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass sie eher auf Fehler in der Probenbearbeitung zurückzuführen sind als auf ein unterschiedliches Wachstum der Kulturen. Dementsprechend wurden diese Daten nicht zur Berechnung eines Umrechnungsfaktors zwischen OD₆₀₀ und Trockengewicht herangezogen. Weiterhin wurden die Werte der am längsten inkubierten Kultur (64 h bzw. 24 h) ausgeschlossen, da sie ebenfalls schlecht

korrelierten. Die übrigen Messpunkte wurden genutzt, um einen Umrechnungsfaktor zwischen Trockengewicht und OD₆₀₀ zu erhalten. Die Korrelation der Wachstumsparameter ist jeweils in Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13 im ersten Diagramm gezeigt.

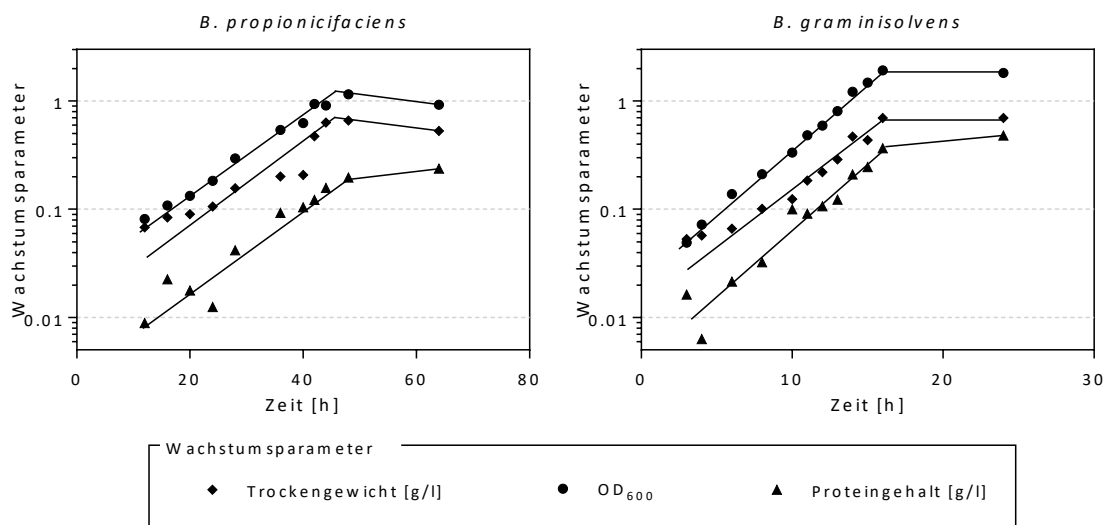


Abbildung 4.11: Wachstum von *B. propionificaciens* und *B. graminisolvens* anhand verschiedener Parameter. Pro Messzeitpunkt wurden je 50 ml DMMG auf eine OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert und bei 30 °C bzw. 37 °C unterschiedlich lange inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/20 %, v/v). Zum Messzeitpunkt wurden OD₆₀₀, Proteingehalt und Zelltrockengewicht jeder Kultur bestimmt. Diamant, Trockengewicht (g/l); Kreis, OD₆₀₀; Dreieck, Proteingehalt (g/l).

Als Nächstes wurde das berechnete Trockengewicht mit den jeweilig gemessenen Produkt- bzw. Substratkonzentrationen in ein Diagramm eingetragen und wiederum eine Regressionsgerade erstellt. In die erhaltene Formel wurde dann die Zahl 1 für die Variable x eingesetzt. Mit den so erhaltenen Werten wurde die Produktbilanz errechnet. Für *B. propionificaciens* ergab sich eine Korrelation zwischen OD₆₀₀ und Trockengewicht von $y = -1,848 \cdot x - 0,02293$ (Abbildung 4.12). Damit wurde berechnet, dass dieser Stamm pro g gebildeten Trockengewichts jeweils rund 17,7 mmol Glucose verbrauchte und dabei 7,0 mol Acetat sowie 15,4 mmol Propionat produzierte. Zur Berechnung der Kohlenstoff- und Wasserstoffbilanz wurden nun die Stoffmengen der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff ermittelt, die in den genannten Verbindungen enthalten waren oder im Verlauf ihrer Produktion an die Umgebung abgegeben werden. Aus diesem Grund wurde vernachlässigt, wie viel Mol Elektronenüberträger bei einer Reaktion oxidiert oder reduziert wurden. Da *B. propionificaciens* kein Formiat bildet, wurde pro mmol Acetat die Freisetzung von 1 mmol CO₂ angenommen. Die molare Zusammensetzung der Zellmasse ergab sich aus den Ergebnissen der Elementarbestimmung des Trockengewichtes (Tabelle A16). Als nächstes wurde die Summe der Elemente aller Produkte gebildet und anschließend die Differenz von Substrat und Produkten (Differenz 1). Daraus ergab sich, dass 5,8 mM Kohlenstoff in der Bilanz fehlten. Es wurde daher angenommen, dass ein Anteil der Glucose über den oxidativen Pentose Phosphat-Weg verstoffwechselt wurde, sodass insgesamt 5,8 mmol CO₂ zusätzlich freigesetzt würden. Da pro Mol Glucose, die über den oxPPP zu GAP verstoffwechselt wird, 1 Mol CO₂ frei wird (Tabelle A13), entspricht das etwa 32,8 % der insgesamt verbrauchten Glucose. Unter dieser Annahme ergab sich eine ausgeglichene Kohlenstoffbilanz (Tabelle 4.3). Nach Abzug des

Sauerstoffs aus CO_2 , waren noch 18,1 mmol O_2 übrig. Da Im Zellstoffwechsel viele Dehydratisierungsreaktionen ablaufen, wurde angenommen, dass der übrige Sauerstoff in Form von H_2O abgegeben wurde. Nach Abzug der Stoffmengen von Wasserstoff, die in dem Wasser enthalten waren (Differenz 3) ergab sich eine Wasserstoffbilanz von $-5,6$ mmol, was 102,6 % des Wasserstoffs entspricht. Da beide Bilanzen so geschlossen werden konnten, ist eine zeitgleiche Verstoffwechselung von Glucose über die Glykolyse und den oxPPP wahrscheinlich.

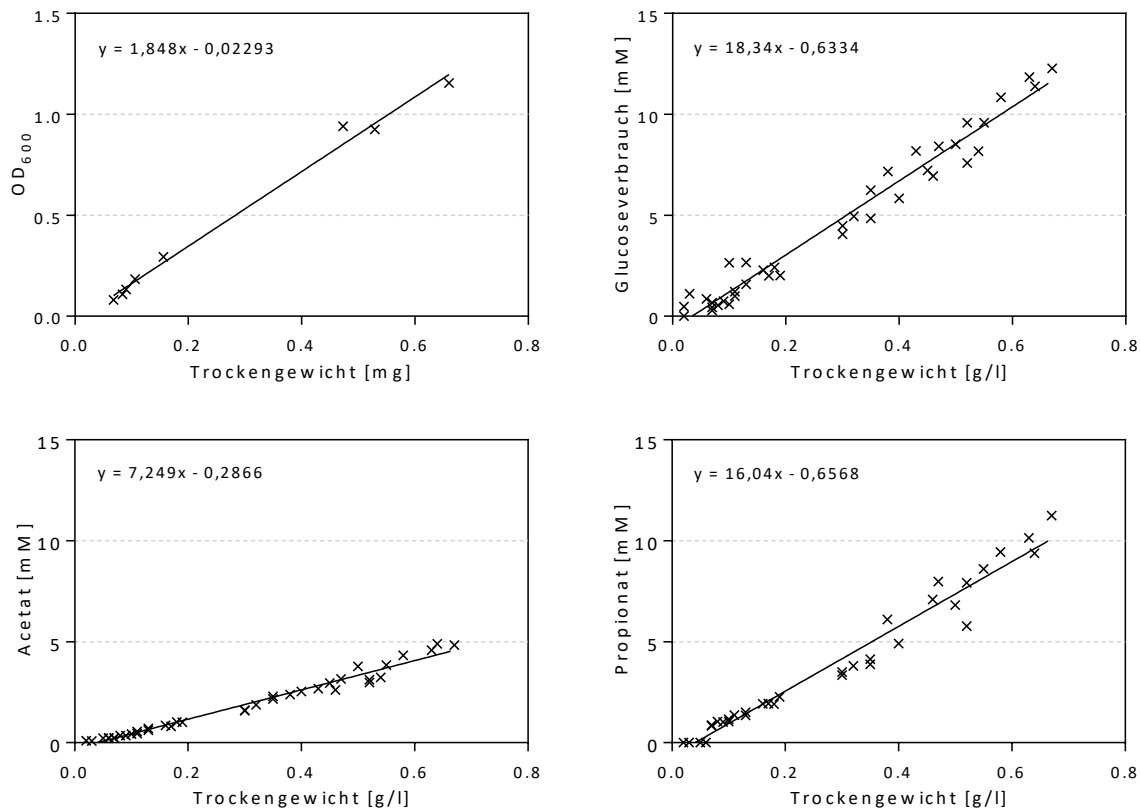


Abbildung 4.12: Korrelation von OD_{600} und Trockengewicht sowie Produktbildung und Trockengewicht von *B. propionificiens*. Mit den Wachstumsparametern aus Abbildung 4.11 wurde eine Regressionsgerade erstellt. Damit konnten OD_{600} -Werte von 3 x 500 ml DMMG-Kulturen in Trockengewicht umgerechnet werden. Diese Werte wurden genutzt, um wiederum Regressionsgeraden mit Produktbildung bzw. Substratverbrauch pro g Trockengewicht zu berechnen.

Tabelle 4.3: Kohlen- und Wasserstoffbilanz wachsender Zellen von *B. propionificiens*. Die in der Spalte Produkte/Substrate fett markierten Werte sind aus Produktmessungen bestimmt, alle anderen rechnerisch ermittelt. Alle Angaben in mmol/g Trockengewicht und auf eine Kommastelle gerundet.

	Produkte/Substrat	C	H	O
1	Acetat ($C_2H_4O_2$)	7,0	13,9	27,8
2	CO ₂ (PFOR)	7,0	-	13,9
3	Propionat ($C_3H_6O_2$)	15,4	46,1	92,3
4	Zellmasse ($C_1H_{1,85}O_{0,54}$)	33,4	61,7	17,9
5	Summe	100,4	181,8	76,5
6	Glucose	17,7	106,2	212,5
7	Differenz 1	5,8	30,6	29,7
8	CO ₂ (PPP)	5,8	-	11,6
9	Differenz 2	0,0	30,6	18,1
10	H ₂ O	15,4	36,2	18,1
11	Differenz 3		-5,6	0,0
12	Bilanz		102,6 %	

1,3,6: aus Abbildung 4.12;

2: $2 = 1$;

4: Aus Elementarbestimmung (Tabelle A16)

5: Summe 1 bis 4

7: 5-6

8: Berechnet so, dass $C7 - 9 = 0$

9: 7-8

10: Berechnet so, dass $O9 - O10 = 0$

11: 9-10

12: $100 - (H11 \cdot 100) / H6$

Die Produktbildung von *B. graminisolvans* wurde auf die gleiche Weise analysiert (Abbildung 4.13, Tabelle 4.4). Es verbrauchte pro g gebildeten Trockengewichts 16,2 mmol Glucose. Daraus produzierte es 3,1 mmol Acetat, 6,3 mmol Propionat, 5,5 mmol Formiat und 6,4 mmol Succinat. Da *B. graminisolvans* mehr Formiat als Acetat produzierte, wurde bei der Acetatproduktion kein CO₂ freigesetzt, stattdessen wurde CO₂ im Zuge der Succinatproduktion fixiert und mit einem negativen Vorzeichen in die Rechnung einbezogen. Auch bei *B. graminisolvans* waren nach Bildung der Differenz 1 noch 11 mmol Kohlenstoff übrig, weswegen wiederum die Freisetzung von CO₂ über den PPP angenommen wurde. Nach dieser Rechnung ergab sich eine Wasserstoffbilanz [H] von - 1 mmol (100,5 %). Somit wurde 67,9 % der Glucose über den PPP verstoffwechselt.

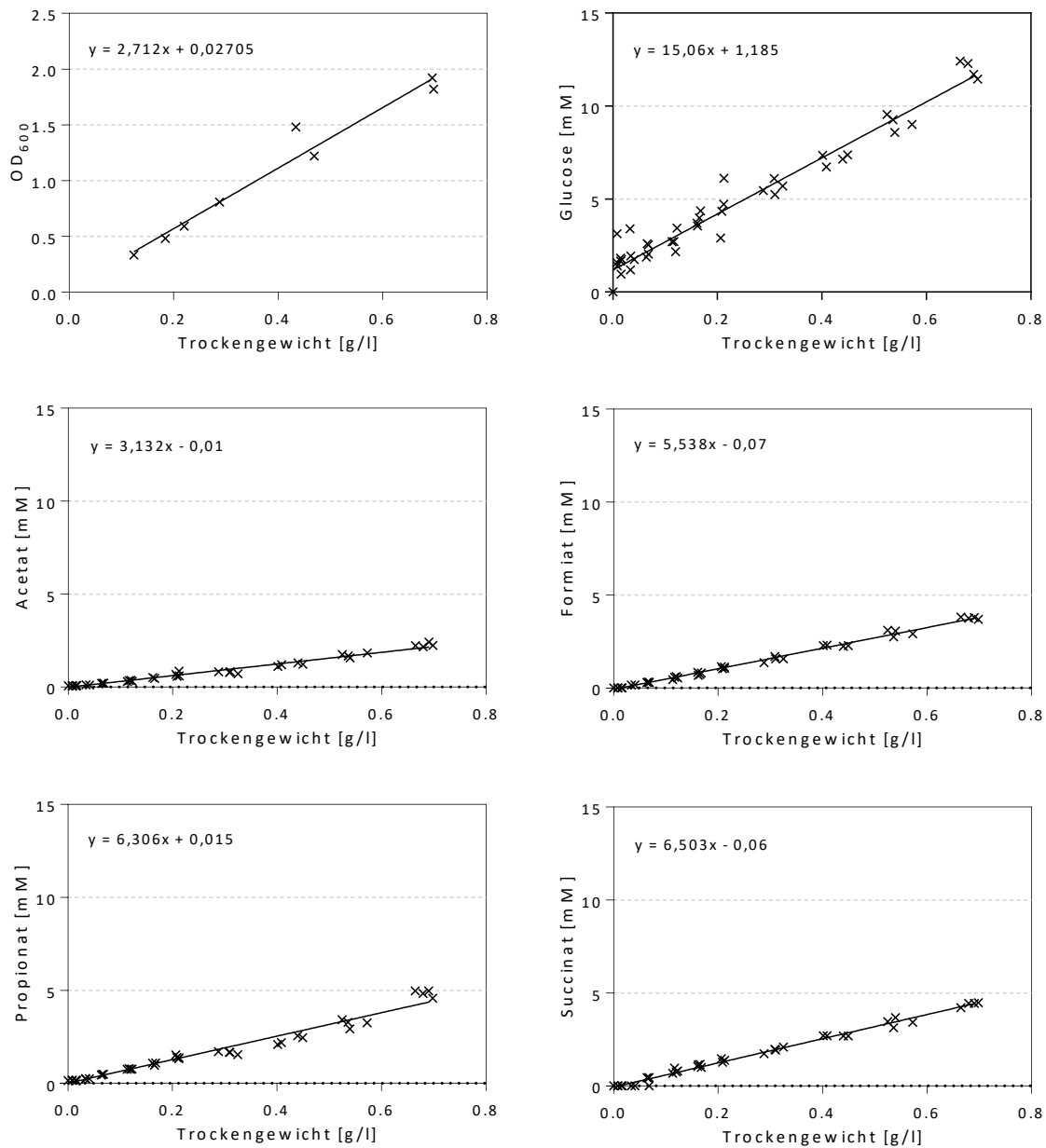


Abbildung 4.13: Korrelation von OD₆₀₀ und Trockengewicht sowie Produktbildung und Trockengewicht von *B. graminisolvens*. Mit den Wachstumsparametern aus Abbildung 4.11 wurde eine Regressionsgerade erstellt. Damit konnten OD₆₀₀-Werte von 3 x 500 ml DMMG-Kulturen in Trockengewicht umgerechnet werden. Diese Daten wurden genutzt, um wiederum Regressionsgeraden mit Produktbildung bzw. Substratverbrauch pro gTg zu berechnen.

Tabelle 4.4: Berechnung der Kohlen- und Wasserstoffbilanz von wachsenden Zellen der Spezies *B. graminisolvans*. Die in der Spalte Produkte/Substrate Fett markierten Werte sind aus Produktmessungen bestimmt, alle anderen rechnerisch ermittelt. Alle Angaben in mmol/gTg

	Substrat/Produkte	C	H	O
1	Acetat ($C_2H_4O_2$)	3,1	6,2	12,5
2	Propionat ($C_3H_6O_2$)	6,3	19,0	37,9
3	Formiat (CH_2O_2)	5,5	5,5	10,9
4	Succinat ($C_4H_6O_4$)	6,4	25,8	38,7
5	CO ₂ Fixierung (PEP-CK)	6,4	-6,4	-
6	Zellmasse ($C_{1.81}H_{1.81}O_{0.49}$)	36,5	65,9	17,8
7	Summe	86,5	165,9	60,5
8	Glucose	16,2	97,5	194,9
9	Differenz 1	11,0	29,0	37,0
10	CO ₂ (PPP)	11,0	11,0	-
11	Differenz 2	0,0	29,0	15,0
12	H ₂ O		30,1	15,0
13	Differenz 3		-1,0	0,0
14	Bilanz		100,5 %	

1,2,3,4,8: aus Abbildung 4.13;

5: $5 = 4$;

6: Aus Elementarbestimmung (Tabelle A16)

7: Summe 1 bis 6

9: 8-7

10: Berechnet so, dass $C_9 - C_{11} = 0$

11: 10-9

12: Berechnet so, dass $O_{11} - O_{12} = 0$

13: 11-12

14: $100 - (H_{13} \cdot 100) / H_8$

4.6 pH-kontrollierte Kultivierung

Die Steigerung der Glucosekonzentration hatte eine Verschiebung des Produktspektrums in Richtung Lactat zur Folge (4.2.3). Gleichzeitig konnte *B. graminisolvans* nur etwa 37 mM Glucose verstoffwechseln, bevor der gestiegene Säuregehalt inhibitorische Effekte auslöste. Aus diesem Grund wurde die pH-kontrollierte Fed-Batch-Kultivierung im Bioreaktor bei pH 7 getestet. Dabei wurde automatisch KOH-Lösung (2 M) in das Medium gepumpt, um den pH konstant zu halten. Außerdem wurde Glucose stufenweise hinzugegeben. Dies sollte die Bildung von Nebenprodukten durch ein Überangebot verringern. Wachstum und Produktbildung der zwei Spezies sind in Abbildung 4.14 gezeigt. *B. propionificiens* wurde 168 h lang inkubiert. Die maximale OD₆₀₀ von 8,12 wurde nach 43 h gemessen. Bis zum Ende der Kultivierung fiel sie dann wieder auf einen Wert von 5,28. Die initiale Glucosekonzentration betrug rund 15 mM. In der ersten Messung, 19 h nach der Inokulation, war sie fast vollständig verbraucht worden (0,21 mM). Über die nächsten zwei Zugaben wurde die Konzentration wieder auf rund 15 mM erhöht. Danach folgte ein größerer Glucose-Puls auf 64,9 mM,

der innerhalb von 16 h auf 7 mM reduziert wurde. Nach der letzten Zugabe betrug die Glucosekonzentration 37,2 mM. Da die Kulturbrühe nach weiteren 7 h Inkubation noch immer 24,8 mM Glucose enthielt, wurde die nächste Probe erst wieder nach 169 h entnommen. Zu diesem Zeitpunkt wurden 4,5 mM Glucose detektiert.

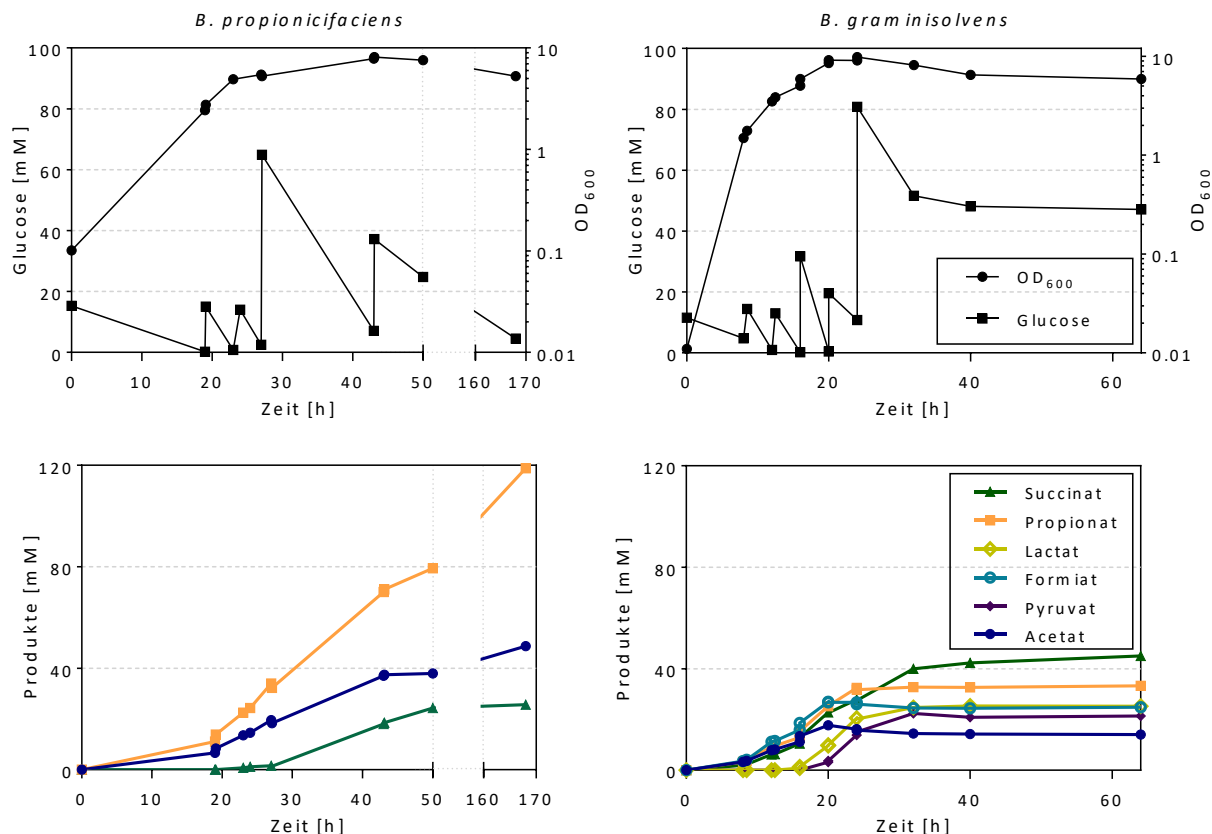


Abbildung 4.14: Wachstum und Produktbildung von *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* in einer pH-kontrollierten Fed-Batch-Kultur. 1 l Kulturmedium (DMMG mit 1 g/l Hefeextrakt, 1,5 g/l NH_4Cl , 530 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 2 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 4 ml/l SL-6-Lsg.; 2 ml/l FeSO_4 -Lsg.; 4 ml/l Hämin-Lsg. 4 ml/l 5 x Wolin-Lsg. mit B_{12} ; 0,4 ml/l Vitamin K-Lsg.) wurde in einem 1,5 l Kulturgefäß mit 1 % des Volumens inokuliert und bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Gas (N_2/CO_2 ; 80 %/20 %, v/v) wurde mit einer Flussrate von 1 l/h in das Gefäß geleitet und die Kulturbrühe bei 50 rpm gerührt. Glucose wurde aus einer 2,5 M anaeroben Stammlösung hinzugegeben. Der pH wurde durch automatische Zugabe von 2 M KOH konstant bei 7 gehalten. Das Wachstum wurde über die Messung der OD_{600} verfolgt. Substrat und Produktkonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Aus den insgesamt verbrauchten 131 mM Glucose produzierte *B. propionificiens* 118,9 mM Propionat, 48,7 mM Acetat und 25,7 mM Succinat. Dabei ist auffällig, dass Succinat während der ersten 27 h des Versuches in sehr geringen Mengen auftrat (1,6 mM), sodass nach dieser Zeit ein P/S-Verhältnis von 21,8 mol_P/mol_S vorlag. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration war auch ein größerer Anstieg der Succinatproduktion zu verzeichnen. Dies verringerte das P/S-Verhältnis am Ende der Messungen auf 4,6 mol_P/mol_S. Der Propionat-Titer am Ende der Fermentation betrug 8,8 g/l und es wurde eine Ausbeute von 0,9 mol_P/mol_G (0,37 g_P/g_G) erreicht. Die Produktivität über den ganzen Versuchsverlauf betrug 0,09 g/l*h, wobei die höchste Produktivität innerhalb der ersten 27 h der Inkubation vorlag (0,21 g/l*h).

B. graminisolvens wuchs deutlich schneller als *B. propionificaciens*. Bereits nach 24 h Inkubation wurde eine OD₆₀₀ von 9,8 erreicht, die bis zum Ende der Messung auf einen Wert von 5,88 abfiel. Nach 24 h wurden Zusätze (Hämin, Vitamin K, 5 x Wolin-Lösung, SL6-Lösung, FeSO₄, NH₄Cl) in doppelter Konzentration zur Kulturbrühe hinzugegeben. Dies sollte den Rückgang der Zelldichte aufgrund von Nährstofflimitation verhindern. Die Zugabe der Substanzen hatte jedoch keinen wachstumsfördernden Effekt. Glucose wurde zunächst wieder in kleineren Mengen hinzugegeben, sodass 15 mM nicht überschritten wurden. Nach 16 h wurde die Konzentration auf 31,7 mM erhöht. Als das Substrat wiederum fast vollständig aufgebraucht war, folgte die Zugabe von Glucose auf zunächst 19,6 mM und schließlich auf 80,8 mM. Sie wurde aber nur bis zu einer Konzentration von 48,1 mM verbraucht. Danach blieb der Wert auch bei Inkubation über weitere 24 h weitgehend konstant. Insgesamt konsumierte *B. graminisolvens* 106,8 mM Glucose und bildete ein breites Spektrum an Produkten. Mit 45,0 mM war Succinat das Hauptprodukt zum Ende der Fermentation, danach Propionat (33,3 mM). Formiat und Lactat wurden in ähnlichen Konzentrationen (24,8 mM bzw. 25,2 mM) produziert, danach folgte Pyruvat mit 21,4 mM. Interessanterweise war Acetat das am geringsten konzentrierte Produkt im Kulturüberstand (14,0 mM). Auch bei *B. graminisolvens* verlief die Produktbildung nicht gleichmäßig. Während Propionat in den ersten 24 h des Versuchs in leicht höheren Konzentrationen vorlag als Succinat, überstieg dessen Konzentration die von Propionat zu den späteren Messzeitpunkten. Lactat und Pyruvat wurden erst ab 16 bzw. 20 h Inkubation gemessen. Danach wurden sie vermehrt produziert. Acetat und Formiat hingegen erreichten ihre höchste Konzentration nach 20 h Inkubation. Später nahm die Konzentration in geringem Maße ab. Insgesamt wurde bei dieser Fermentation eine Propionat-ausbeute von 0,31 mol_P/mol_G (0,13 g_P/g_G) erreicht, mit einem Titer von 2,5 g/l. Während der Fermentation von *B. graminisolvens* fiel außerdem auf, dass sich der Kulturüberstand mit fortschreitender Inkubationsdauer gelb verfärbte (Abbildung A4). Dieses Phänomen trat bei *B. propionificaciens* nicht auf.

4.7 Etablierung genetischer Methoden

Eine Strategie auf dem Weg zu einem industriellen Produktionsstamm ist die Gentechnik. Außerdem können genetische Experimente aufschlussreiche Hinweise auf die Funktionsweise von Enzymen im Stoffwechsel geben. Die bisherigen Ergebnisse warfen die Frage auf, warum einige Stämme trotz gleicher genetischer Grundlagen mehr Propionat produzieren und andere mehr Succinat. Als Versuchsorganismus diente hier *P. vulgatus* ATCC 8284. Es ist eines der wenigen gut charakterisierten Propionat bildenden Bakterien des Phylums *Bacteroidota*, die der Sicherheitsstufe S1 zugeordnet sind. Weiterhin wurde für diesen Organismus bereits eine Technik zur Überproduktion der Lactat-Dehydrogenase entwickelt (Lück und Deppenmeier, 2022). Sie bedient sich des Vektors pG106, der die nötigen Gene besitzt, um durch Konjugation von *Bacteroidota* aufgenommen zu werden (Jones *et al.*, 2020). Ziel war die Überproduktion der Methylmalonyl-CoA-Mutase, eines der zentralen Enzyme des Succinat-Wegs. Anschließend sollten die Effekte auf die Propionatproduktion untersucht werden.

4.7.1 Erstellung des Plasmids pG106_np_mutA_scpA

Zunächst wurde die Zielsequenz über eine Blastn-Analyse identifiziert. Dafür wurde das Genom des Stammes *P. vulgatus* ATCC 8482 (NCBI Reference Sequence: NC_009614.1) mit der Sequenz der gesuchten Gene abgeglichen. Als Referenz dienten *mutA* und *mutB* aus *Propionibacterium*

freudenreichii subsp. *shermanii*. Sie codieren für die kleine und große Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase (Gene Bank: X14965.1). Bei der Analyse wurden zwei Gene identifiziert, BVU_RS01575 (kleine Untereinheit) und BVU_RS01580, (große Untereinheit), die jeweils als *mutA* und *scpA* annotiert waren und im Genom aufeinanderfolgen (Abbildung 4.15). Am 5'-Ende des Abschnittes wurde die Sequenz für ein mögliches Transportprotein identifiziert, am 3'-Ende, Sequenzen für Proteine der äußeren Zellmembran. Gene zur Produktion der anderen am Succinat-Weg beteiligten Enzyme lagen nicht in unmittelbarer Nähe. Die Nukleotidsequenz *mutA* bis einschließlich *scpA*, inklusive 238 bp am 5'-Ende, auf dem sich vermutlich der native Promotor befindet, wurden mit den Primern CD08_fw und CD08_rv amplifiziert (4442 bp) und mit Gibson-Assembly in den Vektor pG106 gebracht.

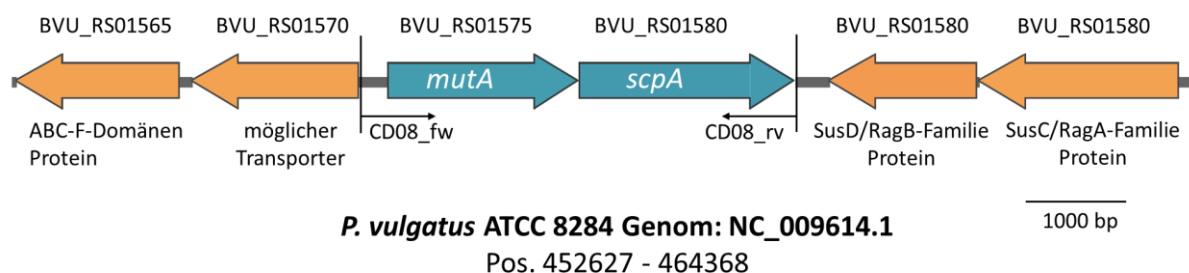


Abbildung 4.15: Bereich um die Gene *mutA* und *scpA* im Genom von *P. vulgatus* ATCC 8482.

Sowohl aufgereinigtes Plasmid als auch PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 4.16). In der Plasmidspur sind die verschiedenen möglichen Konformationen zu erkennen (von unten nach oben: linear einzelsträngig, *supercoiled*, *nicked*). Lediglich die lineare doppelsträngige DNA ist nicht zu erkennen. Entsprechend der Länge des Plasmids müsste sie auf der Höhe von 9278 Basenpaaren zu sehen sein. Die *supercoiled*-Form hatte jedoch ein sehr breites Signal, welches das linearisierte Plasmid überdeckte.

Nach Reinigung der PCR-Produkte wurde das Gibson-Assembly durchgeführt, um die Fragmente zu verbinden. Dann wurden kalziumkompetente *E. coli* DH5α Zellen mit dem Plasmid pG106_P.vu_np_mutA_scpA transformiert. Innerhalb von 24 h wuchsen auf den Selektionsplatten 19 Kolonien, von denen 12 mit Kolonie-PCR auf das Vorhandensein einer Insertionssequenz überprüft wurden (Abbildung 4.17). Als Kontrolle dienten Kolonien, die nur mit dem PCR-Produkt des Vektors transformiert worden waren (Kolonie 13 und 14) und Kolonien, die mit dem ursprünglichen Plasmid transformiert worden waren (Kolonie 15 und 16). Außerdem wurde die PCR direkt mit dem Plasmid pG106 als Matrize durchgeführt. Es wurden die Primer CD07_fw und CD07_rv verwendet. Sie binden an Sequenzen auf dem Plasmid vor und hinter der Insertionsstelle, sodass bei der PCR eines Plasmids mit Insertionssequenz ein DNA-Fragment von 4846 bp Länge entsteht, während bei der PCR eines Plasmids ohne Insertionssequenz Fragmente von 564 bp Länge vervielfältigt werden (Abbildung 4.18). Auf den Agarosegelen ist gut zu erkennen, dass die Kolonien 1, 5, 7 und 9 Plasmide mit Insertionen der erwarteten Länge tragen. Die PCR-Produkte aller anderen Kolonien und Kontrollen entsprechen in ihrer Länge der des ursprünglichen Plasmids in Spur 17 und enthalten keine Insertionen.

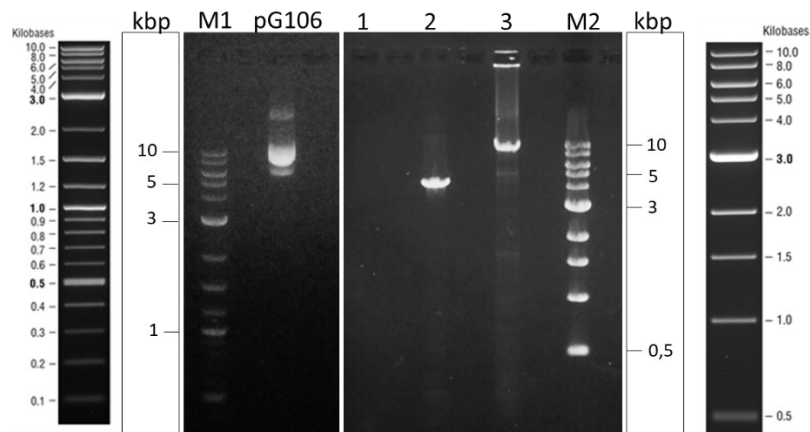


Abbildung 4.16: Gelelektrophorese des Plasmids pG106 und der PCR-Produkte zur Durchführung des Gibson-Assembly. 1%iges Agarosegel (w/v) in TAE-Puffer und 60 µl/l Midori Green. M1, Marker 1: 1kb Plus DNA Ladder (NEB); M2, Marker 2: 1 kb DNA Ladder (NEB); pG106, unverdautes Plasmid pG106; 1, H₂O_{dest.}; 2, PCR-Produkt von *P. vulgatus* ATCC 8482 genomischer DNA, amplifiziert mit den Primern CD08_fw und CD08_rv (Länge von 4379 bp); 3, PCR-Produkt von Plasmid pG106 amplifiziert mit den Primern CD09_fw und CD09_rv (Länge von 9448 bp).

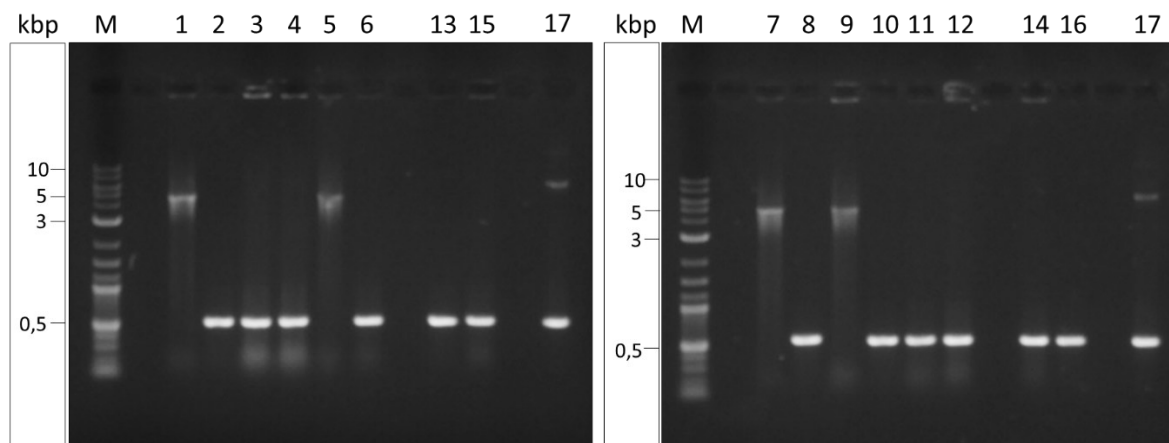


Abbildung 4.17: Gelelektrophoretische trennung der DNA-Fragmente aus der Kolonie-PCR mit Klonen von *E. coli* DH5α. PCR mit den Primern CD07_fw und CD07_rv, Taq-Polymerase. 0,8%iges Agarosegel (w/v) in TAE mit 60 µl/l Midori Green. M, Marker: 1 kb Plus DNA Ladder (NEB). 1-12, Transformation aus Gibson-Assembly mit pG106_np_mutA_scpA; 13-14, Transformation aus Gibson-Assembly mit pG106; 15-16, Transformation mit pG106; 17, pG106.

Im nächsten Schritt wurden die Plasmide der Kolonien 1 und 5 isoliert und in *E. coli* S17-1 transformiert. Im Gegensatz zu *E. coli* DH5α, besitzt dieser Stamm die nötigen Enzyme zur Konjugation. Bei der Konjugation wurden Zellen des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA gemeinsam mit Wildtyp-Zellen von *P. vulgatus* über Nacht bei 30 °C unter oxischen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Zellen auf eine Platte mit Gentamycin und Erythromycin transferiert und im Anaerobier-Zelt inkubiert. Gentamycin sorgte dabei dafür, dass das Wachstum von *E. coli* unterdrückt wurde. Erythromycin wirkte als Selektionsmarker für die Zellen von *P. vulgatus*, die das Plasmid aufgenommen hatten. Es zeigten nur Platten mit dem Ursprungsplasmid aus Kolonie 5 Wachstum. Von dieser Platte wurden je 4 Kolonien vereinzelt und wiederum eine Kolonie-PCR durchgeführt, deren Ergebnisse in

Abbildung 4.19 dargestellt sind. Wie zu sehen ist, tragen alle Klone von *P. vulgatus* das Plasmid mit der erwarteten Insertionssequenz.

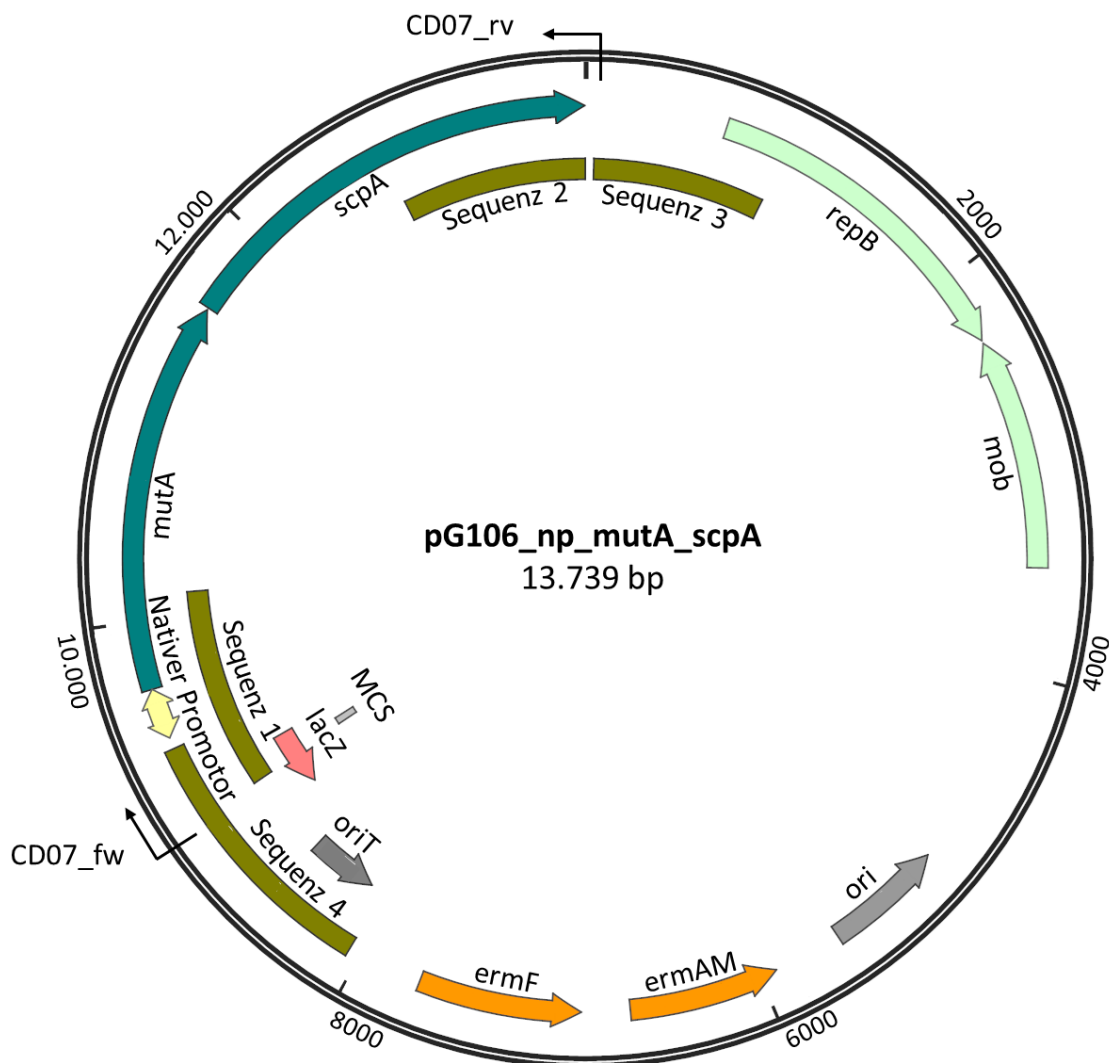


Abbildung 4.18: Karte von pG106_np_mutA_scpA. Das Plasmid wurde mittels Gibson-Assembly aus dem Plasmid pG106 (Jones *et al.*, 2020) und dem 4379 bp-langen Fragment np_mutA_scpA aus *P. vulgatus* ATCC 8284 erstellt. *ori*, origin of replication (Replikationsstartpunkt); *ermAM*, Erythromycin Resistenzkassette *E. coli*; *ermF*, Erythromycin Resistenzkassette *Porphyromonas* und *Bacteroides*; *oriT*, Transferstartpunkt (origin of transfer); *lacZ*, β -Galaktosidase Gen; MCS, Multiple Klonierungsstelle; *mutA*, Gen für Methylmalonyl-CoA-Mutase kleine Untereinheit; *scpA*, Gen für Methylmalonyl-CoA-Mutase große Untereinheit; *repB*, Primase-Gen/replikatives Protein; *mob*, Mobilisierungs-Nuclease; CD07_fw und CD07_rv, Primer zur Identifizierung positiver Klone; Sequenz 1, Abschnitt wurde mit Primer CD07_fw sequenziert; Sequenz 2, Abschnitt wurde mit Primer CD07_rv Sequenziert; Sequenz 3, Abschnitt wurde mit Primer CD22_fw sequenziert; Sequenz 4, Abschnitt wurde mit Primer CD22_rv sequenziert.

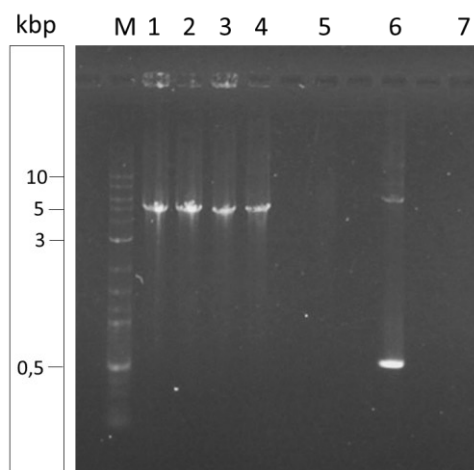


Abbildung 4.19: Kolonie-PCR mit Klonen von *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA. PCR mit den Primern CD07_fw und CD07_rv, Taq-Polymerase. 0,8%iges Agarosegel (w/v) in TAE mit 60 µl/l Midori Green. M, Marker: 1 kb Plus DNA Ladder (NEB). 1-4, Klonen von *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA; 5, genomische DNA von *P. vulgatus* WT; 6, PCR-Produkt vom Plasmid pG106; 7, H₂O_{dest.}

Als nächstes wurde das Plasmid aus *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA (Kolonie 1) und *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA (abgekürzt *P. vulgatus* mutA) (Kolonie 1) isoliert und Abschnitte davon sequenziert. Eine Karte des erwarteten Plasmids ist in Abbildung 4.18 gezeigt. Für die Sequenzierung wurden die Primer CD07_fw, CD07_rv, CD22_fw und CD22_rv verwendet, mit denen jeweils die Abschnitte 1 – 4 überprüft wurden (Abbildung 4.18). Der Abgleich ist in den Abbildungen A5 – A8 zu sehen. Drei der 8 Sequenzen zeigten volle Übereinstimmung ohne Lücken (Tabelle A17). Bei den restlichen Abweichungen von der Zielsequenz handelte es sich um Austausche, die jeweils nur in einem der zwei Plasmide gefunden wurden und auf schlechte Signalqualität zurückzuführen sind. Sequenz 3 bildet eine Ausnahme. Hier wurde an der Position 666 in beiden Plasmiden die Base Adenin anstelle von Cytosin identifiziert. Der Austausch befindet sich vor einem Abschnitt, in dem 5 Adenin Basen aufeinanderfolgen. Da gerade lange Basenrepetitionen bei der Sequenziermethode fehleranfällig sind, kann dies die Erklärung für die Abweichung sein. Ein weiteres interessantes Phänomen ist in der Sequenz 4 zu sehen (Abbildung A8), die mit dem Primer CD22_rv sequenziert wurde. Die Sequenz aus dem *P. vulgatus*-Stamm entspricht genau der publizierten Sequenz des Plasmids pG106. Das Plasmid aus *E. coli* S17-1 weist hingegen eine Lücke von 257 bp auf. Diese Lücke befindet sich im *Origin of Transfer* (oriT) des Plasmids, welcher unverzichtbar für die Konjugation ist. Dies erklärt, warum die Konjugation mit Kolonie 1 von *E. coli* S17-1 nicht erfolgreich war. Abgesehen von dieser großen Lücke stimmt die Sequenz auch auf dem *E. coli*-Plasmid genau überein. Es müssen jedoch noch weitere Abschnitte sequenziert werden, um die komplette Sequenz des Plasmids zu überprüfen.

4.7.2 Physiologische Charakterisierung des Stammes *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA

Nachdem das Vorhandensein des Plasmids in *P. vulgatus* mutA bestätigt wurde, sollte der neue Stamm auf seine physiologischen Eigenschaften untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Wachstumsversuch im Plattenlesegerät sowohl in DMMG als auch in PYG durchgeführt. Da die Überproduktion der Methylmalonyl-CoA-Mutase auch einen erhöhten Bedarf an B₁₂ bewirkt, wurde den Medien jeweils die dreifache Menge 5 x Wolin-Vitaminlösung mit B₁₂ hinzugefügt, sodass die B₁₂-

Konzentration 63 ng/ml betrug. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen, zeigen die drei Stämme unterschiedliches Wachstum, abhängig vom Medium. Während das Wachstum in Komplexmedium in allen Kulturen ähnlich verlief und Wachstumsraten zwischen $0,58 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und $0,47 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ erreicht wurden (Tabelle 4.5), unterschieden sich die Stämme deutlich in DMMG. ATCC8284 zeigte eine Wachstumsrate von $0,30 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Die zwei Stämme mit Plasmid erreichten jedoch nur Wachstumsraten von $0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ und $0,16 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Alle drei Organismen produzierten Acetat, Propionat und Succinat. Formiat wurde nur in der Hälfte der Proben nachgewiesen. Es wurde im Komplexmedium nur vom Stamm mit dem „leeren“ Plasmid pG106 gebildet, dafür aber im Wildtyp und im *mutA*-Stamm nur im definierten Medium. Abgesehen von Formiat, gab es in den DMMG-Kulturen keine Unterschiede der Produktbildung zwischen den Stämmen. So lag die Propionatkonzentration aller Kulturen in einem Bereich von $4,6 \pm 0,3$ bis $4,0 \pm 0,6 \text{ mM}$. Im PYG-Medium traten größere Schwankungen auf. Besonders auffällig waren diese bei Propionat und Succinat. Während der Wildtyp $26,6 \pm 0,4 \text{ mM}$ Propionat bildete, entfielen auf *P. vulgatus* pG106 nur $21,9 \pm 1,6 \text{ mM}$. Die Propionatproduktion des Stammes pG106_np_mutA_scpA viel mit $15,5 \pm 0,8 \text{ mM}$ noch deutlich geringerer aus. Hingegen erreichte dieser Organismus mit $11,9 \pm 0,8 \text{ mM}$ die höchste Succinatkonzentration. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme des Plasmids keinen fördernden Effekt auf die Propionatkonzentration hatte, stattdessen verlangsamte sie das Wachstum durch die zusätzliche Produktion des Plasmides im definierten Medium und steigerte die Succinatproduktion.

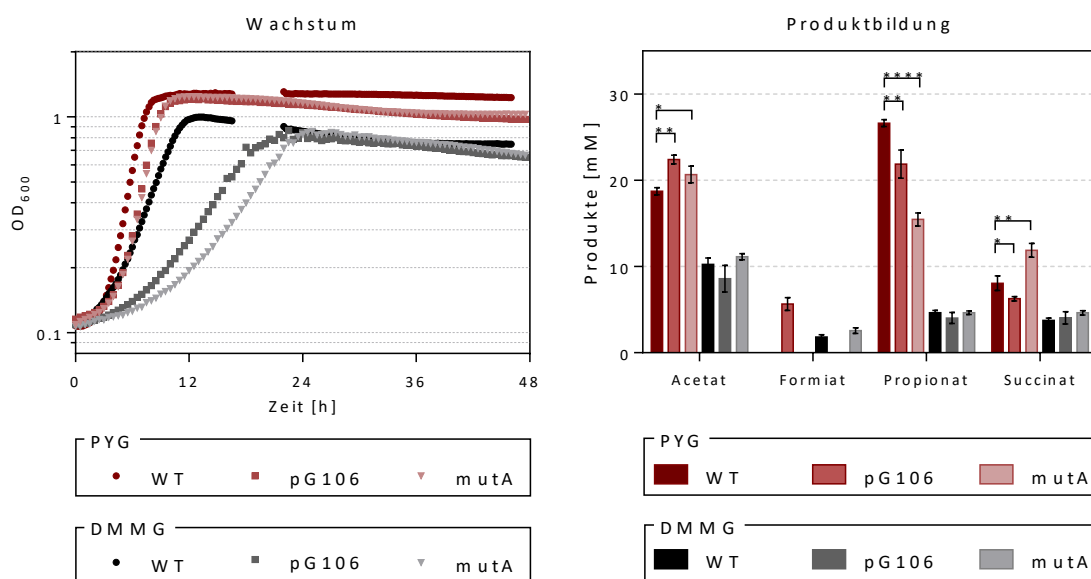


Abbildung 4.20: Wachstum und Produktbildung des *mutA_scpA* Überproduktionsstammes. *P. vulgatus* ATCC8284 (WT), *P. vulgatus* pG106 (pG106) und *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA (*mutA*) wurden zu einer OD_{600} von 0,2 in DMMG und PYG mit je 15 mM Glucose angeimpft und für 48 h bei 37 °C im Plattenlesegerät inkubiert (Gasatmosphäre: $N_2/CO_2/H_2$; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Alle 15 Minuten erfolgte die Messung der OD_{600} . Produktkonzentrationen wurden zum Start und Ende des Versuchszeitraumes mittels HPLC bestimmt. $n = 3$, eine repräsentative Wachstumskurve ist gezeigt.

Tabelle 4.5: Wachstumsraten und maximale Zelldichte des *mutA_scpA* Überproduktionsstammes. Beschriftung und Versuchsdurchführung vgl. Abb. 4.20. Aus der Wachstumskurve wurden Mittelwert und Standardabweichung der Wachstumsrate (μ) und die maximale Zelldichte (OD_{max}) berechnet. $n=3$.

Medium	μ [h^{-1}]			OD_{max}		
	WT	pG106	mutA	WT	pG106	mutA
PYG	$0,58 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,009$	$1,31 \pm 0,004$	$1,22 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,02$
DMMG	$0,30 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,08$	$0,86 \pm 0,006$

4.7.3 Nachweis der Überproduktion

Um zu testen, ob die Gene auf dem Plasmid exprimiert werden, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Dafür wurde die gesamte RNA einer Zelle isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es wurde RNA aus den drei Stämmen (PYG, DMMG) auf die Transkription der kleinen Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase untersucht. Referenz war das Gyrase-Gen (*gyrA*). Verglichen wurde die Expression mit der des Wildtyps. Aus den Daten wurde die relative Transkriptabundanz ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert) berechnet (Abbildung 4.21). Daran, dass der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert unter 1 liegt, ist zu erkennen, dass die Methylmalonyl-CoA-Mutase des Stammes pG106 weniger als im Wildtyp exprimiert wurde ($0,64 \pm 0,2$ bzw. $0,91 \pm 0,2$). Im Stamm *np_mutA_scpA* liegt das Transskript aber in höheren Konzentrationen vor ($22,9 \pm 6,5$ bzw. $24,1 \pm 2,5$). Die Ergebnisse wurden mit einen weiteren Referenzgen überprüft. Das Gen *I23* codiert für ein ribosomales Protein und wurde bereits bei *P. vulgaris* in einer ähnlichen Untersuchung genutzt (Lück und Deppenmeier, 2022). Außerdem wurde auch die Transkriptabundanz des Gens *scpA* für die große Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase überprüft. Die verschiedenen Kombinationen mit Referenzgen und Test-Gen erzielten aber alle ähnliche Ergebnisse (Abbildung A9).

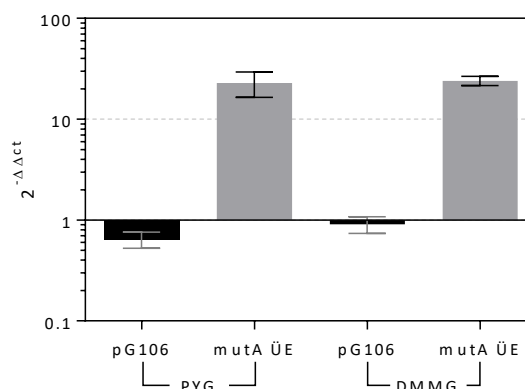


Abbildung 4.21: Relative Transkriptabundanz des Gens *mutA* in *P. vulgaris* pG106 und pG106_*np_mutA_scpA* (*mutA*) im Vergleich zum Wildtyp. Zellen wurden in je 5 ml DMMG und PYG bei 37 °C inkubiert und in der exponentiellen Phase geerntet (Gasatmosphäre: N_2/CO_2 ; 80 %/20 %; v/v). Es wurden qPCR-Reaktionen mit den Primern CD15_fw und CD15_rv durchgeführt, die komplementär zu Gen *mutA* aus *P. vulgaris* ATCC 8284 sind. Als Referenzgen diente *gyrA* aus *P. vulgaris*. Zellen von *P. vulgaris* ATCC 8284 waren Referenz-Kulturen.

4.8 Isolierung und Charakterisierung von *Bacteroidota*

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, Propionat produzierende *Bacteroidota* aus Umweltproben zu isolieren und auf deren Produktbildung zu untersuchen. Dabei sollten vor allem solche Stämme angereichert werden, die die Säure bei Wachstum auf komplexen Substraten wie Xylan oder Cellulose bilden.

4.8.1 Etablierung einer Anreicherungs-methode

Zunächst wurde getestet, auf welchem Substrat sich Propionat bildende Konsortien am besten anreichern lassen. Dazu wurde die erste Anreicherung mit Proben aus dem Abwasserwerk mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Nachdem deutliche Zeichen für Wachstum zu sehen waren, wie beispielsweise eine Trübung oder Gasbildung, wurden die Proben in neue Kulturröhrchen überführt. Gleichzeitig wurden Fermentationsprodukte mittels HPLC gemessen. Tabelle 4.6 zeigt die Propionatkonzentration beispielhaft für die 30-°C-Anreicherungen. In der ersten Passage wurde Propionat mit allen Substraten gebildet. Besonders hohe Konzentrationen fanden sich dabei in der Primärschlamm-Kultur mit Xylan (29,8 mM). In der zweiten Passage kam es jedoch zu einem Rückgang der Propionatproduktion in fast allen Fällen. Die höchsten Konzentrationen wurden in der Regel in den Anreicherungen mit Xylan gemessen und auch in der 2. Passage lag die Propionatkonzentration dieser Ansätze durchgehen über 10 mM, während auf fast allen anderen Substraten nur noch maximal 5,9 mM (Primärschlamm - Avicel) gemessen wurden. Um das Probenaufkommen zu verringern, wurden für die 3. Passage nur noch Xylan oder Xylooligosaccharide verwendet.

Tabelle 4.6: Propionatkonzentration [mM] in Anreicherungen aus dem Abwasserwerk Rostock. Die Proben wurden aus verschiedenen Prozessstufen entnommen (Zulauf, Vorschlämm, Primärschlamm, Bio-P Becken) und in 20 ml DMMG gegeben. Dann wurden 5 ml AM mit 10 g/l verschiedener Substrate mit 1 % der Mischung inokuliert (P1) und bei 30 °C inkubiert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/20 %; v/v). Nachdem Anzeichen von Wachstum erkennbar waren, wurden die Kulturen in AM überimpft (P2). Die Bestimmung der Propionatkonzentration erfolgte jeweils am Ende der Inkubation.

Substrat	Zulauf		Primärschlamm		Vorschlämm		Bio-P Becken	
	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Xylan	23,9	14,6	29,8	24,4	16,0	16,7	18,6	13,7
Avicel	24,6	0,5	13,7	5,9	5,1	0,4	2,9	0,2
Whatman	15,0	4,2	10,8	2,8	6,4	0,2	5,2	0,2
Chitin	-	0,6	8,7	0,4	14,6	1,5	24,7	1,6

Nach Passage 4 sollte die mikrobielle Zusammensetzung der Anreicherungen aus den Klärwerkproben geprüft werden. Dafür wurde die Methode der Amplicon-Sequenzierung angewandt. Dabei werden Sequenzunterschiede hoch variabler Abschnitte innerhalb der 16S rRNA-Sequenz zur Identifizierung und Quantifizierung von Bakterienspezies genutzt. Drei der vier Proben wurden zur Analyse eingeschickt. Die Kulturen setzten sich aus verschiedenen Phyla zusammen (Abbildung 4.22). In den Anreicherungen BX30 und ZX30 waren *Bacteroidota* mit ca. 50 % die abundantesten Bakterien. VX30 enthielt hauptsächlich *Pseudomonatota* (*Proteobacteria*), wobei auch ca. 25 % *Bacteroidota* vorkamen. Darüber hinaus waren auch Bakterien des Phylums *Bacillota* (*Firmicutes*) zwischen 12 % und 20 %

enthalten. ZX30 enthielt im Vergleich zu den anderen zwei Anreicherungen eine gesteigerte Menge *Spirochaeta*. Weitere Phyla waren nur in einer geringen Abundanz vertreten.

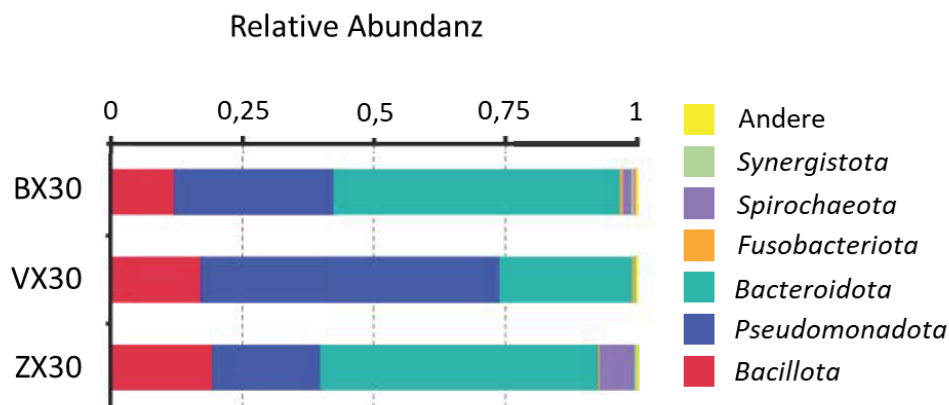


Abbildung 4.22: Relative Abundanz von Bakterien verschiedener Phyla in den Klärwerk-Anreicherungen. Proben aus dem Klärwerk (Z, Zulauf; V, Vorschlamm; B, Bio-P Becken) wurden mit 10 g/l Xylan in AM bei 30 °C angereichert. Jeweils die Passage P4 dieser Anreicherungen wurde mittels Amplicon-Sequenzierung untersucht.

Zur Isolierung Propionat bildender *Bacteroidota* aus den Anreicherungen wurde zunächst Agar mit dem Indikator Bromocresol-Purpur verwendet. Der durch die Säureproduktion hervorgerufene Abfall des pH von 7 auf 5, sollte die Farbe der Kolonien von Violett zu Gelb bewirken. So sollten gezielt diejenigen Kolonien identifiziert werden, die besonders schnell viel Säure abgeben (Tan *et al.*, 2018). Wie in Abbildung 4.23 zu sehen, konnte der Farbumschlag beobachtet werden. Allerdings beschränkte sich die Verfärbung nicht auf einzelne Kolonien, sondern betraf die gesamte Platte, sodass diese Methode nicht für die gezielte Auswahl von Säurebildnern geeignet war und der Indikator nicht weiter Verwendet wurde. Die Isolierten Kolonien wurden drei Mal auf Agarplatten vereinzelt und dann wieder in Flüssigmedium überführt (3.9.4).

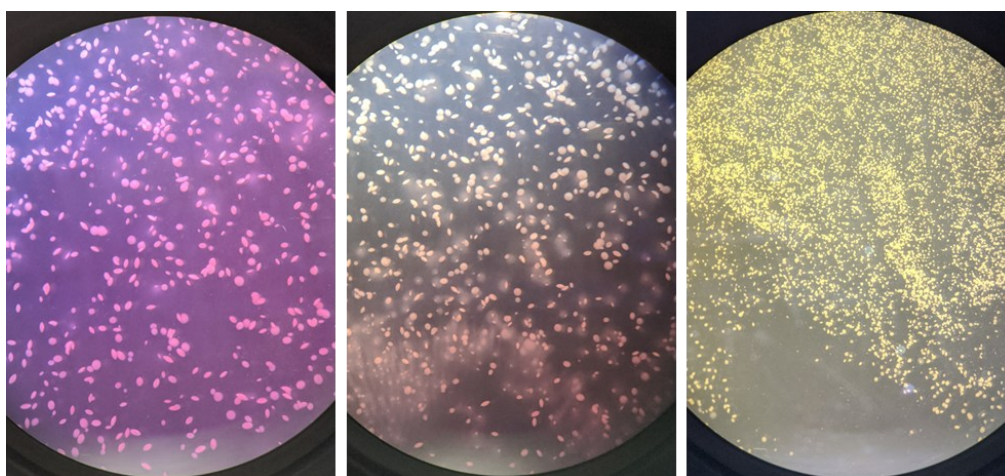


Abbildung 4.23: Gussplatten zur Isolierung von *Bacteroidota* gefärbt mit Bromkresolpurpur. 100 µl Anreicherungskultur aus dem Klärwerk (Passage 5), verdünnt mit 1 x PBS wurde mit ca. 20 ml AM-X-Agar mit 0,012 g/l Bromkresolpurpur vermischt und bei 30 °C für 3 Tage inkubiert.

4.8.2 Produktbildung der Isolate

Im Laufe dieser Arbeit wurden 24 Stämme isoliert, die dem Phylum *Bacteroidota* zugeschrieben werden (Tabelle 4.7). Es wurden aber auch Stämme identifiziert, die zu anderen Phyla gehören. BgIXo374 – 6 waren am nächsten verwandt mit dem Organismus *Paenibacillus oralis* (*Bacillota*). Auch *Klebsiella pneumoniae* (*Pseudomonadota*) wurde in einigen Klärwerkproben gefunden.

Tabelle 4.7: Produktbildung und Identifizierung von *Bacteroidota*-Isolaten. Sie wurden über 48 h in PYHVG bei 30 °C oder 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Säuren Acetat, Succinat und Propionat mit HPLC. Die Identifizierung erfolgte über einen Sequenzabgleich der PCR-Produkte (Eubac1-, Eubac2-Primer) mit der Sequenz der 16S-rRNA.

Isolat	Produkte [mM]			Am nächsten verwandte Art (%Ident.)	Risiko-Gruppe
	Acetat	Propionat	Succinat		
ZX302	23,1	0,0	18,7	<i>B. koreensis</i> (99,4%)	1/2
ZX303	11,5	2,8	10,8	<i>B. ovatus</i> (98,55)	2
ZX304	11,7	1,9	12	<i>B. luhongzhouii</i> (99,45%)	1
ZX305	11,5	2,8	10,8	<i>B. luhongzhouii</i> (99,45%)	1
PX304	11,3	2,4	10,2	<i>B. ovatus</i> (99,66%)	2
PX305	11,2	2,1	10,8	<i>B. ovatus</i> (99,91%)	2
BX304	11,2	5,8	8,0	<i>B. kribbi</i> (98,81)	1/2
BX305	10,9	5,8	8,1	<i>B. koreensis</i> (98,90%)	1/2
BX306	11,2	5,1	8,0	<i>B. koreensis</i> (99,17%)	1/2
Bg0X371b	11,1	1,3	11,4	<i>B. ovatus</i> (99,03%)	2
BgIX371	10,4	2,6	4,1	<i>B. uniformis</i> (99,54%)	2
BgIX372	9,7	1,6	4,6	<i>B. uniformis</i> (99,73%)	2
BgIX374	10,7	0,0	0,6	<i>B. uniformis</i> (99,55%)	2
BgIXo371	11,2	3,4	3,0	<i>B. uniformis</i> (99,42)	2
BgIXo372	9,0	1,3	9,3	<i>B. uniformis</i> (99,64)	2
BgIXo373	7,8	18,5	1,3	<i>B. xylanisolvens</i> (98,46%)	1
BgIXo301	9,4	1,9	4,6	<i>B. uniformis</i> (99,55%)	2
BgIXo305	7,8	0,9	1,3	<i>Dysgonomonas gadei</i> (95,87%)	1
BgIIX375	7,5	7,5	9,3	<i>B. xylanisolvens</i> (98,1 %)	1
BgIIX376	8,9	3,1	6,3	<i>B. uniformis</i> (99,8 %)	2
BgIIXo303	8,6	2,2	7,2	<i>B. uniformis</i> (98,95%)	2
BgIIXo304	9,6	2,3	7,2	<i>B. uniformis</i> (99,71%)	2
BGIIXo305	9,2	3,4	11,0	<i>B. xylanisolvens</i> (98,31%)	1
BGIIXo306	9,3	2,3	6,5	<i>B. uniformis</i> (99,49%)	2

Von den *Bacteroidota* zählte ein Großteil in die Sicherheitskategorie 2. 10 Isolate waren am nächsten Verwandt mit der Spezies *B. uniformis*, gefolgt von *B. ovatus* (4). Zu den Spezies der Sicherheitskategorie S1 gehörte *B. xylanisolvens* (3), *B. luhongzhouii* (2) und *Dysgonomonas gadei* (1). *B. koreensis* (3) und *B. kribbi* sind sehr eng verwandt mit *B. ovatus* (Shin et al., 2017), weshalb eine Abgrenzung rein durch die Sequenz des 16S rRNA-Gens schwierig ist. Fast alle Isolate produzierten Acetat, Propionat und Succinat auf PYHVG, lediglich ZX302 (*B. koreensis*) und BgIX374 (*B. uniformis*) produzierten kein Propionat. Interessant ist, dass einige Isolate, die laut Sequenzübereinstimmung derselben Spezies angehören, trotzdem unterschiedliche Produktspektren aufwiesen. Insgesamt produzierten die meisten Isolate nur geringe Mengen Propionat unter 5 mM. Eine

Ausnahme ist das Isolat BgIXo373 (*B. xylanisolvens*), dessen Fermentation eine Propionat-Konzentration von 18,5 mM hervorbrachte.

4.8.3 Wachstum und Produktbildung des Isolats BGG-A1

Parallel zu den Anreicherungen dieser Arbeit wurde der Stamm BGG-A1 von Sonja Kurrer aus Proben der Biogasanlage Güstrow isoliert (Tabelle A1). Der Stamm wies hohe Sequenzübereinstimmung mit dem Bakterium *Dysgonomonas gadei* auf. Dieses ursprünglich aus einer infizierten Gallenblase isolierte Bakterium wurde bisher noch nicht auf seine Propionatproduktion untersucht (Hofstad *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden die gleichen Wachstumsversuche durchgeführt wie auch für die DSMZ-Stämme (4.3). Sowohl in definiertem Medium (DMMG) als auch mit 0,5 g/l Hefeextrakt (DMMG-H) erreichte BGG-A1 die stationäre Phase nach ca. 12 h (Abbildung 4.24). Die maximal gemessene OD₆₀₀ betrug $0,62 \pm 0,01$ in DMMG und $0,67 \pm 0,01$ in DMMG-H. Die Wachstumsrate war in DMMG-H mit $0,320 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ geringfügig höher als in DMMG ($0,283 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$).

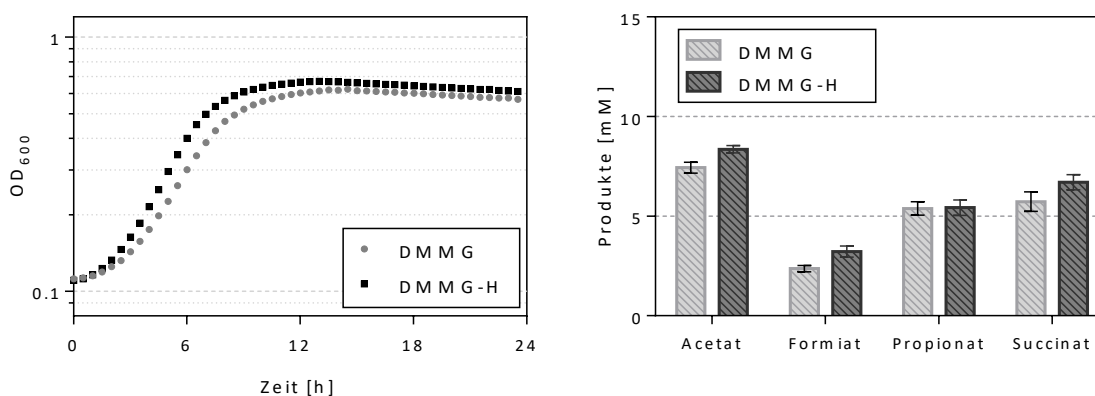


Abbildung 4.24: Wachstum und Produkte des Isolats BGG-A1. Der Stamm wurde für 24 h im 48-Well Format in DMMG und DMMG-H bei 37 °C kultiviert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Alle 15 Minuten wurde die OD₆₀₀ gemessen (eine repräsentative Kurve pro Wachstumsbedingung, jede 2. Messung). Am Anfang und Ende wurden Produktkonzentrationen mittels HPLC bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Unter beiden Bedingungen produzierte das Isolat Acetat, Formiat, Propionat und Succinat, wobei Acetat mit $7,4 \pm 0,3 \text{ mM}$ das Hauptprodukt darstellte. Propionat und Succinat wurden in nahezu gleicher Konzentration von $5,4 \pm 0,4 \text{ mM}$ und $5,7 \pm 0,5 \text{ mM}$ nachgewiesen und Formiat in einer Konzentration von $2,4 \pm 0,2 \text{ mM}$. In DMMG-H produzierte der Stamm etwas mehr der Säuren, maximal waren die Konzentrationen jedoch um 0,9 mM erhöht (Acetat). Dementsprechend erreichte der Stamm eine Propionatausbeute von $0,15 \pm 0,01 \text{ gp/gG}$ in DMMG bzw. $0,14 \pm 0,01 \text{ gp/gG}$ in DMMG-H. Zwar produzierte der Stamm im Vergleich zu den bisher untersuchten Stämmen relativ viel Succinat, dennoch gehörte er mit seiner Ausbeute zu den effektiveren der bisher untersuchten Spezies.

4.8.4 Stoffwechselbilanz des Isolats BGG-A1

Als nächstes wurde die Stoffwechselbilanz des Stammes BGG-A1 untersucht. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt ähnlich wie mit *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* in Abschnitt 4.3. Der

Unterschied war, dass pro Messpunkt eine 50-ml-Kultur DMMG angeimpft wurde, für die zu unterschiedlichen Zeitpunkten Trockengewicht, Proteingehalt, OD₆₀₀ und Stoffkonzentrationen bestimmt wurden. Anhand der Wachstumsparameter in Abbildung 4.25 ist zu erkennen, dass die einzelnen Werte jeder Kultur eine Kurve ähnlich eines typischen Wachstumsverlaufes ergeben. Besonders die Werte für OD₆₀₀ und Trockengewicht innerhalb der exponentiellen Phase korrelieren stark.

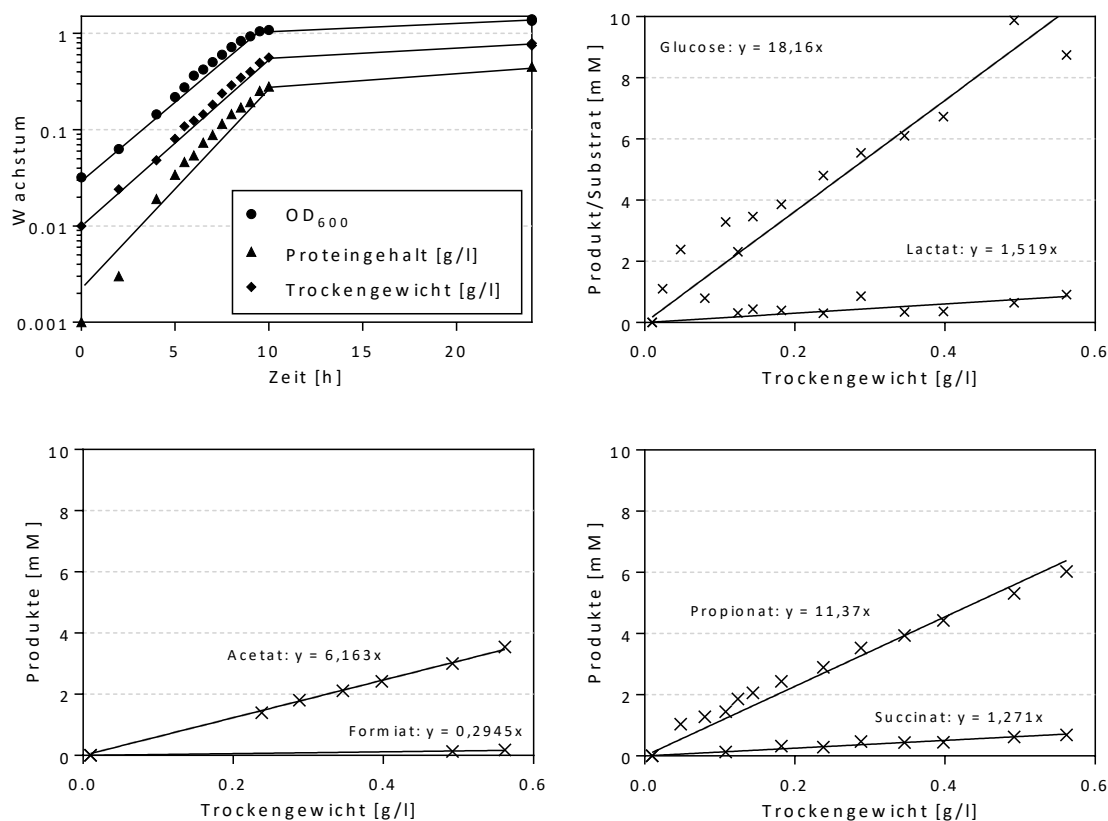


Abbildung 4.25: Wachstum von BGG-A1 anhand verschiedener Parameter. Pro Messzeitpunkt wurden je 50 ml DMMG mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert und bei 37 °C unterschiedlich lange inkubiert. Dann wurden OD₆₀₀, Proteingehalt und Zelltrockengewicht bestimmt. Weiterhin wurden Produktkonzentrationen mittels HPLC gemessen und diese im Verhältnis zum Trockengewicht aufgetragen.

Die Produktbildung konnte direkt mit der Zelltrockenmasse ins Verhältnis gesetzt werden. Der Stamm verbrauchte pro g Trockengewicht 18,1 mM Glucose und produzierte 6,2 mM Acetat. Interessanterweise erhöhte sich das Verhältnis von Propionat zu Succinat deutlich im Vergleich zum vorherigen Versuch (11,4 mM/g_{Tg} Propionat, 1,3 mM/g_{Tg} Succinat). Lactat und Formiat wurden ebenfalls in geringen Mengen produziert. In der letzten vermessenen Kultur erreichte die Fermentation eine maximale Propionatausbeute von 0,67 mol_p/mol_G. Mit den erhaltenen Werten wurde erneut eine Bilanzrechnung aufgestellt (Tabelle 4.8). Damit die Kohlenstoffbilanz ausgeglichen ist, musste eine CO₂-Produktion von 11 mM/g Trockengewicht über den oxidativen Pentosephosphatweg angenommen werden. Das entspräche 60 % der verstoffwechselten Glucose. Dies resultiert in einer H₂-Bilanz von 95 %. Der Stoffwechsel wäre also größtenteils ausgeglichen.

Tabelle 4.8: Kohlen- und Wasserstoffbilanz von wachsenden Zellen des Isolats BGG-A1. Die in der Spalte Produkte/Substrate Fett markierten Werte sind aus Produktmessungen bestimmt, alle anderen rechnerisch ermittelt. Alle Angaben in mmol/gTG

	Substrat/Produkte	C	H	O
1	Acetat ($C_2H_4O_2$)	6,2	12,3	12,3
2	Formiat (CH_2O_2)	0,3	0,6	0,6
3	Propionat ($C_3H_6O_2$)	11,4	34,1	22,7
4	Succinat ($C_4H_6O_4$)	1,3	5,1	5,1
5	Lactat ($C_3H_6O_6$)	1,5	4,5	4,5
6	CO ₂ (PFOR)	5,9		11,7
7	Zellmasse ($C_1H_{1,81}O_{0,49}$)	37,1	67,6	17,9
8	Summe	99,3	177,7	74,9
9	Glucose	18,2	109,0	109,0
10	CO ₂ Fixierung (PEP-CK)	1,3	1,3	2,5
11	Differenz 1	11,0	40,2	36,6
12	CO ₂ (PPP)	11,0	11,0	21,9
13	Differenz 2	0,00	40,2	14,7
14	H ₂ O		29,4	14,7
15	Differenz 3		10,8	
16	Bilanz		95,0 %	

1 - 5, 9: aus Abbildung 4.25;

6: $6 = 1 - 2$;

7: Aus Elementarbestimmung (Tabelle A16)

8: Summe 1 bis 7

10: $10 = 4$

11: $9 + 10 - 8$

12: Berechnet so, dass $C_9 + C_{10} - C_8 = 0$

13: $11 - 12$

10: Berechnet so, dass $O_9 - O_{10} = 0$

11: $9 - 10$

12: $100 - (H_{11} \cdot 100) / H_6$

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass *Bacteroidota* mit der verwendeten Technik angereichert und isoliert werden können. Besonders die Anreicherungskulturen mit Xylan erreichten hohe Propionatkonzentrationen. Die meisten der Isolate produzierten jedoch nur geringe Mengen Propionat und viele zeigten große genetische Verwandtschaft mit S2-Organismen, weswegen sie nicht weiter untersucht wurden. Dennoch konnte BGG-A1 als ein Isolat identifiziert werden, was auf komplexen Substraten wächst und auf Glucose relativ viel Propionat produziert. Weiterhin wurde für dessen Typstamm noch keine Propionatproduktion experimentell nachgewiesen und dessen Stoffwechsel ist noch weitgehend unerforscht.

5 Diskussion

Neben den *Bacillota* hat das Phylum *Bacteroidota* den größten Anteil am Darm-Mikrobiom des Menschen (Eckburg *et al.*, 2005). Dabei übernehmen die Bakterien wichtige Aufgaben, die die Gesundheit des Wirts beeinflussen. Den *Bacteroidota* kommt dabei eine wichtige Rolle beim Abbau von pflanzlichen und wirtsspezifischen Polysacchariden zu. Beispielsweise sind viele *Bacteroidota* am Abbau von Xylan, Pektin und Inulin beteiligt, können aber auch die von den Mukosazellen sezernierten Mucine nutzen (Pudlo *et al.*, 2022). Aus den Substraten produzieren *Bacteroidota* verschiedene organische Säuren wie Acetat, Propionat und Succinat, die die Zusammensetzung des Mikrobiomes modulieren, die epitheliale Barriere stärken und so die Kolonisierung durch Pathogene erschweren (Mann *et al.*, 2024). Besonders Bakterien der Klasse *Bacteroidia* spielen dabei eine gesundheitsfördernde Rolle, können aber auch als opportunistische Pathogene wirken (Zafar und Saier, 2021). Dies hat dazu geführt, dass sie in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen haben und intensiv erforscht wurden. Obwohl die Propionatproduktion einen wichtigen Teil im Stoffwechsel dieser Organismen spielt, ist nur wenig darüber bekannt. Das zeigt sich besonders in Spezies, die nicht zu den Modellorganismen zählen. Propionat ist aber über den Gesundheitsaspekt hinaus ein wichtiger Metabolit der Zellen. Es wird als Bulk-Chemikalie in einer Vielzahl von Industriezweigen, beispielsweise als Vorläufer bei der Produktion von Kunststoffen, Lacken und Kosmetika verwendet. Außerdem ist es ein wichtiges Konservierungsmittel insbesondere in der Futtermittelindustrie (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Aufgrund seiner vielfältigen Nutzung gibt es schon lange das Bestreben, diese Chemikalie über biotechnologische Verfahren herzustellen. Bisherige Versuche, die sich alle auf andere Propionatproduzenten fokussierten, schafften es jedoch nicht, die erforderliche Ausbeute und Produktivität zu erreichen, die notwendig sind, um mit der petrochemischen Produktion zu konkurrieren (Ranaei *et al.*, 2020). In dieser Arbeit sollten daher die *Bacteroidota* genauer auf ihre Propionatproduktion untersucht werden. Mit ihrer Fähigkeit auf pflanzlichen Polymeren zu wachsen, eröffnen sie neue Möglichkeiten der Propionatproduktion beispielsweise aus landwirtschaftlichen Abfällen. Bei der Untersuchung wurden dabei mehrere Ansätze verfolgt. Zunächst sollte eine Auswahl von Propionatproduzenten getroffen werden, die dann miteinander verglichen wurden, um besonders gute Produzenten zu identifizieren. Diese wurden dann genauer auf ihre physiologischen Eigenschaften untersucht. Die zweite Strategie bestand darin, einen bereits etablierten Organismus gentechnisch zu verändern, um dessen Propionatproduktion zu verbessern. Schließlich sollten auch neue Propionatproduzenten isoliert werden, um das Spektrum Propionat produzierender *Bacteroidota* zu erweitern.

5.1 Auswahl geeigneter *Bacteroidota*

Darmassoziierte *Bacteroidota* gehören häufig den Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, und *Parabacteroides* an (Falony *et al.*, 2016). Diese Genera lassen sich in der Klasse der *Bacteroidia* zusammenfassen. Physiologische Untersuchungen dieser Gruppe konzentrieren sich auf einige wenige Modellorganismen, wie beispielsweise *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* oder *B. fragilis*. *B. fragilis*, wurde bereits 1898 von Veillon und Zuber beschrieben und auch die anderen Spezies werden bereits seit dem Ende des 20. Jahrhundert erforscht (Cato und Johnson, 1976). Dies wird beispielsweise an der Anzahl der Suchergebnisse auf PubMed deutlich. Während das Stichwort „*B. fragilis*“ 2.976 Ergebnisse erzielte, wurden für „*B. thetaiotaomicron*“ noch 710 Einträge angezeigt und 390 für „*B. ovatus*“ (30.09.2024).

Die drei genannten Spezies sind aber in Deutschland in der Sicherheitskategorie 2 eingestuft. Eine biotechnologische Nutzung dieser Stämme wäre daher nur unter Beachtung spezieller Sicherheitsvorschriften möglich, was zusätzliche Kosten und bürokratische Hürden bedeuten würde und eine biotechnologische Nutzung unattraktiv macht. Im Zuge einer Literaturrecherche wurden jedoch weitere Spezies identifiziert, die Propionat produzieren und als S1-Stämme eingestuft sind. Viele von ihnen wurden erst seit den frühen 2000er Jahren beschrieben und sind daher noch wenig erforscht, was sich an der Datenlage bemerkbar macht. So ergab die Suche auf PubMed mit dem Stichwort „*B. cellulosilyticus*“ nur 28 Ergebnisse (30.9.24).

Doch gerade die relativ neuen S1-Stämme rücken immer weiter in den Fokus. Das Bakterium *P. vulgatus* beispielsweise wurde in den letzten Jahren intensiver erforscht (Clausen *et al.*, 2024; Keitel *et al.*, 2023; Keitel *et al.*, 2024). Andere Organismen, wie z.B. *B. xylanisolvens* sind besonders für deren Polymer-Nutzung und Gesundheitsfördernden Eigenschaften als Darm-Symbiont und mögliches Probiotikum für die Forschung interessant (Fu *et al.*, 2023; Ulsemer *et al.*, 2012b). Die Propionatproduktion der *Bacteroidota* zur Nutzung im biotechnologischen Setting ist aber bisher kaum untersucht. Dies beginnt bereits bei dem Problem, dass nicht alle Erstbeschreibungen auch ein Produktprofil untersuchen, wie bei dem Organismus *D. gadei* (Hofstad *et al.*, 2000). Weiterhin war es bisher nicht möglich, die Propionatbildung zu vergleichen, da unterschiedliche Kultivierungsbedingungen genutzt wurden, die häufig nicht auf die Produktion von Propionat angepasst waren. Daher musste zunächst eine einheitliche Methode etabliert werden.

5.2 Anforderung der *Bacteroidia* zur Propionatproduktion

Zunächst musste eine Kultivierungsmethode entwickelt werden, die sowohl den Vergleich der Propionatbildung der Stämme ermöglicht, gleichzeitig aber auch die individuellen Voraussetzungen jeder Spezies für eine optimale Produktion erfüllt. Für die ersten Untersuchungen wurden die Typstämme von *P. johnsonii* und *B. graminisolvens* ausgewählt. *P. johnsonii* hatte in einer initialen Beurteilung in PYHVG-Medium die höchste Propionat-Konzentration erzielt (Abschnitt 4.2.1.). Dagegen hatte *B. graminisolvens* zwar wenig Propionat produziert, zeigte dafür aber ein besonders hohes Propionat/Acetat-(P/A)-Verhältnis. Die Untersuchungen sollten in definiertem Medium (DMMG) erfolgen, da dieses Medium bei der anschließenden Untersuchung des Stoffwechsels genutzt werden sollte. Erste Ergebnisse hatten jedoch gezeigt, dass die zunächst eingesetzte Zusammensetzung des DMMG-Mediums bei *P. johnsonii* eine deutliche Verschlechterung des Wachstums im Gegensatz zum Komplexmedium hervorrief (Abbildung 4.2). Das Medium entstand auf Basis von Untersuchungen zu minimalen Wachstumsanforderungen verschiedener *Bacteroides* (Varel und Bryant, 1974). Sie zeigten, dass die Gabe von 2 g/l Casiton eine fördernde Wirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *B. fragilis* hat, nicht aber essenziell ist, da das Bakterium seinen Stickstoffbedarf über Ammonium decken kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass *B. fragilis* mit und ohne Casiton gleich schnell wächst, wohingegen *B. ruminicola* die gleiche OD auch ohne Casiton erreicht, aber erst nach späterer Zeit. Nur in *B. amylophilus* kam es ohne Casiton zu einer leicht verringerten OD₆₀₀. Bei *P. johnsonii* scheint ein Faktor im DMMG-Medium limitierend gewesen zu sein, da die Glucose nicht vollständig verbraucht wurde. *B. graminisolvens* zeigte dieses Verhalten nicht und die Glucose wurde vollständig verbraucht, was zeigt, dass das Bakterium ähnlich wie *B. fragilis* nicht auf Casiton angewiesen ist.

Abgesehen vom Nährstoff Ammonium gibt es noch weitere wichtige Faktoren für Wachstum und Propionatproduktion. Dazu gehören Hämin und Vitamin B₁₂. Bereits 1981 wurde gezeigt, dass diese zwei Substanzen für das Wachstum von *B. fragilis* und weiteren *Bacteroidia* förderlich sind (Chen und Wolin, 1981). Auch viele der kürzlich entdeckten Organismen benötigen Häm und Cobalamin (Nishiyama *et al.*, 2009). Beides sind Tetrapyrrole, die aus δ -Aminolävulinsäure synthetisiert werden (Fang *et al.*, 2017). Uroporphyrinogen III ist dabei das letzte gemeinsame Intermediat in der Synthese von Häm und Cobalamin (Balabanova *et al.*, 2021). Häm ist als Teil von Cytochromen an Elektronenübertragungen beteiligt (Fuller und Caldwell, 1982), spielt aber auch eine Rolle bei der Toleranz von Sauerstoffstress (Paunkov *et al.*, 2022). Das hier verwendete Medium enthielt 1 μ g/ml Hämin. Bereits 40 ng/ml waren aber schon ausreichend für eine maximale Wachstumssteigerung in *B. fragilis* (Chen und Wolin, 1981), weswegen keine weitere Anpassung erfolgte.

Vitamin B₁₂ ist ein Oberbegriff für Moleküle aus der Gruppe der Cobalamine. Sie bestehen aus einer Tetrapyrrol-Grundstruktur, die von Kobalt komplexiert wird und verschiedene axiale Liganden trägt. Bei der industriellen Produktion entsteht häufig das inaktive Cyanocobalamin, welches jedoch von den Organismen in die biologisch aktiven Formen umgewandelt werden kann (Warren und Deery, 2009). Besonders die Formen 5'-Desoxyadenosincobalamin und Methylcobalamin sind von biologischer Bedeutung (Martens *et al.*, 2002). Um den Einfluss auf die zwei *Bacteroides*-Spezies zu untersuchen, wurden Medien mit unterschiedlichen B₁₂-Konzentrationen (Cyanocobalamin) von 1 – 41 ng/ml getestet (4.2.3). Interessant ist, dass die Wirkweise des Vitamins in beiden Organismen unterschiedlich ausfiel. Als Co-Faktor für die Methylmalonyl-CoA-Mutase (Takahashi-Iñiguez *et al.*, 2012) ist B₁₂ direkt an der Propionatbildung beteiligt, was die Zunahme des Propionat/Succinat-(P/S)-Verhältnisses mit zunehmender B₁₂-Konzentration in *B. graminisolvens* erklärt (Abbildung 4.3). Das Wachstum wurde durch die zusätzliche Vitamingabe aber nicht beeinflusst, was schon in der Erstbeschreibung des Organismus festgestellt wurde (Nishiyama *et al.*, 2009). Gerade bei hohen Konzentrationen stieg jedoch auch das Verhältnis von Succinat und Propionat gegenüber Acetat. Möglicherweise wurden also auch andere Stoffwechselwege beeinflusst, sodass die Redoxbilanz verschoben wurde. B₁₂-Kofaktoren sind ebenfalls Teil der B₁₂-abhängigen Methionin-Synthase. Eine Steigerung der B₁₂-Konzentration konnte daher das Wachstum des Bakteriums *Vibrio campbellii* steigern (Groom *et al.*, 2025). Dieser Effekt könnte auch bei *Bacteroidia* eine Rolle spielen, da bereits gezeigt wurde, dass die Zugabe von Methionin die B₁₂-Abhängigkeit von *B. fragilis* und *B. vulgatus* aufhebt (Varel und Bryant, 1974). Dies erklärt, warum B₁₂ in *P. johnsonii* keinen Einfluss auf die Produktbildung hatte, dafür aber dessen Wachstum steigerte. Möglicherweise ist in *P. johnsonii* ein anderes an der Propionatbildung beteiligtes Enzym limitierend, beispielsweise die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, oder der Flux in diesen Stoffwechselweg ist begrenzt. Dann kann auch eine Steigerung der Mutase-Aktivität keine Verbesserung der Propionatbildung bewirken. In *B. graminisolvens* gab es hingegen eine eindeutige Steigerung der Propionatproduktion, die Reaktion der Mutase muss also bei niedrigen B₁₂-Konzentrationen limitierend gewesen sein. Gleichzeitig könnte *B. graminisolvens* aber einen B₁₂-unabhängigen Syntheseweg von Methionin nutzen, was erklären würde, warum das Wachstum durch B₁₂ nicht beeinflusst wurde (Ferla und Patrick, 2014). Mikroorganismen sind die einzigen Lebewesen, die der Lage sind B₁₂ zu synthetisieren (Martens *et al.*, 2002). Zu den Produzenten zählen auch viele Propionibakterien (Piwowarek *et al.*, 2018). Zwar konnten in vielen *Bacteroides*, darunter auch *P. johnsonii*, die Gene zur Bildung von B₁₂ ausgehend von Precorrin 2 identifiziert werden (Magnúsdóttir *et al.*, 2015), die Enzyme

zur Synthese von δ -Aminolävulinsäure und weiterer Vorstufen bis zur Bildung von Uroporphyrinogen III fehlen jedoch in anaeroben *Bacteroidota* (Parker *et al.*, 2020). Auch in den Genomen von *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* konnten die entsprechenden Gene nicht identifiziert werden. Bei deren Kultivierung auf rein pflanzlichen Substraten ohne externe B₁₂-Gabe kann daher kein Propionat entstehen. Die Nutzung von aufgereinigtem B₁₂ ist jedoch ein ernstzunehmender Kostenfaktor. Eine Möglichkeit bietet hier die Co-Kultur. Untersuchungen mit *B. thetaiotaomicron* und dem B₁₂-Produzenten *Dialister hominis* konnten einen Anstieg der Propionatproduktion von fast 0 auf 25 mM berichten (Sakamoto *et al.*, 2022). Vitamin K wird ebenfalls von einigen *Bacteroidia* benötigt (Varel und Bryant, 1974; Fenn *et al.*, 2017), darunter auch *S. copri* (Franke und Deppenmeier, 2018). Bei anderen Arten, wie *B. propionificiens* und *B. paurosaccharolyticus* hat es jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum (Ueki *et al.*, 2008; Ueki *et al.*, 2011). Vitamin K oder Menachinon ist Teil der Elektronenübertragungsketten unter anderem auch bei der Fumarat-Atmung, deswegen trägt es maßgeblich zur Energiekonservierung in den Organismen bei. Einige *Bacteroidota* haben jedoch nur einen unvollständigen Syntheseweg (Ravcheev und Thiele, 2016), was die Wachstumssteigerung durch externe Gabe erklärt. Der Effekt, dass die Propionatbildung ohne Zugabe von B-Vitaminen oder der Wolin-Lösung fast zum Erliegen kam (Abbildung A1), lässt sich dadurch erklären, dass die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase Biotin als Cofaktor benötigt (Buckel, 2001).

Bei der Untersuchung des Glucoseverbrauchs zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen den Spezies, da *P. johnsonii* etwa 6 mM Glucose mehr konsumierte als *B. graminisolvens*. Beide zeigten jedoch einen überproportionalen Anstieg von Lactat im Vergleich zu den anderen Fermentationsprodukten. Hauptfaktor für die Hemmung der weiteren Fermentation war hier der pH-Wert, der in beiden Kulturen mit hoher Glucosekonzentration auf Werte zwischen 5,3 und 5,0 fiel. So wie der Nährstoffbedarf ist auch das pH-Optimum der *Bacteroidia* variabel. Für *B. graminisolvens* wurde ein pH-Optimum von 7,2 bestimmt und durch Fermentation von Glucose wurde ein finaler pH von 4,9 erreicht (Nishiyama *et al.*, 2009). *B. propionificiens* hingegen hat ein eher alkalisches Optimum von 7,9 und erreichte bei der Fermentation mit Glucose einen pH von 5,1 (Ueki *et al.*, 2008). Am unteren Rand des Spektrums liegt *B. xylanisolvens* mit einem pH-Optimum von 6,8 (Chassard *et al.*, 2008). Diese unterschiedlichen Anforderungen machen einen direkten Vergleich der Spezies schwierig. Um die Propionatproduktion der ausgewählten Stämme dennoch vergleichen zu können, wurde die Glucosekonzentration bei 15 mM belassen. Da der pH-Wert dieser Kulturen am Ende immer noch im neutralen Bereich lag, konnte so die limitierende Wirkung der Protonenkonzentration umgangen werden.

Die Hemmung des Metabolismus durch die eigenen Produkte ist ein wichtiger Limitationsfaktor der mikrobiellen Propionatproduktion. Bei niedrigen extrazellulären pH-Werten liegen schwache Säuren wie Acetat und Lactat vermehrt in ihrer protonierten Form vor, was es ihnen ermöglicht, durch die Zellmembran in die Zelle zu gelangen. Dort dissoziieren sie wieder, verringern den pH innerhalb der Zelle und führen zu Säurestress. Weiterhin entkoppeln sie den Protonen-Gradienten und verringern somit die Energieausbeute der Zelle (Axe und Bailey, 1995; Trček *et al.*, 2015). Darüber hinaus haben auch die Säureanionen einen hemmenden Effekt auf die Zelle, da sie die Anionenzusammensetzung beeinflussen und damit Veränderungen der komplexen Wechselwirkungen innerhalb der Zelle herbeiführen (Roe *et al.*, 1998). Propionat selbst führt bei Propionibakterien zu einer

Wachstumshemmung (Gu *et al.*, 1998). Die Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten und Endprodukten ist daher ein wichtiger Faktor in der industriellen Produktion von Propionat. Propionibakterien zeigen hier vorteilhafte Eigenschaften im Vergleich zu *Bacteroides*, da sie auf Glucose finale pH-Werte von 4,5 bis 4,2 erreichen, können sie insgesamt mehr Säure produzieren, bevor eine Inhibition einsetzt (Rehberger und Glatz, 1998). Versuche, bei denen mittels Genom-Shuffling Stämme mit erhöhter Propionat-Toleranz generiert wurden, resultierten daher in einer Steigerung des Propionat-Titers von 45 g/l auf 60 g/l bei gleichzeitiger Verkürzung der Lag-Phase (Guan *et al.*, 2012). Der bisher höchste Propionat-Titer (135 g/l) wurde in immobilisierten Zellen von *P. acidipropionici* gemessen, deren Trehalose-Produktion durch Gentechnik gesteigert wurde. Da Trehalose einen Schutzfaktor für eine Reihe von Stressfaktoren wie Säure und oxidativem Stress darstellt, konnte die hemmende Wirkung von Propionat auf die Produktbildung verringert werden (Jiang *et al.*, 2015).

5.3 Vergleich der Propionatproduktion der *Bacteroidia*

Wie bereits erwähnt, wurden viele der ausgewählten Stämme erst in jüngster Zeit isoliert und beschrieben, jedoch wurde die Produktbildung nur bei wenigen quantifiziert. Dort, wo Ergebnisse existieren, variieren die Kultivierungsverhältnisse und sie wurden nicht für die Propionatproduktion optimiert. Beispielsweise enthielt das Medium für die Erstbeschreibung der Produktbildung von *B. graminisolvens* nur 10 ng/ml B₁₂, dafür jedoch 10 g/l Glucose (55,5 mM), 10 g/l Pepton und 5 g/l Hefeextrakt (Nishiyama *et al.*, 2009). Das Medium zur Kultivierung von *B. cellulosilyticus* hingegen wurde mit einer anderen Vitaminlösung und zusätzlich Pansen-Flüssigkeit hergestellt. Außerdem wurden komplexe Polymere wie Avicel pH 101 und Sigmacell 50 als Kohlenstoffquellen verwendet (Robert *et al.*, 2007). Das macht einen quantitativen Vergleich der verschiedenen Arten schwierig. Mit den zuvor erhaltenen Erkenntnissen zur Medienanforderung (4.2) wurde daher ein Vergleich von Wachstum und Produktbildung aller ausgewählten Stämme durchgeführt. Dafür wurde das Mineralmedium DMMG verwendet, welchem zusätzlich Vitamin B₁₂ hinzugefügt wurde, sodass die Konzentration 21 ng/ml betrug. Außerdem wurden die Versuche auch mit Medium durchgeführt, dem 0,5 g/l Hefeextrakt hinzugefügt wurden (DMMG-H). So sollte überprüft werden, ob Stämme von komplexen Medienbestandteilen profitieren.

Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Stämme wurden aus einem Darm-assoziierten-Kontext gewonnen, entweder direkt aus menschlichen und tierischen Faeces oder aber aus Bioreaktoren, die mit tierischen Exkrementen gespeist wurden (Tabelle A8). Trotzdem variieren ihre Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen und ihre Produktbildung, was zeigt, dass sie alle eine eigene Nische in ihrem respektiven Ökosystem einnehmen. Die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten Stämme ließ sich durch die Gabe von Hefeextrakt leicht steigern. Dies war allerdings nicht der Fall bei *B. graminisolvens* und *B. luti*, die auch im definierten Medium die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit erzielten. *B. propionificiens* und *P. johnsonii* hingegen profitierten deutlich von 0,5 g/l Hefeextrakt, da nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit gesteigert wurde, sondern auch die maximal erreichte OD₆₀₀. Die Nutzung von Hefeextrakt mit Hinblick auf eine industrielle Propionatproduktion stellt wieder einen zusätzlichen Kostenfaktor dar. Hefeextrakt kann jedoch relativ kostengünstig aus Abfällen der Brauerei-Industrie gewonnen werden (Gao *et al.*, 2024) und bereits 0,5 g/l waren ausreichend für eine deutliche Wachstumssteigerung. Gegebenenfalls könnte aber auch Kartoffelsaft eingesetzt werden, ein

Abfallprodukt bei der Produktion von Kartoffelstärke (Tufvesson *et al.*, 2013). Daher stellt diese Anforderung keinen großen Nachteil gegenüber den anderen Bakterien dar. *B. xylanisolvens* war einer der Organismen mit der höchsten Wachstumsrate, produzierte allerdings nur geringe Mengen Propionat. Hingegen wurde die größte Menge Propionat von dem Organismus mit der niedrigsten Wachstumsrate produziert (*B. propionificaciens*). *B. graminisolvens* erreichte die zweithöchste Propionatproduktion und nur die fünft beste Wachstumsrate in DMMG-Medium, es konnte daher kein genauer Vorteil der Propionatproduktion abgeleitet werden. Eine Mutante von *B. thetaiotaomicron* mit Deletion der Methylmalonyl-CoA-Mutase zeigte keine Verringerung des Wachstums *in vitro* und auch die Kolonisation von Antibiotika-behandelten Mäusen wurde nicht beeinflusst (Wang *et al.*, 2024). Es stellt sich daher die Frage, welchen evolutiven Nutzen die Propionatbildung hat.

Die Produktverhältnisse variierten sehr stark zwischen den untersuchten *Bacteroidia*-Stämmen. Im Stoffwechsel der Bakterien wird Glucose oxidiert, wobei die Elektronen zunächst an Elektronenüberträger wie NAD^+ und Fd_{ox} abgegeben werden. Diese müssen im Laufe der Fermentation wieder durch Reduktion verschiedenster Metabolite regeneriert werden. Die bei diesen Reaktionen entstehenden Produkte werden an die Umgebung abgegeben. Je nachdem auf welchem Wege die Produkte entstehen, werden unterschiedlich viele Elektronen übertragen. Ein wichtiges Stoffwechselintermediat stellt hier Acetyl-CoA dar. Es kann in *Bacteroidia* über zwei Wege produziert werden: 1. Durch die Aktivität der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR), bei der Pyruvat decarboxyliert wird und die freigewordenen Elektronen auf Ferredoxin übertragen werden oder 2. Über die Aktivität der Pyruvat-Formiat Lyase (PFL), bei der Formiat von Pyruvat abgespalten wird (Franke und Deppenmeier, 2018). Bei der Reaktion der PFOR müssen die auf Ferredoxin übertragenen Elektronen dann wiederum auf ein anderes Metabolit übertragen werden, zum Beispiel auf Fumarat. Beim 2. Weg ist das nicht der Fall, da Formiat bereits ein reduziertes Fermentationsprodukt darstellt. Dies hat einen Einfluss auf die möglichen Produktverhältnisse. Werden beispielsweise nur Propionat und Acetat produziert, könnte ein Produktverhältnis von 2:1 erzielt werden. Würde Acetyl-CoA ausschließlich von der PFL produziert, verringert sich das Verhältnis auf 1:1:1 (Propionat:Acetat:Formiat) (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Dementsprechend wäre zu erwarten, dass das PS/A-Verhältnis zwischen 1 und 2 liegt und dabei umso niedriger ist, je mehr Formiat produziert wurde. Dieser Zusammenhang konnte in den Ergebnissen nicht verifiziert werden. Der einzige Stamm, dessen Produktverhältnisse mit den theoretischen Werten zu erklären sind, ist *B. propionificaciens* mit einem Propionat + Succinat/Acetat-(PS/A)-Verhältnis von 2,2. Viele der anderen *Bacteroidia* zeigten zwar ein PS/A-Verhältnis von annähernd 1, es wurde aber nicht die entsprechende Menge Formiat produziert, um diese Produktzusammensetzung zu erklären (Tabelle 4.1). So lag das PS/A-Verhältnis von *B. xylanisolvens* zwar bei 0,8, es wurden aber nur 0,5 mM Formiat gemessen. Auch in der Untersuchung des Stoffwechselweges von *S. copri* wurde das erwartete Produktverhältnis nicht erreicht, stattdessen betrug es rund 1:1:0,25. Grund dafür ist, dass die Zellmasse selbst reduzierter ist als Glucose. Die Summenformel der Zellmasse von *S. copri* ist $\text{C}_1\text{H}_{1,79}\text{O}_{0,44}$ (Franke und Deppenmeier, 2018). Das bedeutet, dass ein Teil der Elektronen nicht auf Stoffwechselintermediate übertragen wird, sondern zum Aufbau der Zellmasse benötigt wird. Auch die hier getesteten Organismen hatten eine ähnliche Zellzusammensetzung (Tabelle A16: Berechnung der elementaren Zusammensetzung von 3 *Bacteroidota* Spezies in 1 g Trockenmasse. Tabelle A16). Trotzdem weicht das Verhältnis von *B. xylanisolvens* mit 0,9:1:0,06 noch sehr weit von den erwarteten Werten ab. Dies bedeutet aber auch,

dass das PS/A-Verhältnis von *B. propionificiens* zu hoch ausfällt, da bei diesen Produktverhältnissen die Elektronenbilanz nahezu ausgeglichen ist und keine Elektronen für das Zellmaterial zur Verfügung stehen. Das Produktspektrum von *B. graminisolvens* unterschied sich besonders stark von den anderen Spezies. Das Bakterium produzierte deutlich mehr Formiat (5,9 mM) als Acetat (3,2 mM). Aufgrund der geringen Acetatkonzentration, lag das PS/A-Verhältnis bei 3,7, also deutlich über dem theoretisch möglichen. In früheren Untersuchungen fiel es mit 4,3 sogar noch höher aus. Über die Formiatkonzentration gab es hingegen keine Angaben (Nishiyama *et al.*, 2009).

B. propionificiens und *B. graminisolvens* stachen wegen ihrer relativ hohen Propionatproduktion gegenüber den anderen getesteten Stämmen hervor. Die Produktkonzentrationen wichen teilweise von bisherigen Werten der Literatur ab. *B. propionificiens* erreichte auf Glucose ein (PS/A)-Verhältnis von 1,6, während unter den hier getesteten Bedingungen ein Verhältnis von 2,0 in DMMG berechnet wurde. Es produzierte Succinat aber ebenso nur in Spuren (0,4 mM) (Ueki *et al.*, 2008). Bei *B. graminisolvens* stimmte das Produktverhältnis von Propionat zu Acetat (2,5) in dieser Untersuchung, nahezu mit publizierten Ergebnissen überein (2,4). Allerdings wurde in der früheren Publikation ein Propionat/Succinat-(P/S)-Verhältnis von nur 1,2 erzielt, während das Verhältnis in dieser Untersuchung 2,2 betrug (Nishiyama *et al.*, 2009). Dies lässt sich durch die geringere B₁₂-Konzentration der erklären (10 ng/ml), die in der Erstbeschreibung eingesetzt wurde, da eine Konzentration von 9 ng/ml auch in dieser Arbeit zu einem verringerten P/S-Verhältnis führte (1,6; Kap. 4.2.3). Interessant ist auch, dass in den Untersuchungen von Nishiyama *et al.* kein Lactat gemessen wurde, obwohl die Zellen auf 55,5 mM Glucose kultiviert wurden. Außerdem detektierten sie maximal 3,6 mM jeder weiteren Säure. In den aktuellen Untersuchungen erzielten die Kulturen dieses Bakteriums mit 50 mM Glucose jedoch deutlich höhere Produktkonzentrationen (9,0 mM Acetat; 11,1 mM Propionat; 20,0 mM Succinat; Abbildung 4.4). Möglicherweise war in den Versuchen von Nishiyama *et al.* ein Faktor limitierend, sodass die Glucose nicht vollständig abgebaut werden konnte, ähnlich wie es bei *P. johnsonii* in Abschnitt 4.2.2 der Fall war.

Anhand der Ergebnisse wurde ausgewählt, welche Stämme genauer untersucht werden sollten. *P. vulgatus* ist eines der am besten untersuchten *Bacteroidia*, die in Deutschland zur Sicherheitskategorie S1 gezählt werden und daher ohne großen bürokratischen Aufwand kultiviert werden können. Mit 3,4 mM Propionat in DMMG zählte es jedoch zu den schlechteren Produzenten. Das zeigt, wie wichtig es ist, das Wissen über Stoffwechselwege und Zusammenhänge über die etablierten Stämme hinaus auszuweiten. *P. johnsonii* produzierte in den ersten Versuchen im Komplexmedium mit Abstand die größte Menge Propionat, erreichte aber in den Versuchen mit DMMG und DMMG-H nur knapp die Hälfte im Vergleich zu *B. propionificiens*. Die hohe Propionatproduktion durch *P. johnsonii* kann daher durch die Verstoffwechselung der Aminosäuren und Zucker im Komplexmedium zustande gekommen sein. Valin, Isoleucin, Threonin und Methionin können in vielen Bakterien zu Propionat verstoffwechselt werden (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a) und auch bei Wachstum auf Glutamat, Lysin und Histidin kann Propionat durch Bakterien des Colons gebildet werden (Smith und Macfarlane, 1997). Es fiel beispielsweise auch auf, dass *P. johnsonii* auch ohne Glucose im Komplexmedium wachsen konnte, während dies bei einigen anderen Stämmen nicht möglich war. Genauere Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Es gibt bereits Untersuchungen zur Bildung von Propionat aus

Threonin bei *Saccharomyces cerevisiae* bei denen ein Titer von rund 1 g/l erreicht wurde (Ding *et al.*, 2022). Die Propionatproduktion aus Aminosäuren wird jedoch als ineffizient und nicht konkurrenzfähig eingestuft (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Außerdem lag der Fokus dieser Arbeit auf der saccharolytischen Propionatproduktion, daher wurde *P. johnsonii* nicht weiter untersucht. Aufgrund seiner starken Propionatproduktion in DMMG-H wurde *B. propionificiens* als Stamm für weitere Untersuchungen ausgewählt. Auch mit *B. graminisolvens* wurden weitere Experimente durchgeführt. Neben seiner guten Propionatproduktion, wurde für dieses Bakterium auch die Nutzung von Xylan und Stärke beschrieben (Nishiyama *et al.*, 2009). Außerdem sollte der Grund für die unerwartet hohen PS/A-Verhältnisse genauer untersucht werden.

5.4 Physiologie von *B. graminisolvens* und *B. propionificiens*

5.4.1 Abhängigkeit Produktbildung von der CO₂-Konzentration

Als nächste sollte die Frage geklärt werden, welchen Einfluss CO₂ auf Wachstum und Produktbildung ausgewählter *Bacteroidia* hat. CO₂ ist an mehreren Stellen im Succinat-Weg der *Bacteroidia* als Reaktionspartner beteiligt (Abbildung 4.7). Es wird durch die Aktivität der PFOR bei der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA abgegeben. Wird die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA jedoch über die PFL katalysiert, ist dies nicht der Fall. Stattdessen entsteht Formiat (Franke und Deppenmeier, 2018). Die Produktion von Succinat aus Oxalacetat (OxAc) benötigt dagegen CO₂, da OxAc durch die Carboxylierung von PEP über die PEP-Carboxykinase (PEP-CK) entsteht. Es wird jedoch auf dem Weg zu Propionat durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase wieder freigesetzt (Macy *et al.*, 1978), wodurch Propionat netto ohne CO₂-Verbrauch produziert wird. Die Produktion von Lactat erfolgt hingegen CO₂-unabhängig (Lück und Deppenmeier, 2022). Somit sind CO₂-Produktion und Verbrauch direkt von der Zusammensetzung der Fermentationsprodukte abhängig. Dementsprechend sollte sich die unterschiedliche Produktzusammensetzung der zwei untersuchten Arten auf deren CO₂-Abhängigkeit auswirken. Der Propionatproduzent *P. vulgaris* beispielsweise erreichte unterhalb von 20 mM NaHCO₃ eine deutlich höhere finale OD₆₀₀ als das Bakterium *S. copri*, dem die genetische Ausstattung zur Propionatproduktion fehlt (Franke und Deppenmeier, 2018). Tatsächlich unterschieden sich die beiden untersuchten *Bacteroides* stark in ihrer CO₂-Abhängigkeit (Abbildung 4.6). Während *B. propionificiens* auch ohne CO₂ wachsen konnte, zeigte sich bei *B. graminisolvens* eine deutliche CO₂-Abhängigkeit. Kulturen mit geringem NaHCO₃-Gehalt produzierten zudem vermehrt Lactat. Ähnliche Effekte konnten bereits bei anderen *Bacteroidia* beobachtet werden. *P. vulgaris* wuchs bei Kultivierungsbedingungen unter 4 vol% CO₂ deutlich schlechter und produzierte ebenfalls vermehrt Lactat (Keitel *et al.*, 2023). In *B. fragilis* verringerten geringe CO₂-Konzentrationen die Wachstumsgeschwindigkeit nur leicht, hatten aber vor allem eine Verlängerung der Lag-Phase auf bis zu 35 h zur Folge (Caspari und Macy, 1983). Die Propionatkonzentration überstieg dabei die von Succinat, jedoch produzierte das Bakterium ebenfalls vermehrt Lactat. Auch in *B. graminisolvens* wirkten sich geringe NaHCO₃-Konzentrationen positiv auf das P/S-Verhältnis aus. Der Effekt war aber im Vergleich zur Wachstumshemmung und zur Steigerung der Lactatproduktion zu gering, um einen Vorteil in der Propionatproduktion zu bewirken, da sich die Ausbeute insgesamt von 0,15 gP/gG (DMMG) auf 0,11 gP/gG (5 mM NaHCO₃) verringerte. Bei *B. propionificiens* wurde nur ein geringer Einfluss von CO₂ auf die Produktbildung beobachtet. Tatsächlich wurde das höchste P/S-Verhältnis in den Kulturen mit der höchsten NaHCO₃-Konzentration gemessen. Die Versuche wurden jedoch in

geschlossenen Kulturgefäßen durchgeführt. In kontinuierlicher Kultur von *B. fragilis* mit Stickstoffbegasung konnte gezeigt werden, dass bei geringer Verdünnungsrate nur Acetat und Propionat produziert wurden und erst bei Steigerung der Verdünnungsrate die Menge an Succinat und Lactat zunahm (Caspari und Macy, 1983). Dementsprechend könnten die Ergebnisse unter limitierenden Bedingungen anders ausfallen. Interessant ist auch der Vergleich mit den ursprünglich bestimmten Produktverhältnissen aus Versuch 4.3. Hier produzierte *B. propionificiens* kein Succinat, während in den Versuchen mit NaHCO_3 bei allen NaHCO_3 -Konzentrationen geringe Mengen Succinat (zwischen 1,4 und 2,8 mM) nachgewiesen wurden. Dieser Effekt erklärt sich möglicherweise durch die Kultivierungsbedingungen. Während die Kulturen im 1. Versuch im Plattenleser kultiviert worden waren, wurde im CO_2 -Versuch mit luftdicht verschlossenen Hungate-Röhrchen gearbeitet. Bei 0 mM NaHCO_3 wurden 6,2 mM Acetat produziert. Da kein Formiat gebildet wurde, müssten 6,2 mM CO_2 freigesetzt worden sein. Succinat, das einzige Produkt, das CO_2 benötigt, wurde maximal bis zu Konzentrationen von 2,4 mM gebildet. Somit wurde netto CO_2 freigesetzt, was bedeutet, dass *B. propionificiens* in einer geschlossenen Kultur seine eigene CO_2 -Atmosphäre produziert. Dieses Verhalten ähnelt dem von *A. acidipropionici*. Beim Wachstum auf Glucose zeigte es ebenfalls keine Reaktion auf CO_2 , da die Produktion über die PFOR und den oxPPP den CO_2 -Bedarf der restlichen Stoffwechselwege deckt. (Zhang *et al.*, 2015). Auch bei *B. fragilis* wurde nachgewiesen, dass CO_2 bei Kultivierung in reiner Stickstoffatmosphäre produziert wird (Caspari und Macy, 1983). Bei dem geringen Volumen der Gasphase in den Hungate-Röhrchen (ca. 5 ml) könnte das sich anreichernde CO_2 dazu geführt haben, dass die Propionatproduktion gehemmt und mehr Succinat freigesetzt wurde (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Auch bewirken gesteigerte CO_2 -Konzentrationen eine Verringerung des pH (Pines *et al.*, 2016), was zusätzlich die Produktverhältnisse beeinflusst haben könnte (Guan und Liu, 2020). Die Kultivierung im Plattenleser erfolgte jedoch in einem Anaerobenzelt, was ein Gasvolumen von ca. 160 l aufweist. Die Produktion von CO_2 hat in diesem Volumen keinen Einfluss auf die Gesamtkonzentration und auch der pH-Abfall fiel geringer aus. Bei der Kultivierung der *Bacteroidia* sollte daher für hohe Propionatausbeuten darauf geachtet werden, dass überschüssiges CO_2 aus den Kulturgefäßen abgeleitet werden kann.

5.4.2 Rekonstruktion des Stoffwechsels

Die bisherigen Ergebnisse dienen dem Zweck, einen Überblick über die verschiedenen *Bacteroidia* zu erhalten, sowie die Abhängigkeit der Propionatproduktion von äußeren Faktoren wie der Medienzusammensetzung zu erfassen. Gerade im Hinblick auf die Nutzung genetischer Methoden zur Verbesserung der Propionatproduktion ist es jedoch wichtig, den Mechanismus und dessen molekulare Stellglieder zu beleuchten. Um die Stoffwechselwege der zwei Propionatproduzenten genauer zu erforschen, wurden eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden genetische Analysen durchgeführt, die zeigen sollten, inwiefern sich die zwei Arten genetisch voneinander unterscheiden. Dann wurden Versuche zur Bilanzierung der Stoffwechselwege durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen.

Die Stoffwechselwege von *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* unterschieden sich in ihren grundlegenden Genen nur in wenigen Punkten (Abbildung 4.7). Alle erforderlichen Gene zum Ablauf der Glykolyse wurden identifiziert, was darauf schließen lässt, dass Glucose wie auch in anderen

Bakterien der Gruppe über die Glykolyse verstoffwechselt wird (Franke und Deppenmeier, 2018; Macy *et al.*, 1978). Darüber hinaus konnten in *B. graminisolvens* auch die Gene identifiziert werden, die einen vollständigen Pentosephosphatweg (*pentose phosphate pathway*, PPP), ausgehend von Glucose-6-Phosphat (G6P) ermöglichen. Im oxidativen Teil des Stoffwechselweges (oxPPP) wird G6P zunächst zu Phosphoglunonolacton oxidiert bei gleichzeitiger Reduktion von NADP^+ zu NADPH. Dann folgt die Umwandlung zu Phosphogluconat und schließlich die oxidative Decarboxylierung zu Ribulose-5-Phosphat, bei der CO_2 und NADPH freigesetzt werden. Anschließend folgt der nicht-oxidative Teil. Ribulose-5-Phosphat wird dabei durch Epimerase und Isomerase zu Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) bzw. Ribose-5-Phosphat umgewandelt. Danach werden die Pentosen über die Reaktionen der Transaldolase und Transketolase reversibel zu GAP und Fructose-6-Phosphat (F6P) umgeformt und wieder in die Glykolyse eingeschleust (Stincone *et al.*, 2015). Der PPP erfüllt dabei mehrere Aufgaben innerhalb der Zelle. Der oxidative Teil ist ein Mechanismus zur Generierung von NADPH. Es wird für Reduktionsreaktionen anaboler Prozesse, besonders bei der Synthese von DNA und Lipiden sowie für den Schutz vor oxidativem Stress benötigt. (Spaans *et al.*, 2015). Die Intermediate des nicht-oxidativen Teils dienen als Ausgangsstoffe für die Synthese von Nukleotiden und aromatischen Aminosäuren (Stincone *et al.*, 2015). Eine weitere wichtige Funktion des PPP in *Bacteroidia* besteht aber in der Metabolisierung verschiedenster Pentosen wie Xylose und Arabinose (Turner und Robertson, 1979), die Grundbausteine von Pflanzenpolymeren wie Xylan und Pektin darstellen (Bastawde, 1992; Mohnen, 2008). Viele *Bacteroidia* besitzen daher einen vollständigen Pentosephosphatweg, beispielsweise *P. vulgatus* (Garschagen *et al.*, 2021) und *B. fragilis* (Rios-Covian *et al.*, 2015). Sowohl Xylose und Arabinose als auch Xylan und Pektin werden von *B. graminisolvens* verstoffwechselt, daher ist es nicht verwunderlich, dass der Organismus die entsprechenden Gene besitzt.

Im Genom von *B. propionificiens* konnten die gleichen Gene identifiziert werden wie in *B. graminisolvens*, mit Ausnahme der Transaldolase. Das würde bedeuten, dass dieses Bakterium keinen vollständigen PPP besitzt und keine Pentosen verstoffwechseln kann. Tatsächlich kann *B. propionificiens* zwar auf Arabinose wachsen, nicht jedoch auf Xylose (Ueki *et al.*, 2008). Das kann daran liegen, dass Arabinose auf einem anderen Weg verstoffwechselt wird. Ältere Untersuchungen vermuteten, dass Arabinose bei *P. vulgatus* unabhängig vom PPP zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt und so in die Glykolyse eingeschleust wird (Newman und Caldwell, 1987). Kürzliche Proteomanalysen weisen aber daraufhin, dass es zu Xu5P umgewandelt und über den PPP verstoffwechselt wird (Clausen *et al.*, 2024). Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass ein funktionierender Pentosephosphatweg trotz der fehlenden Transaldolase besteht. Dieser Weg wurde in *S. copri* identifiziert (Garschagen *et al.*, 2021). In dem Stoffwechselweg wird Seduheptulose-7-Phosphat Pyrophosphat abhängig zu 1,7-Seduheptulose-Bisphosphat phosphoryliert und anschließend zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) und DHAP gespalten. Schließlich wird E4P mit Xu5P durch die Aktivität einer Transketolase zu GAP und F6P umgewandelt (Koendjibiharie *et al.*, 2020). Die für diesen alternativen Pentosephosphatweg benötigten Enzyme Pyrophosphat F6P Phosphotransferase und die Fructose Aldolase wurden neben *S. copri* auch in weiteren *Bacteroidia* identifiziert, darunter auch *P. johnsonii* (Garschagen *et al.*, 2021). Auch die Genome von *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* enthalten Gensequenzen mit hoher Übereinstimmung zu den entsprechenden Enzymen. Ein alternativer Pentosephosphatweg ist also auch in *B. propionificiens* codiert.

Ausgehend von PEP als Intermediat der Glykolyse spaltet sich der Stoffwechselweg auf. Zum einen kann Oxalacetat entstehen, zum anderen Pyruvat. Die Reaktionen, die das Kohlenstoffgerüst zwischen PEP, Pyruvat und Oxalacetat umwandeln, sind vielfältig und bilden einen Knotenpunkt für die Bildung unterschiedlicher Metabolite, der je nach Energie- und Redoxzustand reguliert werden kann (Sauer und Eikmanns, 2005). Dies spiegelt sich in der Vielfalt der Enzyme wider, die auch in den zwei untersuchten Stämmen identifiziert wurden. Die Bildung von Oxalacetat erfolgt dabei wahrscheinlich über die PEP-Carboxykinase, die in beiden Genomen nachgewiesen wurde. Auch in *B. fragilis* wurde die PEP-Carboxykinase als Katalysator dieser Reaktion identifiziert, wobei die Energie aus der Spaltung der Enolbindung in Form von ATP konserviert wird (Macy *et al.*, 1978). Der gleiche Mechanismus wurde auch in *S. copri* nachgewiesen (Franke und Deppenmeier, 2018). Die Nutzung der Pyruvatcarboxylase konnte nicht gezeigt werden. Hier zeigt sich ein großer Unterschied zum Metabolismus der Propionibakterien. Sie produzieren Oxalacetat ausgehend von Pyruvat über die Methylmalonyl-CoA Carboxyltransferase, wobei die Carboxylierung von Pyruvat mit der Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA gekoppelt wird und somit ohne ATP-Verbrauch abläuft. (Thierry *et al.*, 2011). Auch besitzt *P. acidipropionici* zusätzlich eine Pyruvat-Carboxylase zur Bildung von Oxalacetat und eine Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase zur Bildung von Propionyl-CoA (Parizzi *et al.*, 2012).

Oxalacetat wird im reversen Citratzyklus über Malat und Fumarat zu Succinat umgewandelt (Macy *et al.*, 1978). In *B. fragilis* katalysiert die Fumarat-Reduktase die Redoxreaktion von Ubichinol und Fumarat, wobei Succinat entsteht (Baughn und Malamy, 2003; van Hellemond und Tielens, 1994). Dieses Enzym wird später im Zusammenhang mit den Redoxenzymen genauer diskutiert. Succinat ist dann Ausgangsstoff für die Propionatproduktion über den Succinat-Weg. Zunächst wird dabei Coenzym A von Propionyl-CoA auf Succinat übertragen. Die Methylmalonyl-CoA-Mutase wandelt das Succinyl-CoA dann in R-Methylmalonyl-CoA um. Dieses kann durch die Methylmalonyl-CoA Epimerase in S-Methylmalonyl-CoA umgewandelt werden. Anschließend folgt die Decarboxylierung über die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase zu Propionyl-CoA. Propionat wird dann bei der Reaktion mit Succinat freigesetzt. Die entsprechenden Gene wurden in den zwei *Bacteroides*-Stämmen identifiziert. Für die Reaktion von Succinat mit Propionyl-CoA können dabei mehrere Proteine infrage kommen. Das gefundene Gen wurde als Acetyl-CoA Hydrolase/Transferase annotiert, hat aber Sequenzübereinstimmungen mit der Succinat:CoA Transferase von *Corynebacterium kutscheri*, der Succinyl-CoA:Acetat CoA-transferase aus *Acetobacter aceti* und der Propanoyl-CoA:Succinat CoA Transferase aus *E. coli*, die an der Propionatbildung beteiligt ist (Haller *et al.*, 2000). Es kann daher nicht genau vorhergesagt werden, ob das Enzym substratspezifisch ist oder auch in anderen Reaktionen der Zelle eine Rolle spielt.

Als Referenzsequenz zur Identifikation der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase wurde das gut charakterisierte Enzym von *Veillonella parvula* genutzt. Es koppelt die bei der Decarboxylierung freigesetzte Energie an die Translokation von Na⁺-Ionen. Der Na⁺-Gradient kann mit einer Na⁺-abhängigen ATP Synthase zur Energiekonservierung genutzt werden (Dimroth, 1997). Dieser Mechanismus könnte auch in den untersuchten *Bacteroidia* vorkommen. Es konnten jedoch nur 3 von 5

Untereinheiten in den untersuchten Stämmen identifiziert werden (Untereinheiten Alpha, Beta und Gamma). Für die Untereinheiten Delta und Epsilon wurde keine Übereinstimmung gefunden. Die Alpha-Untereinheit fungiert dabei als Carboxyltransferase und überträgt eine Carboxylgruppe vom Substrat auf Biotin. Die Beta-Untereinheit ist an der Natrium translozierenden Biotin-Decarboxylierung beteiligt und die Gamma-Untereinheit wurde als Biotin-Carrier-Protein identifiziert (Hilpert und Dimroth, 1991). Während die Delta-Untereinheit in *V. parvula* für die katalytische Funktion essenziell ist, wird für die Epsilon-Untereinheit nur eine stabilisierende Funktion vermutet, denn Aktivität konnte trotz Deletion nachgewiesen werden (Huder und Dimroth, 1995). In *B. thetaiotaomicron* wurde ein Cluster aus 4 Genen identifiziert, dessen Deletion die Propionatproduktion beendete (Abbildung 5.1) (Porter und Larsbrink, 2022). Diese Gene wurden jedoch nicht als Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase annotiert, sondern als Beta-UE der Acyl-CoA Carboxylase (FE838_RS22000), ein OadG-ähnliches Protein (FE838_RS22005), Biotin-Carrier Protein (FE838_RS22010) und Na⁺-Ionen translozierende Decarboxylase (FE838_RS22015). Automatische Annotationen sind jedoch häufig fehleranfällig, besonders bei Enzymen, die der gleichen Superfamilie angehören (Schnoes *et al.*, 2009) und die Gene der beiden untersuchten Stämme sind auf gleiche Weise im Genom organisiert wie bei *B. thetaiotaomicron* (*B. graminisolvens*: C511_RS0112055, C511_RS0112060; C511_RS0112065; C511_RS0112070; *B. propionificaciens*: B091_RS0101375; B091_RS0101380; B091_RS0101385; B091_RS0101390). Dementsprechend könnte die Annotation in diesem Fall von der tatsächlichen Genfunktion abweichen. Zusätzlich zu den Genen, die vermutlich die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase bilden, findet sich auch die Methylmalonyl-CoA Epimerase im 5'-Bereich des Clusters (*B. graminisolvens*: C511_RS0112050; *B. propionificaciens*: B091_RS0101370). Es ist also wahrscheinlich, dass trotz der nicht übereinstimmenden Annotation, diese 5 Gene an der Bildung von Propionat in *B. propionificaciens* und *B. graminisolvens* beteiligt sind und dass sich der Aufbau des Enzyms in *Bacteroidia* von *Veillonella parvula* unterscheidet.

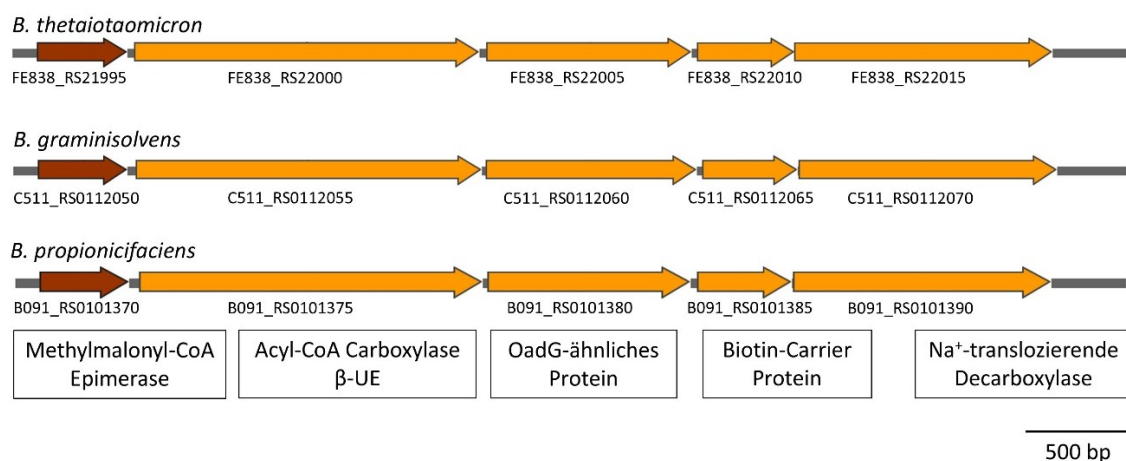


Abbildung 5.1: Gencluster aus Methylmalonyl-CoA Epimerase (rot) und Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (orange) in *Bacteroidia*. Es wurden Genome von *B. thetaiotaomicron* (NZ_CP040530.1), *B. graminisolvens* (NZ_ATZI01000024.1) und *B. propionificaciens* (NZ_AQWS01000003) nach den Genen durchsucht. Gezeigt ist ein Abschnitt von 5001 bp auf dem jeweiligen Genom.

Pyruvat ist ein weiterer Ausgangspunkt für die Bildung verschiedener Fermentationsprodukte. Auch in den untersuchten *Bacteroidia* kann es durch die Aktivität der Pyruvat-Kinase aus PEP entstehen. Darüber hinaus wurde aber auch gezeigt, dass Pyruvat noch aus weiteren Intermediaten gebildet wird beispielsweise Malat und Oxalacetat und dass diese Produkte in einem Gleichgewicht ineinander umgewandelt werden (Macy *et al.*, 1978; Porter und Larsbrink, 2022). Ausgehend von Pyruvat kann Lactat über die Lactat-Dehydrogenase produziert werden (Lück und Deppenmeier, 2022). Während eine Lactatbildung in *B. graminisolvens* beobachtet wurde, bildete *B. propionificiens* kein Lactat in den getesteten Bedingungen, obwohl ein entsprechendes Gen im Genom identifiziert wurde. Es bildete jedoch große Mengen Lactat in Medium, dem B-Vitamine fehlten und war in der Lage, auf Lactat zu wachsen, wobei bis zu 20,9 mM Propionat entstanden (Ueki *et al.*, 2008). Das bestätigt, dass dieses Enzym zwar im Organismus vorhanden, aber bei den untersuchten Bedingungen nicht aktiv ist. Auch *B. graminisolvens* scheint die Fähigkeit zu besitzen Lactat zu Propionat umzuwandeln, da im Experiment mit ruhenden Zellen Propionat aus Lactat entstanden war, sobald keine Glucose mehr im Medium nachweisbar war (4.5.3).

Eine weitere Möglichkeit für *Bacteroidia* Pyruvat zu nutzen ist die Bildung von Acetyl-CoA und dann die Energie konservierende Produktion von Acetat über Acetyl-Phosphat. Wie bereits erwähnt, kann Acetyl-CoA über die PFOR und die PFL gebildet werden, deren Gene in beiden Spezies nachgewiesen wurden. Während bei der ersten Reaktion Ferredoxin reduziert und CO₂ freigesetzt wird, entsteht bei der zweiten Reaktion Formiat als Nebenprodukt. Dementsprechend könnte die Zelle maximal so viel Formiat produzieren wie Acetat, wenn Pyruvat vollständig über die PFL umgewandelt werden würde. In den meisten der hier untersuchten *Bacteroidia* müssten jedoch beide Enzyme parallel aktiv sein, denn es wurden deutlich geringere Mengen Formiat als Acetat gemessen (Tabelle 4.1, Tabelle 4.2). In *S. copri*, welches etwa 4x so viel Acetat wie Formiat produzierte, wurde zudem gezeigt, dass beide Enzyme zu gleichen Anteilen exprimiert werden (Franke und Deppenmeier, 2018). *B. graminisolvens* produzierte aber in allen Experimenten deutlich mehr Formiat als Acetat. Um dieses Phänomen zu erklären, wurden die Gene des Citratzyklus ausgehend von Acetyl-CoA in den untersuchten Spezies identifiziert. Dazu zählen die Enzyme Citrat Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase. Am Ende dieser Reaktionskette entsteht 2-Oxoglutarat. Es ist Ausgangsstoff für die Bildung der Aminosäure Glutamat (Gunka und Commichau, 2012) aus der dann Glutamin, Prolin und Arginin synthetisiert werden können (Bender, 2012). Es macht daher Sinn, dass die *Bacteroidia*, die auf Minimalmedium wachsen können, die genetische Ausstattung zur Bildung verschiedener Aminosäuren besitzen. Durch die Reaktion der 2-Oxoglutarat-Oxidoreduktase entsteht dann Succinyl-CoA. Auch das Gen für dieses Enzym konnte in beiden Spezies nachgewiesen werden. In dem Modellorganismus *E. coli* wird diese Reaktion durch die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase katalysiert, einem Multi-Enzymkomplex aus drei funktionellen Untereinheiten (Frank *et al.*, 2007). In der Blastp-Analyse konnten für fast alle der untersuchten Spezies jedoch nur 2 der 3 Untereinheiten identifiziert werden. *B. xylanisolvens* ist das einzige Bakterium unter den getesteten *Bacteroidia*, in dem ein möglicher E1-Komplex identifiziert wurde. Es muss daher noch näher untersucht werden, ob dieses Enzym in den *Bacteroidia* vorhanden ist oder nicht. Im Gegensatz zu *B. propionificiens* wurde in *B. graminisolvens* jedoch auch ein Gen identifiziert, dass hohe Sequenzübereinstimmung mit der Succinyl-CoA-Ligase aus *Thermus thermophilus* hat (Joyce *et al.*,

2012). Dieses Enzym wandelt Succinyl-CoA in Succinat um und konserviert Energie durch Bildung von ATP oder GTP. Das würde bedeuten, dass der Citratzyklus von *B. graminisolvens* vollständig ist und Succinat sowohl im reduktiven Ast aus Oxalacetat als auch in oxidativer Richtung aus Oxalacetat und Acetyl-CoA entstehen kann. Dies ist beispielsweise der Fall bei *B. thetaiotaomicron* (Catlett *et al.*, 2020; Porter und Larsbrink, 2022).

Ein wichtiger Aspekt des Metabolismus ist die Abgabe von Elektronen, die im Laufe der Glykolyse freigesetzt werden (Abbildung 5.2). Der erste Schritt besteht dabei in der Regeneration von NADH zu NAD⁺ bzw. Fd_{red.} zu Fd_{ox.}, indem die Elektronen auf Chinon übertragen werden. Dafür wurden in *B. fragilis* verschiedenste Redoxenzyme identifiziert, darunter die Natrium translozierende NADH:Chinon Oxidoreduktase (Nqr) und die NADH-Dehydrogenase II (Ndh2) (Ito *et al.*, 2020). Die Gene aller 6 Untereinheiten der Nqr wurden in beiden hier untersuchten Stämmen nachgewiesen. Es ist ein Enzym, welches die Übertragung von Elektronen an die Translokation von Natriumionen koppelt und so einen Natriumgradienten über der inneren Zellmembran generiert (Belevich *et al.*, 2016). Diesen Gradienten können Bakterien nutzen, um über eine Na⁺-abhängige ATPase Energie zu konservieren (Dimroth, 1997). Andererseits wird der Gradient auch für Transportprozesse genutzt (Jung, 2001). In *Prevotella bryantii* treibt der Na⁺-Gradient den Antiport von Protonen an und der dabei entstandene Protonengradient ist wiederum treibende Kraft für eine protonenabhängige ATP-Synthase. Auch die zwei hier untersuchten Stämme besitzen einen solchen Na⁺/H⁺-Antiporter (NahC, *B. propionificiens*: WP_018109528.1.; *B. graminisolvens*: WP_024997271.1). Somit verschafft die Nqr den *Bacteroidia* einen energetischen Vorteil. Das zeigt sich auch darin, dass dieser Komplex in *B. fragilis* für etwa 65 % der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktaseaktivität verantwortlich ist (Ito *et al.*, 2020). Und auch in allen anderen in dieser Arbeit analysierten Stämme mit Ausnahme von *B. luti*, konnten die Gene für dieses Enzym nachgewiesen werden. Die Ndh2 überträgt ebenfalls Elektronen auf Chinon, trägt aber nicht zum H⁺- oder Na⁺-Gradienten bei (Heikal *et al.*, 2014). Sie besteht aus einer Untereinheit und wurde in allen untersuchten *Bacteroidia* nachgewiesen. In *B. graminisolvens* wurden weiterhin Gene des Enzymkomplexes NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Nuo/NdhI) identifiziert. Die Gene stimmen überein mit den Untereinheiten A-D und H-N aus *E. coli*. Diese Zusammensetzung wurde auch in *S. copri* gefunden (Franke und Deppenmeier, 2018) und sie sind in der gleichen Cluster Struktur angeordnet wie im Genom von *B. fragilis* (Ito *et al.*, 2020). Es ist jedoch noch unbekannt, welche Funktion es im Elektronentransport der *Bacteroidia* einnimmt, da es NADH nicht reduziert und die Deletion des H⁺-translozierenden Komplexes auch keine Nachteile in der Kolonialisierung von sterilen Mäusen mit sich brachte (Ito *et al.*, 2020). Es wird daher spekuliert, ob dieses Enzym, ähnlich wie das Enzym von *Campylobacter jejunii*, dem die Untereinheiten E und F fehlen, Fd_{red} als Elektronendonator nutzt (Weerakoon und Olson, 2008; Franke und Deppenmeier, 2018). Die Elektronen von Fd_{red}, die bei der Reaktion der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase frei werden, können jedoch auch über die Na⁺-translozierende Ferredoxin:NAD⁺-Oxidoreduktase (Rnf) auf NAD⁺ übertragen werden und dann mittels Nqr und NdhII auf Chinon über gehen. Dieses Enzym wurde in *Prevotella brevis* GA33 und *P. ruminicola* 23 nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2023) und die hier untersuchten Stämme hatten die gleichen 5 Gene in einem Cluster angeordnet (abgesehen von *B. luti*). Der Rnf-Komplex scheint also auch in den hier untersuchten Spezies eine Rolle bei der Redoxbalance der Zelle zu spielen. Als terminaler Elektronenakzeptor während des anaeroben Wachstums dient schließlich Fumarat. Die Elektronenübertragung von Hydrochinon wird dabei von der Fumarat-Reduktase katalysiert. In

Prevotella bryantii wurde gezeigt, dass dieses Enzym einen Superkomplex mit der Nqr und Chinon bildet und so einen Natriumgradienten generiert (Schleicher *et al.*, 2021). Dieser Mechanismus bietet den *Bacteroides* dabei einen energetischen Vorteil gegenüber anderen Bakterien des Darmtraktes, die ihre Energie nur aus Substratkettenphosphorylierung generieren. Eine Untersuchung fand, dass *B. fragilis* so bis zu 4,5 mol ATP pro mol Glucose generieren kann, anstelle der 2,5 mol ATP/mol Glucose, die bei *E. coli* unter anaeroben Bedingungen erzielt werden (Macy *et al.*, 1975).

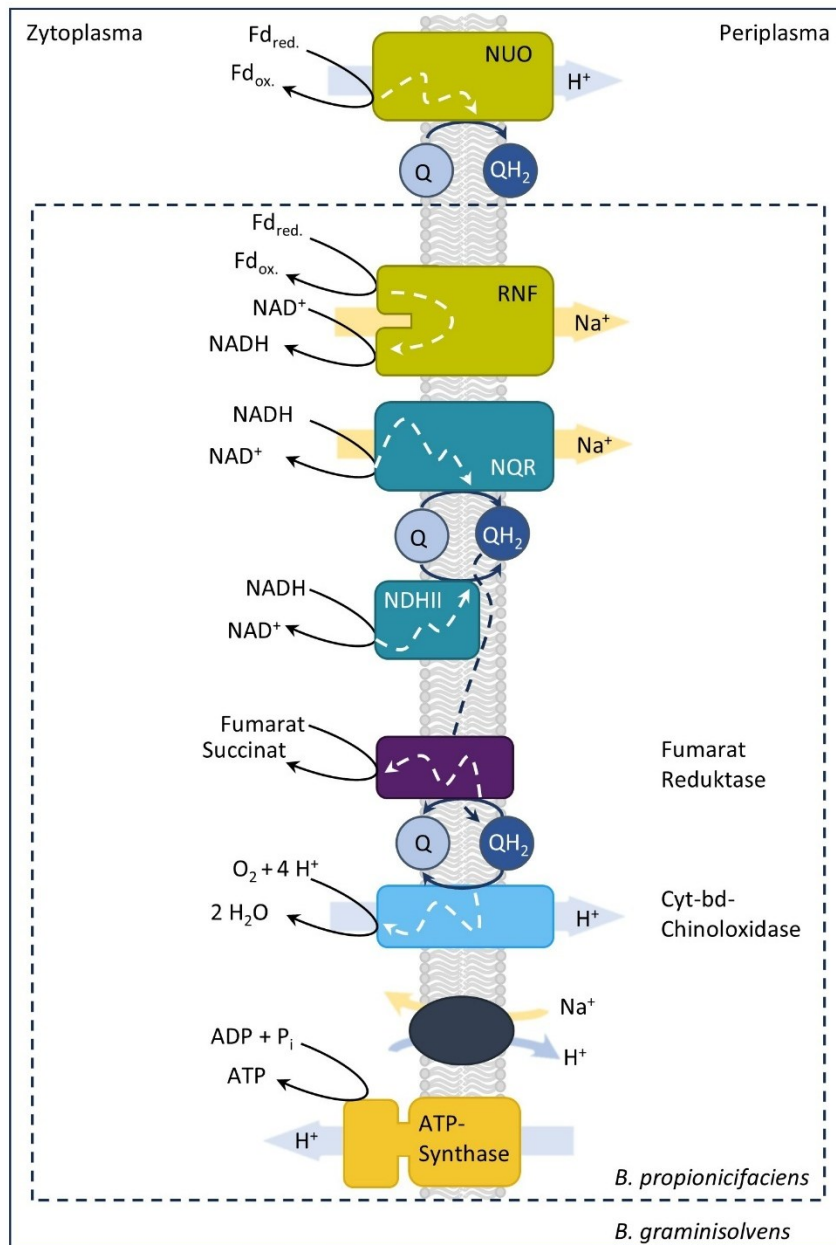


Abbildung 5.2: Modell der Atmungskette von *B. graminisolvans* und *B. propionificaciens*. Nuo, kopflose Variante der NADH:Chinon-Oxidoreduktase, oxidiert potentiell $\text{Fd}_{\text{red.}}$ anstelle von NADH; Rnf, Ferredoxin:NAD $^+$ -Oxidoreduktase; Nqr, NADH:Chinon-Oxidoreduktase; NdhII, NADH-Dehydrogenase II; Q, Chinon; QH_2 , Hydrochinon.

Für Darmbakterien ist es jedoch nicht ausgeschlossen, dass sie in Kontakt mit geringen Mengen Sauerstoff kommen, beispielsweise in Nähe der Darmmukosa (Albenberg *et al.*, 2014). Sie besitzen daher auch die Möglichkeit, Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen. Dafür besitzen sie die Cytochrom-bd-II Chinol-Oxidase. Dieses Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, die in allen getesteten Spezies im Genom nachgewiesen werden konnten. Es ist in *B. fragilis* für das Wachstum bei O₂ Konzentrationen im nanomolaren Bereich notwendig und ermöglicht es dem Bakterium O₂ aus der Umgebung zu entfernen (Baughn und Malmay, 2004). Während zunächst angenommen wurde, dass dieses Enzym Elektronen von Ubiquinol auf Sauerstoff überträgt, ohne dabei einen Protonengradienten zu erzeugen, geht man mittlerweile davon aus, dass die Reaktion doch elektrogen ist (Sharma *et al.*, 2012).

Eine weitere Strategie, Elektronen abzugeben, liegt in der Produktion von molekularem Wasserstoff (H₂). Dafür besitzen viele *Bacteroidia* Hydrogenasen vom FeFe-Typ, mit denen sie Elektronen auf Protonen übertragen und dann in Form von H₂ abgeben (Wolf *et al.*, 2016). Mit Ausnahme von *B. graminisolvens* und *B. propionificiens*, konnten derartige Hydrogenasen in allen untersuchten Spezies gefunden werden, was bestätigt, dass diese Fähigkeit unter den *Bacteroidia* weit verbreitet ist. Auch die Untersuchung des Wasserstoffgehaltes im Gasraum der Kulturröhrchen bestätigte, dass diese beiden Stämme kein Wasserstoff produzieren (4.5.2). Gerade im Hinblick auf die Propionatproduktion scheint das jedoch ein Vorteil zu sein. Wachsen die Bakterien unter anoxischen Bedingungen, ist Fumarat der einzig mögliche Elektronenakzeptor und die Succinatproduktion wird gesteigert, was Voraussetzung für eine effektive Propionatproduktion ist. Das wird auch deutlich beim Vergleich der Produktverhältnisse der untersuchten *Bacteroidia*, denn gerade die zwei Stämme, die keine Hydrogenase codieren, waren diejenigen mit den höchsten PS/A-Verhältnissen. Beispielsweise erreichte *B. cellulosilyticus* nur ein PS/A-verhältnis von 0,7 in DMMG während *B. propionificiens* 2,1 erzielte.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich das genetische Potential der beiden untersuchten Stämme im Hinblick auf die zentralen katabolen Stoffwechselwege nicht wesentlich von dem umfassend untersuchten *Bacteroidia* unterscheidet. Besonders auffällig war, dass die zwei Stämme fast die gleiche genetische Ausstattung besaßen, sich das Produktspektrum aber stark unterschied. Das unterstreicht, dass die Untersuchung der Gensequenzen der Organismen nur erste Hinweise auf die Stoffwechselwege geben kann, denn die Aktivität der Enzyme und die Bedingungen, unter welchen sie exprimiert werden, sind mindestens ein genauso wichtiger Faktor. Auch kann von Sequenzähnlichkeiten allein nicht zweifelsfrei auf die Funktion geschlossen werden. Auf lange Sicht sind daher weitere Analysen notwendig, um den Stoffwechsel der beiden Spezies aufzuklären.

5.4.3 Bilanzierung des Stoffwechsels

Anhand der gewonnenen Daten aus der Genomanalyse sollte überprüft werden, ob die Stoffwechselbilanz ausgeglichen ist. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Zunächst wurde die Produktbildung von ruhenden Zellen getestet. Hierbei wurden Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in einem Puffer ohne Ammonium aufkonzentriert, sodass kein Zellwachstum möglich ist. Dem Puffer hinzugefügte Glucose sollte dann nur zur Produktion von Energie für die Zellerhaltung genutzt werden und dabei freigewordene Elektronen in Form von Fermentationsprodukten an die Umgebung abgegeben

werden. Bis auf geringe Mengen Pyruvat und Succinat entsprach das Produktspektrum von *B. propionificiens* dem der wachsenden Zellen im Plattenleser (Versuch 4.3). Die Berechnungen der Bilanzen ergaben jedoch, dass nur 73,6 % des Kohlenstoffs aus der Glucose in den Fermentationsprodukten wiederzufinden waren. Auch die Redoxbilanz war nicht vollständig ausgeglichen (64,2 %). Zusätzlich zu den Fermentationsprodukten wurde für *B. propionificiens* auch der Gehalt an intrazellulären Polysacchariden (IPS) gemessen, die nach 7 h ihr Maximum von ca. 100 mg/l erreichten und nach 24 h etwa wieder auf dem Ausgangswert abgefallen war. Dieser Verlauf zeigt, dass *B. propionificiens* intrazelluläre Polysaccharide akkumulierte, wenn Glucose vorhanden war und bei Glucose-Knappheit wieder abbaut. Die Produktion von Speicherpolysacchariden ist in *Bacteroidia* weit verbreitet. In wachsenden Kulturen von *B. fragilis* wurden intrazelluläre Polysaccharide nachgewiesen, die in Granula in der Zelle vorlagen und als Glykogen identifiziert wurden (Lindner *et al.*, 1979). Bei Glucosekonzentrationen oberhalb von 1,7 mM wurde Glykogen dabei aufgebaut und darunter abgebaut (Lindner *et al.*, 1979). Auch in *Prevotella ruminicola* wurde die Bildung von Glykogen nachgewiesen, wobei jedoch eine stärkere Akkumulation beim Wachstum auf Maltose beobachtet wurde (Lou *et al.*, 1997). Glykogen ist ein wichtiges Speicherpolysaccharid in Bakterien. Es besteht zu ca. 90 % aus α -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Glucosemolekülen, die zusätzlich α -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte Verzweigungsstellen aufweisen (Cifuentes *et al.*, 2019). Seine Funktion liegt darin, Perioden von Substratknappheit zu überwinden. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass es sich dabei eher um einen Kurzzeitmechanismus handelt als um eine langfristige Überlebensstrategie, die besonders bei kurzfristigen Änderungen des Nährstoffangebots hilfreich ist (Sekar *et al.*, 2020). Gerade für Darmorganismen ist diese Strategie sinnvoll, da sich Art und Verfügbarkeit der Substrate ständig ändern (Esteban-Torres *et al.*, 2023). In den wachsenden Zellen von *B. propionificiens* konnten trotz Produktion von Glykogen noch immer 23,4 % der verbrauchten Glucose nicht in den Produkten nachgewiesen werden. Die gemessene Glykogen-Menge entsprach jedoch nur etwa 0,5 mM Glucose (ca. 3 % der verbrauchten Glucose). Zellsuspensionen von *B. thetaiotaomicron* bauten ebenfalls ein nicht näher bestimmtes Polysaccharid in ihre Zellen ein, allerdings entsprach die Menge zwischen 50 % und 80 % der Glucose (Hylemon *et al.*, 1977). Möglicherweise wurde also der Gehalt an IPS in den Zellen von *B. propionificiens* unterbestimmt und der Anteil eingespeicherter Glucose war eigentlich höher. Gerade durch die Waschschriffe mit Methanol kann es zu einem Verlust von Substrat gekommen sein. Auch war die Inkubationszeit von 15 min deutlich zu kurz, denn eine umfangreiche Untersuchung zur Glykogenbestimmung empfiehlt eine Inkubationszeit von 2 – 5 h abhängig von der Beschaffenheit der Probe (Lanham *et al.*, 2012). Wenn der Glykogengehalt der Zellen größer war, könnte dies auch die Zunahme der Kohlenstoffausbeute von 24 h zu 144 h Inkubationszeit erklären. Ein weiterer Störfaktor ist die leichte Zunahme der Zellmasse. Obwohl die Zellen in einem Puffer ohne Ammonium inkubiert worden waren und vor Beginn der Messung ausgehungert wurden, gab es eine geringe Steigerung der Proteinkonzentration von 0,03 g/l innerhalb von 7 h. Entsprechend den Ergebnissen aus Versuch 4.5.4 entspräche dies in etwa 0,06 g/l Trockengewicht und damit maximal 0,5 mM Glucose (3 %). Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, um das Kohlenstoffdefizit zu erklären.

Das Produktspektrum der Zellsuspensionen von *B. graminisolvens* unterschied sich deutlich von dem des Versuchs mit wachsenden Zellen (4.3), da das Bakterium relativ viel Lactat und Pyruvat produzierte. Dieses Verhalten war auch schon beim Wachstum mit gesteigerter Glucosekonzentration (Abbildung 4.4) und verringertem CO₂-Gehalt (Abbildung 4.6) beobachtet worden. Dass Mikroorganismen bei

hohem Substratangebot auf Stoffwechselwege zurückgreifen, die energetisch ineffizient sind, ist ein schon lange untersuchtes Phänomen. Dabei kann zwischen zwei Strategien unterschieden werden: Entweder schaltet die Zelle zwischen einem *High-* und *low-Yield* Stoffwechselweg um, wie es bei *Lactococcus lactis* der Fall ist, oder die Zelle betreibt *Overflow*-Metabolismus, wie bei *E. coli*. Hierbei hält die Zelle ihren *High-Yield* Stoffwechselweg aufrecht, jedoch reicht die Kapazität der Enzyme nicht aus, um die anfallenden Metabolite zu verarbeiten und ein Teil wird über *Low-Yield* Prozesse weiterverarbeitet (van Hoek und Merks, 2012). Da Propionat trotzdem noch das Hauptprodukt der Fermentation war, scheint *B. graminisolvens* also eher wie *E. coli* zu agieren und die energetisch ungünstigeren Nebenprodukte sind ein Zeichen dafür, dass Intermediate über alternative Wege verarbeitet werden. *B. propionificiens* hat hingegen die Intermediate Pyruvat und Succinat direkt ins Medium abgegeben und kein Lactat produziert. Obwohl das Thema schon seit langem untersucht wird, sind die molekularen Ursachen noch nicht abschließend geklärt. Eine relativ neue Theorie geht davon aus, dass respiratorische Stoffwechselwege durch ihr großes Enzymarsenal höhere Proteomkosten haben als fermentative. Gerade bei schnell wachsenden Zellen bewirkt dies, dass die Produktion von Enzymen für „einfache“ Wege bevorzugt wird (Basan *et al.*, 2015). Eine Ammoniumlimitierung könnte daher einen ähnlichen Effekt haben, da die Proteinbiosynthese limitiert ist und die Zelle mit ihren Proteinen haushalten muss. Auch ist eine Theorie, dass sich bei verringerter Expression von Genen des TCA und AS-Synthese, Intermediate am Pyruvat-Knoten stauen (Li *et al.*, 2014). Dies würde die Abgabe von Pyruvat ins Medium erklären. Nachdem die Glucose verbraucht war, wurde etwa die Hälfte der produzierten Säuren wieder aufgenommen bei gleichzeitiger Produktion von Propionat. Das zeigt, dass auch *B. graminisolvens*, ähnlich wie *B. propionificiens*, Lactat und Pyruvat als Substrat für die Propionatproduktion nutzen kann. Die Berechnung der Kohlenstoff- und Redoxbilanz ergab eine noch geringere Kohlenstoffausbeute (67 %) als bei *B. propionificiens*, dafür aber eine Redoxbilanz von 106,4 %. Dies würde bedeuten, dass in den Zellen mehr Elektronen freigesetzt worden sind, als bei der Glykolyse hätten frei werden können. Die Zelle muss daher einen weiteren Stoffwechselweg nutzen, wie beispielsweise den oxPPP bei dem zusätzlich NADPH freigesetzt wird. Durch die Reaktion würde außerdem CO₂ abgegeben werden, was die verringerte Kohlenstoffausbeute erklärt.

Da die Untersuchung ruhender Zellen keine eindeutigen Ergebnisse hervorgebracht hatte, wurde eine Methode angewendet, um die Stoffwechselbilanz wachsender Zellen zu berechnen, ähnlich wie sie für *S. copri* publiziert ist (Franke und Deppenmeier, 2018). Dies hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Zellen ähnliche Produktverhältnisse aufwiesen wie in den ersten Wachstumsversuchen. Im Gegensatz zu den Berechnungen mit ruhenden Zellen weisen die Ergebnisse mit den wachsenden Zellen darauf hin, dass der oxidative Pentosephosphatweg auch von *B. propionificiens* genutzt wird. Kohlenstoff und Wasserstoffbilanz waren ausgeglichen, wenn etwa 33 % der verbrauchten Glucose über den oxPPP verstoffwechselt wurden. Bei *B. graminisolvens* waren die Bilanzen ausgeglichen, wenn rund 68 % der Glucose über den oxPPP verstoffwechselt wurden. Da die genetischen Untersuchungen ergeben hatten, dass Acetyl-CoA auch über den Citratzyklus oxidiert werden könnte, wurde die Bilanz auch für dieses Szenario berechnet. In diesem Fall würden rund 53 % der Glucose über den oxPPP verstoffwechselt werden. Zwar ist bekannt, dass verschiedene *Bacteroidia* den oxPPP nutzen können (Bailey und Love, 1995), es gibt aber keine Referenzwerte, zu welchen Anteilen sie dies tun. Auch ist der Fluss durch den oxPPP stark reguliert und wird beispielsweise durch oxidativen Stress begünstigt (Stincone *et al.*, 2015). Für verschiedene Propionibakterien wurde berechnet, dass Glucose zu 24 % - 60 % über den PPP

verstoffwechselt wird (Papoutsakis und Meyer, 1985). Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte sind also möglich. Sie widersprechen jedoch den Ergebnissen aus Versuch 4.4, der gezeigt hatte, dass *B. graminisolvens* ohne CO₂ nicht wachsen konnte. Laut den hier berechneten Werten müsste es netto CO₂ freisetzen und somit genug CO₂ für die Bildung von Oxalacetat aus PEP vorhanden sein, um Wachstum zu ermöglichen. Möglich ist aber auch, dass der oxPPP in Versuch 4.4 weniger genutzt wurde. *A. acidipropionici* beispielsweise verstoffwechselt Glucose zu 34 % über den oxPPP, wenn es ohne CO₂ kultiviert wird und zu 52 % in CO₂-Atmosphäre (Zhang *et al.*, 2015). Die Verwendung des oxPPP zum Abbau der Glucose stellt eine interessante Perspektive für die Verringerung von Nebenprodukten dar, denn die verstärkte Oxidation liefert mehr Elektronen, die auf Fumarat übertragen werden können, um Succinat zu produzieren. Das wurde auch bereits bei *P. vulgatus* gezeigt, wo eine Steigerung des Glucose-Abbaus über den OxPPP nach Überproduktion der Transketolase eine Verbesserung der Succinatproduktion zur Folge hatte (Gindt *et al.*, 2024). Er verringert jedoch auch die maximal mögliche Menge an Propionat, da ein Teil des Kohlenstoffs als CO₂ „verloren“ geht.

5.4.4 Upscaling der Propionatproduktion

Wie in Abbildung 4.4 gezeigt, können *Bacteroidia* in Batch Kulturen nur eine begrenzte Menge von rund 30 mM Glucose verstoffwechseln, bevor der sinkende pH hemmend wirkt und das Wachstum zum Erliegen kommt. Für industrielle Zwecke sind jedoch hohe Produktkonzentrationen (Titer) notwendig. Aus diesem Grund werden Propionibakterien häufig mit pH-Kontrolle kultiviert. *A. acidipropionici* produzierte in so einem Versuchsaufbau 17,3 g/l Propionat aus 40 g/l Glucose (Zhang *et al.*, 2015) (Tabelle 5.1). In einem ähnlichen Versuch wuchs *S. copri* bis auf eine OD₆₀₀ von 11 und konsumierte fast 300 mM Glucose (54 g/l) (Franke, 2020). Es mangelt jedoch an Untersuchungen in *Bacteroidia*, die sich auf die Propionatproduktion fokussieren. Daher wurden auch *B. propionificiens* und *B. graminisolvens* in einem pH-kontrollierten Bioreaktor kultiviert. Da jedoch die vorherigen Ergebnisse gezeigt hatten, dass zu hohe Glucosekonzentrationen besonders in *B. graminisolvens* zur Produktion von Lactat führten, wurde Glucose in kleineren Pulsen (Fed-Batch) hinzugefügt. Mit dieser Methode produzierte *B. propionificiens* 119 mM (9.3 g/l) Propionat aus 131 mM (23,6 g/l) Glucose, was einer Ausbeute von 0,9 mol_P/mol_G (0,37 g_P/g_G) entspricht und vergleichbar ist mit den Wachstumsversuchen mit 15 mM Glucose (Tabelle 4.1). Diese Ausbeute ist vergleichbar mit *A. acidipropionici* in pH-kontrollierter Kultur und Glucose als Substrat (Tabelle 5.1). Succinat wurde von *B. propionificiens* auch erst produziert, als eine große Menge Glucose auf einmal zum Medium hinzugegeben wurde. Dementsprechend könnte eine Verkleinerung der Glucose-Pulse die Ausbeute noch weiter erhöhen. *B. graminisolvens* erreichte hingegen nur eine Ausbeute von 0,13 g_P/g_G, was an der massiven Produktion von Nebenprodukten wie Lactat, Pyruvat und Succinat lag. In zukünftigen Versuchen muss also darauf geachtet werden, dass Glucose nur in geringen Mengen hinzugegeben wird. Auch eine kontinuierliche Kultivierung mit Glucose-Limitation könnte getestet werden. Gerade bei geringen Verdünnungsraten und ohne CO₂ produzierte *B. fragilis* bevorzugt Propionat anstelle von Succinat (Caspari und Macy, 1983). Der Glucoseverbrauch der hier getesteten *Bacteroidia* war jedoch trotz pH-Kontrolle limitiert. Zwar konnte *B. propionificiens* die Glucose fast vollständig aufbrauchen, die Rate verringerte sich jedoch zum Ende der Messung. Bei *B. graminisolvens* kam die Glucoseaufnahme nach ca. 40 h zum Erliegen, sodass es maximal 106 mM verbrauchte. Möglicherweise wirkten hier die Fermentationsprodukte hemmend. Untersuchungen mit *P. vulgatus* zeigten, dass es bereits ab 1 g/l Lactat oder 1,5 g/l Acetat zu Wachstumseinbußen kommt (Keitel *et al.*, 2024). Zum

Vergleich: Am Ende der Fermentation von *B. propionificiens*, enthielt der Kulturüberstand ca. 49 mM Acetat, was rund 2,9 g/l entspricht. Und zum Ende der Kultivierung von *B. graminisolvens* waren alleine 2,2 g/l Lactat im Kulturüberstand messbar. Auch könnte der Salzstress, hervorgerufen durch die Zugabe von NaOH und die Akkumulation der Fermentationsprodukte die Produktbildung und das Wachstum negativ beeinflusst haben, denn auch *P. vulgatus* bildet bei höheren Osmolaritäten vermehrt Lactat (Keitel *et al.*, 2024). Wenn Bakterien Salzstress ausgesetzt sind, bilden sie Substanzen, die als kompatible Solute bezeichnet werden, beispielsweise Trehalose oder Glycinbetain (Argüelles, 2000). Immobilisierte Zellen von *A. acidipropionici* produzierten in einem Fed-Batch-setup vermehrt Trehalose und eine Überproduktion dieser Substanz führte zu einer Verringerung der Acetat- und Succinatproduktion im Vergleich zu Propionat (Jiang *et al.*, 2015).

Tabelle 5.1: Vergleich der Propionatbildung der in dieser Arbeit untersuchten *Bacteroidia* mit verschiedenen Fermentationen von *P. acidipropionici*.

Ausbeute [gP/gC]	Titer [g/l]	Produktivität [g/l x h]	Kultivierungsbedingungen	Referenz
<i>B. propionificiens</i>				
0,37	9,3	0,09	Glucose, pH-Kontrolle (7,0), Fed-Batch	Diese Arbeit (4.6)
<i>B. graminisolvens</i>				
0,13	2,5	0,04	Glucose, pH-Kontrolle (7,0), Fed-Batch	Diese Arbeit (4.6)
<i>P. acidipropionici</i>				
0,35	17,3	0,2	Glucose, pH-Kontrolle (7,0)	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
0,7	23,55	0,12	Glycerol, pH-Kontrolle (7,0)	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
0,54	32,4	0,5	Lactose, pH-Kontrolle (6,0), Fed-Batch, immobilisierte Zellen	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
0,67	135	0,6	Lactose, pH-Kontrolle (6,0), Fed-Batch, immobilisierte Zellen, <i>otsA</i> -Überproduktionsstamm	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
	45	0,2	Glycerol, pH-Kontrolle (7,0)	(Guan <i>et al.</i> , 2012)
	60	0,33	Glycerol, pH-Kontrolle (7,0), pH-toleranter rekombinanter Stamm	(Guan <i>et al.</i> , 2012)
0,36	33	0,2	Glucose, pH-Kontrolle (6,0), Fed-Batch, niedrige initiale Zellmasse (0,3 g/l)	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
0,36	70	0,42	Glucose, pH-Kontrolle (6,0), Fed-Batch, hohe initiale Zellmasse (43 g/l)	(Liu <i>et al.</i> , 2016)

Es ist daher notwendig, die Kultivierungsbedingungen genauer zu untersuchen und Ursachen für die Wachstumshemmung zu bestimmen. Versuche mit *B. fragilis* in einem Bioreaktor zeigten, dass Änderungen der Medienzusammensetzung, der Inokulationsvolumens und der Kultivierungsbedingungen eine 10-fache Steigerung der Succinatproduktion mit sich brachten (Dalland

und Hofstad, 1974). Auch die Erkenntnisse aus der Forschung mit den Propionibakterien können als Ansatz für die weitere Verbesserung der Propionatproduktion in *Bacteroidia* genutzt werden. So bewirkte beispielsweise die Erhöhung der Zelldichte bei ruhenden Zellen von *A. acidipropionici* eine Steigerung der Produktivität (Liu *et al.*, 2016). Prozessoptimierung ist daher ein wichtiger nächster Schritt um die Fermentationsparameter zu verbessern.

5.5 Genetische Methoden zur Verbesserung der Propionatproduktion

Neben der Prozessoptimierung ist die Gentechnik eine Ressource zur Verbesserung der Propionatproduktion. Darüber hinaus kann die Deletion oder Überexpression von Genen Aufschluss über Stoffwechselwege und Enzymfunktionen geben. Die Verbesserung und Erweiterung der genetischen Methoden stellt dabei einen Vorteil gegenüber Propionibakterien dar, da besonders das Bakterium *A. acidipropionici*, was für seine hohen Propionattiter bekannt ist, nur schwer genetisch zugänglich ist (Ammar und Philippidis, 2021). Besonders für *B. thetaiotaomicron* wurden in den letzten Jahren viele genetische Methoden entwickelt und Erkenntnisse gewonnen (Mimee *et al.*, 2015; García-Bayona und Comstock, 2019; Porter und Larsbrink, 2022). Auch für das S1-Bakterium *P. vulgaris* wurde mittlerweile eine Technik zur markerlosen Deletion publiziert (Neff *et al.*, 2023). Zur Untersuchung der Propionatproduktion sollte jedoch eine Methode angewendet werden, mit der bereits die Lactat-Dehydrogenase in *P. vulgaris* überproduziert wurde (Lück und Deppenmeier, 2022). Dabei wurde das Gen zusammen mit einer 200 bp langen Promotorregion in das high-Copy-Plasmid pG106 (Jones *et al.*, 2020) kloniert und mittels Elektroporation in *P. vulgaris* eingebracht. Dadurch dass das Plasmid und damit auch das Gen in ca. 30-facher Kopienzahl in *P. vulgaris* vorlag, stieg auch die Menge an aktivem Enzym und die Lactatproduktion wurde deutlich erhöht (Lück und Deppenmeier, 2022). Diese Technik stellt daher eine einfache Möglichkeit zur Überproduktion von Enzymen dar, besonders für die Untersuchung von Enzymfunktionen. Sie wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Methylmalonyl-CoA-Mutase in *P. vulgaris* zu produzieren. Dazu wurden die zwei Gene *mutA* und *scpA* aus *P. vulgaris* genutzt. Sie liegen im Genom im gleichen Cluster vor wie in *B. thetaiotaomicron*. Dort wurde bestätigt, dass es für eine funktionelle Methylmalonyl-CoA-Mutase codiert (Wang *et al.*, 2024). Da *P. vulgaris* im Vergleich mit den anderen getesteten *Bacteroidia* nur einen niedrigen P/S-Quotienten erzielte (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2), war das Bakterium ein gutes Testobjekt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit der Lactat-Dehydrogenase, wurde das Plasmid mittels Konjugation in *P. vulgaris* eingebracht. Obwohl das Plasmid in *P. vulgaris* nachgewiesen wurde, konnte kein positiver Effekt auf die Propionatbildung beobachtet werden. Es führte im Minimalmedium eher zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Diese trat sowohl in Zellen mit dem Plasmid pG106 als auch pG106_np_mutA_scpA auf und ist darin zu erklären, dass die Zellen vermehrt Ressourcen für die Produktion von Nukleotiden einsetzen müssen, um das Plasmid zu replizieren und für die Antibiotikaresistenz. Im Komplexmedium wurde sogar eine Verringerung der Propionatproduktion zugunsten von Succinat festgestellt. Wie bereits erwähnt kann es im Komplexmedium zur Bildung von Propionat aus Aminosäuren kommen (Abschnitt 5.3). Da die Reaktion von Succinyl-CoA zu (R)-Methylmalonyl-CoA reversibel ist (Mancia *et al.*, 1999), könnte das Enzym auch die Rückreaktion gefördert haben, wodurch Aminosäuren über Propionat zu Succinat umgewandelt werden. Es konnte jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass ein funktionierendes Enzym von dem Organismus produziert wurde. Zwar zeigten die qPCR-Untersuchungen eine bis zu 24-fache Erhöhung des

Transkriptionsebenen (Abbildung 4.21), jedoch wurde bisher noch nicht nachgewiesen, dass auch die Enzymaktivität beeinflusst wurde. Die Experimente müssen daher überprüft und Enzymaktivitätstests durchgeführt werden, um genaue Aussagen zu treffen.

Die Gentechnik ist eine wichtige Ressource zur Verbesserung der Propionatproduktion, da der Metabolit-Fluss zugunsten der gewünschten Produkte manipuliert werden kann. Die Produktion von Lactat und Formiat kann dabei durch die Deletion der verantwortlichen Enzyme LDH und PFL unterdrückt werden (Gindt *et al.*, 2024). Die Acetatbildung kann hingegen nicht vollständig unterbunden werden, da dieser Weg für die Redox-Balance und zur Energiegewinnung notwendig ist (Gindt *et al.*, 2024). Hier hilft nur die Nutzung von reduzierterem Substrat. In vielen Untersuchungen mit Propionibakterien wird daher Glycerol als alleiniges oder Co-Substrat genutzt (Ammar und Philippidis, 2021). *Bacteroidia* besitzen jedoch häufig nicht die Fähigkeit auf Glycerol zu wachsen (Shah *et al.*, 2006). Unter den hier untersuchten Spezies wurde nur bei *B. xylanisolvens* von einer Glycerolverwertung berichtet (Chassard *et al.*, 2008). Glycerol wird dabei zunächst durch die Glycerolkinase zu Glycerol-3-Phosphat umgewandelt und dann zu DHAP oxidiert, was in die Glykolyse eingeschleust wird (Dharmadi *et al.*, 2006). Mittels Gentechnik könnten die erforderlichen Enzyme auch in anderen *Bacteroidia* produziert werden und somit die Succinatproduktion gegenüber der Acetatproduktion fördern beispielsweise in Kombination mit pflanzlichen Polymeren als Substrat. Die Steigerung der Propionatproduktion ist jedoch weniger leicht zu bewirken. Da die Propionatproduktion aus Succinat zyklisch abläuft, könnte jedes dieser Enzyme limitierend sein. Auch scheint die Bildung von Propionat nicht mit dem Redoxstatus der Zelle zusammenzuhängen und kann somit nicht vom Substrat gesteuert werden. Sie scheint aber von der Kohlenstoffverfügbarkeit beeinflusst zu werden (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Auf dem Weg von Propionat zu Succinat sind 4 Enzyme beteiligt: die Succinyl-CoA:CoA Transferase, die Methylmalonyl-CoA-Mutase, die Methylmalonyl-CoA Epimerase und die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase. Die meisten dieser Gene waren bereits Ziel einer Überexpression in anderen Organismen, die den Succinat-Weg nutzen. In einem *E. coli*-Stamm, dem die Gene für den Succinat-Weg eingeführt wurden, war die Aktivität der Methylmalonyl-CoA-Mutase der limitierende Schritt und die zusätzliche heterologe Produktion der MCM aus *Methylobacterium extorquens* verbesserte die Propionatproduktion (Li *et al.*, 2017). In einem auf hohe Propionatkonzentrationen adaptierten Stamm von *A. acidipropionici* wurde hingegen die Propionyl CoA:Succinyl CoA Transferase als eines der Enzyme identifiziert, welches an der verbesserten Propionatproduktion der Zellen beteiligt war (Suwannakham und Yang, 2005). Die Überproduktion dieses Enzyms in *P. freudenreichii* führte zu einer Steigerung des P/S-Quotienten, allerdings nur auf einer Mischung von Glucose und Glycerol (Wang *et al.*, 2015a). Darmbakterien besitzen jedoch häufig mehrere CoA-Transferasen mit geringer Substratspezifität, weswegen es schwierig ist, das verantwortliche Enzym zu identifizieren (Louis und Flint, 2017). Auch die heterologe Produktion der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *A. acidipropionici* wurde in *P. freudenreichii* untersucht. Sie bewirkte eine geringe Steigerung der Ausbeute, Produktivität und des P/S-Quotienten (Wang *et al.*, 2015b). In *Bacteroidia* wird dieses Enzym von 4 Genen codiert (BT1686-1689) (Porter und Larsbrink, 2022), die mit dem Gen für die Methylmalonyl-CoA Epimerase in einem Cluster liegen (mce, BT_RS0855-BT_RS0870). Es umfasst 3401 bp. In Anbetracht, dass mit den zwei Genen für die Methylmalonyl-CoA-Mutase inklusive Promotorbereich 4442 bp über die hier genutzte Methode in *P. vulgatus* eingebracht wurden, könnte auch die Überproduktion der MCE und der MCD mit der

verwendeten Methode getestet werden. Dafür muss aber zunächst geklärt werden, ob die Überproduktion der MCM erfolgreich war oder nicht und woran es lag, dass die Propionatproduktion nicht gesteigert wurde. Eine Möglichkeit wäre es, das Plasmid mittels Konjugation in *B. graminisolvens* zu bringen und zu testen, ob es in diesem Organismus anders wirkt. Möglicherweise müssen auch mehrere der beteiligten Gene überproduziert werden. In diesem Fall stößt jedoch die hier verwendete Technik an ihre Grenzen, da das Konstrukt mit der Methylmalonyl-CoA-Mutase bereits sehr groß war und eine weitere Vergrößerung die Transformations- und Konjugationseffizienz verringern würde. Außerdem bedeutet die ständige Replikation eines *high-copy*-Plasmids zusätzlichen Bedarf an Proteinen und Nährstoffen für die Zelle, was sich negativ auf die Produktion auswirken kann.

5.6 Nutzung neuer Isolate als Propionatproduzenten

5.6.1 Isolierung neuer *Bacteroidia* zur Propionatproduktion

Die Isolierung neuer Stämme aus Umweltproben stellt eine weitere Strategie zur Untersuchung der Propionatbildung in *Bacteroidia* dar, da die Propionatproduktion sehr variabel ist, könnten neue Stämme unerwartete Ressourcen darstellen. Wie in Tabelle A8 gezeigt wurde, wurden die meisten Propionatproduzenten aus Quellen gewonnen, die entweder mit dem Darmmikrobiom von Menschen oder Tieren assoziiert sind, und/oder mit einem großen Angebot von komplexen Pflanzenpolysacchariden in Kontakt waren, wie beispielsweise in einer Biogasanlage oder Abwasser einer Papiermühle. Dementsprechend erfolgte auch die Auswahl der hier verwendeten Probenmaterialien. Es wurden Proben aus verschiedenen Stufen in der Abwasseraufbereitung, aus Kompostmieten von städtischem Bio-Müll oder Biogasanlagen verwendet. Da es das Ziel war, Propionatproduzenten zu finden, die komplexe Polysaccharide als Substrat verwenden, wurden auch solche Stoffe (Xylan, Cellulose, Chitin) für die Anreicherung verwendet. Besonders Xylan wurde in der Vergangenheit schon eingesetzt, um wenig abundante *Bacteroidia* anzureichern (Tan *et al.*, 2018). Da *Bacteroidia* natürlicherweise resistent gegenüber den Antibiotika Vancomycin und Kanamycin sind, wurde eine Kombination der beiden verwendet, um das Wachstum unerwünschter Darmbakterien zu unterdrücken (Duerden, 1980; van Winkelhoff und Graaff, 1983). Die Ergebnisse der Amplicon-Untersuchung zeigen, dass zwischen 25 und 50 % der Bakterien in den Anreicherungskulturen zu den *Bacteroidota* gezählt werden können. In einer Untersuchung zur Diversität des Darmmikrobioms wurde 48 % der amplifizierten 16S-rRNA-Sequenzen zu den *Bacteroidota* gezählt (Eckburg *et al.*, 2005). Die hier gewählte Methode war also nicht ausreichend, um die Abundanz dieses Phylums zusätzlich zu steigern, verhinderte aber, dass Bakterien aus anderen Phyla überhand gewinnen konnten. Als nächstes sollten gezielt *Bacteroidia* aus den Anreicherungskulturen isoliert werden, die bevorzugt Propionat bilden. Es wurde eine Methode getestet, bei der der pH-Indikator Bromocresolpurpur genutzt wurde, um eine schnelle Säurebildung anzuzeigen. Sie erwies sich als wenig hilfreich, da die Säure zu stark im Agar diffundierte und keine einzelnen Kolonien identifiziert werden konnten. Gute Propionatproduzenten konnten daher nur identifiziert werden, nachdem sie isoliert wurden. Die Propionatproduktion der Isolate ähnelte den Werten aus Versuch 4.2.1, da die wenigsten Isolate über 5 mM Propionat produzierten. Generell erreichte aber kein Isolat Propionatkonzentrationen, die den Anreicherungskulturen entsprachen. Das kann daran liegen, dass 10 g/l Xylan deutlich mehr Substrat darstellt als 3,5 g/l Glucose, die im PYHVG enthalten waren. Es zeigt aber auch das Zusammenspiel der Organismen, denn die Zellen nehmen unterschiedliche Nischen in einem komplexen Netzwerk ein.

Einige Bakterien stellen mit ihrer großen Bandbreite von hydrolytischen Enzymen Substrat für andere bereit. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die hydrolytische Aktivität von *B. thetaiotaomicron* ausreicht, um nicht nur sich selbst, sondern auch Zellen ohne die entsprechenden Enzyme zu ernähren (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2016). Gleichzeitig können auch die Abfallprodukte der einen Zelle, Substrat der anderen sein. Während einige Bakterien eher Succinat freisetzen, nutzen andere die Säure, um daraus Propionat oder Butyrat zu produzieren (Louis und Flint, 2017). Eine Co-Kultur von einem *Bacteroidia*-Stamm, der besonders gut Polymere hydrolysiert und von einem guten Propionatproduzenten ist daher eine Möglichkeit zur Steigerung der Propionatproduktion aus Polymeren. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass das Bakterium *Dialister hominis* das von *B. thetaiotaomicron* freigesetzte Succinat effektiv in Propionat umwandeln konnte (Sakamoto *et al.*, 2022). Und Co-Kulturen von entweder *B. xylanisolvens* oder *B. ovatus* mit *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* ermöglichten eine Lactatproduktion auf Xylan (Zeybek *et al.*, 2020). Dennoch ist es wichtig, zur Untersuchung der Propionatproduktion auch gute einzelne Produzenten zu identifizieren. Bei weiteren Anreicherungsversuchen sollten jedoch die gewonnenen Erkenntnisse aus der Untersuchung der beschriebenen *Bacteroidia* angewendet werden. Beispielsweise wird für die Kultivierung von *Bacteroides* eine CO₂-Atmosphäre von mindestens 5 vol% empfohlen (Bacic und Smith, 2008). Während das für die meisten Arten zutreffend ist, war *B. propionificiens* weitgehend unabhängig von der CO₂-Konzentration. Dieser Fakt könnte beispielsweise bei der Selektion der Isolate Anwendung finden, indem Anreicherungsmedien nur geringe CO₂-Konzentrationen enthalten. Auch die Unterscheidung zwischen S1 und S2 Organismen stellt ein Hindernis bei der Suche von effizienten Propionatproduzenten dar. Dabei kann die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Sicherheitskategorie nicht allein über die Zuordnung zu einer bestimmten Spezies zweifelsfrei festgelegt werden, denn Pathogenität ergibt sich aus vielen Faktoren wie Adhäsine, Toxine und Immunmodulatoren (Technischer Arbeitsschutz - TRBA 450, 2016), die nicht für alle Stämme einer Spezies vorliegen müssen. Auch sind die 16S-rRNA-Sequenzen der *Bacteroidia* teilweise so nah verwandt, dass eine Differenzierung alleine über die Sequenz schwer ist. Beispielsweise hat der S1-Organismus *B. koreensis* eine 98,8 %ige Übereinstimmung mit der 16S-rRNA Sequenz von *B. ovatus* (S2) (Shin *et al.*, 2017). Um weitere Propionatproduzenten zu identifizieren könnte die Genomanalyse als Hochdurchsatzmethode verwendet werden, um eine Vorauswahl geeigneter *Bacteroidia* zu treffen. Beispielsweise hatte die Untersuchung der Wasserstoffbildung gezeigt, dass gerade diejenigen Spezies gute Propionatproduzenten waren, die keine Hydrogenase codierten. Da eine Genomsequenzierung auch bei neuen Isolaten immer öfter durchgeführt wird, können so schnell und günstig Isolate ausgewählt werden, die dann unter optimalen Bedingungen getestet werden können.

5.6.2 Physiologische Untersuchungen des Isolats BGG-A1

Eine weitere Anreicherungs- und Isolierungsstrategie, die parallel von Sonja Kurrer verfolgt wurde, nutzte Cellobiose als Substrat. Mit ihr wurde ein Isolat gewonnen, dessen 16S-rRNA hohe Sequenzübereinstimmungen mit der Sequenz aus *Dysgonomonas gadei* zeigte. Der Genus *Dysgonomonas* gehört zur Gruppe der *Bacteroidia*. Obwohl das Bakterium aus einer infizierten Gallenblase isoliert wurde (Hofstad *et al.*, 2000), wird es in Deutschland der Sicherheitskategorie 1 zugeordnet (Technischer Arbeitsschutz - TRBA 466, 2015). In seiner ursprünglichen Beschreibung wurde dieses Bakterium jedoch nicht auf seine Produktbildung untersucht, wuchs aber auf Cellobiose und wies eine große Bandbreite hydrolytischer Enzyme auf (Hofstad *et al.*, 2000). Aus diesem Grund

wurden ähnliche Versuche wie mit den bereits veröffentlichten Stämmen auch mit dem Isolat durchgeführt. Dazu gehörte die Untersuchung von Wachstum und Produktbildung im Plattenlesegerät und das Aufstellen einer Stoffwechselbilanz von wachsenden Zellen. Beim Wachstum im Plattenlesegerät entsprach die Wachstumsrate von $0,28 \text{ h}^{-1}$ etwa der von *B. graminisolvens*. Die Propionatausbeute von $0,15 \text{ g}_P/\text{g}_G$ lag im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen im Mittelfeld. Interessant war, dass das Isolat in den geschlossenen Kulturen (Wachstumsversuch mit 50 ml Medium in 100 ml Serumflaschen, Versuch 4.8.4) deutlich mehr Propionat als Succinat produzierte, denn der P/S-Quotient betrug ca. 9, wohingegen er in Versuch 4.8.3 bei rund 1 lag. *D. gadei* zeigte also genau den gegenteiligen Effekt zu *B. propionificiens*, welches im Plattenlesegerät kein Succinat produzierte, dafür aber in geschlossenen Kulturen. Ein Stamm von *P. freudenreichii*, in dem die PEP-Carboxylase überproduziert wurde, zeigte ebenfalls, dass die Propionatproduktion durch hohe CO_2 Konzentrationen gefördert wurde, was darauf zurückgeführt wurde, dass der Metabolitfluss über OxAc und Succinat durch die verstärkte Carboxylierung von PEP gesteigert wurde (Ammar *et al.*, 2014). Anders als *Bacteroidia* besitzt *P. freudenreichii* jedoch keine Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, deren Aktivität durch CO_2 gehemmt werden könnte. Stattdessen nutzt das Bakterium die Methylmalonyl-CoA-Carboxytransferase, die die Carboxylgruppe direkt auf Pyruvat überträgt, um Oxalacetat zu bilden (Falentin *et al.*, 2010). Für *D. gadei* wurde auch beschrieben, dass es sowohl mit als auch ohne CO_2 wachsen kann (Hofstad *et al.*, 2000). Dies erklärt sich durch die Stoffwechselbilanz. Damit die Stoffwechselbilanz ausgeglichen war, müsste der Abbau der Glucose zu 60 % über den oxPPP erfolgen, ähnlich zu *B. graminisolvens*. Das macht den Organismus unabhängig von externem CO_2 . Somit vereint BGG-A1 die positiven Eigenschaften der beiden bisher untersuchten Stämme: Es zeigt ein relativ schnelles Wachstum, unabhängig von der Zugabe von Hefeextrakt und produzierte in Wachstumsversuchen in Serumflaschen relativ große Mengen Propionat. In einem weiteren Versuch wurde BGG-A1 in einem pH-kontrollierten Reaktor auf Buchenholz-Xylan kultiviert. Obwohl Lactat das Hauptprodukt war (64 mM), produzierte es auch 46,7 mM Propionat (unpublizierte Daten, Forschungspraktikum Julian Schwarzbauer). Das zeigt, dass die Produktion von Propionat auf komplexen Substraten möglich war.

5.7 *Bacteroidota* als Propionatproduzenten in der Industrie

Das Ziel dieser Arbeit war es, gute Propionatproduzenten unter den bereits bekannten Stämmen zu identifizieren und deren Stoffwechselweg genauer zu untersuchen. Außerdem sollten genetische Methoden genutzt werden, um die Propionatproduktion eines bekannten Organismus zu verbessern. Schließlich wurde in Umweltproben nach neuen Propionatproduzenten gesucht. Es wurde gezeigt, dass viele *Bacteroidia* die Fähigkeit besitzen Propionat zu produzieren und es wurde der erste breit angelegte Vergleich der Produktbildung (optimiert für Propionat) durchgeführt. Die zwei Spezies *B. graminisolvens* und *B. propionificiens* zeigten dabei die besten Produktionseigenschaften. Die genauere Untersuchung des Stoffwechsels warf jedoch besonders bei *B. graminisolvens* Fragen auf. Dadurch, dass es so viele reduzierte Produkte wie Propionat, Succinat und Formiat produzierte, muss die Zelle weitere Stoffwechselwege abgesehen von der Glykolyse nutzen, beispielsweise den oxPPP. Genaue Daten, zu welchem Anteil und unter welchen Bedingungen Glucose über den oxPPP verstoffwechselt werden, fehlen jedoch. Es sind daher genauere Untersuchungen in diesem Gebiet notwendig. Um mit den derzeitigen industriellen Produktionsmethoden mithalten zu können, sollte die

Fermentation einer Titer von ca. 100 g/l, eine Ausbeute von 0,6 g/g und eine Produktivität von 1-2 g/l*h erzielen (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017a). Die Versuche mit der pH-kontrollierten Fed-Batch-Methode erzielten jedoch maximal 118 mM (8,7 g/l) mit *B. propionificiens*. Das ist deutlich schlechter als Ergebnisse, die mit verschiedenen Propionibakterien erreicht wurden (Tabelle 5.1), denn in einem ähnlichen Setup produzierte *A. acidipropionici* 16,3 g/l Propionat. Durch Immobilisierung der Zellen und gentechnischer Steigerung der Trehaloseproduktion zur Verbesserung der Säuretoleranz wurden sogar bis zu 135 g/l mit Lactose als Substrat erreicht (Jiang *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu, kann die Propionat-Ausbeute der pH-kontrollierten Kultur von *B. propionificiens* (0,37 g_P/g_G) durchaus mit verschiedenen Fermentationen von *P. acidipropionici* bei ähnlichen Bedingungen mithalten (Tabelle 5.1). Zusätzlich wurde bereits viele Jahre an der biotechnologischen Propionatproduktion durch Propionibakterien geforscht und für *Bacteroidia* fehlt dieses umfangreiche Wissen über deren optimale Kultivierungsbedingungen. Darüber hinaus ist die Fähigkeit Polysaccharide als Substrat zu nutzen, einer der Hauptvorteile der *Bacteroidia* gegenüber den Propionibakterien. Zwar wurde in dieser Arbeit, zum vereinfachten Vergleich der verschiedenen *Bacteroidia*-Arten und zur Untersuchung des Stoffwechsels mit Glucose als Substrat gearbeitet, die Ergebnisse mit BGG-A1 zeigen jedoch, dass eine Propionatproduktion auf Xylan möglich ist. Wichtig ist jedoch, dass der Stoffwechsel der *Bacteroidia* entsprechend verstanden wird und Kultivierungsbedingungen angepasst werden. Auch die Freisetzung von Nebenprodukten bei der Fermentation von Glucose oder Polysacchariden stellt eine der größten Herausforderungen auf dem Weg zur biotechnologischen Propionatproduktion dar, denn es muss ein kostenaufwendiger Aufreinigungsprozess folgen (Rodriguez *et al.*, 2014). Um Nebenprodukte zu verringern, gibt es mehrere Strategien: Acetat kann über die Nutzung von reduziertem Substrat (zB. Glycerol) verringert werden oder es werden zusätzliche Elektronen über Umleitung des Stoffwechsels zum oxPPP freigesetzt. Nebenprodukte wie Lactat und Formiat können durch Deletion von funktionellen Genen zB. für die Lactat-DH (*ldh*) ohne große Auswirkung auf die Fitness der Zelle verringert werden (Gindt *et al.*, 2024). Die Bildung von Succinat kann durch Überproduktion der Gene für die Propionatbildung erreicht werden. Hierfür wurde eine Strategie der Überproduktion der Methylmalonyl-CoA-Mutase getestet, die jedoch keinen fördernden Effekt auf die Propionatproduktion hatte. Es ist daher wichtig zu klären, warum dies so war. Wurde einfach kein funktionierendes Enzym produziert, oder war möglicherweise ein anderer Stoffwechselweg limitierend? Zwar gibt es Hinweise, dass die CO₂-Verfügbarkeit einen Einfluss auf die Propionatbildung hat, es wurde aber noch nicht geklärt, warum einige Spezies mehr und einige weniger Propionat produzieren. Hier könnte eine Strategie sein, einen guten Propionatproduzenten wie *B. propionificiens* genauer zu untersuchen und die Erkenntnisse auf Spezies anzuwenden, die ein größeres Substratspektrum aufweisen und daher eher als Produktionsstämme geeignet sind beispielsweise *B. xylanisolvans* oder *B. graminisolvans*. Eine weitere Strategie ist die Co-Kultur bei der sich die unterschiedlichen Fähigkeiten der Organismen ergänzen. Die Prozessoptimierung ist ein weiterer wichtiger Schritt hin zur biotechnologischen Propionatproduktion, denn die ersten Versuche mit pH-Kontrolle erzielten vielversprechende Ergebnisse. Dabei können Erkenntnisse aus der Forschung mit Propionibakterien auf *Bacteroidia* angewendet werden. Letztlich muss also noch viel Forschung betrieben werden um einen solchen Prozess zu erreichen. Dann könnten *Bacteroidia* aber als Propionatproduzenten von Pflanzenabfällen in der Biotechnologie eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abdelsalam, N. A.; Hegazy, S. M.; Aziz, R. K. (2023): The curious case of *Prevotella copri*. In: *Gut Microbes* 15 (2), S. 2249152. DOI: 10.1080/19490976.2023.2249152.

Adamberg, S.; Tomson, K.; Vija, H.; Puurand, M.; Kabanova, N.; Visnapuu, T.; Jõgi, E.; Alamäe, T.; Adamberg, K. (2014): Degradation of fructans and production of propionic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron* are enhanced by the shortage of amino acids. In: *Frontiers in Nutrition* 1, S. 21. DOI: 10.3389/fnut.2014.00021.

AgileIntel Research (ChemIntel360) (2022): "Market volume of propionic acid worldwide from 2015 to 2022, with a forecast for 2023 to 2030 (in 1,000 metric tons)." Statista, Statista Inc., 5 Jul 2023, <https://www.statista.com/statistics/1245247/propionic-acid-market-volume-worldwide/>.

Albenberg, L.; Esipova, T. V.; Judge, C. P.; Bittinger, K.; Chen, J.; Laughlin, A.; Grunberg, S.; Baldassano, R. N.; Lewis, J. D.; Li, H.; Thom, S. R.; Bushman, F. D.; Vinogradov, S. A.; Wu, G. D. (2014): Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. In: *Gastroenterology* 147 (5), 1055–63.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.07.020.

Ammar, E. M.; Jin, Y.; Wang, Z.; Yang, S.-T. (2014): Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii*: effect of expressing phosphoenolpyruvate carboxylase on propionic acid production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (18), S. 7761–7772. DOI: 10.1007/s00253-014-5836-y.

Ammar, E. M.; Philippidis, G. P. (2021): Fermentative production of propionic acid: prospects and limitations of microorganisms and substrates. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (16–17), S. 6199–6213. DOI: 10.1007/s00253-021-11499-1.

Antone, U.; Ciprovica, I.; Zolovs, M.; Scerbaka, R.; Liepins, J. (2023): Propionic acid fermentation - Study of substrates, strains, and antimicrobial properties. In: *Fermentation* 9 (1), S. 26. DOI: 10.3390/fermentation9010026.

Argüelles, J. C. (2000): Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. In: *Archives of Microbiology* 174 (4), S. 217–224. DOI: 10.1007/s002030000192.

Arora, T.; Sharma, R.; Frost, G. (2011): Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? In: *Appetite* 56 (2), S. 511–515. DOI: 10.1016/j.appet.2011.01.016.

Axe, D. D.; Bailey, J. E. (1995): Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 47 (1), S. 8–19. DOI: 10.1002/bit.260470103.

Bacic, M. K.; Smith, C. J. (2008): Laboratory maintenance and cultivation of *Bacteroides* species. In: *Current Protocols in Microbiology* Chapter 13, Unit 13C.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc13c01s9.

Badía, J.; Ros, J.; Aguilar, J. (1985): Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. In: *Journal of Bacteriology* 161 (1), S. 435–437. DOI: 10.1128/jb.161.1.435-437.1985.

- Bailey, G. D.; Love, D. N. (1995):** Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Activities and Glucose Utilization by Species within the Genera *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas*. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 45 (2), S. 246–249. DOI: 10.1099/00207713-45-2-246.
- Bakir, M. A.; Kitahara, M.; Sakamoto, M.; Matsumoto, M.; Benno, Y. (2006):** *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 1), S. 151–154. DOI: 10.1099/ijs.0.63914-0.
- Balabanova, L.; Averianova, L.; Marchenok, M.; Son, O.; Tekutyeva, L. (2021):** Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: From ecosystems to industrial biotechnology. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9). DOI: 10.3390/ijms22094522.
- Basan, M.; Hui, S.; Okano, H.; Zhang, Z.; Shen, Y.; Williamson, J. R.; Hwa, T. (2015):** Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. In: *Nature* 528 (7580), S. 99–104. DOI: 10.1038/nature15765.
- Bastawde, K. B. (1992):** Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. In: *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 8 (4), S. 353–368. DOI: 10.1007/BF01198746.
- Baughn, A. D.; Malamy, M. H. (2003):** The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. In: *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 6), S. 1551–1558. DOI: 10.1099/mic.0.26247-0.
- Baughn, A. D.; Malamy, M. H. (2004):** The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. In: *Nature* 427 (6973), S. 441–444. DOI: 10.1038/nature02285.
- Baumann, I.; Westermann, P. (2016):** Microbial production of short chain fatty acids from lignocellulosic biomass: Current processes and market. In: *BioMed Research International* 2016, S. 8469357. DOI: 10.1155/2016/8469357.
- Baur, T.; Wentzel, A.; Dürre, P. (2022):** Production of propionate using metabolically engineered strains of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 106 (22), S. 7547–7562. DOI: 10.1007/s00253-022-12210-8.
- Belevich, N. P.; Bertsova, Y. V.; Verkhovskaya, M. L.; Baykov, A. A.; Bogachev, A. V. (2016):** Identification of the coupling step in Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase from real-time kinetics of electron transfer. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 (2), S. 141–149. DOI: 10.1016/j.bbabo.2015.12.001.
- Bender, D. A. (2012):** Amino acids synthesized from glutamate: glutamine, proline, ornithine, citrulline and arginine. In: David A. Bender (Hg.): *Amino Acid Metabolism*: Wiley, S. 157–223.
- Bernadet, J.-F. (2010):** Family i. *Flavobacteriaceae*. In: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward et al. (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, S. 106–314.
- Bjursell, M. K.; Martens, E. C.; Gordon, J. I. (2006):** Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the

suckling period. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (47), S. 36269–36279. DOI: 10.1074/jbc.M606509200.

Blaak, E. E.; Canfora, E. E.; Theis, S.; Frost, G.; Groen, A. K.; Mithieux, G.; Nauta, A.; Scott, K.; Stahl, B.; van Harsselaar, J.; van Tol, R.; Vaughan, E. E.; Verbeke, K. (2020): Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. In: *Beneficial Microbes* 11 (5), S. 411–455. DOI: 10.3920/BM2020.0057.

Blanc, P.; Goma, G. (1987): Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation. In: *Bioprocess Engineering* 2 (4), S. 175–179. DOI: 10.1007/BF00387325.

Boronat, A.; Aguilar, J. (1981): Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: differences in induction of propanediol oxidoreductase. In: *Journal of Bacteriology* 147 (1), S. 181–185. DOI: 10.1128/jb.147.1.181-185.1981.

Bruijns, B.; Hoekema, T.; Oomens, L.; Tiggelaar, R.; Gardeniers, H. (2022): Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. In: *Analytica* 3 (3), S. 371–384. DOI: 10.3390/analytica3030025.

Buckel, W. (2001): Sodium ion-translocating decarboxylases. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1505 (1), S. 15–27. DOI: 10.1016/S0005-2728(00)00273-5.

Cameron, D. C.; Cooney, C. L. (1986): A novel fermentation: The production of R(–)-1,2–propanediol and acetol by *Clostridium thermosaccharolyticum*. In: *Nature Biotechnology* 4 (7), S. 651–654. DOI: 10.1038/nbt0786-651.

Cardon, B. P.; Barker, H. A. (1946): two new amino-acid-fermenting bacteria, *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*. In: *Journal of Bacteriology* 52 (6), S. 629–634. DOI: 10.1128/jb.52.6.629-634.1946.

Caspari, D.; Macy, J. M. (1983): The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. In: *Archives of Microbiology* 135 (1), S. 16–24. DOI: 10.1007/BF00419476.

Catlett, J. L.; Catazaro, J.; Cashman, M.; Carr, S.; Powers, R.; Cohen, M. B.; Buan, N. R. (2020): metabolic feedback inhibition influences metabolite secretion by the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *mSystems* 5 (5). DOI: 10.1128/msystems.00252-20.

Cato, E. P.; Johnson, J. L. (1976): Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: Designation of neotype strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 26 (2), S. 230–237. DOI: 10.1099/00207713-26-2-230.

Chassard, C.; Delmas, E.; Lawson, P. A.; Bernalier-Donadille, A. (2008): *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (Pt 4), S. 1008–1013. DOI: 10.1099/ij.s.0.65504-0.

Chen, M.; Wolin, M. J. (1981): Influence of heme and vitamin B₁₂ on growth and fermentations of *Bacteroides* species. In: *Journal of Bacteriology* 145 (1), S. 466–471.

- Cheng, H. N.; Dowd, M. K.; Shogren, R. L.; Biswas, A. (2011):** Conversion of cotton byproducts to mixed cellulose esters. In: *Carbohydrate Polymers* 86 (3), S. 1130–1136. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.06.002.
- Cheng, J.; Hu, J.; Geng, F.; Nie, S. (2022):** *Bacteroides* utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health. In: *Food Science and Human Wellness* 11 (5), S. 1101–1110. DOI: 10.1016/j.fshw.2022.04.002.
- Cherubini, F.; Jungmeier, G.; Wellisch, M.; Willke, T.; Skiadas, I.; van Ree, R.; Jong, E. de (2009):** Toward a common classification approach for biorefinery systems. In: *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 3 (5), S. 534–546. DOI: 10.1002/bbb.172.
- Chung, L.; Thiele Orberg, E.; Geis, A. L.; Chan, J. L.; Fu, K.; DeStefano Shields, C. E.; Dejea, C. M.; Fathi, P.; Chen, J.; Finard, B. B.; Tam, A. J.; McAllister, F.; Fan, H.; Wu, X.; Ganguly, S.; Lebid, A.; Metz, P.; van Meerbeke, S. W.; Huso, D. L.; Wick, E. C.; Pardoll, D. M.; Wan, F.; Wu, S.; Sears, C. L.; Housseau, F. (2018):** *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells. In: *Cell Host & Microbe* 23 (2), 203–214.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2018.01.007.
- Cifuentes, J. O.; Comino, N.; Trastoy, B.; D'Angelo, C.; Guerin, M. E. (2019):** Structural basis of glycogen metabolism in bacteria. In: *The Biochemical Journal* 476 (14), S. 2059–2092. DOI: 10.1042/BCJ20170558.
- Clausen, U.; Vital, S.-T.; Lambertus, P.; Gehler, M.; Scheve, S.; Wöhlbrand, L.; Rabus, R. (2024):** Catabolic network of the fermentative gut bacterium *Phocaeicola vulgatus* (phylum *Bacteroidetes*) from a physiologic-proteomic perspective. In: *Microbial Physiology*. DOI: 10.1159/000536327.
- Dalland, E.; Hofstad, T. (1974):** Growth of *Bacteroides fragilis* in continuous culture and in batch cultures at controlled pH. In: *Applied Microbiology* 28 (5), S. 856–860. DOI: 10.1128/am.28.5.856-860.1974.
- Davis, M. W.; Jorgensen, E. M. (2022):** ApE, A Plasmid Editor: A freely available DNA manipulation and visualization program. In: *Frontiers in Bioinformatics* 2, S. 818619. DOI: 10.3389/fbinf.2022.818619.
- Debonne, E.; Giannotti, G.; Verbeke, C.; Eeckhout, M.; Devlieghere, F. (2023):** Growth/no-growth models of propionic and sorbic acid for bread and cake moulds. In: *Food Control* 152, S. 109872. DOI: 10.1016/j.foodcont.2023.109872.
- Del Don, C.; Hanselmann, K. W.; Peduzzi, R.; Bachofen, R. (1994):** Biomass composition and methods for the determination of metabolic reserve polymers in phototrophic sulfur bacteria. In: *Aquatic Sciences* 56 (1), S. 1–15. DOI: 10.1007/BF00877431.
- Despres, J.; Forano, E.; Lepereq, P.; Comtet-Marre, S.; Jubelin, G.; Chambon, C.; Yeoman, C. J.; Berg Miller, M. E.; Fields, C. J.; Martens, E.; Terrapon, N.; Henrissat, B.; White, B. A.; Mosoni, P. (2016):** Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1A(T) involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. In: *BMC Genomics* 17, S. 326. DOI: 10.1186/s12864-016-2680-8.

- Dharmadi, Y.; Murarka, A.; Gonzalez, R. (2006):** Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. In: *Biotechnology and Bioengineering* 94 (5), S. 821–829. DOI: 10.1002/bit.21025.
- Dimroth, P. (1997):** Primary sodium ion translocating enzymes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1318 (1-2), S. 11–51. DOI: 10.1016/S0005-2728(96)00127-2.
- Ding, W.; Meng, Q.; Dong, G.; Qi, N.; Zhao, H.; Shi, S. (2022):** Metabolic engineering of threonine catabolism enables *Saccharomyces cerevisiae* to produce propionate under aerobic conditions. In: *Biotechnology Journal* 17 (3), e2100579. DOI: 10.1002/biot.202100579.
- Döring, C.; Basen, M. (2024):** Propionate production by *Bacteroidia* gut bacteria and its dependence on substrate concentrations differs among species. In: *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 17 (1), S. 95. DOI: 10.1186/s13068-024-02539-9.
- Duerden, B. I. (1980):** The isolation and identification of *Bacteroides* spp. from the normal human faecal flora. In: *Journal of Medical Microbiology* 13 (1), S. 69–78. DOI: 10.1099/00222615-13-1-69.
- Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S. R.; Nelson, K. E.; Rman, D. A. (2005):** Diversity of the human intestinal microbial flora. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5728), S. 1635–1638. DOI: 10.1126/science.1110591.
- EFSA ANS Panel, (P. o. F. A. a. N. S. A. t. F. (2014):** Scientific Opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives. In: *EFSA Journal* 12 (7), S. 3779. DOI: 10.2903/j.efsa.2014.3779.
- Eggerth, A. H.; Gagnon, B. H. (1933):** The *Bacteroides* of human feces. In: *Journal of Bacteriology* (25), S. 389–413.
- El Nemr, A.; Eleryan, A.; Mashaly, M.; Khaled, A. (2021):** Comparative study of synthesis of cellulose propionate from different sources using NIS as a new catalyst. In: *Polymer Bulletin* 78 (8), S. 4369–4386. DOI: 10.1007/s00289-020-03313-1.
- Esteban-Torres, M.; Ruiz, L.; Rossini, V.; Nally, K.; van Sinderen, D. (2023):** Intracellular glycogen accumulation by human gut commensals as a niche adaptation trait. In: *Gut Microbes* 15 (1), S. 2235067. DOI: 10.1080/19490976.2023.2235067.
- Falentin, H.; Deutsch, S.-M.; Jan, G.; Loux, V.; Thierry, A.; Parayre, S.; Maillard, M.-B.; Dherbécourt, J.; Cousin, F. J.; Jardin, J.; Siguier, P.; Couloux, A.; Barbe, V.; Vacherie, B.; Wincker, P.; Gibrat, J.-F.; Gaillardin, C.; Lortal, S. (2010):** The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. In: *PloS One* 5 (7), e11748. DOI: 10.1371/journal.pone.0011748.
- Falony, G.; Joossens, M.; Vieira-Silva, S.; Wang, J.; Darzi, Y.; Faust, K.; Kurilshikov, A.; Bonder, M. J.; Valles-Colomer, M.; Vandeputte, D.; Tito, R. Y.; Chaffron, S.; Rymenans, L.; Verspecht, C.; Sutter, L. de; Lima-Mendez, G.; D'hoel, K.; Jonckheere, K.; Homola, D.; Garcia, R.; Tigchelaar, E. F.; Eeckhaudt, L.; Fu, J.; Henckaerts, L.; Zhernakova, A.; Wijmenga, C.; Raes, J. (2016):** Population-level analysis of gut microbiome variation. In: *Science (New York, N.Y.)* 352 (6285), S. 560–564. DOI: 10.1126/science.aad3503.

- Fang, H.; Kang, J.; Zhang, D. (2017):** Microbial production of vitamin B₁₂: a review and future perspectives. In: *Microbial Cell Factories* 16 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y.
- Fenn, K.; Strandwitz, P.; Stewart, E. J.; Dimise, E.; Rubin, S.; Gurubacharya, S.; Clardy, J.; Lewis, K. (2017):** Quinones are growth factors for the human gut microbiota. In: *Microbiome* 5 (1), S. 161. DOI: 10.1186/s40168-017-0380-5.
- Ferla, M. P.; Patrick, W. M. (2014):** Bacterial methionine biosynthesis. In: *Microbiology (Reading, England)* 160 (Pt 8), S. 1571–1584. DOI: 10.1099/mic.0.077826-0.
- Fernandez-Julia, P. J.; Munoz-Munoz, J.; van Sinderen, D. (2021):** A comprehensive review on the impact of β -glucan metabolism by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* species as members of the gut microbiota. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 181, S. 877–889. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.069.
- Frank, R. A. W.; Price, A. J.; Northrop, F. D.; Perham, R. N.; Luisi, B. F. (2007):** Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. In: *Journal of Molecular Biology* 368 (3), S. 639–651. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.01.080.
- Franke, T. (2020):** Aufklärung des zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Darmbakteriums *Prevotella copri*. Dissertation. Friedrich-Willhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Franke, T.; Deppenmeier, U. (2018):** Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. In: *Molecular Microbiology* 109 (4), S. 528–540. DOI: 10.1111/mmi.14058.
- Fröhlich-Wyder, M. T.; Bachmann, H. P. (2004):** Cheeses with propionic acid fermentation. In: Major Cheese Groups, Bd. 2: Elsevier (Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology), 141–XV.
- Fu, T.; Wang, Y.; Ma, M.; Dai, W.; Pan, L.; Shang, Q.; Yu, G. (2023):** Isolation of alginate-degrading bacteria from the human gut microbiota and discovery of *Bacteroides xylanisolvens* AY11-1 as a novel anti-colitis probiotic bacterium. In: *Nutrients* 15 (6). DOI: 10.3390/nu15061352.
- Fuller, M. D.; Caldwell, D. R. (1982):** Tetrapyrrole utilization of *Bacteroides fragilis*. In: *Canadian Journal of Microbiology* 28 (12), S. 1304–1310. DOI: 10.1139/m82-195.
- Gao, F.; Li, Q.; Wei, W.; Wang, Y.; Song, W.; Yang, X.; Ji, H.; Zhou, J.; Xin, Y.; Tan, Z.; Pei, J.; Shi, H. (2024):** Preparation of yeast extract from brewer's yeast waste and its potential application as a medium constituent. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 196 (10), S. 6608–6623. DOI: 10.1007/s12010-024-04885-8.
- García-Alegría, A. M.; Anduro-Corona, I.; Pérez-Martínez, C. J.; Guadalupe Corella-Madueño, M. A.; Rascón-Durán, M. L.; Astiazaran-Garcia, H. (2020):** Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and Sprague Dawley rat and human DNA. In: *International Journal of Analytical Chemistry* 2020, S. 8896738. DOI: 10.1155/2020/8896738.
- García-Bayona, L.; Comstock, L. E. (2019):** Streamlined genetic manipulation of diverse *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolates from the Human gut microbiota. In: *mBio* 10 (4). DOI: 10.1128/mBio.01762-19.

- García-López, M.; Meier-Kolthoff, J. P.; Tindall, B. J.; Gronow, S.; Woyke, T.; Kyrpides, N. C.; Hahnke, R. L.; Göker, M. (2019):** Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of *Bacteroidetes*. In: *Frontiers in Microbiology* 10, S. 2083. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02083.
- Garschagen, L. S.; Franke, T.; Deppenmeier, U. (2021):** An alternative pentose phosphate pathway in human gut bacteria for the degradation of C5 sugars in dietary fibers. In: *The FEBS Journal* 288 (6), S. 1839–1858. DOI: 10.1111/febs.15511.
- Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. (2009):** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. In: *Nature Methods* 6 (5), S. 343–345. DOI: 10.1038/nmeth.1318.
- Gindt, M. E.; Lück, R.; Deppenmeier, U. (2024):** Genetic optimization of the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus* for enhanced succinate production. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 108 (1), S. 465. DOI: 10.1007/s00253-024-13303-2.
- Gonzalez-Garcia, R.; McCubbin, T.; Navone, L.; Stowers, C.; Nielsen, L.; Marcellin, E. (2017a):** Microbial propionic acid production. In: *Fermentation* 3 (2), S. 21. DOI: 10.3390/fermentation3020021.
- Gonzalez-Garcia, R. A.; McCubbin, T.; Turner, M. S.; Nielsen, L. K.; Marcellin, E. (2020):** Engineering *Escherichia coli* for propionic acid production through the Wood-Werkman cycle. In: *Biotechnology and Bioengineering* 117 (1), S. 167–183. DOI: 10.1002/bit.27182.
- Gonzalez-Garcia, R. A.; McCubbin, T.; Wille, A.; Plan, M.; Nielsen, L. K.; Marcellin, E. (2017b):** Awakening sleeping beauty: production of propionic acid in *Escherichia coli* through the *sbm* operon requires the activity of a methylmalonyl-CoA epimerase. In: *Microbial Cell Factories* 16 (1), S. 121. DOI: 10.1186/s12934-017-0735-4.
- Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. (1990):** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4645–4649. DOI: 10.1073/pnas.87.12.4645.
- Grondin, J. M.; Tamura, K.; Déjean, G.; Abbott, D. W.; Brumer, H. (2017):** Polysaccharide utilization loci: Fueling microbial communities. In: *Journal of Bacteriology* 199 (15). DOI: 10.1128/jb.00860-16.
- Groon, L.-A.; Bruns, S.; Dlugosch, L.; Wilkes, H.; Wienhausen, G. (2025):** Effects of vitamin B₁₂ supply on cellular processes of the facultative vitamin B₁₂ consumer *Vibrio campbellii*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, e0142224. DOI: 10.1128/aem.01422-24.
- Gu, Z.; Glatz, B. A.; Glatz, C. E. (1998):** Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. In: *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1), S. 13–18. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00094-X.
- Guan, N.; L. Liu; Zhuge, X.; Q. Xu; J. Chen (2012):** Genome-shuffling improves acid tolerance of *Propionibacterium acidipropionici* and propionic acid production. In: *Advances in Chemistry Research* (15).

Guan, N.; Liu, L. (2020): Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (1), S. 51–65. DOI: 10.1007/s00253-019-10226-1.

Gunka, K.; Commichau, F. M. (2012): Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. In: *Molecular Microbiology* 85 (2), S. 213–224. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08105.x.

Hahnke, R. L.; Meier-Kolthoff, J. P.; García-López, M.; Mukherjee, S.; Huntemann, M.; Ivanova, N. N.; Woyke, T.; Kyrpides, N. C.; Klenk, H.-P.; Göker, M. (2016a): Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes*. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 2003. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02003.

Hahnke, S.; Langer, T.; Koeck, D. E.; Klocke, M. (2016b): Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (3), S. 1466–1475. DOI: 10.1099/ijsem.0.000902.

Haller, T.; Buckel, T.; Rétey, J.; Gerlt, J. A. (2000): Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*. In: *Biochemistry* 39 (16), S. 4622–4629. DOI: 10.1021/bi992888d.

Hardham, J. M.; King, K. W.; Dreier, K.; Wong, J.; Strietzel, C.; Eversole, R. R.; Sfintescu, C.; Evans, R. T. (2008): Transfer of *Bacteroides splanchnicus* to *Odoribacter* gen. nov. as *Odoribacter splanchnicus* comb. nov., and description of *Odoribacter denticanis* sp. nov., isolated from the crevicular spaces of canine periodontitis patients. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (Pt 1), S. 103–109. DOI: 10.1099/ijms.0.63458-0.

Hatamoto, M.; Kaneshige, M.; Nakamura, A.; Yamaguchi, T. (2014): *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 5), S. 1770–1774. DOI: 10.1099/ijms.0.056630-0.

Hayashi, H.; Shibata, K.; Sakamoto, M.; Tomita, S.; Benno, Y. (2007): *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 5), S. 941–946. DOI: 10.1099/ijms.0.64778-0.

Heikal, A.; Nakatani, Y.; Dunn, E.; Weimar, M. R.; Day, C. L.; Baker, E. N.; Lott, J. S.; Sazanov, L. A.; Cook, G. M. (2014): Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: a monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. In: *Molecular Microbiology* 91 (5), S. 950–964. DOI: 10.1111/mmi.12507.

Hetzel, M.; Brock, M.; Selmer, T.; Pierik, A. J.; Golding, B. T.; Buckel, W. (2003): Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. In: *European Journal of Biochemistry* 270 (5), S. 902–910. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03450.x.

Hilpert, W.; Dimroth, P. (1982): Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a Na⁺ gradient. In: *Nature* 296 (5857), S. 584–585. DOI: 10.1038/296584a0.

- Hilpert, W.; Dimroth, P. (1991):** On the mechanism of sodium ion translocation by methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella alcalescens*. In: *European Journal of Biochemistry* 195 (1), S. 79–86. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15678.x.
- Hilpert, W.; Schink, B.; Dimroth, P. (1984):** Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with Na as coupling ion. In: *The EMBO Journal* 3 (8), S. 1665–1670. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb02030.x.
- Hino, T.; Kuroda, S. (1993):** Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. In: *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1), S. 255–259. DOI: 10.1128/aem.59.1.255-259.1993.
- Hitch, T. C. A.; Bisdorf, K.; Afrizal, A.; Riedel, T.; Overmann, J.; Strowig, T.; Clavel, T. (2022):** A taxonomic note on the genus *Prevotella*: Description of four novel genera and emended description of the genera *Hallella* and *Xylanibacter*. In: *Systematic and Applied Microbiology* 45 (6), S. 126354. DOI: 10.1016/j.syapm.2022.126354.
- Hofstad, T.; Olsen, I.; Eribe, E. R.; Falsen, E.; Collins, M. D.; Lawson, P. A. (2000):** *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 Pt 6, S. 2189–2195. DOI: 10.1099/00207713-50-6-2189.
- Horvath, T. D.; Ihekweazu, F. D.; Haidacher, S. J.; Ruan, W.; Engevik, K. A.; Fultz, R.; Hoch, K. M.; Luna, R. A.; Oezguen, N.; Spinler, J. K.; Haag, A. M.; Versalovic, J.; Engevik, M. A. (2022):** *Bacteroides ovatus* colonization influences the abundance of intestinal short chain fatty acids and neurotransmitters. In: *iScience* 25 (5), S. 104158. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104158.
- Huang, K.; Wang, B.; Cao, Y.; Li, H.; Wang, J.; Lin, W.; Mu, C.; Liao, D. (2011):** Homogeneous preparation of cellulose acetate propionate (CAP) and cellulose acetate butyrate (CAB) from sugarcane bagasse cellulose in ionic liquid. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (10), S. 5376–5381. DOI: 10.1021/jf104881f.
- Huder, J. B.; Dimroth, P. (1995):** Expression of the sodium ion pump methylmalonyl-coenzyme A-decarboxylase from *Veillonella parvula* and of mutated enzyme specimens in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 177 (13), S. 3623–3630. DOI: 10.1128/jb.177.13.3623-3630.1995.
- Hylemon, P. B.; Young, J. L.; Roadcap, R. F.; Phibbs, P. V. (1977):** Uptake and incorporation of glucose and mannose by whole cells of *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 34 (5), S. 488–494. DOI: 10.1128/aem.34.5.488-494.1977.
- Ito, T.; Gallegos, R.; Matano, L. M.; Butler, N. L.; Hantman, N.; Kaili, M.; Coyne, M. J.; Comstock, L. E.; Malamy, M. H.; Barquera, B. (2020):** Genetic and biochemical analysis of anaerobic respiration in *Bacteroides fragilis* and its importance *in vivo*. In: *mBio* 11 (1). DOI: 10.1128/mBio.03238-19.
- Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D. (2015):** Role of the normal gut microbiota. In: *World Journal of Gastroenterology* 21 (29), S. 8787–8803. DOI: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.

- Jiang, L.; Cui, H.; Zhu, L.; Hu, Y.; Xu, X.; Li, S.; Huang, H. (2015):** Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. In: *Green Chemistry* 17 (1), S. 250–259. DOI: 10.1039/c4gc01256a.
- Jones, K. R.; Belvin, B. R.; Macrina, F. L.; Lewis, J. P. (2020):** Sequence and characterization of shuttle vectors for molecular cloning in *Porphyromonas*, *Bacteroides* and related bacteria. In: *Molecular Oral Microbiology* 35 (4), S. 181–191. DOI: 10.1111/omi.12304.
- Joyce, M. A.; Hayakawa, K.; Wolodko, W. T.; Fraser, M. E. (2012):** Biochemical and structural characterization of the GTP-preferring succinyl-CoA synthetase from *Thermus aquaticus*. In: *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 68 (Pt 7), S. 751–762. DOI: 10.1107/S0907444912010852.
- Jung, H. (2001):** Towards the molecular mechanism of Na⁺/solute symport in prokaryotes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1505 (1), S. 131–143. DOI: 10.1016/S0005-2728(00)00283-8.
- Kagliwal, L. D.; Survase, S. A.; Singhal, R. S.; Granström, T. (2013):** Wheat flour based propionic acid fermentation: an economic approach. In: *Bioresource Technology* 129, S. 694–699. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.154.
- Keitel, L.; Braun, K.; Finger, M.; Kosfeld, U.; Yordanov, S.; Büchs, J. (2023):** Carbon dioxide and trace oxygen concentrations impact growth and product formation of the gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. In: *BMC Microbiology* 23 (1), S. 391. DOI: 10.1186/s12866-023-03127-x.
- Keitel, L.; Miebach, K.; Rummel, L.; Yordanov, S.; Büchs, J. (2024):** Process analysis of the anaerobe *Phocaeicola vulgatus* in a shake flasks and fermenter reveals pH and product inhibition. In: *Annals of Microbiology* 74 (1). DOI: 10.1186/s13213-023-01745-4.
- Kita, A.; Miura, T.; Okamura, Y.; Aki, T.; Matsumura, Y.; Tajima, T.; Kato, J.; Nakashimada, Y. (2015):** *Dysgonomonas alginatilytica* sp. nov., an alginate-degrading bacterium isolated from a microbial consortium. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (10), S. 3570–3575. DOI: 10.1099/ijsem.0.000459.
- Knappe, J.; Sawers, G. (1990):** A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Reviews* 6 (4), S. 383–398. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04108.x.
- Koendjibiharie, J. G.; Hon, S.; Pabst, M.; Hoofman, R.; Stevenson, D. M.; Cui, J.; Amador-Noguez, D.; Lynd, L. R.; Olson, D. G.; van Kranenburg, R. (2020):** The pentose phosphate pathway of cellulolytic clostridia relies on 6-phosphofructokinase instead of transaldolase. In: *Journal of Biological Chemistry* 295 (7), S. 1867–1878. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011239.
- Kotarski, S. F.; Salyers, A. A. (1981):** Effect of long generation times on growth of *Bacteroides thetaiotaomicron* in carbohydrate-induced continuous culture. In: *Journal of Bacteriology* 146 (3), S. 853–860.
- Krieg, N. R. (2010):** Class I. *Bacteroidia* class. nov. In: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward et al. (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, S. 25.

- Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Euzéby, J.; Whitman, W. B. (2010):** Phylum XIV. *Bacteroidetes* phyl. nov. In: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward et al. (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, S. 25.
- Lanham, A. B.; Ricardo, A. R.; Coma, M.; Fradinho, J.; Carnevalheira, M.; Oehmen, A.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2012):** Optimisation of glycogen quantification in mixed microbial cultures. In: *Bioresource Technology* 118, S. 518–525. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.087.
- Lawson, P. A.; Falsen, E.; Inganäs, E.; Weyant, R. S.; Collins, M. D. (2002):** *Dysgonomonas mossii* sp. nov., from human sources. In: *Systematic and Applied Microbiology* 25 (2), S. 194–197. DOI: 10.1078/0723-2020-00107.
- Le Roy, T.; van der Smissen, P.; Paquot, A.; Delzenne, N.; Muccioli, G. G.; Collet, J.-F.; Cani, P. D. (2019):** *Butyricimonas faecalis* sp. nov., isolated from human faeces and emended description of the genus *Butyricimonas*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (3), S. 833–838. DOI: 10.1099/ijsem.0.003249.
- Li, J.; Zhu, X.; Chen, J.; Zhao, D.; Zhang, X.; Bi, C. (2017):** Construction of a novel anaerobic pathway in *Escherichia coli* for propionate production. In: *BMC Biotechnology* 17 (1), S. 38. DOI: 10.1186/s12896-017-0354-5.
- Li, X.; Wang, K. Y.; Helmer, B.; Chung, T.-S. (2012):** Thin-film composite membranes and formation mechanism of thin-film layers on hydrophilic cellulose acetate propionate substrates for forward osmosis processes. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (30), S. 10039–10050. DOI: 10.1021/ie2027052.
- Li, Z.; Nimtz, M.; Rinas, U. (2014):** The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. In: *Microbial Cell Factories* 13 (1), S. 45. DOI: 10.1186/1475-2859-13-45.
- Lindner, J. G.; Marcelis, J. H.; Vos, N. M. de; Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1979):** Intracellular polysaccharide of *Bacteroides fragilis*. In: *Journal of General Microbiology* 111 (1), S. 93–99. DOI: 10.1099/00221287-111-1-93.
- Liu, Z.; Ge, Y.; Xu, J.; Gao, C.; Ma, C.; Xu, P. (2016):** Efficient production of propionic acid through high density culture with recycling cells of *Propionibacterium acidipropionici*. In: *Bioresource Technology* 216, S. 856–861. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.023.
- Liu, Z.; Ma, C.; Gao, C.; Xu, P. (2012):** Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. In: *Bioresource Technology* 114, S. 711–714. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.118.
- Lou, J.; Dawson, K. A.; Strobel, H. J. (1997):** Glycogen formation by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (4), S. 1483–1488. DOI: 10.1128/aem.63.4.1483-1488.1997.
- Louis, P.; Flint, H. J. (2017):** Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. In: *Environmental Microbiology* 19 (1), S. 29–41. DOI: 10.1111/1462-2920.13589.

- Lück, R.; Deppenmeier, U. (2022):** Genetic tools for the redirection of the central carbon flow towards the production of lactate in the human gut bacterium *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 106 (3), S. 1211–1225. DOI: 10.1007/s00253-022-11777-6.
- Ludwig, W.; Euzéby, J.; Whitman, W. B. (2010):** Road map of the phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward et al. (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, S. 1–21.
- Lundberg, D. S.; Yourstone, S.; Mieczkowski, P.; Jones, C. D.; Dangl, J. L. (2013):** Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. In: *Nature Methods* 10 (10), S. 999–1002. DOI: 10.1038/nmeth.2634.
- Macfarlane, G. T.; Hay, S.; Macfarlane, S.; Gibson, G. R. (1990):** Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glycosidase production by *Bacteroides ovatus*, in batch and continuous culture. In: *The Journal of Applied Bacteriology* 68 (2), S. 179–187. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02564.x.
- Macfarlane, S.; Macfarlane, G. T. (2003):** Regulation of short-chain fatty acid production. In: *The Proceedings of the Nutrition Society* 62 (1), S. 67–72. DOI: 10.1079/PNS2002207.
- Macy, J.; Probst, I.; Gottschalk, G. (1975):** Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin. In: *Journal of Bacteriology* 123 (2), S. 436–442. DOI: 10.1128/jb.123.2.436-442.1975.
- Macy, J. M.; Ljungdahl, L. G.; Gottschalk, G. (1978):** Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. In: *Journal of Bacteriology* 134 (1), S. 84–91. DOI: 10.1128/JB.134.1.84-91.1978.
- Magnúsdóttir, S.; Ravcheev, D.; Crécy-Lagard, V. de; Thiele, I. (2015):** Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. In: *Frontiers in genetics* 6, S. 148. DOI: 10.3389/fgene.2015.00148.
- Mancia, F.; Smith, G. A.; Evans, P. R. (1999):** Crystal structure of substrate complexes of methylmalonyl-CoA mutase. In: *Biochemistry* 38 (25), S. 7999–8005. DOI: 10.1021/bi9903852.
- Mann, E. R.; Lam, Y. K.; Uhlig, H. H. (2024):** Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 24 (8), S. 577–595. DOI: 10.1038/s41577-024-01014-8.
- Martens, J. H.; Barg, H.; Warren, M. J.; Jahn, D. (2002):** Microbial production of vitamin B₁₂. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (3), S. 275–285. DOI: 10.1007/s00253-001-0902-7.
- McKee, L. S.; La Rosa, S. L.; Westereng, B.; Eijsink, V. G.; Pope, P. B.; Larsbrink, J. (2021):** Polysaccharide degradation by the *Bacteroidetes*: mechanisms and nomenclature. In: *Environmental Microbiology Reports* 13 (5), S. 559–581. DOI: 10.1111/1758-2229.12980.
- Mills, S.; Stanton, C.; Lane, J. A.; Smith, G. J.; Ross, R. P. (2019):** Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science. In: *Nutrients* 11 (4). DOI: 10.3390/nu11040923.

- Mimee, M.; Tucker, A. C.; Voigt, C. A.; Lu, T. K. (2015):** Programming a human commensal bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to sense and respond to stimuli in the murine gut microbiota. In: *Cell Systems* 1 (1), S. 62–71. DOI: 10.1016/j.cels.2015.06.001.
- Miscevic, D.; Mao, J.-Y.; Moo-Young, M.; Chou, C.-H. P. (2020):** High-level heterologous production of propionate in engineered *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 117 (5), S. 1304–1315. DOI: 10.1002/bit.27276#bit27276-bib-0020.
- Mohnen, D. (2008):** Pectin structure and biosynthesis. In: *Current Opinion in Plant Biology* 11 (3), S. 266–277. DOI: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Morrison, D. J.; Preston, T. (2016):** Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. In: *Gut Microbes* 7 (3), S. 189–200. DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Nakagawa, Y. (2010):** class IV. *Cytophagia* class. nov. In: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward et al. (Hg.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, S. 370.
- Neff, A.; Lück, R.; Hövels, M.; Deppenmeier, U. (2023):** Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. In: *Anaerobe* 81, S. 102742. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2023.102742.
- Newman, K.; Caldwell, D. R. (1987):** d-Pentose metabolism by *Bacteroides vulgatus* strain 8482. In: *Current Microbiology* 15 (1), S. 51–56. DOI: 10.1007/BF01577214.
- Nishiyama, T.; Ueki, A.; Kaku, N.; Watanabe, K.; Ueki, K. (2009):** *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (8), S. 1901–1907. DOI: 10.1099/ijms.0.008268-0.
- Oren, A.; Garrity, G. M. (2021):** Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71 (10), S. 5056. DOI: 10.1099/ijsem.0.005056.
- Papoutsakis, E. T.; Meyer, C. L. (1985):** Fermentation equations for propionic-acid bacteria and production of assorted oxychemicals from various sugars. In: *Biotechnology and Bioengineering* 27 (1), S. 67–80. DOI: 10.1002/bit.260270109.
- Parizzi, L. P.; Grassi, M. C. B.; Llerena, L. A.; Carazzolle, M. F.; Queiroz, V. L.; Lunardi, I.; Zeidler, A. F.; Teixeira, P. J. P. L.; Mieczkowski, P.; Rincones, J.; Pereira, G. A. G. (2012):** The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. In: *BMC Genomics* 13, S. 562. DOI: 10.1186/1471-2164-13-562.
- Parker, A. C.; Bergonia, H. A.; Seals, N. L.; Baccanale, C. L.; Rocha, E. R. (2020):** The *uroS* and *yifB* genes conserved among tetrapyrrole synthesizing-deficient *Bacteroidales* are involved in *Bacteroides fragilis* heme assimilation and survival in experimental intra-abdominal infection and intestinal colonization. In: *Infection and immunity* 88 (8). DOI: 10.1128/iai.00103-20.
- Paunkov, A.; Gutenbrunner, K.; Sóki, J.; Leitsch, D. (2022):** Haemin deprivation renders *Bacteroides fragilis* hypersusceptible to metronidazole and cancels high-level metronidazole

resistance. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77 (4), S. 1027–1031. DOI: 10.1093/jac/dkab485.

Peters, J. W.; Lanzilotta, W. N.; Lemon, B. J.; Seefeldt, L. C. (1998): X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395), S. 1853–1858. DOI: 10.1126/science.282.5395.1853.

Pines, D.; Ditkovich, J.; Mukra, T.; Miller, Y.; Kiefer, P. M.; Daschakraborty, S.; Hynes, J. T.; Pines, E. (2016): How acidic is carbonic acid? In: *The Journal of Physical Chemistry. B* 120 (9), S. 2440–2451. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b12428.

Piowarek, K.; Lipińska, E.; Hać-Szymańczuk, E.; Kieliszek, M.; Ścibisz, I. (2018): *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B₁₂, and other metabolites important for the industry. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (2), S. 515–538. DOI: 10.1007/s00253-017-8616-7.

Polk, B. F.; Kasper, D. L. (1977): *Bacteroides fragilis* subspecies in clinical isolates. In: *Annals of Internal Medicine* 86 (5), S. 569–571. DOI: 10.7326/0003-4819-86-5-569.

Porter, N. T.; Larsbrink, J. (2022): Investigation and alteration of organic acid synthesis pathways in the mammalian gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *Microbiology Spectrum* 10 (1), e0231221. DOI: 10.1128/spectrum.02312-21.

Pour, F. H.; Makkawi, Y. T. (2021): A review of post-consumption food waste management and its potentials for biofuel production. In: *Energy Reports* 7, S. 7759–7784. DOI: 10.1016/j.egy.2021.10.119.

Pudlo, N. A.; Urs, K.; Crawford, R.; Pirani, A.; Atherly, T.; Jimenez, R.; Terrapon, N.; Henrissat, B.; Peterson, D.; Ziemer, C.; Snitkin, E.; Martens, E. C. (2022): Phenotypic and genomic diversification in complex carbohydrate-degrading human gut bacteria. In: *mSystems* 7 (1), e0094721. DOI: 10.1128/msystems.00947-21.

Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K. S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Li, J.; Xu, J.; Li, S.; Li, D.; Cao, J.; Wang, B.; Liang, H.; Zheng, H.; Xie, Y.; Tap, J.; Lepage, P.; Bertalan, M.; Batto, J.-M.; Hansen, T.; Le Paslier, D.; Linneberg, A.; Nielsen, H. B.; Pelletier, E.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; Turner, K.; Zhu, H.; Yu, C.; Li, S.; Jian, M.; Zhou, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Li, S.; Qin, N.; Yang, H.; Wang, J.; Brunak, S.; Doré, J.; Guarner, F.; Kristiansen, K.; Pedersen, O.; Parkhill, J.; Weissenbach, J.; Bork, P.; Ehrlich, S. D.; Wang, J. (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. In: *Nature* 464 (7285), S. 59–65. DOI: 10.1038/nature08821.

Qiu, Y.-L.; Kuang, X.-Z.; Shi, X.-S.; Yuan, X.-Z.; Guo, R.-B. (2014): *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-producing bacterium isolated from rice paddy field. In: *Archives of Microbiology* 196 (3), S. 149–155. DOI: 10.1007/s00203-013-0951-1.

Qu, Z.; Liu, H.; Yang, J.; Zheng, L.; Huang, J.; Wang, Z.; Xie, C.; Zuo, W.; Xia, X.; Sun, L.; Zhou, Y.; Xie, Y.; Lu, J.; Zhu, Y.; Yu, L.; Liu, L.; Zhou, H.; Dai, L.; Leung, E. L.-H. (2025): Selective utilization of medicinal polysaccharides by human gut *Bacteroides* and *Parabacteroides* species. In: *Nature Communications* 16 (1), S. 638. DOI: 10.1038/s41467-025-55845-7.

- Rakoff-Nahoum, S.; Foster, K. R.; Comstock, L. E. (2016):** The evolution of cooperation within the gut microbiota. In: *Nature* 533 (7602), S. 255–259. DOI: 10.1038/nature17626.
- Ranaei, V.; Pilevar, Z.; Khaneghah, A. M.; Hosseini, H. (2020):** Propionic Acid: Method of production, current state and perspectives. In: *Food Technology and Biotechnology* 58 (2), S. 115–127. DOI: 10.17113/ftb.58.02.20.6356.
- Ravcheev, D. A.; Thiele, I. (2016):** Genomic analysis of the human gut microbiome suggests novel enzymes involved in quinone biosynthesis. In: *Frontiers in Microbiology* 7, S. 128. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00128.
- Razavi-Rohani, S. M.; Griffiths, M. W. (1999):** Antifungal effects of sorbic acid and propionic acid at different pH and NaCl conditions. In: *Journal of Food Safety* 19 (2), S. 109–120. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1999.tb00238.x.
- Rehberger, J. L.; Glatz, B. A. (1998):** Response of cultures of *Propionibacterium* to acid and low pH: tolerance and inhibition. In: *Journal of Food Protection* 61 (2), S. 211–216. DOI: 10.4315/0362-028X-61.2.211.
- Reichardt, N.; Duncan, S. H.; Young, P.; Belenguer, A.; McWilliam Leitch, C.; Scott, K. P.; Flint, H. J.; Louis, P. (2014):** Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. In: *The ISME Journal* 8 (6), S. 1323–1335. DOI: 10.1038/ismej.2014.14.
- Rios-Covian, D.; Sánchez, B.; Salazar, N.; Martínez, N.; Redruello, B.; Gueimonde, M.; los Reyes-Gavilán, C. G. de (2015):** Different metabolic features of *Bacteroides fragilis* growing in the presence of glucose and exopolysaccharides of bifidobacteria. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 825. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00825.
- Robert, C.; Chassard, C.; Lawson, P. A.; Bernalier-Donadille, A. (2007):** *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 7), S. 1516–1520. DOI: 10.1099/ijs.0.64998-0.
- Rodriguez, B. A.; Stowers, C. C.; Pham, V.; Cox, B. M. (2014):** The production of propionic acid, propanol and propylene via sugar fermentation: an industrial perspective on the progress, technical challenges and future outlook. In: *Green Chemistry* 16 (3), S. 1066–1076. DOI: 10.1039/C3GC42000K.
- Roe, A. J.; McLaggan, D.; Davidson, I.; O'Byrne, C.; Booth, I. R. (1998):** Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. In: *Journal of Bacteriology* 180 (4), S. 767–772. DOI: 10.1128/jb.180.4.767-772.1998.
- Rutenberg, R.; Bernstein, S.; Fallik, E.; Paster, N.; Poverenov, E. (2018):** The improvement of propionic acid safety and use during the preservation of stored grains. In: *Crop Protection* 110, S. 191–197. DOI: 10.1016/j.cropro.2017.09.005.
- Sakamoto, M.; Ikeyama, N.; Iino, T.; Ohkuma, M. (2022):** Growth of succinate consumer *Dialister hominis* is supported by *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *Anaerobe* 77, S. 102642. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2022.102642.

- Sakamoto, M.; Kitahara, M.; Benno, Y. (2007):** *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (Pt 2), S. 293–296. DOI: 10.1099/ij.s.0.64588-0.
- Sakamoto, M.; Ohkuma, M. (2012):** Reclassification of *Xylanibacter oryzae* Ueki *et al.* 2006 as *Prevotella oryzae* comb. nov., with an emended description of the genus *Prevotella*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (Pt 11), S. 2637–2642. DOI: 10.1099/ij.s.0.038638-0.
- Sakamoto, M.; Ohkuma, M. (2013):** *Bacteroides reticulotermis* sp. nov., isolated from the gut of a subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (Pt 2), S. 691–695. DOI: 10.1099/ij.s.0.040931-0.
- Salyers, A. A.; Vercellotti, J. R.; West, S. E.; Wilkins, T. D. (1977):** Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. In: *Applied and Environmental Microbiology* 33 (2), S. 319–322.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning. 2. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Samel, U.-R.; Kohler, W.; Gamer, A. O.; Keuser, U.; Yang, S.-T.; Jin, Y.; Lin, M.; Wang, Z.; Teles, J. H. (2018):** Propionic acid and derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, S. 1–20. DOI: 10.1002/14356007.a22_223.pub4.
- Sauer, U.; Eikmanns, B. J. (2005):** The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4), S. 765–794. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.11.002.
- Saxena, R. K.; Anand, P.; Saran, S.; Isar, J.; Agarwal, L. (2010):** Microbial production and applications of 1,2-propanediol. In: *Indian Journal of Microbiology* 50 (1), S. 2–11. DOI: 10.1007/s12088-010-0017-x.
- Schleicher, L.; Trautmann, A.; Stegmann, D. P.; Fritz, G.; Gätgens, J.; Bott, M.; Hein, S.; Simon, J.; Seifert, J.; Steuber, J. (2021):** A sodium-translocating module linking succinate production to formation of membrane potential in *Prevotella bryantii*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 87 (21), e0121121. DOI: 10.1128/AEM.01211-21.
- Schmidt, K.; Jensen, S. L.; Schlegel, H. G. (1963):** Die Carotinoide der Thiorhodaceae. In: *Archives of Microbiology* 46 (2), S. 117–126. DOI: 10.1007/BF00408204.
- Schnoes, A. M.; Brown, S. D.; Dodevski, I.; Babbitt, P. C. (2009):** Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies. In: *PLoS Computational Biology* 5 (12), e1000605. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000605.
- Scott, K. P.; Martin, J. C.; Campbell, G.; Mayer, C.-D.; Flint, H. J. (2006):** Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium "*Roseburia inulinivorans*". In: *Journal of Bacteriology* 188 (12), S. 4340–4349. DOI: 10.1128/jb.00137-06.

- Sekar, K.; Linker, S. M.; Nguyen, J.; Grünhagen, A.; Stocker, R.; Sauer, U. (2020):** Bacterial glycogen provides short-term benefits in changing environments. In: *Applied and Environmental Microbiology* 86 (9). DOI: 10.1128/AEM.00049-20.
- Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. (2016):** Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. In: *PLoS Biology* 14 (8), e1002533. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shah, H. N.; Jacinto, R. C.; Ahmod, N.; Langham, S.; Saheer, E. G.; Kallow, W.; Welker, M. (2006):** The genus *Bacteroides*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York.
- Sharma, P.; Hellingwerf, K. J.; Mattos, M. J. T. de; Bekker, M. (2012):** Uncoupling of substrate-level phosphorylation in *Escherichia coli* during glucose-limited growth. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (19), S. 6908–6913. DOI: 10.1128/AEM.01507-12.
- Shin, Y.; Park, S.-J.; Paek, J.; Kim, J.-S.; Rhee, M.-S.; Kim, H.; Kook, J.-K.; Chang, Y.-H. (2017):** *Bacteroides koreensis* sp. nov. and *Bacteroides kribbi* sp. nov., two new members of the genus *Bacteroides*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67 (11), S. 4352–4357. DOI: 10.1099/ijsem.0.002226.
- Shipman, J. A.; Cho, K. H.; Siegel, H. A.; Salyers, A. A. (1999):** Physiological characterization of SusG, an outer membrane protein essential for starch utilization by *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *Journal of Bacteriology* 181 (23), S. 7206–7211. DOI: 10.1128/jb.181.23.7206-7211.1999.
- Shkoporov, A. N.; Khokhlova, E. V.; Chaplin, A. V.; Kafarskaia, L. I.; Nikolin, A. A.; Polyakov, V. Y.; Shcherbakova, V. A.; Chernaia, Z. A.; Efimov, B. A. (2013):** *Coprobacter fastidiosus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Porphyromonadaceae* isolated from infant faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63 (Pt 11), S. 4181–4188. DOI: 10.1099/ijms.0.052126-0.
- Simon, R.; Priefer, U.; Pühler, A. (1983):** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. In: *Nature Biotechnology* 1 (9), S. 784–791. DOI: 10.1038/nbt1183-784.
- Smith, E. A.; Macfarlane, G. T. (1997):** Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. In: *Anaerobe* 3 (5), S. 327–337. DOI: 10.1006/anae.1997.0121.
- Spaans, S. K.; Weusthuis, R. A.; van der Oost, J.; Kengen, S. W. M. (2015):** NADPH-generating systems in bacteria and archaea. In: *Frontiers in Microbiology* 6, S. 742. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00742.
- Stincone, A.; Prigione, A.; Cramer, T.; Wamelink, M. M. C.; Campbell, K.; Cheung, E.; Olin-Sandoval, V.; Grüning, N.-M.; Krüger, A.; Tauqeer Alam, M.; Keller, M. A.; Breitenbach, M.; Brindle, K. M.; Rabinowitz, J. D.; Ralser, M. (2015):** The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. In: *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 90 (3), S. 927–963. DOI: 10.1111/bvr.12140.
- Strobel, H. J. (1992):** Vitamin B₁₂-dependent propionate production by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola* 23. In: *Applied and Environmental Microbiology* 58 (7), S. 2331–2333. DOI: 10.1128/aem.58.7.2331-2333.1992.

- Sun, L.; Toyonaga, M.; Ohashi, A.; Turlousse, D. M.; Matsuura, N.; Meng, X.-Y.; Tamaki, H.; Hanada, S.; Cruz, R.; Yamaguchi, T.; Sekiguchi, Y. (2016):** *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum *Bacteroidetes*, and proposal of *Lentimicrobiaceae* fam. nov. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (7), S. 2635–2642. DOI: 10.1099/ijsem.0.001103.
- Sun, X.-W.; Abdugheni, R.; Huang, H.-J.; Wang, Y.-J.; Jiang, M.-Z.; Liu, C.; Zhou, N.; Jiang, H.; Liu, S.-J. (2022):** *Bacteroides propionigenes* sp. nov., isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72 (5). DOI: 10.1099/ijsem.0.005397.
- Surana, N. K.; Kasper, D. L. (2012):** The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA. In: *Immunological Reviews* 245 (1), S. 13–26. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01075.x.
- Suwannakham, S.; Yang, S.-T. (2005):** Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. In: *Biotechnology and Bioengineering* 91 (3), S. 325–337. DOI: 10.1002/bit.20473.
- Takahashi-Iñiguez, T.; García-Hernandez, E.; Arreguín-Espinosa, R.; Flores, M. E. (2012):** Role of vitamin B₁₂ on methylmalonyl-CoA mutase activity. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 13 (6), S. 423–437. DOI: 10.1631/jzus.B1100329.
- Tan, H.; Zhai, Q.; Chen, W. (2019a):** Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. In: *Food Research International* 116, S. 637–644. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.088.
- Tan, H.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q.; Chen, W. (2018):** Isolation of low-abundant *Bacteroidales* in the human intestine and the analysis of their differential utilization based on plant-derived polysaccharides. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 1319. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01319.
- Tan, H.; Zhao, J.; Zhang, H.; Zhai, Q.; Chen, W. (2019b):** Novel strains of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides ovatus* alleviate the LPS-induced inflammation in mice. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (5), S. 2353–2365. DOI: 10.1007/s00253-019-09617-1.
- Tan, H.-Q.; Li, T.-T.; Zhu, C.; Zhang, X.-Q.; Wu, M.; Zhu, X.-F. (2012):** *Parabacteroides chartae* sp. nov., an obligately anaerobic species from wastewater of a paper mill. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (Pt 11), S. 2613–2617. DOI: 10.1099/ijss.0.038000-0.
- Tancula, E.; Feldhaus, M. J.; Bedzyk, L. A.; Salyers, A. A. (1992):** Location and characterization of genes involved in binding of starch to the surface of *Bacteroides thetaiotaomicron*. In: *Journal of Bacteriology* 174 (17), S. 5609–5616. DOI: 10.1128/jb.174.17.5609-5616.1992.
- Technischer Arbeitsschutz - TRBA 450. Einstufungskriterien für biologische Arbeitsstoffe (2016). Online verfügbar unter <https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/TRBA-450>, zuletzt aktualisiert am 12.03.2025.
- Technischer Arbeitsschutz - TRBA 466. Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen (2015). Online verfügbar unter <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html>, zuletzt aktualisiert am 05.06.2023, zuletzt geprüft am 05.06.2023.

- The UniProt Consortium (2025): UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. In: *Nucleic Acids Research* 53 (D1), D609–D617. DOI: 10.1093/nar/gkæ1010.
- Thierry, A.; Deutsch, S.-M.; Falentin, H.; Dalmasso, M.; Cousin, F. J.; Jan, G. (2011): New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. In: *International Journal of Food Microbiology* 149 (1), S. 19–27. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026.
- Thomas, F.; Hehemann, J.-H.; Rebuffet, E.; Czjzek, M.; Michel, G. (2011): Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. In: *Frontiers in Microbiology* 2, S. 93. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00093.
- Tran-Din, K.; Gottschalk, G. (1985): Formation of d(-)-1,2-propanediol and d(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation. In: *Archives of Microbiology* 142 (1), S. 87–92. DOI: 10.1007/BF00409243.
- Trček, 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.
- Tufvesson, P.; Ekman, A.; Sardari, R. R. R.; Engdahl, K.; Tufvesson, L. (2013): Economic and environmental assessment of propionic acid production by fermentation using different renewable raw materials. In: *Bioresource Technology* 149, S. 556–564. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.049.
- Turner, K. W.; Robertson, A. M. (1979): Xylose, arabinose, and rhamnose fermentation by *Bacteroides ruminicola*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 38 (1), S. 7–12. DOI: 10.1128/aem.38.1.7-12.1979.
- Ueki, A.; Abe, K.; Kaku, N.; Watanabe, K.; Ueki, K. (2008): *Bacteroides propionificiens* sp. nov., isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (2), S. 346–352. DOI: 10.1099/ij.s.0.65486-0.
- Ueki, A.; Abe, K.; Ohtaki, Y.; Kaku, N.; Watanabe, K.; Ueki, K. (2011): *Bacteroides paurosaccharolyticus* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61 (Pt 2), S. 448–453. DOI: 10.1099/ij.s.0.022566-0.
- Ueki, A.; Akasaka, H.; Suzuki, D.; Hattori, S.; Ueki, K. (2006a): *Xylanibacter oryzae* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, xylanolytic bacterium isolated from rice-plant residue in flooded rice-field soil in Japan. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 9), S. 2215–2221. DOI: 10.1099/ij.s.0.64364-0.
- Ueki, A.; Akasaka, H.; Suzuki, D.; Ueki, K. (2006b): *Paludibacter propionigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 1), S. 39–44. DOI: 10.1099/ij.s.0.63896-0.
- Ulsemer, P.; Toutounian, K.; Kressel, G.; Schmidt, J.; Karsten, U.; Hahn, A.; Goletz, S. (2012a): Safety and tolerance of *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 in healthy adults. In: *Beneficial Microbes* 3 (2), S. 99–111. DOI: 10.3920/BM2011.0051.

- Ulsemer, P.; Toutounian, K.; Schmidt, J.; Karsten, U.; Goletz, S. (2012b):** Preliminary safety evaluation of a new *Bacteroides xylanisolvens* isolate. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2), S. 528–535. DOI: 10.1128/AEM.06641-11.
- van Hellemond, J. J.; Tielens, A. G. (1994):** Expression and functional properties of fumarate reductase. In: *The Biochemical Journal* 304 (Pt 2) (Pt 2), S. 321–331. DOI: 10.1042/bj3040321.
- van Hoek, M. J. A.; Merks, R. M. H. (2012):** Redox balance is key to explaining full vs. partial switching to low-yield metabolism. In: *BMC Systems Biology* 6, S. 22. DOI: 10.1186/1752-0509-6-22.
- van Winkelhoff, A. J.; Graaff, J. de (1983):** Vancomycin as a selective agent for isolation of *Bacteroides* species. In: *Journal of Clinical Microbiology* 18 (5), S. 1282–1284. DOI: 10.1128/JCM.18.5.1282-1284.1983.
- Varel, V. H.; Bryant, M. P. (1974):** Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. In: *Applied Microbiology* 28 (2), S. 251–257.
- Wang, X.; Cai, Z.; Wang, Q.; Wu, C.; Sun, Y.; Wang, Z.; Xu, X.; Xue, W.; Cao, Z.; Zhang, M.; Zhu, Y.; Lin, H.; Zhang, Y.; Yuan, M.; Zhao, Y.; Gao, A.; Yu, Y.; Bi, Y.; Ning, G.; Wang, W.; Wang, J.; Liu, R. (2024):** *Bacteroides* methylmalonyl-CoA mutase produces propionate that promotes intestinal goblet cell differentiation and homeostasis. In: *Cell Host & Microbe* 32 (1), 63-78.e7. DOI: 10.1016/j.chom.2023.11.005.
- Wang, Y.-J.; Xu, X.-J.; Zhou, N.; Sun, Y.; Liu, C.; Liu, S.-J.; You, X. (2019):** *Parabacteroides acidifaciens* sp. nov., isolated from human faeces. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69 (3), S. 761–766. DOI: 10.1099/ijsem.0.003230.
- Wang, Z.; Ammar, E. M.; Zhang, A.; Wang, L.; Lin, M.; Yang, S.-T. (2015a):** Engineering *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: effects of overexpressing propionyl-CoA:Succinate CoA transferase. In: *Metabolic Engineering* 27, S. 46–56. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.10.005.
- Wang, Z.; Lin, M.; Wang, L.; Ammar, E. M.; Yang, S.-T. (2015b):** Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: Effects of overexpressing three biotin-dependent carboxylases. In: *Process Biochemistry* 50 (2), S. 194–204. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.11.012.
- Warren, M. J.; Deery, E. (2009):** Vitamin B12 (Cobalamin) Biosynthesis in the Purple Bacteria. In: Govindjee, C. Neil Hunter, Fevzi Daldal, Marion C. Thurnauer und J. Thomas Beatty (Hg.): *The Purple Phototrophic Bacteria*, Bd. 28. Dordrecht: Springer Netherlands (Advances in Photosynthesis and Respiration), S. 81–95.
- Weerakoon, D. R.; Olson, J. W. (2008):** The *Campylobacter jejuni* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH. In: *Journal of Bacteriology* 190 (3), S. 915–925. DOI: 10.1128/jb.01647-07.
- Welsh, C.; Cabotaje, P. R.; Marcelino, V. R.; Watts, T. D.; Kountz, D. J.; Gould, J. A.; Doan, N. Q.; Lingford, J. P.; Solari, J.; D’Adamo, G. L.; Huang, P.; Bong, N.; Gulliver, E. L.; Young, R. B.; Walter, K.; Wolf, P. G.; Ridlon, J. M.; Gaskins, H. R.; Giles, E. M.; Lyras, D.; Lappan, R.;**

- Berggren, G.; Forster, S. C.; Greening, C. (2024):** A widespread hydrogenase drives fermentative growth of gut bacteria in healthy people. DOI: 10.1101/2024.08.15.608110.
- Werner, H.; Rintelen, G.; Kunstek-Santos, H. (1975):** Eine neue buttersäurebildende *Bacteroides*-Art: *B. splachnicus* n. sp. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* 231 (1-3), S. 133–144.
- Wolf, P. G.; Biswas, A.; Morales, S. E.; Greening, C.; Gaskins, H. R. (2016):** H₂ metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes. In: *Gut Microbes* 7 (3), S. 235–245. DOI: 10.1080/19490976.2016.1182288.
- Wu, M.; Liu, X.; Tu, W.; Xia, J.; Zou, Y.; Gong, X.; Yu, P.; Huang, W. E.; Wang, H. (2023):** Deep insight into oriented propionate production from food waste: Microbiological interpretation and design practice. In: *Water Research* 243, S. 120399. DOI: 10.1016/j.watres.2023.120399.
- Xiong, R.-G.; Zhou, D.-D.; Wu, S.-X.; Huang, S.-Y.; Saimaiti, A.; Yang, Z.-J.; Shang, A.; Zhao, C.-N.; Gan, R.-Y.; Li, H.-B. (2022):** Health benefits and side effects of short-chain fatty acids. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 11 (18). DOI: 10.3390/foods11182863.
- Zafar, H.; Saier, M. H. (2021):** Gut *Bacteroides* species in health and disease. In: *Gut Microbes* 13 (1), S. 1–20. DOI: 10.1080/19490976.2020.1848158.
- Zeybek, N.; Rastall, R. A.; Buyukkileci, A. O. (2020):** Utilization of xylan-type polysaccharides in co-culture fermentations of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* species. In: *Carbohydrate Polymers* 236, S. 116076. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116076.
- Zhang, A.; Sun, J.; Wang, Z.; Yang, S.-T.; Zhou, H. (2015):** Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. In: *Bioresource Technology* 175, S. 374–381. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.046.
- Zhang, A.; Yang, S.-T. (2009):** Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. In: *Process Biochemistry* 44 (12), S. 1346–1351. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.07.013.
- Zhang, B.; Lingga, C.; Groot, H. de; Hackmann, T. J. (2023):** The oxidoreductase activity of Rnf balances redox cofactors during fermentation of glucose to propionate in *Prevotella*. In: *Scientific Reports* 13 (1), S. 16429. DOI: 10.1038/s41598-023-43282-9.
- Zhang, C.; Brandt, M. J.; Schwab, C.; Gänzle, M. G. (2010):** Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. In: *Food microbiology* 27 (3), S. 390–395. DOI: 10.1016/j.fm.2009.11.019.
- Zhang, F.; Nan, X.; Wang, H.; Guo, Y.; Xiong, B. (2020):** Research on the applications of calcium propionate in dairy cows: A Review. In: *Animals* 10 (8), S. 1336. DOI: 10.3390/ani10081336.
- Zheng, L.; Tan, Y.; Hu, Y.; Shen, J.; Qu, Z.; Chen, X.; Ho, C. L.; Leung, E. L.-H.; Zhao, W.; Dai, L. (2022):** CRISPR/Cas-based genome editing for human gut commensal *Bacteroides* species. In: *ACS Synthetic Biology* 11 (1), S. 464–472. DOI: 10.1021/acssynbio.1c00543.

Anhang

Tabelle A1: Organismenliste. DMM, Definiertes Mineralmedium; AM, Anreicherungsmedium; CMC, Carboxymethylcellulose; Van/Kan, Vancomycin/Kanamycin.

Organismus/Stamm	Ursprung	Besonderheit/Genotyp
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> CRE21	AG Bonn (DSM 14838) (Robert <i>et al.</i> , 2007)	Typstamm
<i>Bacteroides graminisolvens</i> XDT-1	DSMZ (DSM 19988) (Nishiyama <i>et al.</i> , 2009)	Typstamm
<i>Bacteroides intestinalis</i> 341	DSMZ (DSM 17393) (Bakir <i>et al.</i> , 2006)	Typstamm
<i>Bacteroides luti</i> UasXn-3	DSMZ (DSM 26991) (Hatamoto <i>et al.</i> , 2014)	Typstamm
<i>Bacteroides propionificiens</i> SV434	DSMZ (DSM 19291) (Ueki <i>et al.</i> , 2008)	Typstamm
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A	DSMZ (DSM 18836) (Chassard <i>et al.</i> , 2008)	Typstamm
<i>Parabacteroides chartae</i> NS31-3	DSMZ (DSM 24967) (Tan <i>et al.</i> , 2012)	Typstamm
<i>Parabacteroides johnsonii</i> M-165	AG Bonn (DSM 18315) (Sakamoto <i>et al.</i> , 2007)	Typstamm
<i>Phocaeicola paurosaccharolyticus</i> WK042	DSMZ (DSM 21004) (Ueki <i>et al.</i> , 2011; García-López <i>et al.</i> , 2019)	Typstamm (ehem. <i>Bacteroides paurosachharolyticus</i>)
<i>Phocaeicola vulgatus</i>	AG Bonn (DSM 1447) (Eggerth und Gagnon, 1933; García-López <i>et al.</i> , 2019)	Typstamm (ehem. <i>Bacteroides vulgatus</i>)
<i>Segatella copri</i> CB7	AG Bonn (DSM 18205) (Hayashi <i>et al.</i> , 2007; Hitch <i>et al.</i> , 2022)	Typstamm (ehem. <i>Prevotella copri</i>)
<i>Phocaeicola vulgatus</i> pG106	Sonja Kurrer Laborsammlung Nr. 10 (Basen)	Plasmid pG106
<i>Phocaeicola vulgatus</i> pG106_np_mutA_scpA	Diese Arbeit Laborsammlung Nr. 74 (Basen)	Plasmid pG106_np_mutA_scpA
<i>E. coli</i> DH5 α	(Grant <i>et al.</i> , 1990) Laborsammlung Nr.: 11 (Bahl)	F– ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK–, mK+) phoA supE44 λ –thi-1 gyrA96 relA1
<i>E. coli</i> DH5 α pG106	(Jones <i>et al.</i> , 2020) Laborsammlung Nr.: 25 (Basen)	Plasmid pG106
<i>E. coli</i> S17-1	(Simon <i>et al.</i> , 1983) Laborsammlung Nr.: 945 (Bahl)	294 (recA pro res mod+) Tpr Smr (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)
<i>E. coli</i> S17-1 pG106_np_mutA_scpA	Diese Arbeit Laborsammlung Nr.: 75 (Basen)	Plasmid pG106_np_mutA_scpA
Isolat BGG-A1	Sonja Kurrer Biogasanlage Güstrow Fermenter A (38 - 40 °C) (S. Kurrer, persönliche Kommunikation, 25.09.2024)	Anreicherung: (30 °C, Van/Kan) P1:DMM +Avicel (10 g/l), P2:AM + Avicel (10 g/l) Isolierung: AM-CMC-Van/Kan (30 °C) Identifizierung: PCR mit Eub 1 99,2 % " <i>Dysgonomonas</i> sP. strain AAn1/gadei

Tabelle A2: Liste der Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pG106	f1 ori, Erythromycin Resistenz (<i>ermF</i> , <i>ermAM</i>), MCS, repB-mob Region	(Jones <i>et al.</i> , 2020)
pG106_np_mutA_scpA	pG106 mit BVU_309 und BVU_310 sowie 250 bp upstream Region	Diese Arbeit

Tabelle A3: Liste der verwendeten Oligonukleotide. T_m, Schmelztemperatur; T_a, Anlagerungstemperatur.

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung	T _m /T _a [°C]	Zielsequenz (Länge)
Eub 1	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	OneTaq-PCR, Sequenzierung	54/49	16S-Gen (~1500 bp)
Eub 2	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	OneTaq-PCR, Sequenzierung	48/49	
CD07_fw	CGATTAAGTTGGGTAACGCCAG	OneTaq-PCR Sequenzierung	57/51	pG106 (546 bp) pG106_np_mutA_scpA (4864 Bp)
CD07_rv	GTGCCAAAACAACCTTGACTTG	OneTaq-PCR Sequenzierung	56/51	
CD08_fw	GTAATACGGTTATCCACAGAAT CGCCGCAAATTAATGAATTCC	Q5-PCR	60/61	<i>P. vulgaris</i> np_mutA_scpA (4379 bp)
CD08_rv	CAGAACAAATCACTCAATTG GATCGCTTATTCCTCTTCGTCCAG	Q5-PCR	62/61	
CD09_fw	CTGGACGAAGAGGAATAAGCG ATCCAATTGAGTGATTTGTTCTG	Q5-PCR	62/61	pG106 (9448 bp)
CD09_rv	GGAATTCATTAATTTGCGGC GATTCTGTGGATAACCGTATTAC	Q5-PCR	60/61	
CD12_fw	TAACTTCGGCTCTGTTGATGGT	qPCR	57/52	<i>P. vulgaris gyrA</i> (146 bp)
CD12_rv	GTCCTGCAACGTGTCATCAAA	qPCR	57/52	
CD13_fw	CGATTCGGCTTTATTGTACGTCC	qPCR	57/52	<i>P. vulgaris l23</i> (156 bp)
CD13_rv	ACGACCATTGATGATTCCAGACT	qPCR	57/52	
CD15_fw	ACTGGCTCCGCTACCTAAATTC	qPCR	58/52	<i>P. vulgaris mutA</i> (129 bp)
CD15_rv	ACCAGCTTGCTCAGATATTCGT	qPCR	58/52	
CD16_fw	ATTTGCTGGAAGTGGCTGTAGA	qPCR	57/53	<i>P. vulgaris scpA</i> (160 bp)
CD16_rv	GCTCTTGCGAAGTCTGTATCCT	qPCR	58/53	
CD22_fw	CGATCCAATTGAGTGATTTGTTC TGG	Sequenzierung	57/51	pG106_np_mutA_scpA (9429 bp)
CD22_rv	GGGAATTCATTAATTTGCGGCG	Sequenzierung	56/51	

Tabelle A4: Ablauf der PCR-Reaktionen mit *OneTaq*® und *Q5*® Polymerasen.

Schritt	OneTaq® Polymerase		Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	
	Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	98 °C	30 s
2. Denaturierung	94 °C	30 s	98 °C	10 s
3. Anlagerung	T _a (TaB. A3)	60 s	T _a (TaB. A3)	30 s
4. Elongation	68 °C	1 min/kbp	72 °C	30 s/kbp
	2-4: 30 Zyklen		2-4: 35 Zyklen	
5. Finale Elongation	68 °C	10 min	72 °C	2 min
6. Kühlung	10 °C	∞	4 °C	∞

Tabelle A5: Zusammensetzung des SOC-Mediums

Substanz	Menge pro l H ₂ O _{dest.}
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
1 M KCL	2,5 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l sterilfiltrierte 1 M MgCl₂-Lösung hinzugegeben sowie 20 ml sterilfiltrierte 1 M Glucose-Lösung

Tabelle A6: Kultivierungsbedingungen für Anreicherungskulturen von *Bacteroidota*. Bm, Biomüll (Kompostwerk Parkentin); Z, Zulauf Kläranlage; V, Vorschlämm; P, Primärschlämm; B, Bio-P Becken (Z, V, P, B, Klärwerk Rostock); Bg, Biogasanlage (0, I, Biogasanlage Groß Babelin; II, Biogasanlage Güstrow); AMX, Anreicherungsmedium mit 10 g/l Xylan aus Buchenholz; AMXo, Anreicherungsmedium mit 15 mM Xylooligosacchariden; DMMX, definiertes Minimalmedium mit 10 g/l Xylan aus Buchenholz; P, Anzahl der Passagen.

Kürzel	Temperatur (°C)	Medium Anreicherung	Medium Vereinzelung
Bm	30*/37	P1: AMX-Va; P2-P5: AMX	AMXo
Z	30*/37	P1: AMX-Va; P2-P4: DMMX	AMX
V	30*/37	P1: AMX-Va; P2-P4: DMMX	AMX
P	30*/37	P1: AMX-Va; P2-P4: DMMX	AMX
B	30*/37	P1: AMX-Va; P2-P4: DMMX	AMX
Bg0	37	-	AMX
BgI	30/37	P1-P6: AMX/AMXO	AMX/AMXo
BgII	37	P1-P5: AMX/AMXO	AMX/AMXo

* Isolate stammen nur aus 30 °C Anreicherungen

Tabelle A7: Chemikalien- und Herstellerliste

Hersteller	Chemikalie
2024 Merck KGaA, Darmstadt	Caseinpepton, $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, P-Aminobenzoesäure, Glykogen aus Rinderleber, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, Anthron, Pyridoxin-HCl
AppliChem GmbH, Darmstadt	Hefeextrakt, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, Agar Kobe I, Trypton, MOPS, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, KOH, NaOH, Na-Pyruvat, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, Gentamycinsulfat, KH_2PO_4 , H_2SO_4 , $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, Cyanocobalamin (B_{12}), α -Liponsäure, Na-NADP ⁺ , $\text{Na}_2\text{-ATP}$, Ethanol (96 %), Na-Acetat, BSA, Bromocresolpurpur, Na_2HPO_4 ,
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Fleischextrakt, Chitin aus Krabbenschalen, NaCl, Erythromycin, K_2HPO_4 , NaHCO_3 , D-Glucose $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, L-Cystein-HCl $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, KCL, Kaliumnatriumtartrat $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Kaliumjodid, Xylan aus Buchenholz, Tris, Xylooligosaccharide, Methanol, HCl (37 %), $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, Vitamin K1, Thiamin-HCl, Na-Formiat
Fluka Chemie GmbH, Buchs	$\text{Na}_2\text{-Succinat}$, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, Biotin
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren	NucleoSpin Microbial DNA, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, NucleoSpin Tissue, Plasmid Easy Pure Kit
New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main	Monarch PCR & DNA Cleanup Kit, Gel Loading Dye Purple (6X), 1 kb Plus DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder, OneTaq Quick-Load 2x Mastermix mit Standard Puffer, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase
Qiagen, Hilden	RNeasy Kit
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	Nicotinsäure, Ca-Panthothenat,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Avicel PH-101 50 μM Partikelgröße, Glass Beads (150 -212 μm), Na-D/L-Lactat, Na-Propionat, Na-Butyrat, Hemin, Riboflavin, Vancomycin, Kanamycin, NaH_2PO_4
Sonstige	Na-Resazurin (Riedel-de -Haën, Selze), H_3BO_3 (Laborchemie Apolda GmbH, Apolda), Folsäure (Ferak Berlin GmbH, Berlin), Midoi Green Advance DNA stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren), Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Version 05 (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen)

Tabelle A8: Auswahl Propionat bildender *Bacteroidota* und mögliche komplexe Substrate. Produkte sind nach relativer Quantität in absteigender Reihenfolge aufgelistet. Grau hinterlegte Spezies wurden in dieser Arbeit näher untersucht. A, Acetat; P, Propionat; S, Succinat; L, Lactat; F, Formiat; M, Malat; B, Butyrat; IB, Isobutytrat; IV, Isovalerat; Fu, Fumarat; ND, nicht Definiert; CWS, Spinat Zellwand (cell wall spinach); CMC, Carboxymethylcellulose; GIT; Gastrointestinaltrakt

Organismus	Quelle	Produkte	Komplexe Substrate	Risiko Gruppe	Referenz
<i>Bacteroides</i>					
<i>B. cellulosilyticus</i> CRE21	Fäzes (Mensch)	A, P, S, F, L	CWS, Cellulose (Avicel p101, Sigmacell 101), Stärke, Pektin	1	(Robert <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. fragilis</i> EN-2	Appendix-Abszess	S, A, P, L	Stärke	2	(Chen und Wolin, 1981; Salyers <i>et al.</i> , 1977)
<i>B. graminisolvens</i> XDT-1	Methanogener Reaktor	A, P, S, L, B	Xylan, Stärke, Pektin	1	(Nishiyama <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. intestinalis</i> 341	Fäzes (Mensch)	Fu, A, P	-	1	(Hatamoto <i>et al.</i> , 2014; Bakir <i>et al.</i> , 2006);
<i>B. luti</i> UasXn-3	Methanogener Schlamm	A, S, P, F	Cellulose, Xylan, Stärke	1	(Hatamoto <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. ovatus</i> ATCC 8483	Fäzes (Mensch)	A, P, S	Stärke, Pektin, Xylan, Arabinogalactan	2	(Macfarlane <i>et al.</i> , 1990; Horvath <i>et al.</i> , 2022)
<i>B. propionificiens</i> SV434	Methanogener Reaktor	A, P, S	Stärke	1	(Ueki <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. propionigenes</i> NSJ-90	Fäzes (Mensch)	A, P, IV	Stärke, Xylan	ND	(Sun <i>et al.</i> , 2022)
<i>B. reticulotermitis</i> Rs-03	Termiten-GIT	S, A, P	Xylan, Stärke, CMC, Pektin	1	(Sakamoto und Ohkuma, 2013)
<i>B. thetaiotaomicron</i> E50		A, P, S	Stärke, Pektin, Polygalacturonat, Arabinogalactan	2	(Kotarski und Salyers, 1981; Salyers <i>et al.</i> , 1977; Adamberg <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. xylanisolvens</i> XB1A	Fäzes (Mensch)	A, P, S	Xylan	1	(Chassard <i>et al.</i> , 2008)
<i>Butyricimonas</i>					
<i>B. faecalis</i> H184	Fäzes (Mensch)	P, A, IB, B, IV, V	-	ND	(Le Roy <i>et al.</i> , 2019)
<i>Copro bacter</i>					
<i>C. fastidiosus</i> NSB1	Kleinkind Fäzes	A, P, S	Nd.	1	(Shkoporov <i>et al.</i> , 2013)
<i>Dysgonomonas</i>					
<i>D. alginatilytica</i> HUA-2	Alginat abbauendes Konsortium	L, S, A, P	Alginat	1	(Kita <i>et al.</i> , 2015)
<i>D. capnocytophagoides</i> CCUG 17996	Infizierte Gallenblase	P, L, S	Nd.	2	(Hofstad <i>et al.</i> , 2000)
<i>D. mossii</i> CCUG 3457	klinische Probe	L, A, P	Nd.	1	(Lawson <i>et al.</i> , 2002)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle A8

<i>Fermentimonas</i> <i>F. caenicola</i> ING2-E5B	Biogas Reaktor	A, P	Lösliche Stärke	1	(Hahnke <i>et al.</i> , 2016b)
<i>Lentimicrobium</i> <i>L. saccharophilum</i> TBC1	Methanogener Schlamm	A, M, P, F	Stärke	1	(Sun <i>et al.</i> , 2016)
<i>Odoribacter</i> <i>O. splanchnicus</i> 1651/6	Abdominaler Abszess	A, P, IB, B	ND.	2	(Werner <i>et al.</i> , 1975; Hardham <i>et al.</i> , 2008)
<i>Paludibacter</i> <i>P. propionigenes</i> WB4	Reis Feld: Anoxische Erde	P, A, S	Lösliche Stärke	1	(Ueki <i>et al.</i> , 2006b)
<i>P. jianxiensis</i> NM7	Reis Feld	A, P	Cellobiose, Pektin, Stärke	1	(Qiu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Parabacteroides</i> <i>P. acidifaciens</i> 426-9	Fäzes (Mensch)	A, P, IB	ND.	ND	(Wang <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. chartae</i> NS31-3	Abwasser Papiermühle	L, P, F, A	ND.	1	(Tan <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. johnsonii</i> M-165	Fäzes	S, A, P	ND.		(Sakamoto <i>et al.</i> , 2007)
<i>Petrimonas</i> <i>P. mucosa</i> ING2-E5A	Biogas Reaktor	A, P	Lösliche Stärke	1	(Hahnke <i>et al.</i> , 2016b)
<i>Phocaeicola</i> <i>P. paurosaccharolyticu</i> <i>s</i> WK042	Methanogener Reaktor	A, P, S	Glykogen, Stärke, Pektin	1	(Ueki <i>et al.</i> , 2011; García- López <i>et al.</i> , 2019)
<i>P. vulgatus</i> ATCC 8482	Fäzes (Mensch)	A, S, F, L, P	Stärke, Arabinogalactan	1	(Salyers <i>et al.</i> , 1977; Lück und Deppenmeier, 2022; García-López <i>et al.</i> , 2019)
<i>Prevotella</i> <i>P. ruminicola</i> 23	Rumen	P, A, S		2	(Strobel, 1992; Hitch <i>et al.</i> , 2022)
<i>Proteiniphilum</i> <i>P. saccharofermentans</i> M3/6	Biogas Reaktor	A, P	Lösliche Stärke	1	(Hahnke <i>et al.</i> , 2016b)
<i>Xylanibacter</i> <i>X. oryzae</i> KB3	Reis Feld: Anoxische Erde	A, P, S, M	Xylan, Pektin, CMC	1	(Ueki <i>et al.</i> , 2006a; Sakamoto und Ohkuma, 2012)

Tabelle A9: Finaler pH des Kulturüberstands bei steigender initialer Glucosekonzentration. Die Zellen wurden im Plattenlesegerät in DMMG bei 37 °C für 48 h (*P. johnsonii*) bzw. 24 h (*B. graminisolvens*) im 24-Well-Format inkubiert. Im Anschluss folgte die Messung des pH im Kulturüberstand. n=1.

Glucose [mM]	<i>P. johnsonii</i>	<i>B. graminisolvens</i>
15	7,1	7,0
25	6,8	6,5
40	5,6	5,1
50	5,3	5,0
75	5,2	5,0

Tabelle A10: pH-Grenzwerte (min. und max.) und Optima einer Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Stämme.

Stamm	Min.	Optimum	max.	Referenz
<i>B. cellulosilyticus</i> CRE21	6,5	6,8	7,2	(Robert <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. graminisolvens</i> XDT-1	6,1	7,2	8,2	(Nishiyama <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. luti</i> UasXn-3	5,5	6,5	8,5	(Hatamoto <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. propionificiens</i> SV434	5,7	7,9	8,9	(Ueki <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. xylanisolvens</i> XB1A	6,0	6,8	7,2	(Chassard <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. chartae</i> NS31-3	5,5	7,0-7,5	8,5	(Tan <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. paurosaccharolyticus</i> WK042	7,5	7,7	9,0	(Ueki <i>et al.</i> , 2011)

Tabelle A11: Wachstum verschiedener *Bacteroidota* in DMMG und DMMG-H. Die Bakterien wurden 24 bzw. 45 h (*B. propionificiens*) im 48-Well Format in DMMG ohne (-) und mit (+) 0,5 g/l Hefeextrakt kultiviert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). OD_{max} ist die höchste in einer Kultur gemessene Zelldichte. Die Wachstumsrate wurde aus je 5 aufeinanderfolgenden Datenpunkten berechnet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten.

Organismus	Hefe-Extrakt	OD _{max}	Wachstumsrate [h ⁻¹]
<i>Bacteroides</i>			
<i>B. cellulosilyticus</i> CRE21	-	0,80 ± 0,09	0,44 ± 0,01
	+	0,82 ± 0,04	0,5 ± 0,00
<i>B. graminisolvens</i> XDT-1	-	0,73 ± 0,04	0,27 ± 0,02
	+	0,73 ± 0,03	0,28 ± 0,03
<i>B. intestinalis</i> 341	-	0,88 ± 0,02	0,44 ± 0,01
	+	0,88 ± 0,08	0,48 ± 0,01
<i>B. luti</i> UasXn-3	-	0,58 ± 0,01	0,16 ± 0,02
	+	0,59 ± 0,04	0,16 ± 0,01
<i>B. xylanisolvens</i> XB1A	-	0,78 ± 0,00	0,50 ± 0,08
	+	0,81 ± 0,00	0,61 ± 0,01
<i>B. propionificiens</i> SV434	-	0,68 ± 0,03	0,09 ± 0,00
	+	0,76 ± 0,02	0,14 ± 0,00
<i>Parabacteroides</i>			
<i>P. chartae</i> NS31-3	-	0,86 ± 0,02	0,36 ± 0,05
	+	0,87 ± 0,03	0,35 ± 0,00
<i>P. johnsonii</i> M-165	-	0,65 ± 0,00	0,23 ± 0,02
	+	0,73 ± 0,00	0,32 ± 0,00
<i>Phocaeicola</i>			
<i>P. paurosaccharolyticus</i> WK042	-	0,90 ± 0,01	0,16 ± 0,01
	+	0,92 ± 0,02	0,17 ± 0,00
<i>P. vulgatus</i> ATCC 8482	-	0,88 ± 0,03	0,33 ± 0,03
	+	0,92 ± 0,02	0,39 ± 0,01

Tabelle A12: Identifikation zentraler Enzyme bzw. Gene der Stoffwechselwege ausgewählter *Bacteroidota*. Es wurde eine spezies-spezifische Blastp- Suche mit Aminosäure-Sequenzen charakterisierter Enzyme durchgeführt. Die Sequenzen wurden entweder von UniProt ([www. https://www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/)) oder der *Protein Data Bank in Europe* (PDBe, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/>) bezogen (Referenznummer). Ergebnisse: -, keine signifikante Übereinstimmung; hellgraue Felder, Übereinstimmung mit prozentualer Identität < 30 % und E-value > 10⁻²⁰ und/oder abweichender Annotation; +, prozentuale Identität ≥ 30 %, E-value ≤ 10⁻²⁰; Organismen (NCBI TaxID): 1, *S. copri* (165179); 2, *B. graminisolvens* (477666); 3, *B. propionificiens* (392838); 4, *B. cellulosilyticus* (246787); 5, *B. intestinalis* (329854); 6, *B. luti* (1297750); 7, *B. xylanisolvens* (371601); 8, *P. chartae* (1037355); 9, *P. johnsonii* (387661); 10, *P. paurosaccharolyticus* (732242); 11, *P. vulgatus* (821); 2.1 – 3.2: Ergebnisse der stammspezifischen Blastn Analyse mit je 2 Genomen von *B. graminisolvens* (NZ_BAJS01000063.1; NZ_ATZI01000001.1) und *B. propionificiens* (NZ_BAJO01000080.1; NZ_AQWS01000001.1) gegen die gleichen Sequenzen.

Kategorie/Enzym	Referenzenzym		Gen	Organismus											2.1	2.2	3.1	3.2
	Referenznum	EC Nummer		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
Pentose-Phosphat-Weg																		
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	P0AC53	EC:1.1.1.49	zwf	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-Phosphogluconolactonase	P0AC53	EC:3.1.1.31	pgl	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	P00350	EC:1.1.1.44	gnd	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribulose-5-Phosphat Isomerase	P37351	EC:5.3.1.6	rpiB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribulose-Phosphat 3-Epimerase	P0AG07	EC:5.1.3.1	rpe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Transketolase 1	P27302	EC:2.2.1.1	tktA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Transketolase 2	P33570	EC:2.2.1.1	tktB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Transaldolase <i>P. vulgatus</i>	A6L5J5	EC:2.2.1.2	tal	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Transaldolase <i>B. subtilis</i>	P19669	EC:2.2.1.2	tal	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Pyrophosphat-F6P Phosphotransferase	P29495	EC:2.7.1.90	pfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-Phosphofructokinase			PREVCOP_04138												+	+	+	+
Diphosphat-F6P 1-Phosphotransferase			PREVCOP_03899												+	+	+	+
Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase			PREVCOP_06123												+	+	+	+
Produkte aus Pyruvat																		
Pyruvat-Formiat-Lyase	P09373	EC:2.3.1.54	pfl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	P94692	EC:1.2.7.1	pfor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactat Dehydrogenase	P00343	EC:1.1.1.27	ldh	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phosphat Acetyltransferase	P0A9M8	EC:2.3.1.8	pta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetat Kinase	P0A6A3	EC:2.7.2.1	ack	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkohol Dehydrogenase	P28036	EC:1.1.5.5	adhA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Succinat-Weg																		
Succinyl-CoA:Acetat CoA-Transferase	B3EY95	EC:2.8.3.18	scat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methylmalonyl-CoA Mutase große UE	P11653	EC:5.4.99.2	scpA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methylmalonyl-CoA Mutase kleine UE	P11652	EC:5.4.99.2	mutA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methylmalonyl-CoA Decarboxylase	Q57286	EC:7.2.4.3	mmdB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Q56724	EC:7.2.4.3	mmdD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Q57079	EC:7.2.4.3	mmdA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Q57490	EC:7.2.4.3	mmdE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Q57111	EC:7.2.4.3	mmdC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methylmalonyl-CoA Epimerase	PDBe > 1jc5	EC 5.1.99.1	mce	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionyl-CoA:Succinat CoA-Transferase	P52043	EC:2.8.3.-	spcC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alternative Propionatproduktion																		
Methylmalonyl-CoA Carboxyltransferase	Q8GBW6	EC:2.1.3.1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	Q70AC7	EC:2.1.3.1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Lactoyl-CoA Dehydratase AlphaUE	G3KIM4	EC:4.2.1.54	lcdA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Lactoyl-CoA Dehydratase Beta UE	G3KIM3	EC:4.2.1.54	lcdB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Propanal Dehydrogenase	Q9XDN1	EC:1.2.1.87	pduP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle A12

Glycolyse

[illegible]

PEP und Pyruvat Metabolismus

[illegible]

Citrat-Zyklus

[illegible]

Na⁺-translozierende NADH:Quinone Reduktase

Q56586	EC:7.2.1.1	nqrA	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Q56587		nqrB	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Q56582		nqrC	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Q57095		nqrD	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Q56589		nqrE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Q56584		nqrF	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

NADH:Quinon Oxidoreduktase

P0AFC3	EC:7.1.1.-	nuoA	+	+	-		+	+	+	+	-	+	+		+	+	-	-	
P0AFC7		nuoB	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+		+	+	-	-	
P33599		nuocd	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	-	-	
P0AFD1		nuoE	-	-	-	+	+		+	+	+	-	+		-	-	-	-	
P31979		nuoF	+	+		+	+	+	+	+	+				-	-	-	-	
P33602		nuoG	-	-	-							-	-		-	-	-	-	
P0AFD4		nuoH	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+	-	-
P0AFD6		nuoI	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
P0AFE0		nuoJ			-						-	-						-	-
P0AFE4		nuoK	+	-	-	-	-	-	-	+				-				-	-
P33607	nuoL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+	
P0AFE8	nuoM	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+	
P0AFF0	nuoN	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		+	+	+	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle A12

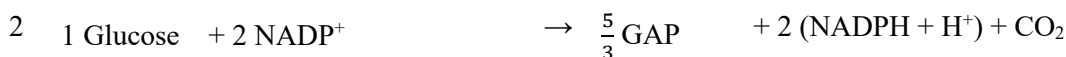
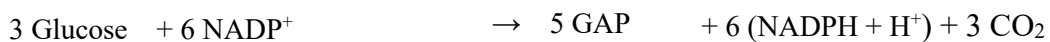
Na ⁺ - translozierende Ferredoxin: NAD ⁺ Reduktase (Rnf)																						
PDBe › 7zc6	EC 7.2.1.2	rnfA	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
		rnfB	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
		rnfC	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
		rnfD	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
		rnfE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
		rnfG	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+				
Cytochrom bd-II Ubiquinol Oxidase																						
P26459	EC:7.1.1.3	appC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
P26458		appB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Typ II NADH:Quinone Oxidoreduktase																						
P00393		ndh	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
ATP-Synthase																						
ATP-Synthase (Protonen)																						
P0ABB0	EC:7.1.2.2	atpA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
P0ABB4		atpB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
P0A6E6		atpE	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+				
OABA0		atpF	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
ATP-Synthase (Na ⁺ -Ionen)																						
P29706	EC:7.2.2.1	atpA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
P21903		atpB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Na ⁺ -Ionen bindender Rotor															PDBe › 3zk2				+	+	+	+
[FeFe]-Hydrogenase																						
P29166	EC:1.12.7.2	phf1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-				

Tabelle A13: Umsätze zur Berechnung der Kohlenstoff- und Redoxbilanz ruhender Zellen. ATP-Produktion wurde nicht berücksichtigt. oxPPP, oxidativer Pentosephosphatweg; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PEP, Phosphoenolpyruvat.

Glykolyse



oxPPP



Produkte

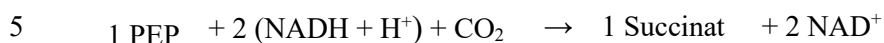


Tabelle A14: Berechnung der Kohlenstoff- und Redoxbilanz von *B. propionificiens* Zellsuspensionen. Zellsuspensionen mit einer Proteinkonzentration von $0,46 \pm 0,01$ mg/ml wurden für insgesamt 144 h nach Zugabe von rund 15 mM Glucose bei 30 °C inkubiert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/ 20 %; v/v). Werte auf Basis von Messwerten sind fett markiert (HPLC-Daten, Mittelwert, n = 3), alle anderen wurden durch Berechnungen und theoretische Überlegungen ermittelt.

24 h				144 h			
		A	B			A	B
		Substrat, Produkt [mM]	[H] [mM]			Substrat, Produkt [mM]	[H] [mM]
1	Glucose	16,6		1	Glucose	16,6	
2	GAP (Glykolyse)	33,2		2	GAP (Glykolyse)	33,2	
3	PEP	33,2	33,2	3	PEP	33,2	33,2
Produkte				Produkte			
4	Pyruvat	1,2	0,0	4	Pyruvat	0,0	0,0
5	Succinat	1,3	2,6	5	Succinat	2,4	4,8
6	Propionat	13,3	26,6	6	Propionat	16,7	26,6
7	Acetat (PFOR)	7,9	-7,9	7	Acetat (PFOR)	7,4	-7,4
8	Acetat/Formiat (PFL)	0,7	0,0	8	Acetat/Formiat (PFL)	0,9	0,0
9	Lactat	0,0	0,0	9	Lactat	0,0	0,0
10	Summe	24,4	21,3	10	Summe	27,4	24
Bilanz:				Bilanz:			
PEP-Ausbeute [%] (A10*100/A3)		73,6		PEP-Ausbeute [%] (A10*100/A3)		82,5	
[H]-Ausbeute [%] (B10*100/B3)			64,2	[H]-Ausbeute [%] (B10*100/B3)			72,3

Erläuterungen:

Spalte A: Konzentration der Substrate, Intermediate und Produkte (HPLC-Daten, Mittelwert, n = 3);

Spalte B: ([H]), [H], Konzentration der beteiligten elektronenübertragenden Moleküle (NAD(P)⁺/ NAD(P)H oder Fd_{ox}/Fd_{red}.)

A2: durch die Glykolyse entstandene Menge GAP (A1 x 2)

A3: entstandene Menge an PEP (A3 = A2)

A4-A9: Produktkonzentrationen. Da Acetat entweder über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) oder die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL) entstehen kann ist es zweimal aufgeführt. Die über die PFL gebildete Acetat-Menge entspricht der Formiatkonzentration. Die über die PFOR entstandene Acetatmenge ist die Differenz aus der gemessenen Konzentration und der Acetatproduktion über die PFL

B4-B9: Bei der Bildung der Produkte aus PEP benötigte Konzentration an reduzierten elektronenübertragenden Molekülen; Da bei der Bildung von Acetat über die PFOR Fd_{red} entsteht, bekam der Wert ein negatives Vorzeichen; **A10, B10:** Summe Zeilen 4-9

PEP-Ausbeute: Prozentualer Anteil von A10 an A3 (Kohlenstoffausbeute)

[H]-Ausbeute: Prozentualer Anteil von B10 an B3;

Tabelle A15: Berechnung der Kohlenstoff- und Produktbilanz von *B. graminisolvens* Zellsuspensionen. Zellsuspensionen mit einer Proteinkonzentration von $0,54 \pm 0,03$ mg/ml wurden für insgesamt 24 h nach Zugabe von rund 15 mM Glucose bei 37 °C inkubiert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/ 20 %; v/v). Werte auf Basis von Messwerten sind fett markiert (HPLC-Daten, Mittelwert, n = 3), alle anderen wurden durch Berechnungen und theoretische Überlegungen ermittelt.

24 h			
		A Substrat, Produkt [mM]	B [H] [mM]
1	Glucose	17,3	
2	GAP (Glykolyse)	34,6	
3	PEP	34,6	34,6
Produkte			
4	Pyruvat	1,0	0,0
5	Succinat	2,4	4,8
6	Propionat	14,5	29,0
7	Acetat (PFOR)	0,0	0,0
8	Acetat/Formiat (PFL)	2,3	0,0
9	Lactat	3,0	3,0
10	Summe	23,2	36,8
Bilanz			
	PEP-Ausbeute [%] (A11*100/A4)	67,0	
	[H]-Ausbeute [%] (B11*100/B4)		106,4

Erläuterungen:

Spalte A: Konzentration der Substrate, Intermediate und Produkte (HPLC-Daten, Mittelwert, n = 3)

Spalte B: [H], Konzentration der beteiligten elektronenübertragenden Moleküle (NAD(P)⁺/ NAD(P)H oder Fd_{ox}/Fd_{red}.)

A2: über Glykolyse entstandene GAP-Konzentration aus der entsprechenden Menge Glucose (17,3 mM x 2)

A3: Aus GAP entstandene Menge an PEP

B3: [H] aus Reaktion GAP → PEP)

A4-A9: Produktkonzentrationen. Da Acetat entweder über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) oder die Pyruvat-Formiat Lyase (PFL) entstehen kann ist es zweimal aufgeführt. Die über die PFL gebildete Acetat-Menge entspricht der Formiatkonzentration. Die über die PFOR entstandene Acetatmenge ist die Differenz aus der gemessenen Konzentration und der Acetatproduktion über die PFL.

B4-B9, Bei der Bildung der Produkte aus PEP benötigte Konzentration an reduzierten elektronenübertragenden Molekülen;

A10, B10: Summe Zeilen 5-10

PEP-Ausbeute, Anteil A10 an A3

[H]-Ausbeute: Anteil B10 an B3

Tabelle A16: Berechnung der elementaren Zusammensetzung von 3 *Bacteroidota* Spezies in 1 g Trockenmasse. Zellen wurden in 500 - 1000 ml DMMG inkubiert und zum Ende der exponentiellen Phase geerntet. Dazu wurden die Zellen für 20 Minuten bei 8000 x g sedimentiert und mit 200 ml H₂O_{dest.} gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet bis zu 48 h lyophyllisiert und homogenisiert. Die Analyse erfolgte durch das Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP. Die Bestimmung der Masseanteile erfolgte bei Sauerstoff als Dreifachbestimmung, bei allen anderen als Doppelbestimmung. Der Anteil jedes Elements wurde nach folgender Formel berechnet: *Anteil des Elements an der Summenformel* = $\frac{m_x \times M_c}{M_x \times m_c}$.

<i>B. graminisolvens</i>					
Gewichtsanteil	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]
Messung 1	10,88	43,86	6,68	0,41	28,97
Messung 2	10,8	43,82	6,61	0,41	27,97
Messung 3					28,58
Mittelwert:	10,84	43,84	6,65	0,41	28,47
Gewicht [g]	0,1084	0,4384	0,0665	0,0041	0,2847
Stoffmenge [mol]	0,0077	0,0365	0,0659	0,0001	0,0178
Anteil an Summenformel	0,21	1,00	1,81	0,00	0,49
Formel	C ₁ H _{1.81} O _{0.49}				

<i>B. propionicifaciens</i>					
Gewichtsanteil	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]
Messung 1	8,45	40,1	6,24	0,38	29,17
Messung 2	8,37	40,09	6,19	0,39	28,12
Messung 3					28,5
Mittelwert:	8,41	40,10	6,22	0,39	28,65
Gewicht [g]	0,0841	0,4010	0,0622	0,0039	0,2865
Stoffmenge [mol]	0,0060	0,0334	0,0617	0,0001	0,0179
Anteil an Summenformel	0,18	1,00	1,85	0,00	0,54
Formel	C ₁ H _{1.85} O _{0.54}				

<i>Dygonomonas gadei</i> BGG-A1					
Gewichtsanteil:	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]
Messung 1	10,32	44,61	6,78	0,39	30,30
Messung 2	10,33	44,55	6,84	0,38	28,53
Messung 3					26,92
Mittelwert:	10,33	44,58	6,81	0,39	28,58
Gewicht [g]	0,1033	0,4458	0,0681	0,0039	0,2858
Stoffmenge [mol]	0,0074	0,0371	0,0676	0,0001	0,0179
Anteil an Summenformel	0,20	1,00	1,82	0,00	0,48
Formel	C ₁ H _{1.82} O _{0.48}				

Tabelle A17: Zusammenfassung des Sequenzabgleichs des Plasmides pG106_np_mutA_scpA. Die Sequenz des konstruierten Plasmids wurde mit der DNA-Sequenz der aus *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA und *P. vulgatus* pG106_np_mutA_scpA isolierten Plasmide verglichen. Es wurden 4 Primer verwendet, mit denen jeweils 4 Sequenzen ermittelt werden konnten.

Primer	Sequenz Nr.	Abschnitt [bp]	Organismus	Diskrepanz [bp]	Lücken [bp]
CD07_fw	1	9004 -10126	<i>E. coli</i>	0	0
			<i>P. vulgatus</i>	4	0
CD07_rv	2	12715 - 13739	<i>E. coli</i>	1	1
			<i>P. vulgatus</i>	0	0
CD22_fw	3	48 -1004	<i>E. coli</i>	3	1
			<i>P. vulgatus</i>	3	4
CD22_rv	4	8061-9362	<i>E. coli</i>	0	257
			<i>P. vulgatus</i>	0	0

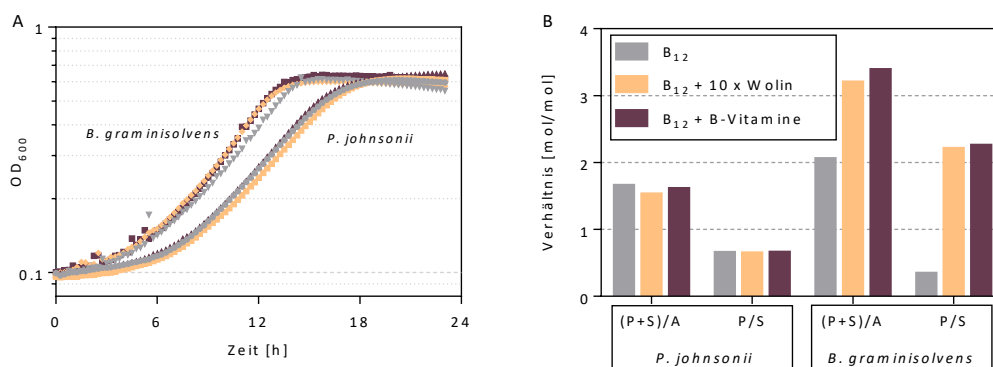


Abbildung A1: Einfluss der Vitaminzusammensetzung auf Wachstum und Produktverhältnisse von *P. johnsonii* und *B. graminisolvans*. Kulturen wurden bis zur stationären Phase bei 37 °C in DMMG mit 20 ng/ml B₁₂ im Plattenleser inkubiert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Das Medium enthielt entweder nur B₁₂ oder zusätzlich Wolin bzw. B-Vitamin Lösungen (Absatz 3.2.1). Ein biologisches Replikat. P, Propionat; S, Succinat; A, Acetat.

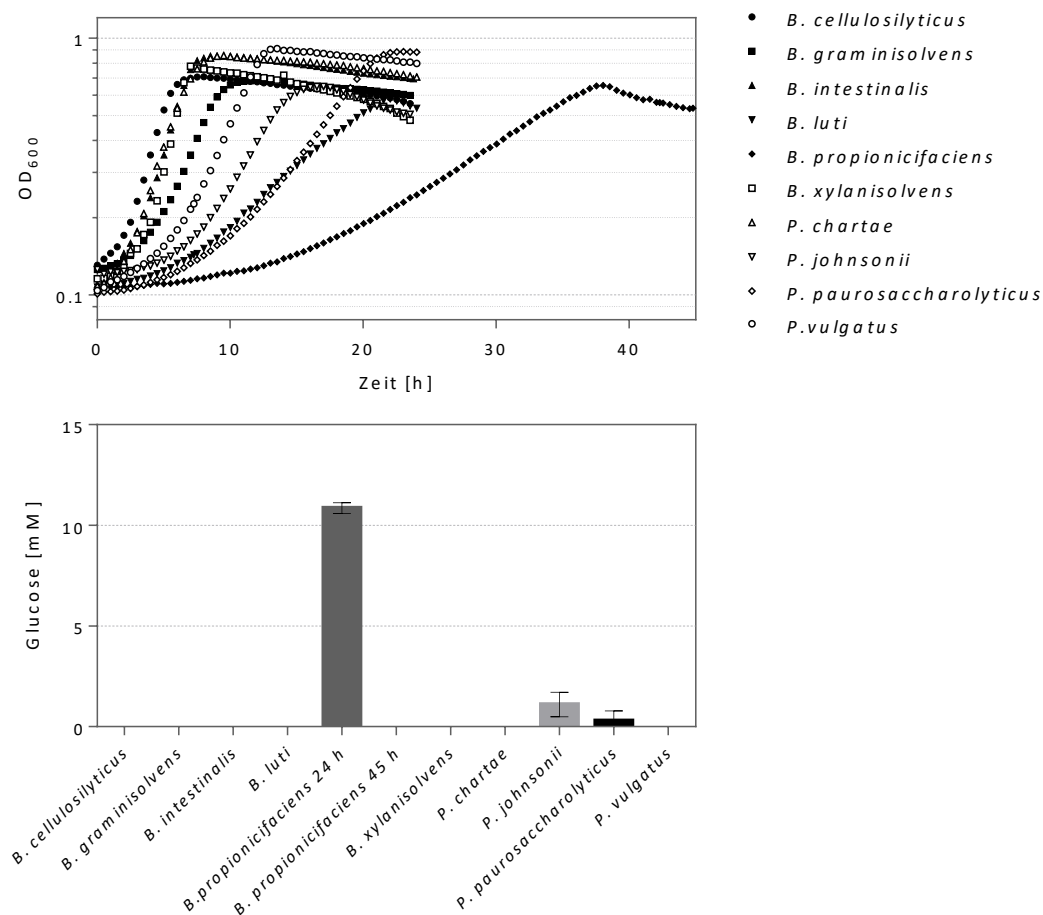


Abbildung A2: Wachstumskurven und Rest-Glucose der 10 *Bacteroidota* Stämme in DMMG. Die Kulturen wurden 24 bzw. 48 h (*B. propionificaciens*) in DMMG kultiviert (Gasatmosphäre: N₂/CO₂/H₂; ~80 %/ ~20 %/ max. 4 %; v/v). Im Anschluss wurde die Glucose Konzentration mittels HPLC bestimmt.

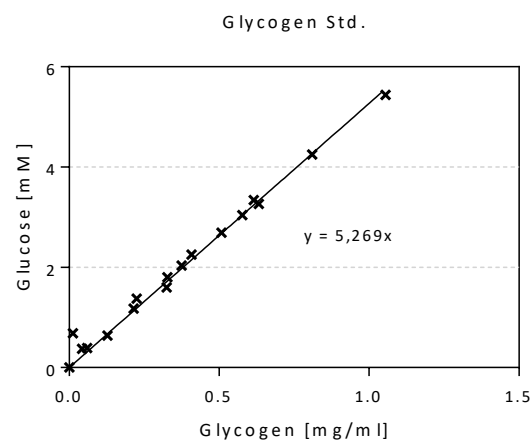


Abbildung A3: Glucosegehalt in Glykogen aus Rinderleber. Es wurden jeweils zwischen 0 und 2 mg Glykogen aus Rinderleber abgewogen und in 2 ml H₂O_{dest.} gelöst. Anschließend wurde Glykogen mittels HCl hydrolysiert und die Glucosekonzentration mittels HPLC bestimmt.

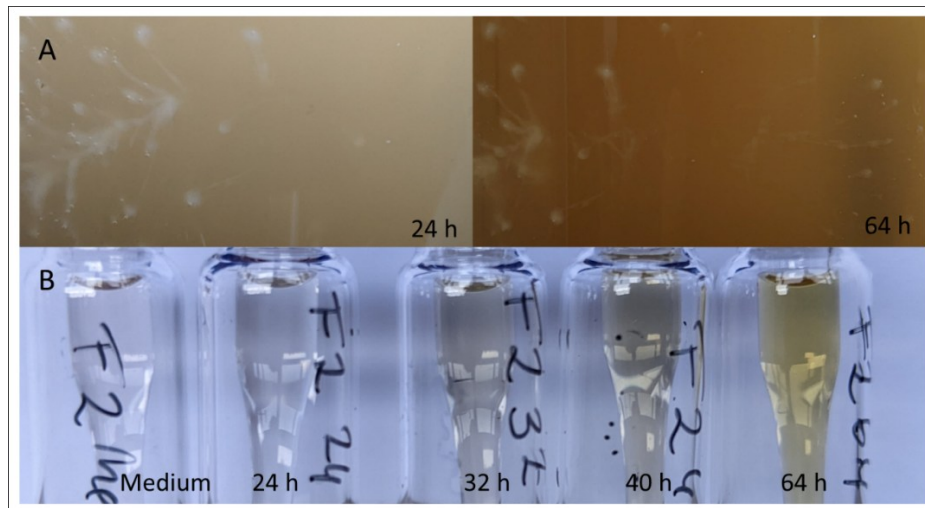


Abbildung A4: Verfärbung des Kulturüberstandes einer pH-kontrollierten Fed-Batch-Kultur von *B. graminisolvens*. *B. graminisolvens* wurde über 68 h in DMMG-H mit 1 g/l Hefeextrakt und der doppelten Konzentration an Nährstoffen unter automatischer Zufuhr von 2 M KOH bei einem pH von 7,0 inkubiert. A, Färbung der Kultur nach 24 und 68 h Inkubationsdauer; B, Färbung des Ursprungsmediums und des Kulturüberstandes zu verschiedenen Probezeitpunkten.

```
pG106 np mutA scpA.ape from 9004 to 10126
Alignment to
Eco_07fw.ape-- Matches:1123; Mismatches:0; Gaps:0 Pvu_07fw.ape-- Matches:1082; Mismatches:4; Gaps:0
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      F R R G T F E L E T G P S G R S D V Q L C A L K A Y D H D Y S N G T
      aaACGacgGCCagtGAAttcGAGctcGGTaccCGGggaTCctctAGAgtcGACctgCAGgcaTGCaagCTTggcGTaatcATAgctGTTccctG
9004>aaacgacggccagtgaaattcgagctcggtaccggggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttccctg>9103
E. coli: 1>AAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG>100
P. vu: 1>AAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG>100
      H F Q * G S V I G C L M R A P L M F H L
      TgtgAAAttgTTATccGCTcacAATtccACaacaCATacgAGCcggaAGcatAAAggtTAA
9104>tgtgaaattggttatccgctcacaattccacacacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaataagtgagtgagtaactcacattaat>9203
101>TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACTACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT>200
101>TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACTACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT>200
9204>tcgctgttcgctcactgcccgtcttccagtcgggaaacctgtcgtgcagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagagcggtttgctgattggg>9303
201>TGCCTTTCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGG>300
201>TGCCTTTCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCCTATTGGG>300
9304>cgctcttccgcttccctcgctcactgactcgctcgctcggtcggttcgctcgccgagcggtatcagctcactcaaaggcggtatacgggttatccacag>9403
301>CGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTGCGCTCGCGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAACGCTTATCCACAG>400
301>CGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTGCGCTCGCGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAACGCTTATCCACAG>400
9404>aatcgccgcaaaatgaattccccctcactcagcccaacaatttgaaaactattatttcatgattcctatttattttgcaatatccactttgcaataa>9503
401>AATCGCGCAAAATTAATGAATTCCTCTCACTCAGCCCAACAATTTGAAAACCTATTATTTTCATGATTCTTATTATTGCAATATCCACTTTGCAATAA>500
401>AATCGCGCAAAATTAATGAATTCCTCTCACTCAGCCCAACAATTTGAAAACCTATTATTTTCATGATTCTTATTATTGCAATATCCACTTTGCAATAA>500
9504>gaacatcttttatttttgcctcacttaacaaaatgacagaaacctcttctcctttatgaaaatagctaaaaaaaggattctattttaaagggttttagta>9603
501>GAACATCTTTTATTTTCGCTCACTTAACAAAATGACAGAAACCTCTCTTCTCCTTTATGAAAATAGCTAAAAAAGGATTCTATTAAAAAGGTTTtagta>600
501>GAACATCTTTTATTTTCGCTCACTTAACAAAATGACAGAAACCTCTCTTCTCCTTTATGAAAATAGCTAAAAAAGGATTCTATTAAAAAGGTTTtagta>600
      M A D S K E K L F S D F
      ATGgcaGATagtAAAgagAAActcTTTtcgGACttcC
9604>tatttgcctgactattgaaaaagtgatgtatataattcttaaatattaataccgaataaactatgagcagatagtaagagaaactcttttcggacttcc>9703
601>TATTTCGCCGCTACTATTGAAAAAGTATGTATATAATTCTTAAATATTAATACCGAATAAACTATGGCAGATAGTAAAGAGAACTCTTTTCGGACTTCC>700
601>TATTTCGCCGCTACTATTGAAAAAGTATGTATATAATTCTTAAATATTAATACCGAATAAACTATGGCAGATAGTAAAGAGAACTCTTTTCGGACTTCC>700
      P A V S T E Q W M E K I T A D L K G A D F E K K L V W R T N E G F K
      CAgcGTTtctACGgaaCAGtgATGgaaAGattACAgccGACTtgAAAggcGCTgatTTTgaaAAGaaaTTGgttTGgagaACCaacGAAGgtTTTaa
9704>cagccggttctacgggaacagtgatggaaagattacagccgacttgaaaggcgctgattttgaaaagaaattgggtttgggagaaacgaaggttttaa>9803
701>CAGCCGTTTCTACGGAACAGTGGATGGAAAAGATTACAGCCGACTTGAAAGGCGCTGATTTTGAAAAGAAATTGGTTTGGGAGAACCAACGAAGGTTTAA>800
701>CAGCCGTTTCTACGGAACAGTGGATGGAAAAGATTACAGCCGACTTGAAAGGCGCTGATTTTGAAAAGAAATTGGTTTGGGAGAACCAACGAAGGTTTAA>800
      V K P F Y R Q E D L E G L K T T E G L P G E F P Y V R G T K K N D
      aGTAAAAcCAAttTATcgCAGgaaGATctgGAAGgtTTGaaaACAactGAAGgaCTAccGGAgaaTTCCcctATgtAAGAggcACGaagAAAaacGAC
9804>agtaaaaccattttatcgccaggaagatctggaaggtttgaaaacaactgaaggactaccggagaaattccctatgtaagggcacgaagaaacgcag>9903
801>AGTAAACCATTTTATTCGCCAGGAAGATCTGGAAGGTTTGAACAACCTGAAGGACTACCCGGAGAATTCCCTATGTAAAGAGGCACGAAGAAAACGAC>900
801>AGTAAACCATTTTATTCGCCAGGAAGATCTGGAAGGTTTGAACAACCTGAAGGACTACCCGGAGAATTCCCTATGTAAAGAGGCACGAAGAAAACGAC>900
      N T W F V R Q E I K V E C P K E A N A K A L D I L N K G V D S L G
      aatACTtggTTCgtgCGTcagGAAatcAAAgtaGAAtgcCCTaaagAGGctAATgctAAAGcaCTGgatATTtGACaaAGGTgttGACtcaTTGggaT
9904>aataacttgggttcgtcgctcaggaatcaaatgagaatgccctaaaggcgctaatgctaaagcactggatatttgaacaaagggtgttgactcattgggt>10003
901>AATACTTGGTTCGTGCGTCAGGAAATCAAAGTAGAATGCCCTAAAGAGGCTAATGCTAAAGCACTGGATATTTGAAACAAGGTTTGACTCATTGGGAT>1000
901>AATACTTGGTTCGTGCGTCAGGAAATCAAAGTAGAATGCCCTAAAGAGGCTAATGCTAAAGCACTGGATATTTGAACAAGGTTTGACTCATTGGGAT>1000
      F Y V K K K D L S P E Y I E T L L N D I C A E C I E L N F S T C Q G
      TctacGTAaagAAGaaaGACctcAGTcctGAAtatATCgaaACAttaTTGaatGATatcTGtgcgGAAtgcATTgagTTAaacTTcctcACTtgcCAagg
10004>tctacgtaaagaagaagacctcagtcctgaatatatcgaaacattattgaatgatatctgtgcggaatgcattgagttaaacttctccacttgccaagg>10103
1001>TCTACGTAAAGAAGAAAGACCTCAGTCTGAATATATCGAAACATTATTGAATGATATCTGTGCGGAATGCATTGAGTTAACTCTCCACTTGGCAAGG>1100
1001>TCTACGTAAAGAAGAAAGACCTCAGTCTGAATATATCGAAACATTATTGAATGATCTGTGCGGAATGCATTGAGTTAACTTC~~~~~>1086
      H T V E L A K
      aCATacgGTGgaaTTAgcAAAT
10104>acatacgggtggaattagccaaat>10126
1101>ACATACGGTGGAAATTAGCCAAAT>1123
1086>~~~~~>1086
```

Abbildung A5: Sequenzabgleich der Sequenz 1 (Primer CD07_fw) aus den Plasmiden des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA und *P. vulgaris* ATCC824 pG106_np_mutA_scpA mit der Sequenz des Plasmids pG106_np_mutA_scpA.

```
Mon Sep 09, 2024 8:11 CEST
pG106_np_mutA_scxA.ape from 12715 to 13739
Alignment to
Pvu_07rv.ape-- Matches:1025; Mismatches:0; Gaps:0 Eco_07rv.ape-- Matches:1018; Mismatches:3; Gaps:1
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
-----A R N T Q I Y I Q E E T Y V C K N V
-----GCAGctAATactCAGattTATattCAGgaaGAAacaTATgttTGCaagAACgtg
12715>~~~~~gcacgtaataactcagatttatattcaggaagaacatatgtttgcaagaacgtg>12768
P. vu. 1094<ATTGGATGAGGCAATTGCATGCCCACCGACTCTTTGCCAGTATGGCAGCTAATACTCAGATTTATATTCAGGAAGAAACATATGTTTGAAGAACGTG<995
1039<~~~~~GTAATACTCAGATTTATATTCAGGAAGAAACATACCTTTGCAAGAACGTG<990
E. coli
      D P W G- G S Y Y V E S L T N E L A H K A W E H I Q E I E S L G G M
      GACccaTGGgg-tGGTtctTACTatGTAgaaCTTtaACTTaacGAActgGCTocAAAGctTGGgaaCATattCAGgaaATTgaaAGcttGGCggtATG
12769>gaccatgggg-tggttcttactatgtagaatctttaactaacgaactggctcacaaggcttgggaacataattcaggaattgaaagcttggcggtatg>12867
994<GACCCATGGGG-TGGTTCCTTACTATGTAGAATCTTTAACTAACGAAGCTGGCTCACAAGGCTTGGGAACATATTTCAGGAAATTGAAAGCTTGGCGGTATG<896
989<GACCCATGGGG-TGGTTCCTTACTATGTAGAATCTTTAACTAACGAAGCTGGCTCACAAGGCTTGGGAACATATTTCAGGAAATTGAAAGCTTGGCGGTATG<890
      A K A I E T G V P K M R I E E A A A R T Q A R I D S G A Q T I V G
      gcgAAAgctATCgaaACCGgaGTAcccAAAatgCGTattGAAGaaGCTgCGCagTACTcagGCCcgtATCgacTCCggtGCCcagACAattGTAggca
12868>gcgaaagctatcgaaacggagtagcccaaaatgcgtattgaagaagctggcgacgtactcagggccgtatcgactccggtgccagacaattgtaggca>12967
795<CGAAGCTATCGAAACCGGAGTACCCAAAATGCGTATTGAAGAAGCTGCGGCACGTACTCAGGCCCGTATCGACTCCGGTGCCAGACAATTGTAGGCA<796
889<GCGAAAGCTATCGAAACCGGAGTACCCAAAATGCGTATTGAAGAAGCTGCGGCACGTACTCAGGCCCGTATCGACTCCGGTGCCAGACAATTGTAGGCA<790
      T N K Y R L E K E D P I D I L E V D N T A V R L E Q I E N L K R L K
      CTAacAAAatCGTttgGAAAAAGGatCCTatcGATatcCTTgaaGTAgacAAATacaGCTgtACGTttgGAAcaaATTgaaATctgAAGcgtTTGaa
12968>ctaaacaatatcggttggaaaaagaggatcctatcgatactcttgaagtagacaatacagctgtacgtttggaacaaattgaaatctgaagcgtttgaa>13067
795<CTAACAAATATCGTTTGGAAAAAGAGGATCCTATCGATATCCTTGAAGTAGACAATACAGCTGTACGTTTGGAAACAAATTGAAATCTGAAGCGTTTGAAG<696
789<CTAACAAATATCGTTTGGAAAAAGAGGATCCTATCGATATCCTTGAAGTAGACAATACAGCTGTACGTTTGGAAACAAATTGAAATCTGAAGCGTTTGAAG<690
      E G R N Q A E V D K A L A A I T E C V K T G K G N L L E L A V E A
      aGAAggcCGCaatCAAGcaGAAGtaGACaaGCTttgGCAgCtATCaccGAAtgtGTAAagACAggtAAAgcAATttgCTGgaaCTGgctGTAgagGCA
13068>agaaggccgcaatcaagcagaagtagacaagctttggcgagccatcacccgaatgtgtaagacaggtaaaggcaatttgcgtggaactggcgttagaggca>13167
795<AGAAAGCCGCAATCAAGCAGAAGTAGACAAAGCTTTGGCAGCCATCACCGAATGTGTAAAGACAGGTAAAGGCAATTGCTGGAACCTGGCTGTAGAGGCA<596
689<AGAAGGCCGCAATCAAGCAGAAGTAGACAAAGCTTTGGCAGCCATCACCGAATGTGTAAAGACAGGTAAAGGCAATTGCTGGAACCTGGCTGTAGAGGCA<590
      A H V R A T L G E I S D A C E T I V G R Y K A V I R T I S G V Y S
      gctCATgtcCGTgctACcttggGcgagATTtgcGATgctTGTgaaACAattGTAggaCGTtataAAgcaGTAatcAGAactATAtacAGCGgtGTACTcaT
13168>gctcatgtccgtgctaccttggcgagatttgcgatgcttgtgaaacaattgtaggacgttataaagcagtaatacagaactatcagcggtgactcat>13267
595<GCTCATGTCCGTGCTACCTTGGCGGAGATTTCGGATGCTTGTGAAACAATTGTAGGACGTTATAAAGCAGTAATCAGAACTATATCAGGCGGTACTCAT<496
589<GCTCATGTCCGTGCTACCTTGGCGGAGATTTCGGATGCTTGTGAAACAATTGTAGGACGTTATAAAGCAGTAATCAGAACTATATCAGGCGGTACTCAT<490
      S E S K K D T D F A R A C E L T E E F A K K E G R R P R I M I A K M
      CAgaaAGTaaaAGGatACAgacTTCgcaAGAGctTGCgaaCTGaccGAAGaaTTTgcaAAAGagGAAGgcCGCgctCCGgctATCatgATTgccAAGat
13268>cagaaagtaaaaggatagacagacttcgcaagagcttgcgaactgaccgaagaatttgcgaagaaggaaggccgctccgctatcatgattgccaaagt>13367
495<CAGAAAGTAAAAAGGATACAGACTTCGCAAGAGCTTGCAGACTGACCGAAGAAATTGCAAGAGAGGAAGGCCGCGCTCCGCTATCATGATTGCCAAGAT<396
489<CAGAAAGTAAAAAGGATACAGACTTCGCAAGAGCTTGCAGACTGACCGAAGAAATTGCAAGAGAGGAAGGCCGCGCTCCGCTATCATGATTGCCAAGAT<390
      G Q D G H D R G A K V V A T G Y A D C G F D V D M G P L F Q T P A
      gGGAacgGACggaCACgacCGTggtGCaaaGTAgttGCAacaGGTtatGCCgacGTGgttTCgacGTAgatATGggaCCgttgTTccaaACTcctGCC
13368>gggacaggacggacacgacgacctggtgcaaaagtagttgcaacaggttatgccgactgtggttccgactagatatgggacctgtgtccaaactcctgcc>13467
395<GGACAGGACGACAGCAGACCGTGGTGCAAAAGTAGTTGCAACAGGTTATGCCGAGTGTGGTTTCGACGTAGATATGGGACCGTGTGTCCAACTCCTGCC<296
389<GGGACAGGACGACACGACCGTGGTGCAAAAGTAGTTGCAACAGGTTATGCCGACTGTGGTTTCGACGTAGATATGGGACCGTGTGTCCAACTCCTGCC<290
      E A A R D A V E N D V H V V G V S S L A A G H K T L I P Q I I E E
      gaaGCTgctCGTgacGCAgtGAAaatGACgttCATgtAGTAggtGTTtctTCAttgGCTgcccGGAcacAAGacACTGatCCGcagATTattGAAGaaT
13468>gaagctgctcgtgacgagcagtggaatgacgttcatgtagtaggtgttcttcttattggtgctgcccagacacaagacactgatcccgagattatgaagaat>13567
295<GAAGCTGCTCGTGACGACGTGGAATGACGTTTCATGTAGTAGGTTTCTTTCATTGGCTGCCGACACAGACACTGATCCCGCAGATTATTGAAGAAT<196
289<GAAGCTGCTCGTGACGACGTGGAATGACGTTTCATGTAGTAGGTTTCTTTCATTGGCTGCCGACACAGACACTGATCCCGCAGATTATTGAAGAAT<190
      L K K L G R E D I L V I A G G V I P A Q D Y D F L Y K A G V V A I F
      TaaagAAAttaGGTcgtGAAGatATTtGTcATcGCCggtGGTgttATCcccGCTcaaGACTatGACttcTTAtacAAGGcaGGTgttGTAgcaATCtt
13568>taaagaaattaggtcgtgaagatatatttgggtcatcgccggtggtgttatccccgctcaagactatgacttcttatacaaggcaggtgtttagcaaatcct>13667
195<TAAAGAAATTAGTCTCGTGAAGATATTTTGGTCATCGCCGGTGGTGTATCCCCGCTCAAGACTATGACTTCTTATACAAGGAGGTTGTGTAGCAATCTT<96
189<TAAAGAAATTAGTCTCGTGAAGATATTTTGGTCATCGCCGGTGGTGTATCCCCGCTCAAGACTATGACTTCTTATACAAGGCAAGTGTGTAGCAATCTT<90
      G P G T S V A K A A V Q I M D I L L D E E E *
      cGGTcccGGAactTCTgttGCCaaaGCAgctGTTcagATTatgGACattTTActgGACgaaGAGgaaTAA
13668>cgggtcccggaaacttctgttggccaaagcagctgttcagattatggacatttactggacgaagaggaataagc~~~~~>13739
95<CGGTCCCGGAACCTCTGTGTCGCAAGCAGCTGTTcagATTatgGACattTTActgGACgaaGAGgaaTAA
89<CGGTCCCGGAACCTCTGTGTCGCAAGCAGCTGTTcagATTatgGACattTTActgGACgaaGAGgaaTAAAGGATCCCAATTGAGTGAT~~~~~<1
```

Abbildung A6: Sequenzabgleich der Sequenz 2 (Primer CD07_rv) aus den Plasmiden des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scxA und *P. vulgatus* ATCC824 pG106_np_mutA_scxA mit der Sequenz des Plasmids pG106_np_mutA_scxA.

```
Mon Sep 09, 2024 8:23 CEST
pG106 np mutA scpA.ape from 48 to 1004
Alignment to
Eco_22fw.ape-- Matches:832; Mismatches:3; Gaps:1 Pvu_22fw.ape-- Matches:953; Mismatches:3; Gaps:4
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
48>~~~~~aacaagtcaa-gggtgtttt-ggcac-gaagttaacgccaagacaatagcccgattgctattgcgagaatgttctagtgtttcatagctg>135
E. coli:1>~~~~~TACAGTCAA-GGTTGTTT-GGCAC-GAAGTTAACGCCAAGACAATAGCCCGATTGCTATTGCGCAGAATGTTCTAGTTTTCATAGCTG>87
P. vu: 1>TTGGGCTTTAACAAGTCAAAGTTGTTTGGCACGAAGTTAACGCCAAGACAATAGCCCGATTGCTATTGCGCAGAATGTTCTAGTTTTCATAGCTG>100

136>cttaggttttagtgttttgaattcaagataaagctctcttaagaggttgcttaccgcaagataaagaattgcaaaaaatatgcaatacctactgtt>235
88>CTTAGGTTTAGTGTTTGTATTCAAGATAAGTCTCTCTTAAGAGGTTGTCTTACCGCCAAGATAAAGAATTGCAAAAAATATATGCAATACCTACTTGT>187
101>CTTAGGTTTAGTGTTTGTATTCAAGATAAGTCTCTCTTAAGAGGTTGTCTTACCGCCAAGATAAAGAATTGCAAAAAATATATGCAATACCTACTTGT>200

236>gcgatattcttgggttttctcccaaaaaatcaaccccaaaatgacgtagaacgatgacgcagaaggaggtctcaaaaaacctccttacctttgtaccaca>335
188>GCGATATTCTTTGTTTCTTCCCAAAAAATCAACCCCAAAATGACGTAGAACGATGACGCAGAAGGAGGTCTCAAAAAACCTCCTTACCTTTGTACCACA>287
201>GCGATATTCTTTGTTTCTTCCCAAAAAATCAACCCCAAAATGACGTAGAACGATGACGCAGAAGGAGGTCTCAAAAAACCTCCTTACCTTTGTACCACA>300

336>agtggggattttacttcattgataatatagcccccccgatgaatttttggggagcgtagcgagccaaaaattccaccccaaatgacgtagaaggaggt>435
288>AGTGGGGATTTTACTTCATTGATAATATACGCCCCCGTATGAATTTTGGGGAGCGTAGCGAGCCAAAAATCCACCCAAATGACGTAGAAGGAGGT>387
301>AGTGGGGATTTTACTTCATTGATAATATACGCCCCCGTATGAATTTTGGGGAGCGTAGCGAGCCAAAAATCCACCCAAATGACGTAGAAGGAGGT>400

436>ctcaaaaaatcctccttatcttgggtgccacaagtggcaaaaaaaatatattgataatatatgcccccgatgatgttttggggagcggaagcgacacca>535
388>CTCAAAAAATCCTCTTATCTTTGTGCCACAAGTGGCAAAAAAAATATATTGATAATATATGCCCCCGTATGATTTTGGGGAGCGAAGCGACACCA>487
401>CTCAAAAAATCCTCTTATCTTTGTGCCACAAGTGGCAAAAAAAATATATTGATAATATATGCCCCCGTATGATTTTGGGGAGCGAAGCGACACCA>500

536>aaaaatcaccccaaaatgacgtagaaggaggtctcaaaaaatcctccttatcttgggtgccacaagtggcaaaaaaaatatattgataatatatgcccccg>635
488>AAAAATCACCCCAAAATGACGTAGAAGGAGGTCTCAAAAAATCCTCTTATCTTTGTGCCACAAGTGGCAAAAAAAATATATTGATAATATATGCCCCCG>587
501>AAAAATCACCCCAAAATGACGTAGAAGGAGGTCTCAAAAAATCCTCTTATCTTTGTGCCACAAGTGGCAAAAAAAATATATTGATAATATATGCCCCCG>600

      M T D N S N I S H D V F L S
      ATGactGATaatTCTaatATTtctCACgatGTTtttCTCtc
636>tatgatgttttggggagcgaagcgacaccccaaaatcaccccaaaatgacgtagaacgatgactgataattctaattttctcacgatgttttctctc>735
588>TATGATTTTGGGGAGCGAAGCGACACCAAAAAATCACCCCAAAATGACGTAGAACGATGACTGATAATTCTAATATTTCTCACGATGTTTTCCTCTC>687
601>TATGATTTTGGGGAGCGAAGCGACACCAAAAAATCACCCCAAAATGACGTAGAACGATGACTGATAATTCTAATATTTCTCACGATGTTTTCCTCTC>700

      K N L Y L E S N E T F E Y R S L K P F E F F Q I I F G S C D H N D
      tAAAAaTTAtacTTAgagAGTaagGAGaccTTTgaaTATcgaTCTcttAAAcccTTTgagTTCttcCAaataATCttGGTtctTGTgacCATaatGAC
736>taaaattttatacttagagagtaaatgagaccttgaatatcgatctcttaaaccctttgagttcttccaaataatcttgggttcttgtgaccataatgac>835
688>TAAATTTTATACTTAGAGAGTAATGAGACCTTTGAATATCGATCTCTTAAACCTTTGAGTTCCTCCAATAATCTTTGGTCTTGTGACCATAATGAC>787
701>TAAAAATTTATACTTAGAGAGTAATGAGACCTTTGAATATCGATCTCTTAAACCTTTGAGTTCCTCCAATAATCTTTGGTCTTGTGACCATAATGAC>800

      P Q C P I Y P F E K E L C Q E Y I D W R A Q Q A G R K S K S K A G
      ccgCAatgcCCTatcTATcctTTTgaaAAAgagCTGtgcCAAGaaTACatcGATtggAGGgctCAAcagCAgggAGAAgTCTaagTCCaaaGCaggTA
836>ccgcaatgccttatctatccttttgaagagagctgtgccaagaatacatcgattggagggctcaacaagcagggagaaagtctaagtcacaaagcaggt>935
788>CCGCAATGCCCTATCTATCTTTTGAAGAGAGCTGTGCCAAGAATAC~~~~~>835
801>CCGCAATGCCCTATCTATCTTTTGAAGAGAGCTGTGCCAAGAATACATCGATTGGAGGCTCAACAAGCAGGGAGAAAGTCTAAGTCCAAGCAGGT>900

      K K A I Y N P A Q P F R Y N A L V Q A V Y S V
      AGaaaGCAatcTATaatCCAgctCAAcctTTCcgcTATaatGCTtggTGcaaGCTgtcTACagcGTAag
936>agaaagcaatctataatccagctcaacctttccgctataatgcttgggtgcaagctgtctacagcgtag>1004
835>~~~~~>835
901>GAAAGCAATCTATAATCCAGCTCAACCTTTCCGCTATAATGCTTTGGTGCAAGCTGTCTACAGCGTAG>968
```

Abbildung A7: Sequenzabgleich der Sequenz 3 (Primer CD22_fw) aus den Plasmiden des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA und *P. vulgaris* ATCC824 pG106_np_mutA_scpA mit der Sequenz des Plasmids pG106_np_mutA_scpA.

Mon Sep 09, 2024 8:39 CEST

pG106_np_mutA_scpA.ape from 8061 to 9362

Alignment to

Pvu_22rv.ape-- Matches:855; Mismatches:0; Gaps:0 Eco_22rv.ape-- Matches:1045; Mismatches:0; Gaps:257

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
8061>~~~~~aaacaaataggggttcgcgcacatttccccgaaaagtgcacctgacgtcgggttcgtgtagactttccttggtgt>8138
E. coli: 1<~~~~~<1
P. vu: 1089<TTTGAATGTATTAGAAAAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCTCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCCGGTTCGTGTAGACTTTCCTTGGTGTA<990

8139>tccaacggcgtcagccggcaggataggtgaagtaggccacccgcgagcgggtgttccttcttcactgtcccttattcgcacctggcgggtgtcacaagg>8238
1<~~~~~<1
989<TCCAACGGCGTCAGCGGGCAGGATAGGTGAAGTAGGCCACCGCGAGCGGGTGTCTTCTTCACTGTCCTTATTTCGACCTGGCGGTGCTCAACGG<890

8239>gaatcctgctctgcgaggtggcggctaccgccggcgtaacagatgagggcaagcggatggctgatgaaaccaagccaaccaggaagggcagcccacct>8338
1<~~~~~<1
889<GAATCCTGCTCTCGAGGCTGGCCGGCTACCGCCGGCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGATGGCTGATGAAACCAAGCCAACAGGAAGGGCAGCCACCT<790

8339>atcaaggtgtactgcctccagacgacgtcgggttcgtgtagactttccttgggtgtatccaacggcgtcagccggcaggataggtgaagttagggccacc>8438
1<~~~~~<1
789<ATCAAGGTGTACTGCCTTC~~~~~<770

8439>cgcgagcgggtgttccttcttcactgtcccttattcgcacctggcgggtgtcacaagggaatcctgctctgcgagggtggcggctaccgccggcgtaaca>8538
855<~~~~~TGCAGGCTGGCCGGCTACCGCCGGCGTAACA<824
770<~~~~~<770

8539>gatgagggcaagcggatggctgatgaaaccaagccaaccaggaagggcagcccacctatcaaggtgtactgcctccagacgacgtcttagctctgctga>8638
823<GATGAGGGCAAGCGGATGGCTGATGAAACCAAGCCAACAGGAAGGGCAGCCACCTATCAAGGTGTACTGCCTTCCAGACGACGCTTAGCTGTGCTGA<724
769<~~~~~AGACGAGCTCTTAGCTGTGCTGA<747

8639>tatgggcttcgcctagaggagtgatggactcccgagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgcccggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcg>8738
723<TATGGGCTTCGCCTAGAGGAGTGATGGACTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGGCTCAGCG<624
746<TATGGGCTTCGCCTAGAGGAGTGATGGACTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGGCTCAGCG<647

      H P T F Y R V S A Y
      ATGcggTGTgaaATAccgCACagaTGCgtaA
8739>ggtgttggcgggtgtcggggctggcctaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgacccatattgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaa>8838
623<GGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAA<524
646<GGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAA<547

      P S F V A D P A M R W E P Q A V T P F P S R H P G R R * * A L Q R F
      GGagaAAAtacCGCAtcAGGcgCAttcgCCAttcAGGctgCGCaacTGTtggGAAGggCGAtcGtGcggGCCctctTCGctaTTAcgcCAGctgGCGaa
8839>ggagaaaataccgcatacggcgccattcgccattcaggtctgcgcaactgttgggaagggcgatcgggtcggggcctcttcgctattacgccagctggcgaa>8938
523<GGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTACAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA<424
546<GGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTACAGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA<447

      P S T S C P S * T P Y R W P K G L * S T T F R R G T F E L E T G P
      aGGGggaTGtGtGCAaggCGAttaAGTtggGTAacgCCAgggTTTTccCAGtcaCGAcgtTGTaaaACGacgGCCagtGAAttcGAGctcGGTaccCGG
8939>agggggatgtgctgcaagcgattaaagtgggtaacggcagggttttccagtcacgacgttgtaaaaacgacggccagtgaaatcgagctcggtaccgg>9038
423<AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGG<324
446<AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGG<347

      S G R S D V Q L C A L K A Y D H D Y S N G T H F Q * G S V I G C L
      ggaTCCtctAGAgtcGACctgCAGgcaTGAagCTTggtGTAatcATGgtcATAgctGTTtccTGtGtGAAAttgTTAtccGCTcacaATtccACaacaC
9039>ggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaaC>9138
323<GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGGTAATCATAGGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAC<224
346<GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCGGTAATCATAGGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAC<247

      M R A P L M F H L
      ATacgAGCcggaAGcatAAAgtgTAA
9139>atacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaagtgtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaa>9238
223<ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA<124
246<ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA<147

9239>acctgtcgtccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagagcggttttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcg>9338
123<ACCTGTCTGTCGACGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCG<24
146<ACCTGTCTGTCGACGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCG<47

9339>ctcggtcgttcggctgcggcgagc~~~~~>9362
23<CTCGGTCGTTCCGGTGCGGCGAG~~~~~<1
46<CTCGGTCGTTCCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGC<1
```

Abbildung A8: Sequenzabgleich der Sequenz 4 (Primer CD22_rv) aus den Plasmiden des Stammes *E. coli* S17-1 pG106_np_mutA_scpA und *P. vulgatus* ATCC824 pG106_np_mutA_scpA mit der Sequenz des Plasmids pG106_np_mutA_scpA.

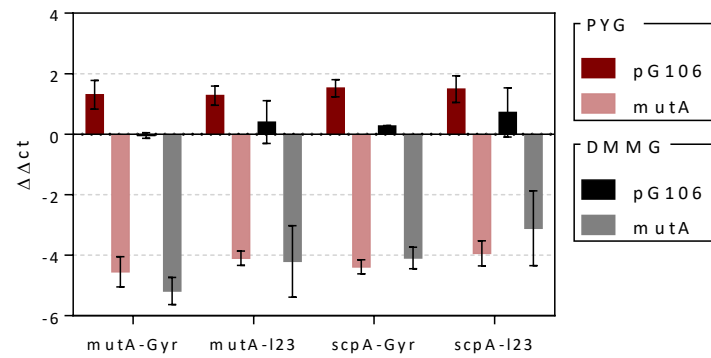


Abbildung A9: Relative Transkriptabundanz der Gene *mutA* und *scpA* in *P. vulgatus* pG106 und pG106_np_mutA_scpA im Vergleich zum Wildtyp. Zellen wurden in DMMG und PYG bei 37 °C inkubiert und in der exponentiellen Phase geerntet (Gasatmosphäre: N₂/CO₂; 80 %/20 %; v/v). Es wurden qPCR-Reaktionen mit den Primern CD15_fw und CD15_rv (*mutA*) sowie CD16_fw und CD16_rv (*scpA*) durchgeführt. Als Referenzgen dienten *gyrA* und *l23* aus *P. vulgatus*. Zellen von *P. vulgatus* ATCC 8284 waren Referenz-Kulturen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carolin Döring
Geburtsdatum: 12.06.1993
Geburtsort: Rostock

Akademischer Werdegang

Seit 09/2023 **Studium der Humanmedizin**, Universität Rostock

Seit 03/2020 **Doktorandin**: Abteilung für Mikrobiologie, MNF, Universität Rostock

2017 – 2019 **Masterstudium**: Mikrobiologie und Biochemie, Universität Rostock

2014 – 2017 **Bachelorstudium**: Biowissenschaften, Universität Rostock

Forschungstätigkeit

Doktorandin der Mikrobiologie (03/2020 – 09/2023):

Abteilung Mikrobiologie, Prof. Dr. Mirko Basen, MNF, Universität Rostock

Thema: „Physiologie, Genetik und Isolierung Propionat bildender Bakterien aus dem Phylum *Bacteroidota*“

Masterarbeit Mikrobiologie (04/2019 – 09/2019):

Abteilung Mikrobiologie, Prof. Dr. Hubert Bahl, MNF, Universität Rostock

Thema: „Sporenanalyse von *Clostridium difficile* mittels Durchflusszytometrie“

Abschlussnote 1,3; GBM-Masterpreis und Institutspreis der Biowissenschaften

Studentische Hilfskraft im Projekt „Card-ii-Omics“ (11/2017 – 03/2019)

Bachelorarbeit Mikrobiologie (04/2017 – 07/2017):

Abteilung Mikrobiologie, Prof Dr. Hubert Bahl, MNF, Universität Rostock

Thema: „Wachstum und Produktbildung einer aerotoleranten Mutante von *Clostridium acetobutylicum* unter oxidativem Stress in einem Chemostat“

Abschlussnote 1,8

Veröffentlichung

Döring, C.; Basen, M. (2024): Propionate production by *Bacteroidia* gut bacteria and its dependence on substrate concentrations differs among species. In: Biotechnology for Biofuels and Bioproducts 17 (1), S. 95. DOI: 10.1186/s13068-024-02539-9.

Konferenzbeiträge

Poster-Präsentation – VAAM-Jahrestagung 2023 (12.09.2023): “Evaluating the potential for biotechnological propionate production in *Bacteroidetes*”

ePoster-Präsentation - Digitale VAAM-Jahrestagung 2022 (22.02.2022): “Gut Bacteria for Biotechnology: Developing a cultivation method for *Bacteroidetes* towards propionate production from polysaccharides” Poster 363

Poster-Präsentation - 6. gemeinsame Tagung der VAAM und DGHM 2020, Leipzig (09.03.2020):
“Flow Cytometric Analyzation and Quantification of *Clostridioides difficile* and its Spores”

Poster-Präsentation - Card-ii-omics Zwischenevaluierung Rostock (18.10.2019):
„Präklinische Studien mit biofunktionalisierten Herzklappen“

ePoster-Präsentation - VAAM-Jahrestagung 2018, Wolfsburg (16.04.2018):
“Product formation of an aerotolerant mutant of *Clostridium acetobutylicum* under oxidative stress”

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den

Carolin Döring

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg bis zur Abgabe dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Mirko Basen dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, an diesem tollen Forschungsprojekt mitzuwirken. Vielen Dank für die anregende Zusammenarbeit und deine Unterstützung.

Auch ein ganz großer Dank geht an die jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung Mikrobiologie (und Biochemie) der Universität Rostock: an Anne Haberberger, Manja Henneberg, Monika Timm, Ralf-Jörg Fischer, Claudia Rüter, Maria Lehmann, Lisa Engelhardt, Laura Nissen, Katja Bär, Benjamin Zeldes, Christoph Baum und Christoph Prohaska. Vielen Dank für die vielen Jahre der guten Zusammenarbeit. Ob im Labor oder in der Freizeit, beim Essen gehen, Doktorhut basteln oder die Nacht mit Zocken um die Ohren schlagen. Einige von euch begleiten mich nun schon seit meiner Bachelorarbeit und dank euch habe ich so viel gelernt, mich willkommen gefühlt und bin gerne zur Arbeit gegangen.

Auch möchte ich mich bei Julian Schwarzbauer und Kaja Beaujean bedanken, die als Hiwis auch Teil des Projektes waren und mich im Labor unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Sonja Elisabeth Kurrer bedanken. Seit dem wir das Mikrobiologie-Praktikum im Bachelorstudium zusammen bewältigt haben, haben sich unsere Wege immer wieder gekreuzt und ich freue mich, dass wir auch wieder bei diesem Projekt zusammenarbeiten konnten. Ich fand wir waren ein gutes Team, vielen Dank dafür.

Vielen Dank auch an meine tollen, schlaun und charismatischen Freundinnen Celine Engel und Felicitas Borchert. Ihr seid die Besten und habt mir so manches Mal Mut gemacht, wenn ich eigentlich keine Lust mehr hatte.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an meine Familie. Ich bin so froh euch zu haben. Danke, dass ihr mich immer in meinen Vorhaben unterstützt habt, auch jetzt, wo ich mit über 30 nochmal ein zweites Studium angefangen habe. Ihr habt mir immer das Gefühl gegeben das Richtige zu tun.

Zuletzt noch ein großes Danke an Johannes Platow, dafür dass du mir so manches Mal den Rücken freigehalten hast und das noch immer tust und mir mit deinen Ratschlägen zur Seite stehst. Zusammen können wir alles schaffen!