

## Mikrobielle Produktionssysteme

# *Vibrio natriegens* – eine neue Plattform für die Biotechnologie?

FELIX MÜLLER, BASTIAN BLOMBACH

PROFESSUR FÜR MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, TU MÜNCHEN,  
CAMPUS STRAUBING FÜR BIOTECHNOLOGIE UND NACHHALTIGKEIT, STRAUBING

High productivity is a crucial factor for biotechnological processes. *Vibrio natriegens* is the fastest growing non-pathogenic organism on our planet and therefore has the potential to speed-up industrial fermentation processes, cell free protein synthesis and routines in molecular biology.

DOI: 10.1007/s12268-019-0196-x  
© Springer-Verlag 2019

■ *Vibrio natriegens* (früher als *Pseudomonas natriegens* und *Beneckea natriegens* klassifiziert) wurde 1961 aus Schlamm der Salzmarische isoliert und ist ein marines, fakultativ anaerobes, Gram-negatives  $\gamma$ -Proteobakterium. *V. natriegens* wächst bevorzugt bei neutralem pH-Wert, hat ein Temperaturoptimum von 37 °C und benötigt Natrium als essenzielle Medienkomponente [1]. Das Bakterium weist

keine Pathogenitätsfaktoren auf, und seit 2013 ist seine gesamte Genomsequenz verfügbar [2]. In Komplexmedium bei niedriger Zelldichte wächst es mit einer minimalen differentiellen Generationszeit von 9,8 Minuten, die zweifach niedriger ist als die geringste Generationszeit von *Escherichia coli* mit 20 Minuten [3, 4]. Damit gehört *V. natriegens* zu den nicht-pathogenen Organismen mit der höchsten Wachs-

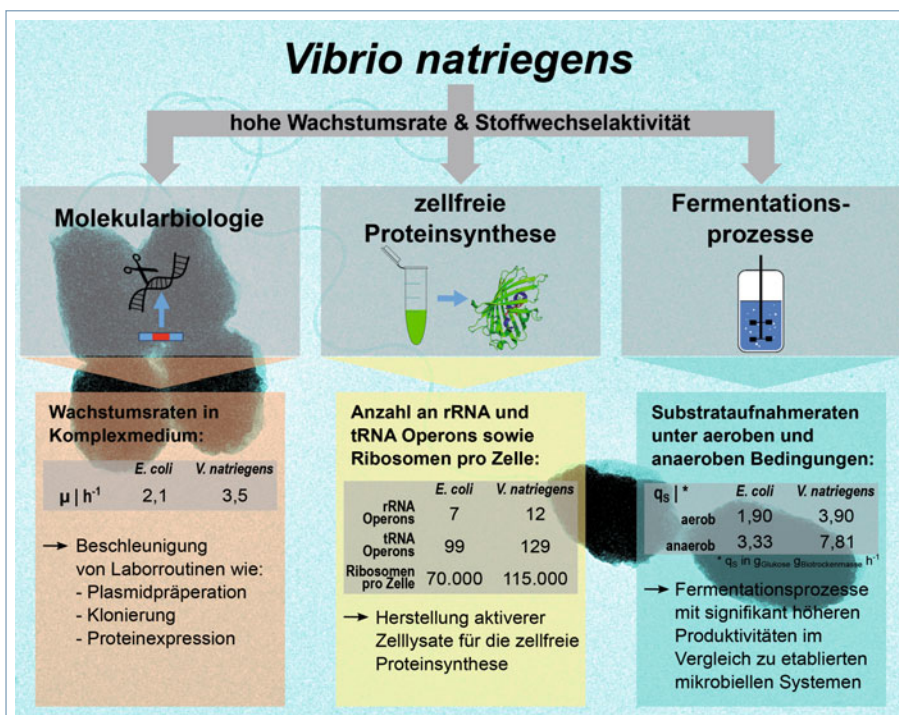
tumsrate auf unserem Planeten. Mehrere Forschergruppen zeigten kürzlich das Potenzial auf, diesen schnell wachsenden Organismus für die Molekularbiologie, die zellfreie Proteinsynthese und für industrielle Fermentationsprozesse zu nutzen (Abb. 1).

### *Vibrio natriegens* beschleunigt molekularbiologische Routearbeiten

Der rasante Fortschritt in der Molekularbiologie hat die gentechnische Zugänglichkeit von *V. natriegens* in nur wenigen Jahren ermöglicht. Standardmethoden wie die Transformation, Plasmidisolierung und Transposonmutagenese stehen zur Verfügung [2, 5]. (Induzierbare) Expressionssysteme und integrative Plasmide für markerlose chromosomale Modifikationen [2, 5] sowie multiplexe Genomeditierung mittels natürlicher Transformation [6] und funktionelle Genomanalysen mithilfe von CRISPRi (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference*) [7] wurden entwickelt und in *V. natriegens* erfolgreich eingesetzt. *V. natriegens* ist gut im Labor zu handhaben und weist zu *E. coli* vergleichbare Transformationseffizienzen auf. Aufgrund des schnelleren Wachstums von *V. natriegens* sind Kolonien bereits nach sechs Stunden auf Agarplatten sichtbar, und Plasmide können mit hoher Ausbeute nach nur drei Stunden Kultivierung isoliert werden. Daher hat *V. natriegens* das Potenzial, *E. coli* im Labor zu ersetzen, um übliche molekularbiologische Routinen, wie die Plasmidisolierung, die Klonierung und die Proteinproduktion, deutlich zu beschleunigen [2, 8].

### *Vibrio natriegens* als Basis für die zellfreie Proteinsynthese

Als Spiegelbild der hohen Wachstumsrate besitzt *V. natriegens* im Vergleich zu *E. coli* mehr rRNA-Operons, Gene für tRNAs und signifikant mehr Ribosomen pro Zelle (Abb. 1, [9]). Um die potenziell aktiveren Extrakte von *V. natriegens* für die zellfreie Proteinsynthese zu nutzen, optimierten mehrere Gruppen die Prozedur zur Extrakterstellung und die Reaktionsbedingungen für die zellfreie Proteinsynthese [9, 10]. Die bislang erreichte Proteinkonzentration von bis zu 1,6 g L<sup>-1</sup> ent-



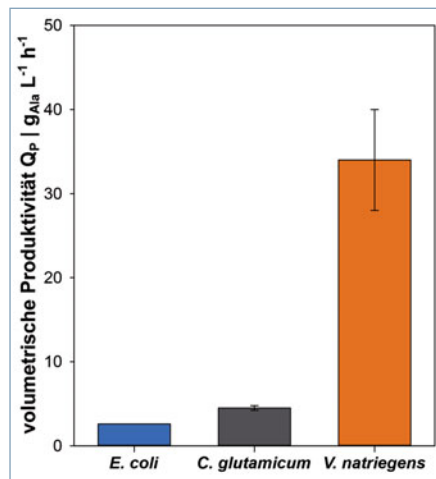
▲ **Abb. 1:** Die hohen Wachstums- und Stoffwechselraten von *Vibrio natriegens* sind eine exzellente Basis, um molekularbiologische Routinen, die zellfreie Proteinsynthese und industrielle Fermentationsprozesse signifikant zu beschleunigen [2, 4, 5, 9].

spricht derjenigen, die mit optimierten *E. coli*-Lysaten erzielt wurde [10]. Weitere Studien müssen wesentlich zur Aufklärung der Transkriptions- und Translationsmaschinerie beitragen, um das Potenzial von *V. natriegens* für diesen Anwendungsbereich voll ausschöpfen zu können.

### **Vibrio natriegens kann außergewöhnliche Produktivitäten erzielen**

Biotechnologische Fermentationsprozesse werden anhand von Leistungsdaten wie dem Produkttiter ( $c_p$ ), der Produktausbeute ( $Y_{p/s}$ ) und der volumetrischen Produktivität ( $Q_p$ ) bewertet. Ein hoher  $c_p$  kann auch bei niedrigem  $Y_{p/s}$  durch Einbringen einer entsprechenden Menge an Substrat in den Prozess erreicht werden. Die Produktausbeute ( $Y_{p/s}$ ) kann durch Prozessoptimierung und durch *Metabolic Engineering* gesteigert werden. Ganz wesentlich wird der  $Q_p$  des Prozesses durch das gewählte mikrobielle System bestimmt, da die spezifische Substratverbrauchsrate ( $q_s$ ) letztlich die maximal mögliche Umsetzungsrate von Substrat zu Produkt bestimmt. Die Steigerung von  $q_s$  durch *Metabolic Engineering* ist aufgrund der Komplexität des Zellstoffwechsels eine schwierige Aufgabe, und es gibt in der Literatur bislang keine Beispiele für eine signifikante Steigerung dieses Wertes.

Aus diesem Grund haben wir nach einem neuartigen Plattformorganismus gesucht, der überlegene Eigenschaften gegenüber traditionell verwendeten mikrobiellen Systemen aufweist. Da die spezifische Substratverbrauchsrate ( $q_s$ ) bei gegebenem Biomassertrag direkt proportional zur Wachstumsrate  $\mu$  ist, identifizierten wir das schnell wachsende Bakterium *V. natriegens* als potenziellen Kandidaten für die industrielle Biotechnologie [5]. *V. natriegens* wuchs in der Tat sehr schnell in BHIN-Komplexmedium – mit einer minimalen Generationszeit von 9,4 Minuten – sowie in Minimalmedium mit verschiedenen industriell relevanten Substraten. Bioreaktorkultivierungen in Minimalmedium mit Glucose zeigten, dass *V. natriegens* unter aeroben Bedingungen ( $3,9 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $\mu = 1,5 \text{ h}^{-1}$ ) und anaeroben Bedingungen ( $7,8 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $\mu = 0,9 \text{ h}^{-1}$ ) einen sehr hohen  $q_s$ -Wert besitzt, der mindestens doppelt so hoch wie bei herkömmlich verwendeten mikrobiellen Systemen (z. B. *E. coli*) ist (**Abb. 1**). Darüber hinaus ist *V. natriegens* prototroph, besitzt einen vielseitigen Metabolismus und die Fähigkeit, mehrere industriell relevante Substrate zu metabolisieren, was eine Grundvoraussetzung für die Realisierung des in der industriellen



▲ **Abb. 2:** Vergleich volumetrischer Produktivitäten ( $Q_p$ ) von publizierten Alanin-Produktionsprozessen mit optimierten bakteriellen Stämmen [5, 11].

Biotechnologie favorisierten flexiblen Rohstoffkonzepts darstellt [5]. Da insbesondere Chloride die Korrosionsprozesse auf Metalloberflächen des Bioreaktors fördern, haben wir ein Minimalmedium entwickelt, das Chlorid nur in Spuren, aber in ausreichendem Maße Natrium enthält, um die hohe Wachstumsrate aufrechtzuerhalten.

In einem anaeroben Produktionsprozess mit ruhenden Zellen von *V. natriegens* wurde Glucose mit einem  $q_s$  von  $1,0 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  zu den sezernierten Fermentationsprodukten Acetat, Formiat, Succinat, Lactat, Ethanol und Alanin mit einem  $Q_p$ -Wert zwischen 1,7 und  $4,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  umgesetzt. In einer Machbarkeitsstudie haben wir *V. natriegens*-Stämme für die anaerobe Alaninproduktion konstruiert und mit *V. natriegens*  $\Delta dldh \Delta lldh \Delta pfl \Delta mdh$  einen  $Q_p$ -Wert von  $34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Alanin aus Glucose erreicht. Dieser liegt etwa zehnmal höher als  $Q_p$ -Werte von maßgeschneiderten *E. coli*- und *Corynebacterium glutamicum*-Alanin-Produzentenstämmen unter gleichen Kultivierungsbedingungen (**Abb. 2**, [5, 11]).

### **Fazit und Ausblick**

Die einfache Handhabung, der vielseitige Stoffwechsel und das schnelle Wachstum von *V. natriegens* bieten die Möglichkeit, molekularbiologische Verfahren und biotechnologische Prozesse deutlich zu beschleunigen. Darüber hinaus ist dieses schnell wachsende Bakterium eine faszinierende Grundlage, um die Grundfesten des Lebens weiter zu erforschen. Um das Potenzial von *V. natriegens* zukünftig voll ausschöpfen zu können, müssen weiterführende Arbeiten wesentlich zum Verständ-

nis des Stoffwechsels und dessen Regulation beitragen. Des Weiteren müssen angepasste Fermentationsverfahren entwickelt werden, um den Anforderungen, bedingt durch die hohen Stoffwechselraten, gerecht zu werden.

### **Danksagung**

Ein herzlicher Dank an alle Mitarbeiter/innen, die an den Arbeiten beteiligt waren. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, BL1408/2-1) gefördert.

### **Literatur**

- [1] Payne WJ, Eagon RG, Williams AK (1961) Some observations on the physiology of *Pseudomonas natriegens* nov. spec. *Antonie Van Leeuwenhoek* 27:121–128
- [2] Weinstock MT, Hesk ED, Wilson CM et al. (2016) *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. *Nat Methods* 13:849–851
- [3] Eagon RG (1962) *Pseudomonas natriegens*, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes. *J Bacteriol* 83:736–737
- [4] Fossum S, Croke E, Skarstad K (2007) Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J* 26:4514–4522
- [5] Hoffart E, Grenz S, Lange J et al. (2017) High substrate uptake rates empower *Vibrio natriegens* as production host for industrial biotechnology. *Appl Environ Microbiol* 83, doi: 10.1128/AEM.01614-17
- [6] Dalia TN, Hayes CA, Stolyar S et al. (2017) Multiplex genome editing by natural transformation (MuGENT) for synthetic biology in *Vibrio natriegens*. *ACS Synth Biol* 6:1650–1655
- [7] Lee HH, Ostrov N, Wong BG et al. (2019) Functional genomics of the rapidly replicating bacterium *Vibrio natriegens* by CRISPRi. *Nat Microbiol* 4:1105–1113
- [8] Schleicher L, Muras V, Claussen B et al. (2018) *Vibrio natriegens* as host for expression of multisubunit membrane protein complexes. *Front Microbiol* 9:2537
- [9] Failmezger J, Scholz S, Blombach B et al. (2018) Cell-free protein synthesis from fast-growing *Vibrio natriegens*. *Front Microbiol* 9:1146
- [10] Wiegand DJ, Lee HH, Ostrov N et al. (2018) Establishing a cell-free *Vibrio natriegens* expression system. *ACS Synth Biol* 7:2475–2479
- [11] Lange J, Takors R, Blombach B (2016) Zero-growth bioprocesses: a challenge for microbial production strains and bioprocess engineering. *Eng Life Sci* 17:27–35



Felix Müller (links) und Bastian Blombach

### **Korrespondenzadresse:**

Prof. Dr. Bastian Blombach  
 Professor für Mikrobielle Biotechnologie  
 Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit  
 Technische Universität München  
 Schulgasse 22  
 D-94315 Straubing  
 Tel.: 09421-187-420  
 bastian.blombach@tum.de  
 www.mib.cs.tum.de