HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Heterologe Produktion von aminosäurebasierten bakteriellen Tensiden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Thies
aus Neuss

Düsseldorf, Oktober 2013

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.

Isaac Newton

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Publikationen

Troeschel SC, Thies S, Link O, Real CI, Knops K, Wilhelm S, Rosenau F & Jaeger K-E (2012). Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. J Biotechnol 161, 71–79.

Thies S, Santiago-Schübel B, **Kovacic F**, **Rosenau F, Hausmann R, Jaeger K-E.** Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli.* Manuskript in Vorbereitung.

Thies S, Troeschel SC, Wilhelm S, Kovacic F, Schuldes J, Schmidt A, Pietruszka J, Rosenau F, Jaeger K-E. From Libraries to production process: First time detection of biosurfactant production by screening of a metagenomic library and identification of new biosurfactant synthesizing enzymes. Manuskript in Vorbereitung.

Präsentationen auf internationalen Konferenzen

Thies S, **Schmidt A, Pietruszka J, Maksym L, Verseck S, Rosenau F, Jaeger K-E (2013).** A novel biosurfactant from the metagenome. *DECHEMA 1st International Workshop "Biosurfactants-Perspectives and Challenges", Frankfurt am Main*, *2013*. Vortrag.

Thies S, Troeschel SC, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger K-E (2012). Novel systems for functional expression of biocatalysts, *CLIB2021 3rd international Conference, Düsseldorf, 2012*. Vortrag.

Pelzer A, Funken F, Thies S, Wilhelm S, Jaeger K-E, Rosenau F (2010). *Pseudomonads* as versatile expression hosts, *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 2010.* Vortrag.

Thies S, Kügler J, Zwick M, Syldatk C, Rosenau F, Jaeger K-E, Hausmann R (2013). Heterologous expression of Serrawettin W1, a promising biosurfactant. *DECHEMA 1st International Workshop "Biosurfactants-Perspectives and Challenges", Frankfurt am Main, 2013.* Posterpräsentation.

Thies S, Troeschel SC, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger K-E (2012). Tools for the analysis of metagenomic libraries regarding the production of secondary metabolites with biosurfactant properties, *VAAM-Jahrestagung, Tübingen, 2012.* Posterpräsentation:

Thies S, Troeschel SC, Wilhelm S, Jaeger K-E, Rosenau F (2011). Prerequisites for the analysis of biodetergent production in metagenomic libraries, *CLIB2021 2nd international Conference, Düsseldorf, 2011.* Posterpräsentation.

Katzke N, Troeschel S, Thies S, Wilhelm S, Jaeger K-E (2011). Topics of interests of MAMBA partners and their contributions to the project: Heinrich Heine University, Düsseldorf, 2011, Webinar http://mamba.bangor.ac.uk/webinars/hhu_mamba_webinar_29_09_11_pdf_12338.pdf

Danksagung

Für die Konzeption dieses interessanten und aktuellen Projektes und die Überlassung dieser Arbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie möchte ich mich bei Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger und Dr. Frank Rosenau herzlich bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die freundliche Übernahme des Korrefererats.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums möchte ich dem CLIB-Graduate Cluster (Pietruszka, 2012) danken, repräsentiert vor allem durch Dr. Jessica Hilbig und Dr. Sonja Meyer zu Berstenhorst, die aufgrund ihres engagierten Einsatz für die Schaffung exzellenter Rahmenbindungen für die Promotion hier eine Erwähnung verdienen.

Den verschiedenen Kooperationspartnern möchte ich für die experimentelle Unterstützung und fruchtbare Zusammenarbeit herzlich danken. Im Besonderem zu nennen sind dabei: am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik II des Karlsruher Instituts für Technologie Johannes Kügler, Michaela Zwick und Prof. Dr. Rudolf Hausmann, Dr. Alexandra Schmidt und Katharina Neufeld am Institut für bioorganische Chemie der HHU Düsseldorf und Dr. Santiago-Schübel vom ZEA-3: Analytic/Biospec am Forschungszentrum Jülich.

Überdies danken für die Unterstützung dieser Arbeit möchte dem ganzen Team des Instituts für molekulare Enzymtechnologie der HHU Düsseldorf, im speziellen den Kollegen in meiner Arbeitsgruppe. Insbesondere zu nennen aufgrund ihrer Beiträge zu den Ergebnissen dieser Arbeit sind dabei Marko Laschinski, Martina Paul, Niwin Flier, Claus-Rüdiger Wallis und, in besonderem Maße, Laura Kukuk sowie Dr. Sonja Rausch, die neben der Schaffung der Grundlagen für die hier beschriebenen Metagenomarbeiten mich auch mit ihrer Expertise auf diesem Gebiet unterstützt hat. Außerdem mir immer beratend zur Seite standen auch Dr. Susanne Wilhelm, Dr. Filip Kovačić und Dr. Anita Loeschcke, der ich auch für die Durchsicht meines Manuskriptes an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Außerdem möchte ich mich bei der BASF Personal Care and Nutrition GmbH, vertreten durch Dr. Stefan Verseck und Dr. Lukas Maksym, für die Bereitschaft, mir im Rahmen des Promotionsprogramms ein hochinteressantes Praktikum im Bereich der industriellen Biotensidforschung zu ermöglichen.

Abschließend ganz herzlich danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren auf dem Weg zur Promotion immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis V

Abbildungsverzeichnis VIII

Tabellenverzeichnis X

Abkürzungsverzeichnis XI

1 Einleitung 1

1.1 Tenside 1

1.1.1 Eigenschaften von Tensiden 1

1.1.2 Klassifizierung von Tensiden 3

1.1.3 Anwendungen von Tensiden 5

1.2 Biotenside 6

1.2.1 Eigenschaften von Biotensiden 6

1.2.2 Klassifizierung von Biotensiden 7

1.2.3 Lipopeptide von *Serratia marcescens* 13

1.2.4 Natürliche Funktionen von Biotensiden 18

1.2.5 Biotechnologisches Anwendungspotential von Biotensiden 20

1.3 Funktionelles Screening von Metagenombanken 23

1.3.1 Metagenom 23

1.3.2 Sekundärmetaboliten aus dem Metagenom. 24

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit 28

2 Material und Methoden 30

2.1 Verwendete Bakterienstämme 30

2.2 Verwendete Plasmide 31

Tabelle 2. 2 Übersicht über die verwendeten Plasmide und Vektoren 31

2.3 Verwendete Oligonukleotide 32

Tabelle 2. 3 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide 32

2.4 Chemikalien und Enzyme 33

2.5 Mikrobiologische Methoden 33

2.5.1 Nährmedien 33
2.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien 34

2.6 Molekularbiologische Methoden 36

2.6.1 Präparation von DNA 36
2.6.2 Agarosegelelektrophorese 37
2.6.3 DNA-Konzentrationsbestimmung 37
2.6.4 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) 37
2.6.5 Ortsspezifische Mutagenese durch *quickchange*-PCR 38
2.6.6 Transkriptnachweis durch RT-qpcr 38
2.6.7 *In vitro* Rekombination von DNA 39
2.6.8 Sequenzierung von DNA 40
2.6.9 Synthese des DNA-Fragmentes T7-MCS-T7 40

2.7 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA 40

2.7.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. Coli*- Zellen 40
2.7.2 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten *E. Coli*- Zellen 41
2.7.3 Elektrotransformation von *Pseudomonas putida* und *Erwinia billingiae* 41

2.8 Methoden zur Detektion, Isolierung und Analyse von Biotensiden 42

2.8.1 *Atomized oil assay* 42
2.8.2 *Drop-collapsing* und *Grid assay* 42
2.8.3 Extraktion von Serrawettin aus verschiedenen Wirten 43
2.8.4 Isolierung von Acyltyrosinen aus Kulturüberständen von *E. Coli* 44
2.8.5 Dünnschichtchromatographie 44
2.8.6 NMR-Analyse 45
2.8.7 HPLC-ESI-MS/MS Analyse 45
2.8.8 Bestimmung von physikalischen Eigenschaften des N-Acyltyrosins 46
2.8.9 Nachweis haemolytischer Aktivität 47
2.8.10 Nachweis antibiotischer Aktivität 48
2.8.11 *Assay* zur Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* 48

2.9 Proteinbiochemische Methoden 49

2.9.1 Löslichkeitsanalyse 49
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 49
2.9.3 Western Blot - Immunologischer Nachweis von auf Membran immobilisierten Proteinen 50

2.10 *In silico* Methoden 51

3 Ergebnisse und Diskussion 53

3.1 Produktion von Lipopeptid-Biotensiden 53

3.1.1 Produktion von Serrawettin W1 in *Serratia marcescens* DSM12481 54

3.1.2 Produktion von Biotensiden in *Erwinia billingiae* Eb661 61

3.1.3 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Escherichia coli* BL21 Gold 65

3.1.4 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Erwinia billingiae* Eb661 71

3.1.5 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Pseudomonas putida* KT2440 und Vergleich der verschiedenen Produktionsstämme 76

3.1.6 Analyse der Zusammensetzung des heterolog produzierten Serrawettin W1 78

3.2 Identifizierung und Produktion neuer metagenomabgeleiteter Biotenside 83

3.2.1 Tools für die Konstruktion und Durchmusterung von Metagenombanken auf Biotensidproduktion 83

3.2.2 Identifizierung von Biotensid produzierenden Klonen in einer Metagenombank 91

3.2.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls zur Isolierung der *Biosurfactants* 93

3.2.4 Identifizierung des metagenomabgeleiteten Biotensids als N-Acyltyrosin 94

3.2.5 Aufklärung der Biosynthese des N-Acyltyrosins 95

3.2.6 Untersuchung des Reaktionsmechanismus der N-Acylaminosäure-Synthase NAS354 100

3.2.7 Chemo-physikalische Eigenschaften des *Biosurfactants* N-Acyltyrosin 102

3.2.8 Biologische Eigenschaften des Biotensids N-Acyltyrosin 105

3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick 111

3.3.1 Biotenside aus dem Metagenom 111

3.3.2 Produktion des Lipopeptids Serrawettin W1 115

4 Zusammenfassung 125

5 Summary 127

6 Literaturverzeichnis 129

7 Anhang 164

Lebenslauf 168

Erklärung 169

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1 Schemata zum Aufbau von Tensiden und deren Verhalten in wässriger Lösung. 2
Abb. 1. 2 Strukturformeln verschiedener Biotenside. 8
Abb. 1. 3 Struktur verschiedener aminosäurehaltiger Biotenside. 11
Abb. 1. 4 Schematischer Aufbau des Surfactinsynthese-Genclusters. 12
Abb. 1. 5 Struktur von Serrawettin W1. 14
Abb. 1. 6 Biosynthese von Serrawettin W1 16
Abb. 1. 7 Mikroskopische Aufnahmen zum *atomized oil assay* 26
Abb. 1. 8 Schematischer Überblick über den allgemeinen Ablauf eines Metagenomprojektes zur Identifizierung von Biotensid-Synthesewegen 29

Abb. 3.1. 1 Publikationen zu Serrawettin in den Jahrzehnten seit der Erstbeschreibung. 54
Abb. 3.1. 2 Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *S. marcescens* DSM12481 auf verschiedenen Festmedien. 56
Abb. 3.1. 3 Serrawettin W1-Produktion von *S. marcescens* DSM12481. 57
Abb. 3.1. 4 Zusammensetzung des Serrawettin W1 aus *S. marcescens* DSM12481. 59
Abb. 3.1. 5 Schematischer Vergleich von SwrW aus *S. marcescens* und der NRPS aus *E. billingiae*. 62
Abb. 3.1. 6 Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *E. billingiae* auf verschiedenen Festmedien. 63
Abb. 3.1. 7 Vergleich der Extrakte von *S. marcescens* DSM12481 und *E. billingiae* Eb661. 64
Abb. 3.1. 8 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 *in E. coli* BL21 Gold. 67
Abb. 3.1. 9 Expression von *swrW* mit C-terminalem His-*tag* in *E. coli* BL21(DE3). 69
Abb. 3.1. 10 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 *in E. bilingiae* Eb661. 74
Abb. 3.1. 11 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *P. putida* KT2440. 77
Abb. 3.1. 12 Vergleich der Serrawettinproduktion in *E. coli*, *E. billingiae und P. putida* 77
Abb. 3.1. 13 Vergleich der Zusammensetzung von Serrawettin W1 aus unterschiedlichen Produktionsstämmen. 80

Abb. 3.2. 1 Sequenz des Fragmentes T7-MCS-T7 85
Abb. 3.2. 2 Schematische Darstellung von pCEV2 86
Abb. 3.2. 3 Schematische Darstellung des Metagenomfragmentes aus TB303. 87
Abb. 3.2. 4 Nachweis der Funktionalität von pCEV2 durch qPCR 88
Abb. 3.2. 5 Nachweis der Funktionalität von pEBP18 (nach Troeschel et al., 2012) 89
Abb. 3.2. 6 Schematische Darstellung von pEBP18 90
Abb. 3.2. 7 Identifizierung von *Biosurfactant* produzierenden *E. coli* DH10b-Klonen. 92

Abb. 3.2. 8 Analyse von Kulturüberstandsextrakten der Biotensid produzierenden DH10b-Klone.92
Abb. 3.2. 9 Validierung einer Fällung als Methode zur *Biosurfactant*-Isolation. 93
Abb. 3.2. 10 Struktur des von Metagenomklonen produzierten Biotensids 94
Abb. 3.2. 11 Schematischer Vergleich der Metagenomfragmente SA343 und SA354. 96
Abb. 3.2. 12 Strukturmodell und strukturelles Alignment von NAS354. 97
Abb. 3.2. 13 Biotensidproduktion in *E. coli* BL21 (DE3)durch Expression von NAS354. 98
Abb. 3.2. 14 Alignment der AS-Sequenzen von drei Gruppe I N-Acyl-Aminosäure-Synthasen und der Acyltransferasedomänen von NAS343 und NAS354. 99
Abb. 3.2. 15 Postulierter Reaktionsmechanismus für die N-Acylaminosäuresynthase FeeM. 100
Abb. 3.2. 16 Verlust der *Surfactant*-Produktion durch den Aminosäure-Austausch E103A. 101
Abb. 3.2. 17 Oberflächenspannung von 0,1 M NaOH bei verschiedenen Konzentrationen von N-Acyltyrosin. 104
Abb. 3.2. 18 Kirby-Bauer Assay zur Auswirkung von N-Acyltyrosin auf verschiedene Bakterienstämme. 106
Abb. 3.2. 19 Einfluss verschiedener Tenside auf die Prodigiosinproduktion von *S. marcescens.* . 108

Abb. 3.3. 1 DNA Sequenz um den Start des putativen NRPS-Gens aus *E. billingiae*. 119
Abb. 3.3. 2 Marktanteile der verschiedenen Tensidarten am globalen Tensidmarkt im Jahr 2012 122
Abb. 3.3. 3 Struktur der Serrataminsäure (N-(3-Hydroxydecanoyl)serin) 123

Abb. A. 1 Alignment der Aminosäuresequenzen von SwrW aus DSM12481 und ATCC274. 164
Abb. A. 2 Massenspektrum von Serrawettin W1 C_{10} + C_{10} (515 Da)..... 166

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. 1 Empfohlene Einsatzgebiete für Tensiden nach HLB-Werten..... 3

Tabelle 1. 2 Beispiele für bei Metagenom*screenings* identifizierten Sekundärmetaboliten. 25

Tabelle 2. 1 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen..... 30

Tabelle 2. 2 Übersicht über die verwendeten Plasmide und Vektoren 31

Tabelle 2. 3 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide 32

Tabelle 2. 4 Übersicht über die verwendeten Antibiotika 35

Tabelle 2. 5 Charakteristische Fragmente beim Zerfall von Serrawettin W1 im MS 46

Tabelle 2. 6 Chemische Gruppen und die ihnen für die HLB-Wertberechnung zugeordneten Gruppenzahlen..... 47

Tabelle 2. 7 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele..... 50

Tabelle 3.1. 1 Kettenlängen der identifizierten Serrawettinspezies im Extrakt von *S. marcescens* DSM12481. 60

Tabelle 3.1. 2 Getestete Antibiotika und deren gegen *E. billingiae* Eb661 wirksame Konzentrationen..... 72

Tabelle 3.1. 3 Vergleich der durch HPLC-MS/MS identifizierten Serrawettinspezies..... 79

Tabelle 3.2. 1 Identifizierte *orf* und blastn gestützte Vorhersagen zu den Metagenomfragmenten in pEBP18-SA343 und pEBP18-SA354. 96

Tabelle 3.2. 2 Chemische Gruppen und die ihnen zugeordneten Gruppenzahlen, Ausschnitt aus Tabelle 2.6..... 103

Tabelle 3.2. 3 Empfohlene Einsatzgebiete für Tensiden nach HLB-Werten, Ausschnitt aus Tabelle 1. 1..... 103

Tabelle 3.2. 4 Übersicht: Physikalische Eigenschaften des aus *E. coli* DH10b-Kultur isolierten N-Acyltyrosins 105

Tabelle A. 1 Charakteristische Fragmente der einzelnen Kongenere 165

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	**Abbildung**
ACP	**Acylcarrierprotein**
bp, kb	**Basenpaare, Kilobasenpaare**
cAMP	***Cyclic adenosine monophosphate***
c-diGMP	***Cyclic diguanylate***
cDNA	***Complementaty DNA***
CIAP	***Calf Intestine Alkaline Phosphatase***
CMC	***Critical Micelle Concentration***
CoA	**CoenzymA**
Da	**Dalton**
DC	**Dünnschichtchromatographie**
eDNA	***enviromental* DNA, d.h. DNA aus Umweltproben**
ESI	***Electro Spray Ionisation***
g	**Gramm**
h	**Stunde(n)**
HLB	***Hydrophilic lipophillic Balance***
HPLC	***High Performance (pressure) Liquid Chromatography***
IPTG	**Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid**
l	**Liter**
LPS	**Lipopolysaccharide**
LV	**Leervektor**
m	**Meter**
M	**Molar**
mA	**Milliampere**
MEL	**Mannosylerythritollipide**
Min	**Minute(n)**
mN	**Millinewton**
MS	***Mass Spectrometry***
NAS	**N-Acylaminosäure Synthase**
NMR	***Nuclear Magnetic Resonance***
NRPS	***Nonribosomal peptide synthetase***
OD	**Optische Dichte**
Orf	***Open reading frame***
PAGE	**Polyacrylamid-Gelelektrophorese**
PAH	**Polyaromatische Kohlenwasserstoffe**
PCP	***Peptidyl Carrier Proteine***
PKS	**Polyketidsynthasen**
PPT	**Phosphopantetheinyltransferase**
RT	**Reverse Transkription**
s	**Sekunden**
SA	***Surface Active***
SDS	***Sodium dodecyl sulfate* (Natriumdodecylsulfat)**
TG	**Trypton-Glycerin-Medium**
ÜK	**Übernachtkultur**
Upm	**Umdrehungen pro Minute**
V	**Volt**
Vol	**Volumen**
XIC	***Extracted Ion Count***

1 Einleitung

1.1 Tenside

1.1.1 Eigenschaften von Tensiden

Jeder Mensch kommt täglich mit Tensiden in Kontakt, mehr noch, Moleküle mit tensidischen Eigenschaften sind darüber hinaus, z.B. als Grundkomponente biologischer Membranen, ein elementarer Bestandteil aller Lebewesen. Der Begriff Tenside bezeichnet eine Gruppe von Verbindungen, die sich durch oberflächenaktive Eigenschaften (daher die englische Bezeichnung *surfactant,* abgeleitet von ***surf**ace **acti**ve ag**ent*** (Rosen & Kunjappu, 2012)) auszeichnen. Tenside sind amphiphile Moleküle, d.h. sie bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil (Abb. 1. 1A). Diese Struktur erlaubt es ihnen, sowohl mit polaren als auch unpolaren Komponenten zu interagieren. Sie orientieren sich dabei bevorzugt an der Phasengrenze zwischen polar und unpolar, z.B. Wasser/Luft oder Wasser/Öl. Die hydrophoben Teile der Moleküle, meistens Acylketten, interagieren mit der unpolaren Phase, während sich die hydrophilen Gruppen zur polaren Phase hin ausrichten (Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002).

Die Spannung an den Oberflächen/Grenzflächen zwischen beiden Phasen wird dabei verringert. Die deutsche Bezeichnung „Tensid“, abgeleitet vom lateinischen *tendere/tensum* im Sinne von „spannen/gespannt“, nimmt Bezug auf diese Eigenschaft, anhand derer zwei Kenngrößen von Tensiden bestimmt werden: Die maximale Reduktion der Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft, sowie die kritische Mizellbildungskonzentration, abgekürzt CMC vom englischen *critical micelle concentration.* Die Oberflächenspannung nimmt mit steigender Konzentration des Tensids immer weiter ab, bei effektiven S*urfactants* sinkt sie von 72,5 mN/m auf ca. 35 mN/m und tiefer (Soberón-Chávez & Maier, 2011), bis eine bestimmte Konzentration erreicht ist, ab der zusätzliche Zugabe von Tensid keine weitere Auswirkung auf die Oberflächenspannung mehr hat.

Bei dieser Konzentration ist die CMC erreicht, d.h. die Grenzfläche ist mit Tensidmolekülen abgesättigt und diese beginnen, in Mizellen zu aggregieren. Mizellen sind Strukturen, bei denen sich die hydrophilen Domänen nach außen zur wässrigen Phase hin orientieren, während sich die hydrophoben Bereiche der Moleküle im inneren der Struktur aneinanderlagern (Abb. 1. 1B). In unpolaren Flüssigkeiten ist die Mizellenstruktur dementsprechend umgekehrt (inverse oder Wasser-in-Öl-Mizellen, McNaught and Wilkinson, 1997;

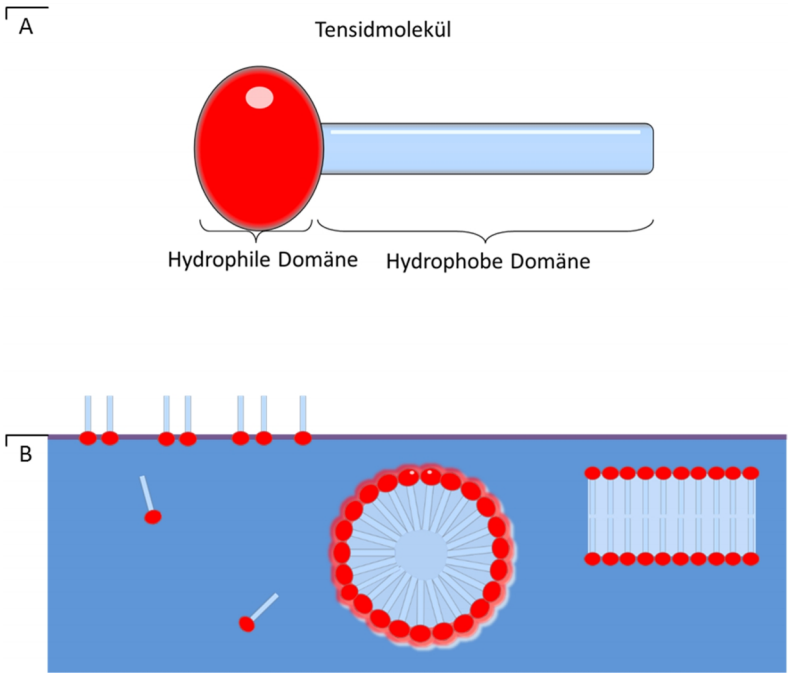


Abb. 1. 1 Schemata zum Aufbau von Tensiden und deren Verhalten in wässriger Lösung. **A** Schematischer Aufbau eines Tensidmoleküls. Rot: Polare oder geladene und somit hydrophile Domäne. Blau: Hydrophobe Domäne, meist aus Acylketten bestehend; **B** Tenside können in Wasser unterschiedliche Aggregate ausbilden, von links: Film an der Phasengrenze; Querschnitt durch eine Mizelle; Querschnitt durch eine Doppelschicht, aus der auch Liposomen gebildet werden können.

Baeurle and Kroener, 2004). Abhängig von Tensidkonzentration, Molekülstruktur, Temperatur und Ionenstärke bilden sich auch andere Formen von Aggregaten wie Stäbchenmizellen, *bilayer*-Strukturen und Vesikel/Liposomen aus (Fabry, 1991; Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002). Dabei besteht zwischen monomeren Molekülen in Lösung und den Aggregaten ein thermodynamisches Gleichgewicht. Zusammengehalten werden alle diese Strukturen durch schwache Wechselwirkungen wie hydrophobe Interaktion und van-der-Waals-Kräfte (Soberón-Chávez & Maier, 2011).

Die molekülspezifische CMC ist ebenfalls abhängig von Parametern wie Ionenstärke und Temperatur (Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002).

Eine weitere definierende Eigenschaft von Tensiden ist ihre Fähigkeit, hydrophobe und hydrophile Phasen zu vermischen, in dem z.B. bei Öl-in-Wasser-Emulsionen kleine Tropfen des Öls von einer Hülle aus Tensidmolekülen umgeben werden, vergleichbar mit den oben angeführten Mizellen. Aufgrund der dabei nach außen zeigenden polaren Gruppen des Tensids sind diese Strukturen in der wässrigen Phase löslich. Umgekehrt bilden sich beim Einsatz von eher hydrophoben Tensiden oder bei veränderten Verhältnissen von Wasser:Tensid:Öl umgekehrte Mizellen (Binks, 1993; McNaught & Wilkinson, 1997), wodurch Wasser in unpolaren Flüssigkeiten emulgiert werden kann (Schubert, 2005).

Ein ähnlicher Effekt tritt beim Einsatz von Tensiden als Netzmittel (englisch *wetting agents)* auf, welche die Spannung zwischen festen Oberflächen und Wasser durch Anlagerung an der Grenzfläche herabsetzten und so eine besser Benetzung der Oberflächen ermöglichen (Churaev, 2003; Matsuyama & Nakagawa, 1996a).

Zur theoretischen Einordnung von Tensiden bezüglich ihrer Emulsionseigenschaften anhand der Molekülstruktur wurden verschiedene mathematische Modelle entwickelt, wie z.B. der *characteristic curvature value* (Acosta *et al.*, 2008), der *hydrophilic lipophilic deviation value* (Salager *et al.*, 1979; Witthayapanyanon *et al.*, 2008) oder der *hydrophilic lipophilic balance value* (HLB-Wert, Tabelle 1. 1; Davies, 1957; Davis, 1994). Bei Letzterem werden verschiedenen chemischen Gruppen bestimmte Gruppenzahlen zugeordnet, die Gesamtsumme der Zahlen der hydrophilen Gruppen mit der Gesamtsumme der hydrophoben Gruppen verrechnet und aus dieser Differenz folgend der HLB-Wert berechnet (siehe auch 2.8.8).

Tabelle 1. 1 Empfohlene Einsatzgebiete für Tensiden nach HLB-Werten (nach Hauthal et al., 2003).

HLB-Wert des Tensides	Verwendungszweck
1,5 bis 3	Schaummittel
3 bis 8	W/O-Emulgatoren
7 bis 9	Netzmittel
8 bis 18	O/W-Emulgatoren
13 bis 15	Waschaktive Stoffe
12 bis 18	Lösungsvermittler für wässrige Systeme
W/O =Wasser in Öl; O/W= Öl in Wasser	

1.1.2 Klassifizierung von Tensiden

Anhand der Ladungseigenschaften ihrer hydrophilen Gruppen werden Tenside in vier Gruppen eingeteilt (Fabry, 1991): Kationische, anionische, amphotere und nichtionische Tenside.

Bei **kationischen Tensiden** enthält die hydrophile Gruppe eine positive Ladung, eingebracht durch primäre, sekundäre oder tertiäre Amine (bei denen die Ladung pH-abhängig ist) oder durch quartäre Amine (Esterquats) wie bei den quartären Dialkylammoniumestern. Die Hauptanwendung für kationische Tenside ist der Einsatz in Weichspülern (BASF, 2012). Zudem werden Liposomen aus kationischen Tensiden als Adjuvantien in Impfstoffen eingesetzt (Christensen *et al.*, 2011) und darüber hinaus deren Einsatzmöglichkeiten

als Vektoren in Gentherapieanwendungen als Alternative zu viralen Vektoren diskutiert (Xiong *et al.*, 2011).

Die negative Ladung der **anionischen Tenside** ist meistens an einer Carboxylat- ($-COO^-$), einer Sulfonat- (SO_3^-) oder einer Sulfatgruppe (SO_4^-) lokalisiert (Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002). Beispiele für Carboxylate sind die am längsten bekannten Tenside überhaupt, die Seifen (d.h. Salze von freien Fettsäure), die seit der Antike durch Verseifung von Lipiden gewonnen werden und von Galenos von Pergamon erstmals als Reinigungsmittel beschrieben wurden (Plinius, 79AD; Partington, 1999). Auch viele mikrobiell produzierte Tenside, z.B. Rhamnolipide, Surfactin oder die offene Form der Sophorolipide fallen in diese Gruppe. Daneben ist die Glycocholsäure als Bestandteil der Galle ein biologisch bedeutendes Carboxylat-Tensid, das im Darm die Emulsion von Lipiden bewirkt (Hofmann & Borgstroem, 1964).

Taurocholsäure, eine weitere Gallensäure, gehört zu den Sulfonat-Tensiden. Industriell bedeutende Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise die linearen Alkylbenzolsulfonate, die heute, hauptsächlich durch ihren Einsatz in verschiedensten Reinigungsmitteln, mit rund 36% Anteil an der Gesamttensidproduktion die meistproduzierten Tenside darstellen (BASF, 2012). Ein weiterer bekannter Vertreter der Sulfonate ist Natriumdodecylsulfat (SDS), welches ebenfalls in vielen Reinigungsmitteln, aber auch in Körperpflegeprodukten Anwendung findet und zudem als proteindenaturierende Verbindung eine wichtige Rolle in der biochemischen Forschung einnimmt (Laemmli, 1970). Mit anionische Tensiden werden 44% des weltweit mit Tensiden gemachten Umsatz erwirtschaftet, wodurch diese eine der ökonomisch bedeutendsten Tensidklassen darstellen (BASF, 2012).

Amphotere oder **zwitterionische Tenside** besitzen sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen. Das hat zur Folge, dass sie je nach umgebendem pH-Wert als Anion, Kation oder auch neutrales Molekül vorliegen können. Beispiele sind Cocamidopropylbetain, mit quartären Amin und Carboxylat, CHAPS (quartäres Amin und Sulfonat) sowie Lecithine und andere Phospholipide (tertiäres Amin und Phosphat). Letztere bilden den Hauptbestandteil in biologischen Membransystemen, die sozusagen großflächige Aggregate dieser Tenside darstellen. Lecithine (Gemische verschiedener Phosphatidylcholine) aus Soja oder Hühnereiern kommen als Emulgatoren in einer Vielzahl von Lebensmitteln zur Anwendung (Zusatzstoff E 322), Cocamidopropylbetain und andere Betaine finden sich aufgrund der Hautverträglichkeit in vielen Körperpflegeprodukten. Des Weiteren hat sich der Zu-

satz von amphoteren Tensiden wie Dodecylphosphocholin als sehr hilfreich für die Aufklärung der NMR-Strukturen von Membranproteinen erwiesen (Anatrace Inc., 2008).

Die vierte große Gruppe stellen die **nichtionischen Tenside**, kurz auch als Niotenside bezeichnet, dar. Hier wird die hydrophile Domäne durch ungeladene Gruppen wie Hydroxy-Gruppen oder Zuckermoleküle gebildet. Industriell wichtige Vertreter sind Fettalkoholethoxylate (FAE) und Alkylpolyglucoside (APG), aber auch Komponenten wie Lacton-Sophorolipid, Tween20 (Polysorbat20), Triton-X und Octylglycosid werden zu dieser Gruppe gezählt. Niotenside finden inzwischen breite Anwendung in Reinigungsmitteln, da sie im Gegensatz zu anionischen Tensiden in ihrer Tensidwirkung unempfindlich gegenüber der Wasserhärte sind und außerdem exzellente Niedrigtemperatureigenschaften besitzen (BASF, 2012). Zudem bieten sie sich an zur Solubilisierung von Membranproteinen (Morandat & El Kirat, 2007). Darüber hinaus können Niotenside wie Polyglykoside komplett auf Basis nachwachsender Rohstoffe (in diesem Beispiel Zucker und Öle) synthetisiert werden, was sie im Sinne des Nachhaltigkeitsgedanken sehr attraktiv macht.

Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass Niotenside inzwischen, gleich den anionischen Tensiden, 44% des weltweiten mit Tensiden erwirtschafteten Umsatzes erzielen. Zudem werden für diese Tensidklasse die größten Nachfragezuwachsraten prognostiziert (Ceresana, 2012).

1.1.3 Anwendungen von Tensiden

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften und der Vielfältigkeit der chemischen Strukturen finden Tenside Anwendungen in vielen unterschiedlichen Bereichen.

Der größte Teil der von der chemischen Industrie produzierten Tenside (55%) wird in den verschiedensten Reinigungs-, Spül- und Waschmitteln in Haushalt und Industrie eingesetzt (BASF, 2012; Ceresana, 2012). Diese Tenside werden auch als Detergenzien bezeichnet, abgeleitet vom lateinischen *„detergere“* (reinigen). Weiterhin sind Tenside als Emulgatoren in vielen Kosmetikprodukten und Nahrungsmitteln zu finden, in pharmazeutischen Anwendungen werden sie zudem auch in Form von Liposomen als *drug delivery system* genutzt, um Wirkstoffe unmetabolisiert an den Zielort zu bringen (Wilczewska *et al.*, 2012). Weitere interessante Anwendungsgebiete sind in der Erdölindustrie zu finden, wo Tenside, neben der Verwendung in Reinigungsmitteln für Tanks und Pipelines, in der tertiären Phase der Ölförderung eingesetzt werden. In dieser letzten Phase der Förderung

werden Tenside in die Lagerstätten eingebracht und emulgieren die dort verbliebenen 40%-80% des Öls, die über die ersten beiden Phasen nicht gewonnen werden können, und ermöglichen so deren Förderung (Perfumo *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2007). In den Fokus geraten Tenside auch immer wieder bei der Beseitigung von Ölkontaminationen. So wurden Tween80 und das Sulfonat-Tensid Aerosol OT (Dioctyl-natrium-sulfosuccinat)zur Bekämpfung des Ölfilms nach der Explosion der Bohrplattform Deepwater Horizon im Jahre 2010 eingesetzt (Larson, 2013).

1.2 Biotenside

1.2.1 Eigenschaften von Biotensiden

Im Zuge des Nachhaltigkeitsgedankens wird der Entwicklung von „grünen" Technologien auch in der chemischen Industrie im Bereich der Tenside immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt, was unter anderem durch die Markteinführung „grüner", umweltfreundlicher Tensidproduktlinien durch Erdal-Rex, Henkel oder Ecover deutlich wird. Hier bedeutet das die Produktion von Substanzen, die biologisch leicht abbaubar sind und nicht auf Basis von Erdöl, sondern aus nachwachsenden Rohstoffen wie Pflanzenölen, beispielsweise Palmöl oder Kokosöl, und Alkoholen oder Zuckermolekülen als hydrophile Komponenten produziert werden können (Clapés & Infante, 2002; Pinazo *et al.*, 2011). Allerdings konkurriert der großflächige Anbau von Pflanzen zur Gewinnung von Öl oder Zucker für den Einsatz in der chemischen Industrie mit Nahrungsmittelpflanzen um Anbauflächen, was sowohl aus ethischen, als auch aus umweltpolitischen Gründen diskussionswürdig ist (vergleichend zur Produktion von Biodiesel und Ethanol für Kraftstoffe (Anton & Steinick, 2012; Endres, 2011)). Die aus nachwachsenden Rohstoffen durch klassische Chemie synthetisierten Tenside werden zur Abgrenzung von petrochemischen Molekülen auf Erdölbasis als Tenside oleochemischen Ursprungs bezeichnet. Oftmals werden sie auch unter dem Begriff Biotenside genannt, das trifft aber nicht die eigentliche Bedeutung des Begriffs im Sinne von biologisch, also durch Organismen, hergestellten Tenside (Fiechter, 1992; Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002).

Nahezu alle Organismen produzieren oberflächenaktive Substanzen, wie aus oben aufgeführten Beispielen deutlich wird, zumindest in Form von amphiphilen Lipiden für den Membranaufbau (Banat, 1995; Lang, 2002). Wirtschaftliche Bedeutung haben die Tenside

aus höheren Organismen vor allem in Form der Lecithine, die wie bereits erwähnt, als Emulgatoren in Lebensmitteln eingesetzt werden. Im Allgemeinen, wenn von Biotensiden oder *Biosurfactants* die Rede ist, bezeichnet dies aber mikrobiell produzierte Tenside, d.h. amphiphile Metaboliten, die von verschiedenen Bakterien und Pilzen produziert werden. Diese sind aufgrund der im Vergleich zu höheren Organismen viel kürzeren Generationszeiten, die damit höhere Raum/Zeit-Ausbeuten ermöglichen, und der großen strukturellen Diversität von größerem wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesse als Tenside aus Pflanzen und Tieren (Lang, 2002).

Mikrobielle Biotenside zeichnen sich durch geringe Toxizität, biologische Abbaubarkeit und damit ein gute Umweltverträglichkeit aus, außerdem besitzen sie häufig bessere Schaumeigenschaften als petrochemische und oleochemische Tenside (Banat *et al.*, 2000; Cameotra *et al.*, 2010; Desai & Banat, 1997; Mulligan, 2005), sowie gute dermatologische Eigenschaften (Kanlayavattanakul & Lourith, 2010; Morita *et al.*, 2013). Darüber hinaus zeigen sie stabile Aktivität auch bei extremen pH-Werten, Ionenstärken und Temperaturen (Cameotra & Makkar, 1998; Desai & Banat, 1997; Marchant & Banat, 2012).

Die Produktion von Biotensiden durch Fermentation von Mikroorganismen ermöglicht die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen (wie bei oleochemischen Tensiden), für viele Biotenside konnte auch bereits eine Produktion auf Grundlage von organischen Abfallprodukten, die in keiner Konkurrenz zu Nahrungsmitteln stehen, etabliert werden (Cagri-Mehmetoglu *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2008; Haba *et al.*, 2003; Mukherjee & Das, 2010; Nitschke *et al.*, 2005; Saharan *et al.*, 2012; Vecino *et al.*, 2013; Wadekar *et al.*, 2011).

Die oben aufgeführten Eigenschaften begründen ein steigendes Interesse an *Biosurfactants* über die letzten Jahre (Jacques, 2011; Müller *et al.*, 2012; Ryall, 2012; Soberón-Chávez & Maier, 2011).

1.2.2 Klassifizierung von Biotensiden

Ähnlich zu den Tensiden im Allgemeinen können auch die Biotenside anhand Ihrer hydrophilen Gruppen eingeteilt werden, die Hauptklassen sind Phospholipide/Fettsäuren u.ä., Glycolipide, polymere Biotenside und Lipopeptide (Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002).

Wie die vielzelligen Organismen produzieren auch Bakterien und einzellige Pilze für grundlegende Zellfunktionen verschiedene amphiphile Moleküle, wie **Phospholipide**, freie **Fettsäuren** oder die **Lipopolysaccharide** der äußeren Membran von Gram negativen

Bakterien. Diese essentiellen Zellbestandteile aus dem Primärmetabolismus stehen aber nicht im Zentrum der Biotensidforschung, die sich eher mit Sekundärmetaboliten beschäftigt.

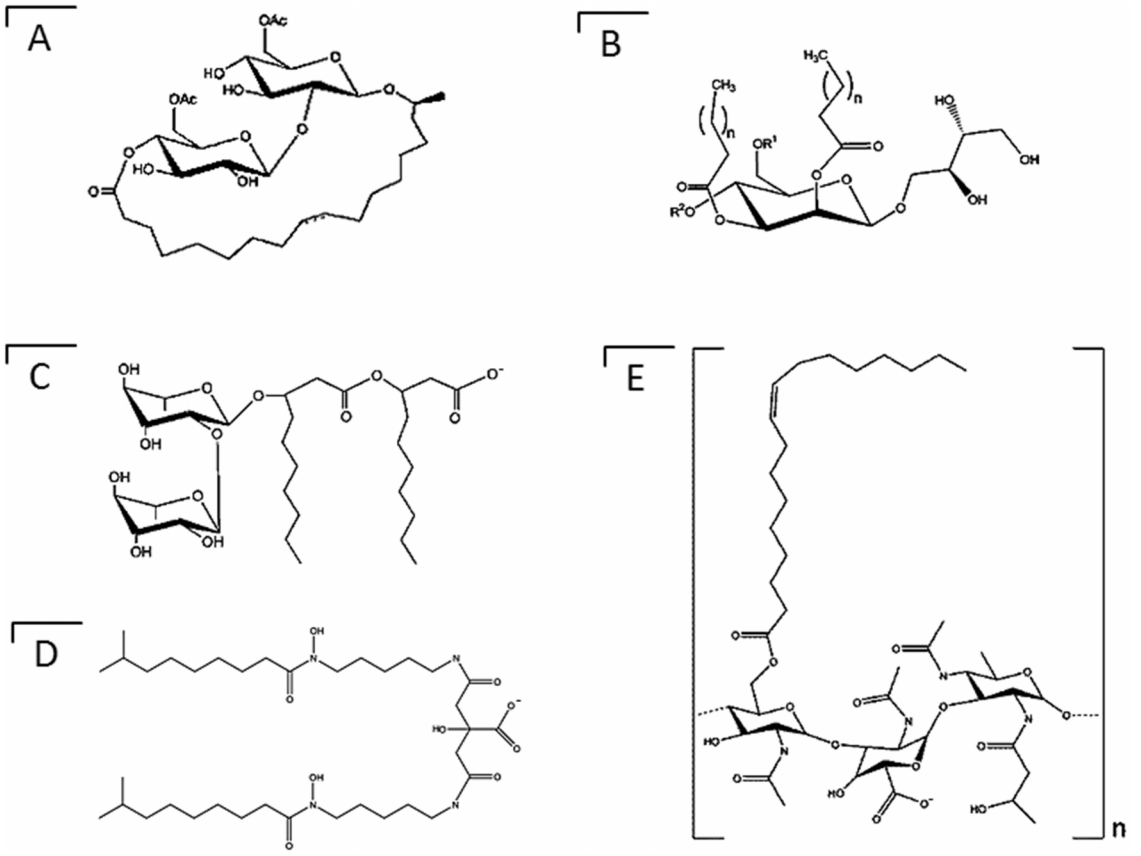


Abb. 1. 2 Strukturformeln verschiedener Biotenside. A Vollständig acylierte Lactonform der Sophorolipide aus *Starmerella bombicola*; **B** Mannosylerythritollipid aus *Pseudozyma spec*.; **C** Di-Rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*, **D** Flavolipid aus *Flavobacterium spec*., **E** Beispiel für Emulsan aus *Acenitobacter* RAG-1.

Die am ausführlichsten beschriebene Gruppe dieser Sekundärmetaboliten bilden die **Glycolipide**, also Verbindungen aus hydrophoben C-Ketten mit Zuckermolekülen. Beispiele für Glycolipide sind Sophorolipide, Mannosylerythritollipide und Rhamnolipide (Abb. 1. 2A-C).

Der am besten erforschte Produzent von Sophorolipiden ist *Starmerella bombicola,* bis Anfang 2013 offiziell auch unter dem Namen *Candida bombicola* geführt (Van Bogaert *et al.*, 2007; Daverey & Pakshirajan, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013; Solaiman *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2011), aber auch einige andere Hefen bilden dieses *Surfactant* (Van Bogaert & Soetaert, 2011). Sophorolipide werden hauptsächlich als Lacton produziert, daneben existiert aber auch die offenkettige anionische Form (Asmer *et al.*, 1988; Otto *et al.*, 1999). Im Vergleich zu anderen Biotensiden können Sophorolipide durch Fermentati-

on von *S. bombicola* mit sehr großen Ausbeuten von bis zu 400 g/L produziert werden (Roelants *et al.*, 2013), weshalb diese Glycolipide die ersten Biotenside waren, die kommerzielle Anwendungen u.a. in Reinigungsmitteln fanden. Kürzlich konnte auch die Biosynthese aufgeklärt werden. Beteiligt sind zwei Glycosyltransferasen, eine Acetyltransferase und eine P450-Monooxygenase, die die terminale Hydroxylierung der Fettsäure katalysiert (Van Bogaert *et al.*, 2013). Darüber hinaus ist für Sophorolipide auch ein spezifisches Transportprotein bekannt. Alle für die Sophorolipidsynthese und Sekretion kodierenden Gene sind in einem Gencluster lokalisiert (Van Bogaert *et al.*, 2013; Soetaert & Van Bogaert, 2012).

Ebenfalls von Hefen, hauptsächlich von Vertretern der Gattungen *Pseudozyma* und *Ustilago*, werden verschiedene Formen der Mannosylerythritollipide (MEL) produziert (Arutchelvi & Doble, 2011; Arutchelvi *et al.*, 2008). Diese nichtionischen Glycolipide bestehen aus einem Zucker (Mannose), einem Zuckeralkohol (Erythritol) und ein bis drei mit dem Zucker veresterten Acylresten (Abb. 1. 2B). Die Biosynthese erfolgt, zumindest in *Ustilago maydis,* durch drei Acyltransferasen und einer Glycosyltransferase, deren Gene, ähnlich wie bei den Sophorolipiden, zusammen mit einem Transportprotein in einem Gencluster organisiert sind (Hewald *et al.*, 2005, 2006).

Aufgrund ihrer dermatologischen Eigenschaften eignen sich MEL sehr gut als Zusätze von Kosmetika (Morita *et al.*, 2010, 2013; Yamamoto *et al.*, 2012).

Aber nicht nur Fungi, auch viele Bakterien produzieren Glycolipide. Das am besten erforschte Beispiel ist die Produktion von Rhamnolipiden in *Pseudomonas aeruginosa* (Abb. 1. 2C). Rhamnolipide bestehen aus ein oder zwei Rhamnosemolekülen, die mit einem β-Hydroxyfettsäure-Dimer (in Ausnahmefällen auch nur mit einer Fettsäure (Déziel *et al.*, 1999)) verknüpft sind (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Die Biosynthese erfolgt durch drei Proteine: Die Acyltransferase RhlA zur Generierung der Fettsäuredimere, die Glycosyltransferase RhlB zur Verknüpfung von Zucker und Fettsäuredimer sowie die Glycosyltransferase RhlC, die gegebenenfalls die Bildung einer Bindung zwischen Monorhamnolipiden und einem zweiten Molekül Rhamnose katalysiert (Schmidberger *et al.*, 2013). Rhamnose wird für die Synthese in aktivierter Form als dTDP-Rhamnose bereitgestellt, die (D)-β-Hydroxyfettsäuren sind durch Bindung an Acylcarrierproteine (ACP) aktiviert. Die Konformation der Fettsäure und ihre Bindung an ACP legen nahe, dass die Quelle für diese Vorläufermetabolite die *de novo*-Fettsäuresynthese ist

(Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002), was auch experimentell bestätigt wurde (Zhu & Rock, 2008). Hydroxy-Fettsäuren aus der β-Oxidation lägen als L-Isomer vor und sind durch Bindung an CoenzymA aktiviert. Der Sekretionsmechanismus der Rhamnolipide ist bisher nicht aufgeklärt. Die Produktion des Biotensids durch *P. aeruginosa* ist komplex reguliert und abhängig von Mediumzusammensetzung, pH, Temperatur und in besonderem Maße von *Quorum sensing* (Nitschke *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2011). Wie beide oben aufgeführten Biotenside stehen Rhamnolipide kurz vor dem kommerziellen Einsatz z.B. in Kosmetika (Lourith & Kanlayavattanakul, 2009; Müller *et al.*, 2012).

Viele weitere Bakterienarten aus verschiedenen Taxa produzieren ebenfalls diverse Glycolipide, wie z.B. *Alcanivorax borkumenis, Rhodococcus sp., Arthrobacter sp., Serratia rubidea*, manche Stämme von *Serratia marcescens* und *Burkholderia glumae* (Costa *et al.*, 2011; Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002; Matsuyama *et al.*, 2011; Passeri *et al.*, 1991; Pruthi & Cameotra, 2000; Shao, 2011; Toribio *et al.*, 2010; Yakimov *et al.*, 1998).

Ebenfalls Zucker als hydrophile Komponente besitzen die verschiedenen Emulsane (Abb. 1. 2E), Vertreter der **polymeren Biotenside** (Gorkovenko, 1999; Smyth *et al.*, 2010; Zuckerberg *et al.*, 1979). Bei diesen *Surfactants* sind anionische Bausteine aus drei acylierten Aminozuckern zu hochmolekularen Substanzen mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 kDa verbunden. Je nach Produzent können diese Lipopolysaccharide auch noch mit Aminosäuren oder Proteinen verknüpft sein. Emulsane und verwandte Substanzen wie Alasan werden hauptsächlich von Bakterien der Gattung *Acenitobacter* produziert (Rosenberg & Ron, 2013, 1997). Die Biosynthese dieser Polymere erfolgt durch die Produkte großer Gencluster, z.B. in *Acinetobacter lwoffii* des 27 kb großen *wee*-Clusters (Nakar & Gutnick, 2001, 2003).

Die hydrophile Domäne von Biotensiden kann aber nicht nur durch Zucker gebildet werden. So übernimmt bei Liamocinen mit Mannitol ein Alkohol diese Funktion (Price *et al.*, 2013), im Falle von Flavolipiden aus *Flavobacterium spec*. besteht die hydrophile Komponente aus Citrat mit zwei Cadaverinmolekülen an C_1 und C_3 (Abb. 1. 2D). Letztere sind verknüpft mit methylierten Fettsäuren (Bodour *et al.*, 2004).

Oftmals bilden auch Aminosäuren die hydrophile Komponente von Biotensiden. Dabei reicht das Spektrum von einfachen Lipoaminosäuren, die häufig Bestandteil von Membranen sind (Geiger *et al.*, 2010), bestehend aus ein oder zwei Aminosäuren und Acylket-

te(n), wie z.B. Ornithinlipide, Lysinlipide oder Cerilipine (Abb. 1. 3A) aus Ornithin und Taurin (Kishimoto *et al.*, 1993; Maneerat *et al.*, 2006; Tahara & Kameda, 1976; Tahara *et al.*, 1976) bis hin zu Hydrophobinen (Abb. 1. 3C), als Ganzes amphiphatischen Proteine, die von einigen Pilzen produziert werden (Sunde *et al.*, 2008; Woesten & Wösten, 2001).

Die prominenteste Klasse der aminosäurehaltigen Biotenside bilden aber die **Lipopeptide** (Abb. 1. 3B und D). Diese oftmals zyklischen Metabolite bestehen aus einer einige Aminosäuren langen Peptidkette, die mit Fettsäurederivaten verknüpft ist.

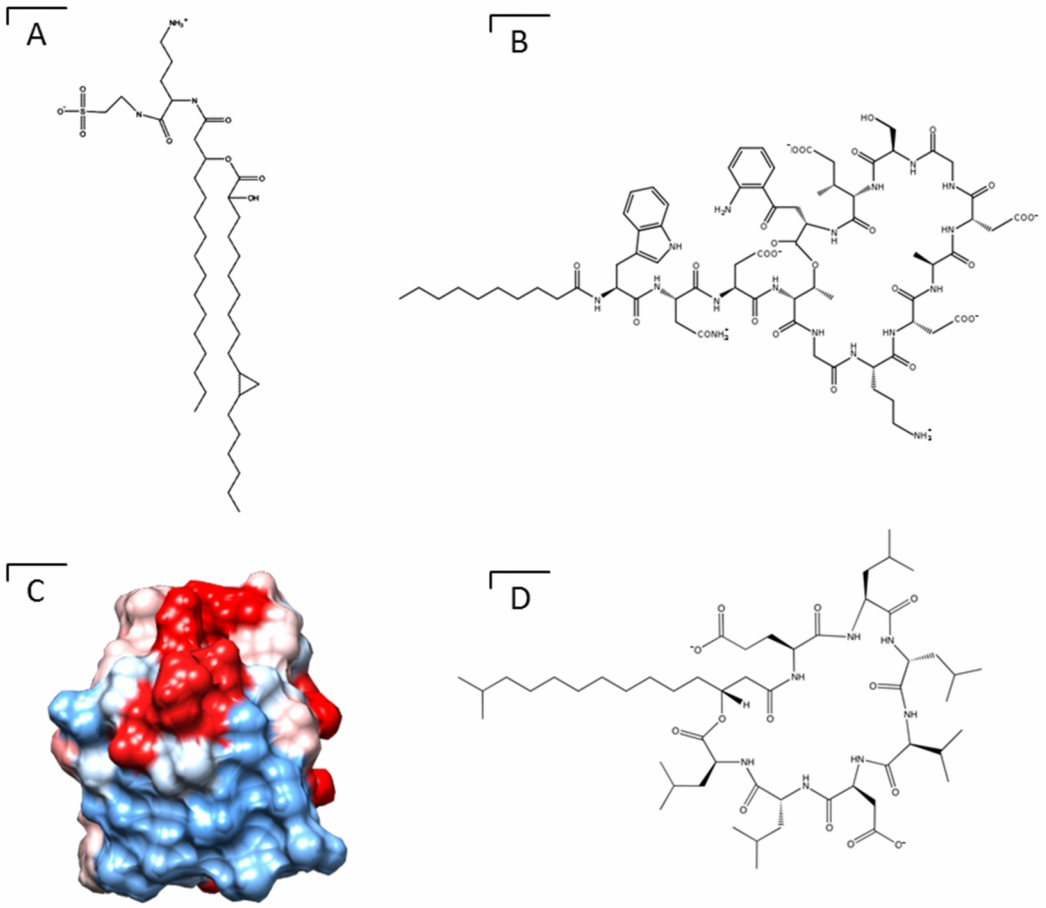


Abb. 1. 3 Strukturen verschiedener aminosäurehaltiger Biotenside. A Cerilipin aus *Gluconobacter cerinus;* **B** Lipopeptidantibiotikum Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus*; **C** Oberflächenmodell von Hydrophobin HFBII aus *Trichoderma reesei* (pdb 2B97). Die hydrophilen Bereiche des 71 Aminosäuren großen Proteins sind rot eingefärbt, die hydrophoben hellblau. Die Modellierung erfolgte mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) **D** Surfactin aus *Bacillus subtilis.*

Die Peptidkomponente wird nicht durch Ribosomen gebildet und besteht häufig nicht nur aus einer Auswahl der 20 proteinogenen L-Aminosäuren. Auch D-Enantiomere und andere Aminosäuren können Bestandteil der Lipopeptide sein, wie es auch für andere nichtribosomale Peptidmetaboliten wie die Siderophore Enterobactin und Pyoverdin aus *Escherichia coli* bzw. *Pseudomonas aeruginosa* oder die Antibiotika der Gramicidin-Familie aus *Bacillus brevis* bekannt ist (Burkhart *et al.*, 1999; Meyer, 2000; Rusnak *et al.*, 1991).

Die Biosynthese von nichtribosomalen Peptiden erfolgt durch ein System von meist mehreren Multidomänenproteinen, den nichtribosomomalen Peptidsynthetasen oder NRPS (Berti *et al.*, 2007; Ongley *et al.*, 2013).

Lipopeptidsynthese ist für eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien publiziert, so beispielsweise für viele Arten der Gattungen *Streptomyces, Pseudomonas, Serratia* und *Bacillus* (Burch *et al.*, 2010; Jacques, 2011; Jang *et al.*, 2013; Kuiper *et al.*, 2004; Raaijmakers *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2008). Am besten erforscht ist bisher die Produktion von Surfactin (Abb. 1. 3D), einem Lipopeptid aus *Bacillus subtilis*, dass in den 60er Jahren des 20. Jahrhundert erstmals beschrieben wurde (Arima *et al.*, 1968; Kakinuma *et al.*, 1969). Es stellt eines der effektivsten Tenside überhaupt dar (Minimale Oberflächenspannung 27 mN/m (Yeh *et al.*, 2008)).

Surfactin besteht aus L-Glutamat, L-Leucin, D-Leucin, L-Valin, L-Aspartat, D-Leucin, L-Leucin und methylierten (D)-β-Hydroxyfettsäuren, hauptsächlich 3-Hydroxy-13--Methylmyristinsäure, also einer verzweigten C_{14}-Kette (Nagal *et al.*, 1996). Über die Fettsäure werden Leucin und Glutamat verknüpft, so dass ein Cyklodepsipeptid entsteht. Wie schon erwähnt, vollzieht sich die Synthese der nichtribosomalen Peptide an Komplexen

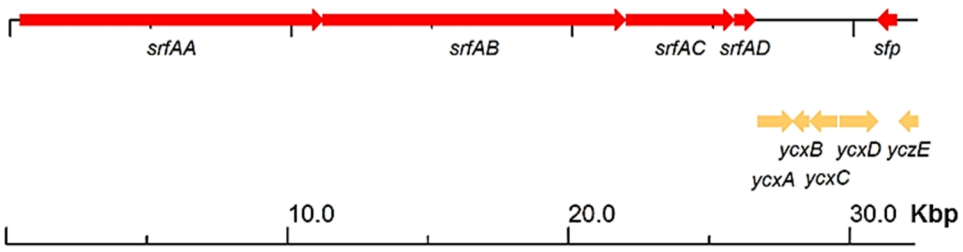


Abb. 1. 4 Schematischer Aufbau des Surfactinsynthese-Genclusters. Die an der Surfactinsynthese beteiligten Gene (Koumoutsi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012) sind rot markiert. *srfAA-C* kodieren NRPS, die jeweils die Bindung der verschiedenen Aminosäuren katalysieren. *srfAD* ist ein Gen für eine zusätzliche Thioesterase, *sfp* kodiert für eine Phosphopantetheinyltransferase (siehe Text 1.2.3.1, S.15). In Gelb dargestellt sind Gene für nach bisherigem Kenntnisstand nicht direkt in die Synthese von Surfactin involvierte putative Proteine. Die auf dem Maßstab angegebenen Werte entsprechen 1000 Basenpaaren. Die Abbildung wurde erstellt mit Clone Manager 9 auf Basis von Genbank JQ073775.1.1

aus Multimodulenzymen. Jedes Modul besitzt dabei mehrere Domänen mit unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten (siehe auch Kapitel 1.2.3) und katalysiert Aktivierung und Einbau von nur einer Aminosäure. Im Falle von Surfactin sind die direkt beteiligten Proteine SrfAA, -B und -C mit 402 kDa, 401 kDa und 144 kDa, deren Gene mit *srfAD* in einem Operon organisiert sind (Abb. 1. 4). An SrfAA wird die Biosynthese durch Verknüpfung der

Fettsäure mit L-Glu initiiert und die Peptidkette um L-Leu und D-Leu erweitert, SrfAB verlängert die Kette um L-Val, L-Asp und D-Leu (beide Proteine bestehen dementsprechend aus drei Modulen), während SrfAC die Bindung von L-Leu und den Ringschluss katalysiert und für die Dissoziation des Peptides vom Synthesekomplex sorgt (Peypoux *et al.*, 1999; Tanovic *et al.*, 2008).

Die Aminosäuren werden durch die Adenylierungsdomänen der NRPS aktiviert, die D-Hydroxyfettsäuren in diesem Fall, im Gegensatz zum Beispiel zur Lipopeptidsynthese in *Streptomyces roseosporus* (Chooi & Tang, 2010), durch Ligation an CoenzymA (Kraas *et al.*, 2010). Auf Grund der tensidischen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften von Surfactin, gibt es großes Interesse, die Produktionsbedingungen für dieses *Surfactant* aufzuklären und zu optimieren (Cagri-Mehmetoglu *et al.*, 2012; Jacques, 2011; Lee *et al.*, 2007; Seydlová & Svobodová, 2008; Yeh *et al.*, 2008). Daneben gilt es als ein Modell für Lipopeptidbiotenside. So ist das terminale Modul der Biosynthese, SrfAC, bisher unserem Wissen nach die einzige vollständige NRPS, deren Struktur aufgeklärt wurde (Finking *et al.*, 2004; Tanovic *et al.*, 2008).

1.2.3 Lipopeptide von *Serratia marcescens*

Ebenfalls seit den 1960er Jahren bekannt ist die Lipopeptidproduktion durch verschiedene *Serratia marcescens* Stämme (Wasserman *et al.*, 1961), diese Metaboliten sind aber in den folgenden Jahrzehnten nicht so sehr in den wissenschaftliche Focus gelangt wie Surfactin oder auch die Rhamnolipide aus *P. aeruginosa*. In der Folgezeit ist *S. marcescens* eher durch einen anderen Sekundärmetabolit, das pharmakologisch sehr vielversprechende rote Tripyrrol-Pigment Prodigiosin bekannt geworden (Chang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013b; Williamson *et al.*, 2006). Nichtsdestotrotz sind gerade in den letzten Jahren mehrere Arbeiten erschienen, die mehr Licht auf die Lipopeptidsynthese werfen.

Serratia marcescens ist ein potentiell humanpathogenes Bakterium aus der Klasse der Enterobakterien, das vor allem nosokomiale Infektionen bei immungeschwächten Personen verursachen kann (Berthelot *et al.*, 1999; Hejazi & Falkiner, 1997; Mahlen, 2011; Maragakis *et al.*, 2008; Voelz *et al.*, 2010). Zusammen mit seiner Fähigkeit, multiple Antibiotikaresistenzen zu entwickeln, macht das dieses Bakterium zu einem ernstzunehmenden Krankenhauskeim (Maragakis *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 1997; Siširak & Hukić, 2013; Suh *et al.*, 2010).

Von verschiedenen Stämmen der Art *S. marcescens* ist die Produktion unterschiedlicher Biotenside bekannt, darunter Ornithinlipide (Hara-Hotta *et al.*, 1991), verschiedene Glycolipide (Anyanwu *et al.*, 2011b; Pruthi & Cameotra, 2000) und bislang drei Lipopeptide, die mit Serrawettin W1, W2 und W3 benannt wurden (Matsuyama *et al.*, 2011). Bisher sind keine Stämme bekannt, die zwei oder alle drei Lipopeptide produzieren. Serrawettin W2 und W3 sind zyklische Depsipeptide mit einer β-Hydroxyfettsäure, also strukturell ähnlich aufgebaut wie Surfactin und werden, nach bisherigem Wissenstand, von nicht pigmentierten *S. marcescens*-Stämmen produziert (Matsuyama *et al.*, 2011). Die Peptidanteile beider Biotenside bestehen aus fünf Aminosäuren -Leucin, Serin, Threonin, Phenylalanin und Isoleucin bei W2, zwei Serinreste, Threonin , Valin und Leucin oder Isoleucin bei W3 (Ibrahim *et al.*, 2013; Matsuyama *et al.*, 1992). Zudem unterscheiden sich die beiden Lipopeptide in der Länge der vorherrschende Fettsäurespezies (C_{10} bei W2, C_{12} bei W3). Über die an der Biosynthese dieser beiden Biotenside beteiligten Proteine ist bislang noch nichts bekannt. Serrawettin W1 ist ebenfalls ein zyklisches Lipopeptid, besitzt aber eine völlig andere Struktur (Abb. 1. 5). Diese symmetrisch aufgebaute Verbindung wird aus zwei Molekülen L-Serin und zwei D-β-Hydroxyfettsäuren aufgebaut (Dwivedi *et al.*, 2008; Nakagawa & Matsuyama, 1993; Wasserman *et al.*, 1962).

Serrawettin W1 wird häufig auch als Serratamolid bezeichnet, da dieses *Biosurfactant* nach seiner Entdeckung 1961 so benannt wurde. Unter diesem Namen wurde es als Cyclo(3-hydroxydecanoyl-L-seryl)$_2$ beschrieben, also als zusammengesetzt aus zwei Serin- und zwei β-Hydroxydecansäureresten. Inzwischen ist aber bekannt, dass in dem Biotensid auch Kongenere (also Moleküle mit dem gleichen Grundgerüst, in diesem Zusammenhang synonym zu „Spezies“) zu finden sind, bei denen eine der beiden Acylketten des Moleküls durch eine kürzere oder längere Fettsäure gebildet wird (Dwivedi *et al.*, 2008; Hara-Hotta *et al.*, 1991; Matsuyama & Nakagawa, 1996a). Da in den Datenbanken für chemische Ver-

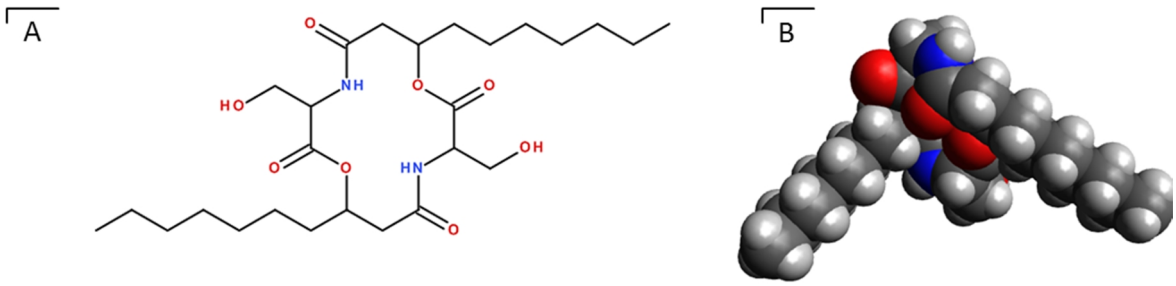


Abb. 1. 5 Struktur von Serrawettin W1. A Strukturformel von Serratamolid, einem Kongener des Serrawettin W1, ein zyklisches Lipopeptid mit der Sequenz β-Hydroxydecansäure-Serin-β-Hydroxydecansäure-Serin; **B** räumliches Kalottenmodell von Serratamolid, erstellt mit Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012).

bindungen (z.B. PubChem und ChemSpider) zudem die Bezeichnung Serratamolid unter der CAS-Nummer 5285-25-6 spezifisch mit der Substanz Cyclo(3-hydroxydecanoyl-L-seryl)$_2$ verknüpft ist, wird in dieser Arbeit für das Biotensid, um Missverständnissen vorzubeugen, durchgehend die eigentlich jüngere Bezeichnung Serrawettin W1 verwendet.

1.2.3.1 Synthese von nichtribosomalen Peptiden am Beispiel Serrawettin W1

Mit diesem symmetrischen Aufbau mit nur einer Spezies von Aminosäuren ist Serrawettin W1 der einfachste bekannte Typ eines nichtribosomalen Peptids. Da damit nur Serin durch die NRPS aktiviert werden muss, ist auch die Biosynthesemaschinerie weniger komplex als z.B. die von Surfactin und es reicht ein NRPS-Modul, damit auch ein NRPS-Protein aus, um dieses Lipopeptid zu synthetisieren (Abb. 1. 6). Als Serrawettin-Synthetase konnte in *S. marcescens* ATCC274 das ca. 150 kDa große Protein SwrW (Abb. 1. 6A) identifiziert werden (Li *et al.*, 2005a), kodiert von einem ca. 4kb langem Gen (Genbank Accession number AB193098.2). Dieses Protein besitzt die für NRPS typischen Domänen für Kondensation, Adenylierung, Aminosäurebindung und Thioesterhydrolyse (Apao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005a).

Die Erkennung und Aktivierung der Aminosäure, hier Serin, erfolgt durch die Adenylierungsdomäne (A), die die Aminosäure an den Phosphopantetheinrest der Peptidyl Carrier-Protein-Domäne (PCP) bindet. Phospopantethein ist eine CoenzymA ähnliche prosthetische Gruppe mit einer terminalen SH-Gruppe, die kovalent an ein Serin der Carrierproteine gebunden ist und Thioester mit den Säuregruppen von Aminosäuren (oder von Fettsäuren im Falle von Acyl Carrier-Proteinen (ACP), die diese prosthetische Gruppe ebenfalls beinhalten) ausbilden und die Subtrate so kovalent an das Carrierprotein binden (Chan & Vogel, 2010). Durch die Bindung der Aminosäure an diesen „Arm“ wird es ermöglicht, dass diese von der in der dreidimensionalen Konformation zentral gelegenen PCP-Domäne der NRPS aus die aktiven Zentren aller drei katalytisch aktiven Domänen erreichen kann (Tanovic *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Gruppe wird die PCP-Domäne auch als Phosphopantetheinyl-Domäne (PP) oder Thiolation-Domäne (T) bezeichnet. Die Kondensierungsdomäne *(Condensation domain,* C*)* katalysiert die Verknüpfung der gebundenen Aminosäure mit der-β-Hydroxyfettsäure. Die Thioesterase (TE) katalysiert im letzten Schritt der Synthese die Spaltung des Thiosesters an der PCP-

Domäne und ermöglicht so die Zyklisierung des Peptids. Wie bei anderen NRPS sind die Domänen vom N-Terminus gesehen in der Reihenfolge C-A-PCP-TE angeordnet.

Im Falle von Serrawettin W1 muss zur Synthese des rotationsymmetrischen Moleküls der oben beschriebene für NRPS grundlegende Mechanismus zweimal ablaufen (Abb. 1. 6B).

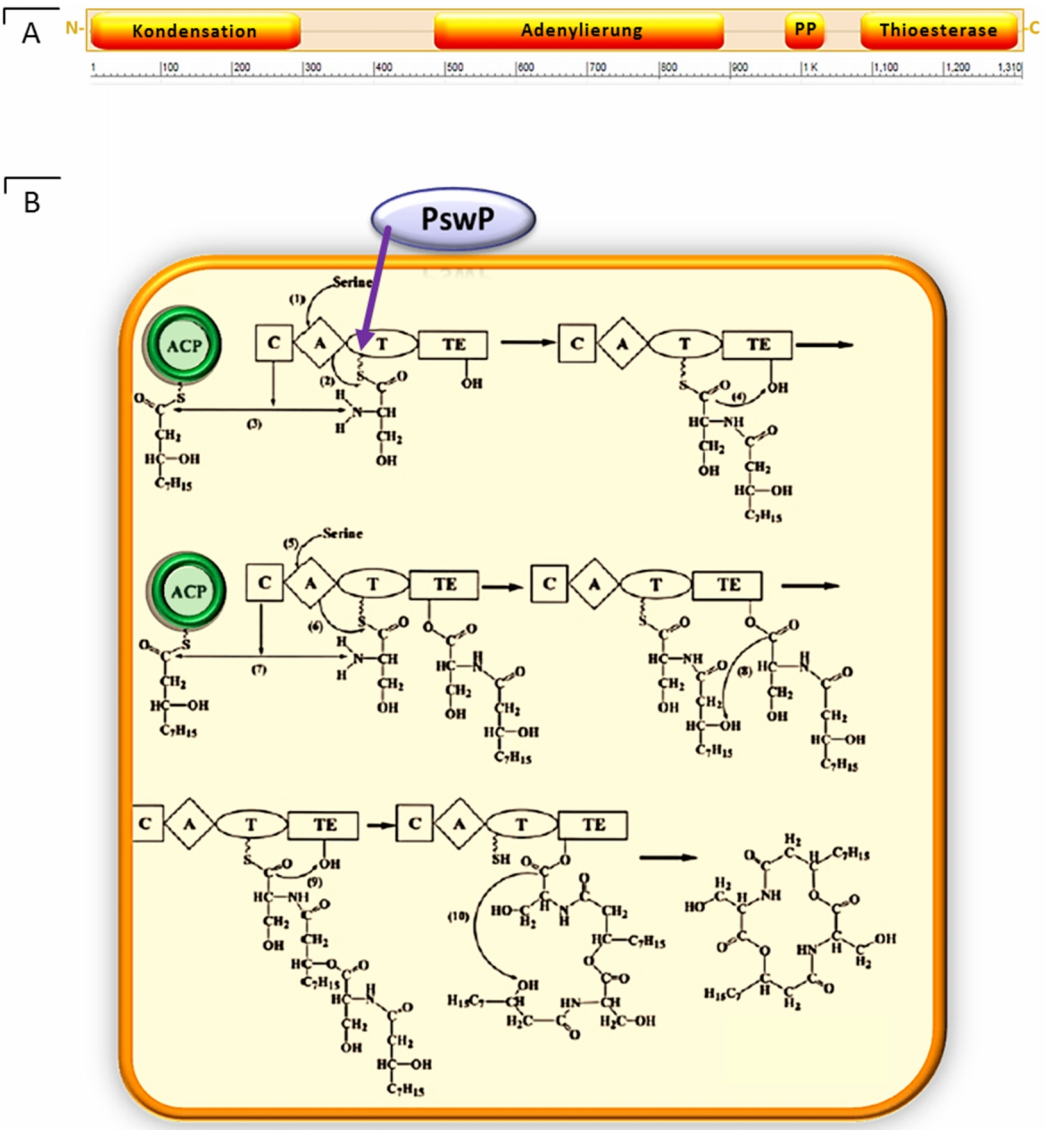


Abb. 1. 6 Biosynthese von Serrawettin W1 A Schematischer Aufbau der Serrawettinsynthetase SwrW mit den vier charakteristischen Domänen eines NRPS-Moduls (PP ist gleicht bedeutend mit Peptidycarrierdomäne). Der Maßstab zeigt die Länge in Aminosäuren an. Die Abbildung wurde erstellt mit MyDomains (Hulo *et al.*, 2008). **B** Propagierter Ablauf der Biosynthese nach Li *et al.*, 2005a. Der orangefarbene Kasten repräsentiert SwrW, die dargestellten Syntheseschritte sind im Text näher erläutert. C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, T: Thiolation-, also Petidylcarrierdomäne, TE: Thioesterasedomäne. Die weiteren mutmaßlich an der Synthese beteiligten Proteine sind das Acylcarrierprotein (ACP, grüner Kreis) zur Bereitstellung der aktivierten Fettsäuren und PswP (blau-violett), das einen Phosphopantetheinylrest (dargestellt durch die Schlangenlinie) an einen konservierten Serinrest an der Adenylierungsdomäne bindet. ACP werden gewöhnlich von anderen PPT modifiziert (Finking *et al.*, 2004), eine Beteiligung von PswP dabei ist also eher unwahrscheinlich. Die schematische Darstellung der Syntheseschritten an SwrW ist mit freundlicher Genehmigung durch den Rechteinhaber aus Li et al., 2005a (©John Wiley & Sons, Inc. (Chichester), 2005) entnommen.

Dafür wird angenommen, dass die erste β-Hydroxyacylat-seryl-Einheit nach Hydrolyse des Thioesters am katalytisch aktiven Serin der TE verbleibt. Damit befindet sich nach Wiederholung von Adenylierung und Kondensation sowohl an der TE-Domäne als auch an der PCP-Domäne je ein β-Hydroxyacylat-seryl-Rest. Diese beiden in direkter Nachbarschaft liegenden Moleküle reagieren miteinander, ähnlich wie es für die Synthese von Gramicidin S propagiert wird (Trauger *et al.*, 2000), zu einem Molekül, das nach Lösung der Bindung an der TE zyklisiert (Li *et al.*, 2005a; Matsuyama *et al.*, 2011).

Neben SwrW ist das Protein PswP essentiell für die Biosynthese von Serrawettin W1. PswP ist eine Phosphopantetheinyltransferase (PPT), die vermutlich für die postranslationale Bindung des Phosphopantetheins an die PCP-Domäne veantwortlich ist (Sunaga *et al.*, 2004). Wie oben beschrieben ist die NRPS ohne diese prostethische Gruppe nicht funktional. Dieses Enzym interagiert nicht nur mit SwrW, es besitzt auch ein essentielle Rolle in der Aktivierung eines Enzyms aus der Prodigiosinsynthese (Sunaga *et al.*, 2004). Daneben wird die Präsenz von Acyl-ACP zur Bereitstellung der aktivierten Fettsäuren als elementar vermutet. Ein experimenteller Nachweis in Form von ACP-defizienten Stämmen konnte aber noch nicht erbracht werden, möglicherweise weil dieses Protein essentiell für elementare Zellfunktionen ist (Matsuyama *et al.*, 2011).

1.2.3.2 Regulation der Serrawettin-Produktion in *Serratia*

Wie auch für andere Biotenside bekannt (Das *et al.*, 2008; Satpute *et al.*, 2010), ist die Biosynthese von Serrawettin W1 komplex reguliert. Auswirkungen haben äußere Einflüsse wie das Verhältnis von Spurenelementen zueinander (Roldán-Carrillo *et al.*, 2011), für die Kolonisierung verfügbare Oberflächen (Yamashita *et al.*, 2001) und die Temperatur. So wird Serrawettin wie auch Prodigiosin bei 30°C gebildet, bei 37°C jedoch nicht (Matsuyama *et al.*, 1986). Des Weiteren sind einige intrinsische Regulationsmechanismen beschrieben. Involviert in die Reaktion auf äußere Einflüsse ist wahrscheinlich der PigP-abhängige Regulationsweg, der auch die Prodigiosin-Synthese beeinflusst. PigP ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität durch HexS (einem LysR-Typ-Regulator) und cAMP-abhängige Katabolitrepression durch das cAMP-Rezeptorprotein (CRP oder CAP) gesteuert wird (Shanks *et al.*, 2013; Tanikawa *et al.*, 2006). Über HexS und PigP wird die Transkriptionsstärke der Synthetasegene (also *swrW* und z.B. *pigA*) reguliert, nicht aber die des PPT-Gens *pswP* (Tanikawa *et al.*, 2006).

Darüber hinaus ist die Produktion der Biotenside wohl abhängig von *Quorum sensing* gesteuerten Regulationsmechanismen, wie es auch von *P. aeruginosa* bekannt ist (Reis *et al.*, 2011). Ein Einfluss von kurzkettigen Homoserinlactonen auf Serrawettin W1 assoziierte Phänotypen wurde bei *S. marcescens* ATCC274 nachgewiesen, für die Serrawettin W2 produzierenden Stämme *S. liquefaciens* MG1 (jetzt *S. marcescens* MG1 (Labbate *et al.*, 2007)) und *S. marcescens* 12I sind Proteine aus der LuxR/I-Familie (zu der beispielsweise auch LasR/I aus *P. aeruginosa* gehören) bereits bekannt, welche die Produktion des Lipopeptids beeinflussen (Coulthurst *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2008; Lindum *et al.*, 1998).

1.2.4 Natürliche Funktionen von Biotensiden

Analog zur ihrer strukturellen Vielfalt (1.2.2) werden Biotensiden eine ganze Reihe von physiologischen Funktionen zugeschrieben, wobei ein Biotensid auch mehrere Funktionen für den produzierenden Mikroorganismus haben kann (Chrzanowski *et al.*, 2012; Raaijmakers *et al.*, 2010; Ron & Rosenberg, 2001).

In Habitaten mit einem hohen Anteil hydrophober Verbindungen wie polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) aus Erdöl könnte die Sekretion von Biotensiden den produzierenden Organismen helfen, diese als Nahrungsquelle verfügbar zu machen, entweder durch Emulsion der hydrophoben Komponenten oder durch Hydrophobierung der Zelloberfläche, was die Anlagerung der Organismen an die hydrophoben Substanzen vereinfacht . Diese Funktion ist zumindest für Biotensidproduzenten, die z.B. aus ölkontaminierten Böden isoliert wurden, anzunehmen, aber auch bei ubiquitär verbreiteten Organismen, die eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen nutzen können, ist eine solche Funktion zu vermuten. So ist beispielsweise für *P. aeruginosa* und *S. marcescens* nachgewiesen, dass die jeweiligen *Biosurfactants* die Hydrophobizität der Zelloberfläche erhöhen (Bar-Ness *et al.*, 1988; Sotirova *et al.*, 2009; Willumsen & Karlson, 1997; Zhang & Miller, 1992; Zhong *et al.*, 2008).

Auf eine weitere Funktion deutet die oft nachgewiesene Assoziation von Biotensidproduktion mit einer bestimmten Form der Motilität auf Oberflächen, dem Schwärmen hin (Partridge & Harshey, 2013; Raaijmakers *et al.*, 2010; Ron & Rosenberg, 2001). Hier dienen oberflächenaktive Substanzen als *wetting agent* und ermöglichen so eine Überwindung der Spannung zwischen fester Oberfläche und der Hülle der Mikroorganismen. Unter Laborbedingungen auf Festmedien konnte bei vielen Arten eine vollständige Repressi-

on des Schwärmens nach Inaktivierung der Biotensidsynthese beobachtet werden, so z.B. für die Produzenten von Surfactin, Rhamnolipiden und Serrawettin W1 (Déziel *et al.*, 2003; Hamze *et al.*, 2009; Kinsinger *et al.*, 2003; Matsuyama & Nakagawa, 1996a, b). Unter natürlichen Bedingungen ist diese Funktion, unter anderem, wichtig für epiphytische Organismen, die auf den Oberflächen von Blättern leben. Diese sind von einer wachsartigen, hydrophoben Schicht, der *Cuticula,* überzogen (Jetter & Schäffer, 2001). Die Produktion von Biotensiden kann hier Adhäsion und Bewegung auf diesen Oberflächen erleichtern (Knoll & Schreiber, 1998; Schreiber *et al.*, 2005). Bei darüber hinaus pflanzenpathogenen Organismen, wie *Ustilago maydis* oder *Pseudomonas syringiae* (Djamei & Kahmann, 2012; Mansfield *et al.*, 2012), könnte die Produktion dieser Substanzen als Virulenzfaktoren auch das Eindringen in das Pflanzengewebe unterstützen (D'aes *et al.*, 2010; Pauwelyn *et al.*, 2013; Raaijmakers & Mazzola, 2012; Scholz-Schroeder *et al.*, 2001). Auch bei humanpathogenen Organismen wurden *Biosurfactants* als Virulenzfaktoren identifiziert (Shanks *et al.*, 2012; Zulianello *et al.*, 2006). Neben Adhäsion und Motilität spielt hier deren Beitrag zum Aufbau von Biofilmen, einer relativ festen Matrix aus Exopolysacchariden, Exoproteinen, DNA und Biotensiden, eine wichtige Rolle (Chrzanowski *et al.*, 2012; Raaijmakers *et al.*, 2010). Biofilme können die Bakterien vor der Immunantwort des Wirtsorganismus und auch vor Antibiotika schützen und so eine Abwehr der Infektion verhindern (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001).

Weitere Funktionen bei der Interaktion mit anderen Arten offenbaren die antimikrobiellen Eigenschaften der Biotenside (Bockmühl, 2012a; Cadieux *et al.*, 2008; Singh & Cameotra, 2004; Sotirova *et al.*, 2012; Wasserman *et al.*, 1962). Diese lassen vermuten, dass die Sekretion dieser Substanzen dazu dienen kann, das Wachstum potentieller Nahrungskonkurrenten zu hemmen, was vor allem in oligotrophen Habitaten einen Selektionsfaktor darstellt (Soberón-Chávez & Maier, 2011). Unterstützt wird diese Theorie durch die Existenz spezifischer Resistenzmechanismen gegen *Biosurfactants*. So sekretiert *Streptomyces spec.* ein spezifisch Surfactin-spaltendes Enzym als Reaktion auf die Präsenz diese Lipopeptids im Medium (Hoefler *et al.*, 2012).

Ferner wird eine Funktion in der Abwehr von Fraßfeinden, wie z.B. Nematoden diskutiert (Pradel *et al.*, 2007; Raaijmakers *et al.*, 2010).

Neben der oben beschriebenen Nutzung von hydrophoben Kohlenstoffquellen könnten Biotenside aufgrund der oftmals nachgewiesenen Fähigkeit, Komplexe mit Metallionen zu

bilden (Aşçi *et al.*, 2010; Bodour *et al.*, 2003; Czaplicka & Chmielarz, 2009; Das *et al.*, 2009) als Siderophore zur Bereitstellung bestimmter Metallionen dienen. Aber auch eine Detoxifikation von schädlichen Metallionen durch Chelation mit Biotensiden wäre denkbar (Raaijmakers *et al.*, 2010; Ron & Rosenberg, 2001). Dafür spräche z.B. der hohe Anteil Biotensid-produzierender Stämme in Proben aus den Schwermetall reichen Abraumhalden von Blei/Zink-Minen (Soberón-Chávez & Maier, 2011).

Eine Funktion unabhängig von den tensidischen Eigenschaften wird für die Sophorolipide aus *S. bombicola* angenommen. Hier ist die Synthese der Glycolipide eine metabolische Überflussreaktion, die sekretierten Lipide dienen u.a. als extrazellulärer Nährstoffspeicher (Van Bogaert *et al.*, 2007).

Diese vielen unterschiedlichen physiologischen Funktionen der Biotenside, begründet auf die unterschiedlichen Eigenschaften, geben Hinweise auf mögliche biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten dieser Stoffklasse.

1.2.5 Biotechnologisches Anwendungspotential von Biotensiden

Als biotechnologische, gut umweltverträgliche Alternative zu petro- und oleochemisch produzierten Tensiden sind die Biotenside immer mehr in den Fokus von Industrie und anwendungsorientierter Forschung gerückt. So hatte der Markt an biobasierten Tensiden 2011 ein Volumen von 1,7 Mrd. US-Dollar und soll bis 2018 um fast 30% wachsen auf ca. 2,2 Mrd. US-Dollar (Transparency Market Research, 2012). Viele mögliche Einsatzfelder wurden dabei für verschiedene Biotenside evaluiert (Banat *et al.*, 2000, 2010; Desai & Banat, 1997; Mukherjee *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007).

Aufgrund guter Reinigungseigenschaften auch bei niedrigen Temperaturen können Biotenside in Wasch- und Reinigungsmitteln bisher eingesetzte Detergenzien ergänzen oder ersetzen (Mukherjee, 2007; Müller *et al.*, 2012; Nguyen & Sabatini, 2011), mit den Sophorolipiden gibt es auch bereits ein Beispiel für eine erfolgreiche Marktplatzierung in Reinigungsmitteln (Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, 2013). Zudem bieten die antimikrobiellen Eigenschaften vieler *Biosurfactants* einen zusätzlichen positiven Aspekt für den Einsatz in Reinigungsmitteln.

Die darüber hinaus geringe Toxizität macht diese Substanzen zudem interessant für Anwendungen als Emulgatoren in Kosmetika, auch hier sind verschiedene Biotenside, sowohl Glycolipide als auch Lipopeptide, bereits positiv bewertet worden (Bockmühl,

2012b; Inoue, 1988; Kanlayavattanakul & Lourith, 2010; Lourith & Kanlayavattanakul, 2009). Für Mannosylerythritollipide ist darüber hinaus eine hautregenerative Wirkung beschrieben worden, so dass zumindest diese Glycolipide nicht nur als biologisch produzierter Emulgator, sondern auch als Wirkstoff interessant sind (Morita *et al.*, 2010, 2013; Ryall, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012). Antimikrobielle Effekte der Biotenside könnten zudem die Zersetzung von z.B. Cremes verlangsamen, so dass auf Konservierungsmittel verzichtet werden könnte (Mandal *et al.*, 2013).

Ähnliches gilt auch für den möglichen Einsatz als Emulgator in Nahrungsmitteln. Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie, sowohl in den Endprodukten, wo mit den Lecithinen bereits Biotenside, wenn auch keine mikrobiell produzierten, im großen Maßstab eingesetzt werden, als auch während des Produktionsprozesses wurden dementsprechend auch bereits diskutiert und teilweise patentiert (Mandal *et al.*, 2013; Nitschke & Costa, 2007; Zezzi do Valle Gomes & Nitschke, 2012).

Zudem sind auch mögliche medizinische Anwendungen publiziert, sowohl als Wirkstoffe oder Emulgatoren in Pharmazeutika, als auch aufgrund ihrer antiadhäsiven Effekte auf viele Bakterien, zur Beschichtung von Oberflächen, z.B. von Prothesen und Kathetern, um die Gefahr von Infektionen zu vermindern (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013; Piljac *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2006; Stipcevic *et al.*, 2006).

Vielversprechend für den Einsatz von *Biosurfactants* aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit sind auch alle Anwendungen, bei denen die Tenside direkt in die Umwelt gelangen, so z.B. die Anwendung als Emulgator oder Wirkstoffverstärker in Pestiziden und Düngemitteln (D'aes *et al.*, 2010; Ongena & Jacques, 2008; Sachdev & Cameotra, 2013; Strobel *et al.*, 2005; Vatsa *et al.*, 2010) oder in der Sanierung von mit Öl kontaminierten Flächen (Cameotra & Makkar, 2010; van Hamme & Urban, 2009; Moldes *et al.*, 2013; Mulligan, 2005; Pérez-Armendáriz *et al.*, 2013). Dementsprechend standen Biotensid produzierende Organismen auch im Focus einiger Studien nach den Unfällen des Tankers Prestige 2002 vor Spanien und der Bohrplattform Deep Water Horizon 2010 im Golf von Mexiko (Beazley *et al.*, 2012; Larson, 2013; Seth-Smith, 2010). Neben der Reinigung von ölkontaminierten Böden ist zudem, aufgrund der chelatbildenden Eigenschaften viele Biotenside, vielfach ein möglicher Einsatz in der Sanierung von schwermetallkontaminierten Flächen publiziert worden (Das *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Mulligan, 2005; Singh & Cameotra, 2013).

Eine weitere Anwendung, die immer wieder diskutiert wird, ist *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR), also ein Einsatz innerhalb der tertiären Phase der Ölförderung (1.1.3). *Biosurfactant*s sollen dabei das im Boden verbliebene Öl emulgieren und so eine Förderung ermöglichen. Hierbei werden drei Varianten diskutiert: Das Einbringen Biotensid produzierender Stämme in die Ölquelle, die Anreicherung des Ölreservoirs mit ausgewählten Nährstoffen, um das Wachstum intrinsischer Biotensidproduzenten zu stimulieren oder das Einbringen von gereinigten Biotensiden, analog zu der unter 1.1.3 angeführten klassischen Strategie der tertiären Ölförderung (Harrington *et al.*, 2007). Das Resultat aller drei Varianten ist die Möglichkeit, weiteres Öl durch Ausspülen mit Wasser an die Oberfläche bringen zu können. Auch für diese Anwendungen sind vielversprechende Ergebnisse nach ersten Feldversuchen publiziert (Al-Sulaimani & Joshi, 2011; Banat, 1995; Gudina *et al.*, 2012; Joshi & Desai, 2013; Sen, 2008).

Bisher sind geringe Ausbeuten und hohe Kosten durch Produktion und *downstream processing,* sowie die häufig auftretende Pathogenität von Biotensidproduzenten die größten Hindernisse für eine breite Verwendung von Biotensiden in industriellen Produktionsprozessen. Trotz eines wachsenden Interesses an nachhaltig produzierten Tensiden seitens der produzierenden Industrie und des Marktes sind Biotenside für viele Anwendungen daher bisher nicht mit den chemisch hergestellten Tensiden wettbewerbsfähig und eine weitere Optimierung der Produktionsprozesse ist unabdingbar für einen kommerziellen Einsatz dieser Naturprodukte (Foley *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2012; Soberón-Chávez & Maier, 2011; Syldatk & Hausmann, 2010). Eine Strategie ist hierbei die heterologe Produktion von Biotensiden in etablierten Laborstämmen (Ochsner *et al.*, 1996; Toribio *et al.*, 2010; Wittgens *et al.*, 2011).

Außerdem zeigt die Vielzahl der unterschiedlichen Strukturen und der damit einhergehenden Eigenschaften, die zu den vielen verschiedenen Anwendungen führt, dass es sinnvoll sein kann, neben der Optimierung der Produktion der „etablierten" Biotenside auch nach Möglichkeiten Ausschau zu halten, um das Portfolio an verfügbaren *Biosurfactants* zu vergrößern. Dies kann z.B. durch genauere Charakterisierung von bereits bekannten Biotensiden geschehen, deren Produktion und Eigenschaften bisher nicht so viel Aufmerksamkeit wie beispielsweise Sophorolipide, Rhamnolipide, Emulsan und Surfactin erfahren haben. Eine weitere Möglichkeit ist das *Screening* nach neuen Substanzen in Umweltproben.

1.3 Funktionelles Screening von Metagenombanken

1.3.1 Metagenom

Ein auf Umweltisolaten basierendes *Screening* ist ein etablierter Weg zur Identifizierung neuer Biokatalysatoren, neuer Varianten von Biokatalysatoren oder bisher unbekannter Sekundärmetabolite. Bislang sind schätzungsweise über 99% aller auf der Erde lebenden Mikroorganismen nicht beschrieben (Akondi & Lakshmi, 2013), somit öffnet sich dem screenenden Wissenschaftler ein potentiell riesiger Pool an bislang nicht identifizierten bioaktiven Molekülen. Eine Möglichkeit des *Screenings* ist dabei, die in den Isolaten enthaltenen Mikroorganismen im Labor zu kultivieren und auf die gesuchten Eigenschaften hin zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Strategie konnten schon mehrfach Biotenside produzierende Stämme in Umweltisolaten, z.B. aus PAH- oder Schwermetall-kontaminierten Böden oder den Teergruben von La Brea in Kalifornien, identifiziert werden (Batista *et al.*, 2006; Belcher *et al.*, 2012; Bodour *et al.*, 2003; Burch *et al.*, 2011; Hamed *et al.*, 2012; Janek *et al.*, 2013; Passeri *et al.*, 1991; Saravanan & Vijayakumar, 2012; Willumsen & Karlson, 1997; Yakimov *et al.*, 1998). Eine solche Vorgehensweise erfasst allerdings nur Substanzen, deren Produzenten unter gegebenen Laborbedingungen kultivierbar sind, für manche Habitate entspricht das einem Anteil von ca. 1% aller Lebewesen (Amann *et al.*, 1995; Schloss & Handelsman, 2003). Das Metagenomkonzept eröffnet Möglichkeiten, diese Limitierung zu umgehen.

Der Metagenomgedanke vereint das Konzept und die Methoden der Genomik, also die Betrachtung der Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus im weitesten Sinne mit dem grundlegenden Gedanken der Metaanalyse im Wortsinne, der Betrachtung von einem übergeordneten Standpunkt aus (Handelsman, 2004; Handelsman *et al.*, 1998). Das heißt, Metagenomik betrachtet nicht nur die genetische Information eines einzelnen Organismus, sondern die von allen Organismen eines ganzen Habitats, das „Meta-Genom“, ohne dass jede einzelne Spezies isoliert und kultiviert werden muss. Der Metagenomansatz ermöglicht es, auch die Informationen der nicht kultivierbaren Organismen auswerten zu können (Chen & Pachter, 2005). Dazu wird die Gesamt-DNA direkt aus der Umweltprobe isoliert (*environmental DNA* oder eDNA) und analysiert. Diese Methode liefert Einblicke in die Vielfalt und Zusammensetzung von mikrobiellen Gemein-

schaften (Schmeisser *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2004; Yooseph *et al.*, 2007), darüber hinaus bietet sie aber auch den Zugang zu Genen für die Synthese von Enzymen und Sekundärmetaboliten der nicht kultivierbaren Organismen. Dabei sind zwei Strategien etabliert:
Im sogenannten sequenzbasierten Ansatz werden durch Oligonukleotide (Gensonden oder (degenerierte) Primer) Sequenzmotive detektiert, die ähnlich in bereits bekannten Enzymen identifiziert wurden. Gene mit diesen Motiven werden dann gezielt amplifiziert, kloniert und die Klone auf die gewünschte Eigenschaft hin untersucht (Ferrer *et al.*, 2005; Galvão *et al.*, 2005; Piel, 2011). Dabei können natürlich nur Gene aufgespürt werden, die eine größere Homologie zu bereits bekannten Genen haben.
Beim funktionsbasierten *Screening* wird das Metagenom in Fragmente zerlegt und eine sogenannte Metagenombibliothek oder –bank angelegt, indem die Fragmente in einen etablierten Laborstamm eingebracht werden. Diese Bibliothek aus Klonen des Laborstammes, die idealerweise alle unterschiedliche Fragmente des Metagenoms beinhalten, wird auf die gewünschte Eigenschaft hin durchmustert (Schloss & Handelsman, 2003, 2005; Streit & Schmitz, 2004). Zwar hat auch der Metagenomansatz Limitierungen, so muss beispielsweise beim funktionsbasierten *Screening* vor allem vorausgesetzt werden, dass die Gene aus der eDNA durch die verwendeten Laborstämme heterolog aktiv exprimiert werden. Durch mangelhafte Promotorerkennung, ineffiziente Translation durch unterschiedliche Codonverwendung, Fehlfaltung der Proteine, fehlender posttranslationaler Modifizierung oder Toxizität der Genprodukte für den Wirtsstamm gehen wohl viele Treffer verloren (Francis & Page, 2010; Liu *et al.*, 2009a; Rosano & Ceccarelli, 2009; Zheng *et al.*, 2011). Diese Verluste lassen sich aber z.B. durch Wahl geeigneter Expressionssysteme und das simultane *Screening* in unterschiedlichen Wirtsorganismen reduzieren (Craig *et al.*, 2010; Troeschel *et al.*, 2012).
Viele Studien konnten das Potential von metagenomischen Ansätzen in Bezug auf die Identifizierung neuer für die Biotechnologie interessanter Biokatalysatoren bereits zeigen (Chow *et al.*, 2012; Elend *et al.*, 2006; Erich *et al.*, 2012; Fernández-Álvaro *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2009; Schmeisser *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2009; Voget *et al.*, 2003).

1.3.2 Sekundärmetaboliten aus dem Metagenom

Ein Metagenomscreening kann nicht nur bei der Suche nach neuen Enzymen hilfreich sein. Darüber hinaus wurde diese Strategie bereits erfolgreich zur Identifizierung neuer

Sekundärmetaboliten (Tabelle 1. 2) und deren Synthesewege etabliert (Brady *et al.*, 2009; Cragg & Newman, 2013; Iqbal *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2011; Piel, 2011; Steele *et al.*, 2009; Wenzel & Müller, 2005; Wilson & Piel, 2013). Eine Herausforderung dabei ist, nicht nur einzelne Enzyme aktiv exprimieren zu müssen, sondern vollständige Synthesewege. Voraussetzung dafür ist eine gewisse Größe der eDNA-Fragmente, um ganze Biosynthesecluster -z.B. für Surfactin >30 kb (Li et al., 2012, Abb. 1. 4)- zu beherbergen. Dafür bieten sich Klonierungssysteme wie *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC), Fosmide (F-Plasmid basierte Vektoren) oder Cosmide (Vektoren für Phagen basierte Transduktion mit *cos site*) an (Streit & Schmitz, 2004; Wilson & Piel, 2013).

Im Falle eines funktionsbasierten *Screenings* ist zudem die Entwicklung eines geeigneten und effizienten *Screening*systems nötig. Sehr gut durchzuführen sind naheliegender Weise *Screening*s auf Pigmentproduktion, aber auch auf antibiotische Eigenschaften. Hier werden die Metagenomklone auf die Fähigkeit hin betrachtet, das Wachstum des Zielbakteriums, z.B. *B. subtilis,* zu inhibieren. Antimikrobielle Substanzen sind dementsprechend auch relativ häufig Ziel von Metagenomscreenings (Brady *et al.*, 2002, 2009; Steele *et al.*, 2009). Andere *Assays* detektieren gezielt die aktive Expression von Phosphopantetheinyltransferasen, die, wie oben beschrieben, essentiell für die Aktivität von NRPS (und auch von Polyketidsynthasen (PKS)) und häufig Bestandteil der entsprechenden Biosynthesegencluster sind (Owen *et al.*, 2012). Darüber hinaus ist auch eine Analyse jedes ein-

Tabelle 1. 2 Beispiele für bei Metagenom*screenings* identifizierten Sekundärmetaboliten. Aufgeführt ist jeweils, neben der Bezeichnung, die *Screening*methode und der Ansatzpunkt des *Screenings*.

Metabolit	Screening	Referenz
Acyl-Aminosäuren	funktionsbasiert, antibakteriell	(Brady & Clardy, 2005a; Brady *et al.*, 2002)
Palmitoylputrescin	funktionsbasiert, antibakteriell	(Brady & Clardy, 2004)
Patellamid D	funktionsbasiert, HPLC-MS	(Long *et al.*, 2005)
Indolotryptoline	sequenzbasiert, *Oxy-Tryptophan dimerization gene*	(Chang & Brady, 2013)
Violaceine	funktionsbasiert, Pigmentierung	(Brady *et al.*, 2001)
Terragin E	funktionsbasiert, HPLC-MS	(Wang *et al.*, 2000)
Sulfo-Teicoplanin aglycone	sequenzbasiert, Couplingenzyme aus Glycopeptidclustern	(Banik & Brady, 2008)
Psymberin	sequenzbasiert, Ketosynthasen aus PKS	(Fisch *et al.*, 2009)
Polytheonamide	sequenzbasiert, Peptidgerüst	(Freeman *et al.*, 2012)

zelnen Klons per HPLC auf Sekundärmetabolitproduktion publiziert, eine allerdings etwas aufwändigere Methode (Piel, 2011). Alternativ kann auch sequenzbasiert gescreent werden, in dem die eDNA auf bestimmte konservierte Motive z.B. von NRPS oder PKS durchsucht wird (Wilson & Piel, 2013).

Bezüglich der Suche nach *Biosurfactants* im Speziellen sind bisher unserem Wissen nach noch keine Metagenomstudien veröffentlicht worden. Aufgrund der strukturellen Diversität dieser Metabolitklasse und den damit verbundenen vielen unterschiedlichen Biosynthesegenen (siehe 1.2.2) bieten sich hier funktionsbasierte *Screening*methoden an. Zur Detektion von *Biosurfactant* produzierenden Organismen oder aktiverer Varianten dieser Stämme wurde in der Vergangenheit meist auf *Assay*s zurückgegriffen, durch die Aktivitäten detektiert werden, die für viele Biotenside typisch sind, wie z.B. Haemolyse oder die Komplexierung von Methylenblau (Pinzon & Ju, 2009; Saravanan & Vijayakumar, 2012). Auch antibakterielle *Screening*s würden in diese Kategorie passen. Diese Methoden sind allerdings nicht spezifisch für oberflächenaktive Substanzen.

Tensidische Eigenschaften könnten durch die Emulsionseigenschaften oder die Oberflächenspannung von Kulturüberständen nachgewiesen werden, wie durch Emulsifikations-, *drop collapsing*- und *grid-Assay* (Chen *et al.*, 2007; Saravanan & Vijayakumar, 2012). Dafür muss allerdings jeder Klon der Metagenombibliothek in Flüssigkultur angezogen werden, was zeit- und arbeitsaufwändig ist. Vor relativ kurzer Zeit ist aber mit dem *atomized oil assay* eine Methode zur Detektion von oberflächenaktiven Substanzen auf Festmedien entwickelt worden, die eine Hochdurchsatzdurchmusterung von Metagenombibliotheken

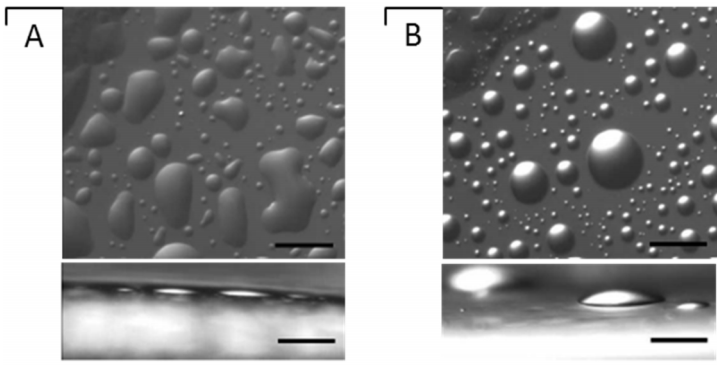


Abb. 1. 7 Mikroskopische Aufnahmen zum *atomized oil assay* Paraffin-Tröpfchen auf LB-Agar. **A** ohne Tenside; **B** mit dem Lipopeptid-Biotensid Syringafactin (rechts). Oben jeweils eine Aufsicht, darunter eine Seitenansicht. Der Balken repräsentiert 0,2 mm. Die Abbildungen sind entnommen aus Burch *et al.*, 2010,© American Society for Microbiology, mit freundlicher Genehmigung des Rechteinhabers.

auf die Produktion von Biotensiden hin erlaubt (Burch *et al.*, 2010, 2011). Dieser *Assay* nutzt aus, dass bei Anwesenheit von Tensiden eine möglichst kleine Kontaktfläche zwischen Agar und darauf aufgebrachter mikroskopisch kleiner Öltröpfchen und damit ein größerer Winkel zwischen Agaroberfläche und Öloberfläche thermodynamisch bevorzugt wird, was in einheitlich geformten, runden Öltröpfchen resultiert. Ohne Tenside nehmen die Öltröpfchen auf dem Agar eine ungeordnete, flachere Form an (Abb. 1. 7).

Regionen mit einheitlich runden Öltropfen weisen ein anderes Lichtbrechungsverhalten auf als Regionen mit flachen Tropfen, was in der Ausbildung eines bei indirektem Lichteinfall sichtbaren Hofes um die Biotensid produzierenden Kolonien herum resultiert (Burch *et al.*, 2010).

Die Anwendung eines solchen *high throughput assays*, speziell zur Detektion oberflächenaktiver Substanzen, bietet gute Chancen, in Metagenombanken auch neue Biotenside zu identifizieren (Kennedy *et al.*, 2011).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Biotenside sind eine interessante Klasse von Metaboliten mit vielen potentiellen Anwendungen in Biotechnologie, Medizin und Umwelttechnik. Zu den mikrobiell produzierten oberflächenaktiven Substanzen gehören strukturell und vom metabolischen Ursprung her sehr unterschiedliche Moleküle, deren strukturelle Vielseitigkeit sich auch in ihren chemophysikalischen und biologischen Eigenschaften wiederspiegelt. Deshalb ist es sinnvoll, die Palette an verfügbaren Biotensiden zu erweitern und neuen Substanzen mit wieder anderen Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten für biotechnologische Prozesse zu erschließen. In dieser Arbeit sollen zwei unterschiedliche Ansatzpunkte verfolgt werden, um dieses Ziel zu erreichen: Einerseits die Etablierung der Produktion eines zwar schon lange bekannten, aber diesbezüglich nicht näher betrachteten Biotensids in Gestalt des Serrawettin W1, andererseits die Evaluierung des Metagenomscreenings als Strategie zur Detektion von neuen Biotensiden.

Im ersten Teil sollen Strategien für die Produktion von Serrawettin W1 entwickelt werden. Mit den Sophorolipiden, den Mannosylerythritollipiden und den Rhamnolipiden sowie dem polymeren Emulsan gehören die meisten bisher für biotechnologische Anwendungen näher in Betracht gezogenen Biotenside zu den Glycolipiden, die ebenfalls anwendungsbezogen interessante Klasse der Lipopeptide ist mit Ausnahme des Surfactins diesbezüglich wenig untersucht.

Serrawettin W1 ist ein solches Lipopeptid, das bisher trotz interessanter Eigenschaft kaum unter dem Gesichtspunkt der biotechnologischen Produktion und Anwendung betrachtet wurde. In dieser Arbeit sollen Grundlagen für die Produktion im homologen Wirt *Serratia marcescens* untersucht werden und darüber hinaus Alternativen zum Einsatz dieses humanpathogenen Organismus in der Produktion etabliert werden. So soll die heterologe Expression der Biosynthesegene für dieses Lipopeptid evaluiert und etabliert werden, was nicht nur das Problem der Pathogenität von *S. marcescens* umgeht, sondern die Produktion zudem unabhängiger von zellulären Regulationsnetzwerken des homologen Wirtes macht.

Im zweiten Teil sollen nach Entwicklung neuer Tools für die Konstruktion von Metagenombanken in Kombination mit Methoden zum Hochdurchsatzscreening Klone einer Metagenombank auf die Produktion von Substanzen mit tensidischen Eigenschaften hin untersucht werden. Im Anschluss an die Identifizierung sollen diese Substanzen isoliert, ihre

Struktur aufgeklärt werden, sowie eine initiale Charakterisierung ihrer chemo-physikalischen und biologischen Eigenschaften erfolgen. Darüber hinaus sollen die an der Biosynthese beteiligten eDNA- Gene bestimmt werden, um Einblicke in die Biosynthese zu gewinnen. Einen Überblick über den Ablauf eines solchen Biotensid-orientierten Metagenomprojekt gibt Abb. 1. 8.

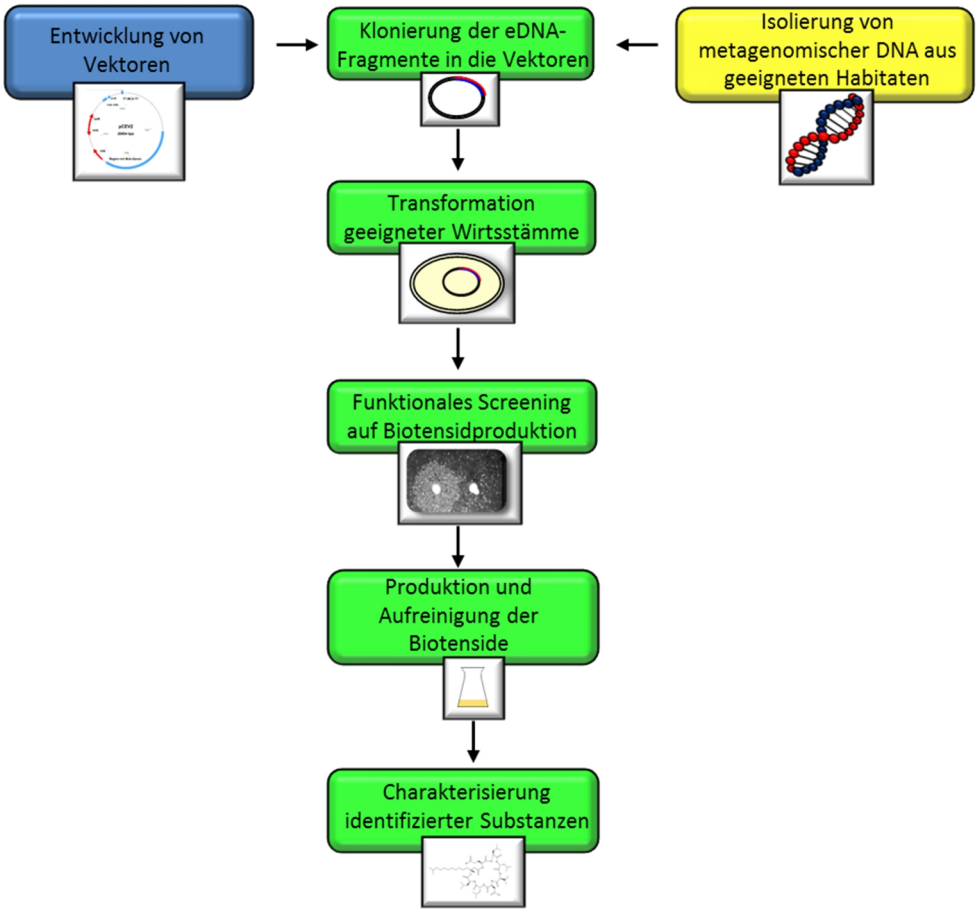


Abb. 1. 8 Schematischer Überblick über den allgemeinen Ablauf eines Metagenomprojektes zur Identifizierung von Biotensid-Synthesewegen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 2. 1 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen

Stamm	Genotyp	Referenz
Bacillus subtilis TEB1030 Marburg 168	Wildtyp	(Kunst *et al.*, 1997)
Chromobacterium violaceum CV026	Variante von ATCC31532, defizient für Violacein Produktion	(McClean *et al.*, 1997)
Corynebacterium glutamicum ATCC13032	Wildtyp	(Abe *et al.*, 1967)
Erwinia billingiae Eb661 DSM17872	Wildtyp	(Mergaert *et al.*, 1999)
Escherichia coli BL21 (DE3)	*F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm* (λIts857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5*-T7gene1)	(Studier & Moffatt, 1986)
Escherichia coli BL21 Gold	*F^- ompT hsdSB(rB^- mB^-) gal dcm^+ endA Tet^R Hte*	Agilent (USA)
Escherichia coli DH10b	*F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-*	(Durfee *et al.*, 2008)
Escherichia coli DH5α	*supE44 Δ (lacZYA-argF)U196 (Φ80DlacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	(Woodcock *et al.*, 1989)
Pseudomonas aeruginosa PAO1	Wildtyp, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Dieter Haas (Lausanne, CH)	(Holloway *et al.*, 1979)
Pseudomonas putida KT2440	Wildtyp	(Bayley *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 2002)
Serratia marcescens DSM12481, (W225)	Wildtyp	(Labrum & Bunting, 1953; Winkler & Timmis, 1973)
Serratia marcescens subsp. *marcescens* DSM30121, (ATCC13880)	Wildtyp	(Colwell & Mandel, 1965)
Sorangium cellulosum DSM53796	Wildtyp	(Schneiker *et al.*, 2007)

Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* (Bachmann, 1990).

2.2 Verwendete Plasmide

Tabelle 2. 2 Übersicht über die verwendeten Plasmide und Vektoren

Plasmid	Genotyp	Quelle/ Referenz
pEBP18	*amyE' 'amyE* ColE1 *cos gfpmut3** Km^R Cm^R MCS minR' P_{T7} P_{xyl}	(Troeschel *et al.*, 2012)
pET22b	*ColE1* P_{T7}*Φ10lacIq,* Amp^R	EMD Millipore
pLAFR3	*Cos sites* Tet^R *Plac mob*	(Staskawicz *et al.*, 1987; Vanbleu *et al.*, 2004)
pMMB207	Cm^R, *RSF1O1O-*$lacI^q/P_{tac}$	(Morales *et al.*, 1991)
pVLT33	Km^R, *RSF1O1O-*$lacI^q/P_{tac}$	(de Lorenzo *et al.*, 1993)
pCEV2	pLAFR3 mit 2 T7 Promotoren und MCS durch Einbau des Oligonukleotids " T7-MCS-T7"	diese Arbeit
pCEV2-TB303	pCEV2 mit Metagenomfragment aus pEBP18 TB303 (Tröschel, 2010)	diese Arbeit
pEBP18-SA343	pEBP18 mit einem 3,3kb Fragment metagenomischer DNA inklusive NAS343	(Tröschel, 2010)
pEBP18-SA354	pEBP18 mit einem 8,8kb Fragment metagenomischer DNA inklusive NAS354	(Tröschel, 2010)
pETSwrW-CHis	pET22b mit *swrW* aus *S. marcescens* DSMZ12481, (XbaI, XhoI)	diese Arbeit,
pET-NAS354	pET22b containing the NAS354 gene	diese Arbeit
pET-NASE103A	pET22b containing the NAS354 gene with Glu103 substituted by Ala	diese Arbeit
pMA-RQ-T7-MCS	Amp^R , enthält T7-MCS-T7	diese Arbeit, Gene-Art/Invitrogen
pMMB-EbiNRPS	pMMB207 mit putativen NRPS-Gen aus *E. billingiae* (XbaI,SalI)	diese Arbeit,
pVLT-SwrW	pVLT33 mit *swrW* aus *S. marcescens* DSMZ12481	diese Arbeit
pVLTSwr-CHis	pVLT33 mit *swrW*-mit C-terminalen His-tag	diese Arbeit,

2.3 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2. 3 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind hervorgehoben, durch Primer eingefügte Mutationen unterstrichen.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Schnittstellen	Funktion
BAec354-LPLAT-bw1	ATAT**CTCGAG**CTCAGGCTGGGTGGTGTGCA	*XhoI*	PCR NAS354 für pET-NAS354
BAec354-LPLAT-fw1	ATAT**CATATG**CAAGACACCACGTTACTC	*NdeI*	PCR NAS354 für pET-NAS354
BA354 E103A QC	GGCCAGATTGCCGCAGTGTCGGCCTTG		Austausch E103A in pETNAS354
BA354 E103A QCbw	CAAGGCCGACACTGCGGCAATCTGGCC		Austausch E103A in pETNAS354
Ebi-NRPS His rev	ATA**CTCGAG**GTGTGGATGAGTTTCGCGG	*XhoII*	PCR für pMMB-EbiNRPS
EbiNRPS-160	CG**TCTAGA**TCAGACGACCATCTCTC	*XbaI*	PCR für pMMB-EbiNRPS
lac frag up	TGAGCGGATAACAATTTCAC		Sequenzierung pCEV2 *anti-sense*
M13-24R	CGGATAACAATTTCACACAGG		Sequenzierung pVLT/pMMB
pCEV2seq	TTCCCAGTCACGACGTTGTAAA		Sequenzierung pCEV2
coli RT rpoD dn	CTGCGTTCGGGTCAACAAAG		RT und q-PCR von *rpoD*
coli RT rpoD up	CAGGTTCAATGCTCCGTTGC		RT und q-PCR von *rpoD*
RT TB mid S1	ACACTACCATCATCGGAAGCC		RT und q-PCR Fragment 2 von pCEV2 TB
RT TB mid S2	TAGCATTCCCAATCCGCTTC		RT und q-PCR Fragment 2 von pCEV2 TB
RT TB start A1	ATGACCCCCATCAAAACCAC		RT und q-PCR Fragment 1 von pCEV2 TB
RT TB start A2	TTGCACCGCCTTCAAAATCG		RT und q-PCR Fragment 1 von pCEV2 TB
ST SwrW seq1	TGGGCGTGCCGGTACATAA		Sequenzierung von *swrW*
ST SwrW seq2	CGCAAGGCGTACATCAATTCC		Sequenzierung von *swrW*
ST SwrW seq3	GTAACGCTTTGCGATCCAG		Sequenzierung von *swrW antisense*
SwrW down	AAA**TCTAGA**CCGGCTGATGTGGTAA	*XbaI*	PCR SwrW für pVLT-SwrW
SwrW Histag rev	ATTA**CTCGAG**AGGAAGATTGCCGAGCATC	*XhoI*	PCR SwrW für pETSwr-CHis
SwrW Histag rev	ACAT**TCTAGA**TAGCAGCCGGATCTCAGT	*XbaI*	PCR SwrW für pVLTSwr-CHis
SwrW up pVLT	AAA**GAATTC**AATGTTCGAGTGCTTGGC	*EcoRI*	PCR SwrW
SwrW rev	CTCTCATCCGCCAAAACAG		Sequenzierung pVLT *anti-sense*

T7-MCS-T7	Synthetisiertes Fragment, siehe Abb. 3.2. 1	Konstruktion von pCEV2
T7prom	TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung pET
T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung pET *antisense*

2.4 Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Applichem (Gatersleben)

Chemikalien: Fluka (Sternheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Applichem (Gatersleben)

Medienkomponenten: Roth (Karlsruhe), Fluka (Sternheim), Difco (Detroit, USA), Fiebig Nährstofftechnik (Idstein-Niederauroff/Taunus), Sensas (Königs Wusterhausen)

Enzyme: Restriktionsenzyme stammen von den Firmen Thermo Fisher Scientific /Fermentas (Schwerte) und New England Biolabs (Schwalbach).

Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase von Fermentas (Schwerte) oder Roche (Basel), *Calf intestine alkaline Phosphatase* (CIAP), T4-Polymerase, Klenow-Fragment und Phusion- Polymerase von Thermo Fisher Scientific /Fermentas (Schwerte).

Antikörper: Der Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) wurde von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) bezogen.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB): (Sambrook & Russell, 2001)	Roth (Karlsruhe), Zusammensetzung: 10 g/L Trypton; 10 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt, pH 8
Trypton Glycerin (TG) Medium: (Matsuyama *et al.*, 1985), modifiziert	5 g/L Trypton aus Casein, 10 g/L Glycerin

Prodigiosinproduktionsmedium: nach (Giri *et al.*, 2004)	20 g/L Erdnussmehl (geröstet, fett (Sensas)) in H_2O bzw. LB-Medium
Blutagarbasis-Medium:	40 g/L Blutagarbasis (Roth, Zusammensetzung: Herzinfus (10 g/L), Pepton aus Fleisch (10 g/L), NaCl (5 g/L), Agar-Agar (15 g/L), pH 7,3))

Festmedien
(Sambrook & Russell, 2001)
Zur Herstellung von Festmedium wurde dem jeweiligen Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar-Agar zugesetzt.

Müller-Hinton Agar:	21 g/L Müller-Hinton Broth (Difco) 15 g/L (w/v)Agar-Agar
Skim milk Agar	60 g/L Skim Milk-Pulver (Fluka) in H_2O 2x LB-Agar Getrennt autoklavieren (30 min, 105°C) und bei ca. 60°C zusammengeben
Tributyrinagar: (Kok *et al.*, 1993)	3 mL Tributyrin und 0,3 g *Gummi arabicum,* auf 6 mL aufgefüllt mit H_2O Dieses Gemisch wurde mit Ultraschall emulgiert und zu 200 mL LB-Agar gegeben.

Sterilisation von Nährmedien

Die Sterilisation von Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren (20 Min, 2 bar und 121°C). Hitzelabile Komponenten (Antibiotika, IPTG) wurden sterilfiltriert (Membranfilter, Porendurchmesser 0,22 µm, VWR (Darmstadt)), bevor sie dem autoklavierten Medium (T < 60°C) zugesetzt wurden.

2.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte sowohl in Flüssigkultivierung als auch auf Festmedien standardmäßig bei 37°C, ausgenommen sind Experimente zur Expression der Serrawettinsynthetase, die in der Regel bei 30°C durchgeführt wurden. *S. marcescens*, *E. billingiae* und *P. putida* wurden standardmäßig bei 30°C inkubiert. Zur Selektion bzw. Stabilisierung von Plasmiden wurde gegebenenfalls ein adäquates Antibiotikum (Tab. 2. 4) zugefügt.

Kulturen bis zu einem Volumen von 5 mL wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller angezogen, während die Inkubation von größeren Volumina in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/5 bis 1/10 des Gefäßvolumens), abgedeckt mit Alufolie, auf einem Inkubationsschüttler bei 120 bis 150 Umdrehungen pro Minute (Upm) erfolgte.

Die Bestimmung der Zelldichte (OD) von Kulturen wurde nach geeigneter Verdünnung mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz durchgeführt.

Tabelle 2. 4 Übersicht über die verwendeten Antibiotika und die eingesetzte Endkonzentration in Kulturen der verschiedenen Stämme.

Antibiotikum	Konzentration für (mg/L)		
	E. coli	*P. putida*	*E. billingiae*
Ampicillin	100	-	-
Chloramphenicol	50	-	50
Tetracyclin	10	50	10
Kanamycin	50	100	50

2.5.2.1 Vorkulturen

Für Übernachtkulturen (ÜK) wurden 10 mL LB-Medium + 0,4% Glukose + gegebenenfalls Antibiotikum entweder mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten oder aus einer Gefrierkultur mit 1/500 Volumen inokuliert und für mindestens 16 h inkubiert.

2.5.2.2 Kulturen zur Expression von *swrW* aus *S. marcescens* und zur Produktion von Serrawettin W1 in *E. coli, E. billingiae* oder *P. putida*

Die heterologe Expression der NRPS erfolgte in Schüttelkolben mit LB-Medium, versetzt mit Antibiotikum und 0,4% Glukose. Die auf eine Zelldichte von OD_{580nm} = 0,05 inokulierten Expressionskulturen wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer OD_{580nm} von 0,5-0,8 entsprach, im Inkubationsschüttler bei 30°C, wenn nicht anders angegeben, inkubiert. Die Induktion der Gen-Expression erfolgte dann durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Nach 18 h wurden Zellen und Kulturüberstand durch Zentrifugation (3220xg, 30 min) getrennt. Das Zellpellet wurde verworfen, der Überstand wurde weiteren Arbeitsschritten zugeführt.

Bei Expressionsversuchen auf Festmedien wurden Einzelkolonien der untersuchten Stämme auf LB-Agar, versetzt mit IPTG (Endkonzentration 0,5 mM bei *E. coli* bzw. 1 mM) und dem passenden Antibiotikum, übertragen, die Platten bei 30°C 16 h bebrütet und die Produktion oberflächenaktiver Substanzen per *atomized oil assay* (2.8.1) analysiert.
Experimente zur Expression der NRPS aus *E. billingiae* in *E. coli* erfolgten analog.

2.5.2.3 Kulturen zur Acyltyrosinproduktion in *E. coli*

Hauptkulturen von *E. coli* DH10b mit pEBP18-SA343 oder pEBP18-SA354 in 10-500 mL LB-Medium mit Kanamycin (50 mg/L) wurden mit Zellen aus einer Vorkultur auf eine Zelldichte, die einer OD_{580nm} von 0,05 entsprach, inokuliert. Die Kulturen wurden 18 h-24 h bei 37°C inkubiert, danach durch Zentrifugation (3220xg, 30 Min) Zellen und Kulturüberstand getrennt. Die Zellmasse wurde verworfen, der Überstand weiteren Arbeitsschritten zugeführt

2.5.2.4 Lagerung von Bakterien

Die dauerhafte Lagerung aller Stämme erfolgte in Gefrierkulturen. Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden 1,8 mL ÜK (2.5.2.1) mit 135 µl DMSO vermischt und in Cryoröhrchen (Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)) bei -80°C eingefroren.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Präparation von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienstämmen erfolgte nach der von Birnboim and Doly, 1979, beschriebenen Methode der alkalischen Lyse mit dem innuPREP PlasmidMini-Kit der Firma Analytik Jena (Jena) aus Übernachtkulturen. Zur Plasmidvermehrung wurde *E. coli* DH5α eingesetzt.
Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte mit dem DNA Blood and Tissue Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellervorschrift oder nach Troeschel et al. 2010 mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung.

2.6.2 Agarosegelelektrophorese (Sambrook & Russell, 2001)

Zur Analyse von DNA-Verdau und PCR-Produkten, zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus Fragmentgemischen und zur Abschätzung von DNA Konzentrationen in Lösungen wurde Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

Folgende Puffer wurden dabei verwendet:

TBE-Puffer 2,5x (pH 8,3): 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (5x): 100 mM EDTA, 43 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in 0,5xTBE-Puffer mittels Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,4 und 1% in 0,5x TBE bei einer angelegten Spannung von 135V, bis die gewünschte Trennung erreicht wurde. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch im Gel enthaltenes Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) auf einem UV-Tisch mittels des Eagle-Eye II-Systems von Agilent/ Stratagene (Heidelberg).

2.6.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Genaue DNA-Konzentrationen wurden mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer (life technologies, Darmstadt) nach Herstellervorschrift bestimmt.

2.6.4 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

PCR-Ansätze setzten sich standardmäßig wie folgt zusammen: ca. 5 ng Plasmid- oder genomische DNA als Matrizen-DNA („*template*“), 1 pmol/µL jedes Oligonukleotids, 0,2 mM dNTP-Mix und 0,05 U/µL Phusion-Polymerase (bei Amplifikation der NRPS) bzw. 1 µL *Pfu* Polymerase (bei Amplifikation von NAS354) im passenden Reaktionspuffer, sowie 8% Betain. Mit H_2O (Millipore-Reinheit) wurde der Reaktionsansatz schließlich auf 50 µL aufgefüllt. Die PCR wurde in dem PCR-Cycler „Mastercycler Gradient“ bzw. „Mastercycler ep-Gradient S“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit untenstehendem Programm durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (2.6.2) überprüft und mit dem PCR-Purification-Kit (gegebenenfalls nach Präparation aus einem Agarosegel) der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

Standard-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	5 Min	98°C	
Denaturierung	1 Min	98°C	30 Zyklen
Primer Hybridisierung	30 s	T_m – 3-5°C	
Elongation*	0,5-2 Min/kb	72°C	
Finale Elongation	10 Min	72°C	

*Die Elongationszeit pro kb ist von der verwendeten DNA-Polymerase abhängig. 30 Sec/kb bei Verwendung der Phusion-Polymerase, 2 Min/kb bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase.

2.6.5 Ortsspezifische Mutagenese durch *QuickChange*-PCR (nach Papworth *et al.*, 1996)

Der Austausch E103A in NAS354 erfolgte durch *QuickChange*-PCR mit pETNAS354 als *template*. Die PCR unter Einsatz der *Pfu*-Polymerase erfolgte grundsätzlich nach dem in 2.6.4. angeführten Protokoll, die finale Elongationszeit betrug hier aber 20 Minuten, die Zykluszahl 18. Nach der PCR wurde die *template* DNA durch Zugabe von 20 U *Dpn*I zum PCR-Ansatz und anschließender Inkubation bei 37°C (3 h) verdaut. Nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzyms (20 Min, 80°C) wurde das PCR-Produkt aufgereinigt (PCR Purification-Kit, Qiagen, Hilden) und *E. coli* DH5α damit transformiert.

Die Sequenz der Primer wurde mit dem Quick Change Primer Design Tool von agilent festgelegt (http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp).

2.6.6 Transkriptnachweis durch RT-qPCR (Reverse Transkription + quantitatve PCR)

Kulturen von *E. coli* BL21(DE3) mit pCEV2-TB303 wurden einer OD_{580nm} von 0,05 entsprechend in 10 mL LB+Tetracylin (10 mg/L) inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{580nm} von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Die Hälfte der Kulturen wurde mit IPTG (0,4 mM Endkonzentration) zur Induktion der T7-RNA-Polymerase-Expression versetzt. Nach drei Stunden, bei einer Zelldichte von OD_{580nm}= 3 - 4 wurden Zellen aus 1 ml Kulturvolumen geerntet und die Gesamt-RNA mittels RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift extrahiert. DNA-Kontaminationen wurden durch Behandlung mit DNAse (Ambion) beseitigt (1 h 37°C, 10 Min 65°C). Die Synthese der jeweiligen einzelsträngigen cDNA erfolgte mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific (Waltham, USA)) nach Vorschrift des Herstellers. Dazu wurden 250 ng Gesamt- RNA als *template* in separaten Ansätzen mit 1pmol eines Strang-spezifischen Primers in 10 µl-Reaktionen eingesetzt. Um spezifisch *sense*- bzw. *antisense*-Transkript nachzuweisen,

wurden die cDNA-Synthese-Reaktionen mit jeweils nur einem Primer durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen dienten Reaktionsansätze ohne reverse Transkriptase.

Die quantitative *real time* PCR wurde in 20 µl-Ansätzen mit 4 µl cDNA-Template und je 4 pmol der entsprechenden Primer mit dem 7900 HT Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt) unter Verwendung des Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt) nach Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Die Amplikongröße lag bei 99 bzw. 137 bp. Alle für die reverse Transkription und qPCR verwendeten Primer sind in Tabelle 2. 3 aufgeführt.

Zur Auswertung der qPCR wurden die ct-Werte herangezogen. Die ct-Werte der TB303 Proben wurden durch Subtraktion der ct-Werte von Ansätzen mit rpoD-Primern normalisiert (Δct), anschließend erfolgte nach Subtraktion der Δct-Werte der Ansätze von nicht induzierten Proben von den Δct-Werten der Ansätze aus mit IPTG versetzten Kulturen (ΔΔct) die Berechnung der Faktoren, um welche sich die Transkription der TB303-Fragmente zwischen den Kulturen unterschied ($2^{-\Delta\Delta ct}$).

Die Primer für cDNA-Synthese und qPCR wurden mit Hilfe des Primer3 Web Interfaces, http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi, (Rozen & Skaletsky, 2000; Untergasser *et al.*, 2012) mit dem Setting „qPCR“ und Default-Einstellungen entwickelt.

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Die Quantifizierung von RNA und DNA für RT-qPCR-Anwendungen erfolgte mithilfe des Qubit® 2.0 Fluorometers (life technologies, Darmstadt).

2.6.7 *In vitro* Rekombination von DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten durch Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung von freien DNA-Enden durch CIAP, sowie *Blunting* von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden durch T4-Polymerase oder Klenow-Fragment wurden nach Enzymherstellerangaben durchgeführt. Die Ligation verschiedener DNA-Fragmente mit T4-Ligase wurde nach Empfehlungen des Herstellers für die Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden (“*sticky ends*”) bei 22°C (30 Min-60 Min oder über Nacht bei 4°C) durchgeführt. *Blunt end* Ligationen erfolgten unter Zusatz von 10% PEG4000 über Nacht bei 4°C.

2.6.8 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeiten durch die Firmen Eurofins MWG Operon Sequencing Department (Martinsried), Sequiserve (Vaterstetten) oder LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Die Sequenzierung der Metagenomfragmente in pEBP18-SA343 und pEBP18-SA354 erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch das Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen Genomics Laboratory, Georg-August Universität Göttingen.

2.6.9 Synthese des DNA-Fragmentes T7-MCS-T7

Das DNA-Fragment T7-MCS-T7 zur Konstruktion von pCEV2 (133 bp) wurde als Auftragsarbeit durch GeneArt (life technologies, Darmstadt) *in vitro* synthetisiert und als Bestandteil des Plasmides pMA-RQ-T7-MCS geliefert. Das Fragment kann mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bgl*II, *Sfi*I oder *Pvu*II aus dem Vektor isoliert werden.

2.7 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2.7.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli*- Zellen (modifiziert nach Hanahan, 1983)

Verwendete Transformationspuffer:

TFB I:

50 mM Kaliumacetat pH 5,8, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM $RbCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15% Glycerin

TFB II:

10mM MOPS pH 7, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, 15% Glycerin

Die Zellen des jeweiligen *E. coli*-Stammes wurden in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (3320xg) bei 4°C geerntet, danach in einem halben Volumen TFB I-Puffer resuspendiert und nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wieder zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in TFB II-Puffer resuspendiert (1/10 des Ausgangsvolumens) und in 200 µL-Aliquots aufgeteilt, die direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert wurden.

2.7.2 Hitzeschock-Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen

(Hanahan, 1983)

Kompetente Zellen wurden nach Zugabe der DNA mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock (90 s bei 42°C) und danach, nach Zugabe von 700 µL LB-Medium die phänische Expression (1-3 h, je nach Antibiotikaresistenz) bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen zur Selektion auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum ausplattiert.

2.7.3 Elektrotransformation von *Pseudomonas putida* und *Erwinia billingiae*

Die Präparation elektrokompetenter *P. putida* mit 300 mM Saccharose-Lösung und Elektroporation erfolgte nach Tröschel, 2010.

Eine Übernachtkultur des gewünschten Stammes wurde in Falcon-Tubes 10 Min auf Eis inkubiert, anschließend mit sterilem Wasser verdünnt (Verhältnis 1:2,5) und die Zellen durch Zentrifugation (3320xg, 4°C, 20 Min) sedimentiert. Resuspendiert wurden die Zellen in einem Volumen (=50 mL/Tube) 300 mM Saccharose und im Anschluss wieder zentrifugiert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in 1 Vol., 0,5 Vol. und 0,2 Vol. Saccharose-Lösung gewaschen und vereinigt, im Anschluss daran die OD_{580nm} bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde mit Saccharoselösung eine Zellkonzentration von 1,75 x 10^{10} Zellen/mL eingestellt. Das Resuspensions-Volumen errechnete sich dabei aus folgender Formel:

$$V[mL] = OD_{580nm}\ x \frac{10^8\ Zellen}{1{,}75x10^{10}\ Zellen\ x\ mL^{-1}}$$

Elektrokompetente *E. billingiae* wurden aus einer Kultur von 100 mL LB-Medium durch Resuspension der sedimentierten Zellen mit je 1x/0,5x/0,05x Volumen eiskaltem 10% (v/v) Glycerin in Wasser, jeweils gefolgt von Sedimentierung durch Zentrifugation (3320xg, 4°C, 15 Min), und abschließender Resuspension in 500 µL 10% Glycerin hergestellt.

In beiden Fällen wurden die finalen Zellsuspensionen in 50 µL Aliquots aufgeteilt und direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Die Elektroporation von mit 1-5 µL DNA-Lösung versetzten Zellen des jeweiligen Stammes erfolgte nach 15 minütiger Inkubation auf Eis mittels Elektroporationsküvetten mit 2 mm Spaltbreite (biobudget) durch einen Strompuls bei 2,5 kV im *MicroPulser™* (Bio-Rad Labo-

ratories GmbH, München). Unmittelbar nach dem Puls wurden 700 µL LB-Medium zu der Zellsuspension gegeben und diese zur phänischen Expression bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum ausplattiert.

2.8 Methoden zur Detektion, Isolierung und Analyse von Biotensiden

2.8.1 *Atomized oil assay* (Burch *et al.*, 2010), modifiziert

Das *atomized oil assay,* das eine Veränderung der Form und somit des Lichtbrechungsverhaltens kleinster Öltröpfchen auf Oberflächen wie Agar durch Tenside ausnutzt (1.3.2), wurde eingesetzt zur Identifizierung von Biotensid produzierenden Kolonien auf Festmedien. Dazu wurden Agarplatten mit für mindestens 18 h angezogenen Bakterienkolonien durch eine Revell Airbrush "Beginner ESB 100" mit einem Spray aus dünnflüssigem Paraffinöl (Merck, Darmstadt) bedeckt. Die bei indirekter Beleuchtung identifizierbaren Höfe wurden mittels des Imaging Systems Stella (raytest, Straubenhardt) mit folgenden Einstellungen dokumentiert:
Lichtquelle white light, Apertur 4,0 oder offen, gain 4, binning 2x2, Belichtungszeit 10 ms, Stufe 2, Focus 205.

2.8.2 *Drop-collapsing* und *Grid assay*

Für den Nachweis von Biotensidproduktion in Flüssigmedien wurde der *drop-collapsing assay* (modifiziert nach (Jain *et al.*, 1991) oder der *grid assay* (Chen *et al.*, 2007) eingesetzt. Beide nutzen die Verringerung der Oberflächenspannung an den Phasengrenzen von wässrigen Flüssigkeiten zu Luft und hydrophoben Kunststoffen durch Tenside aus. Bei ersterem wurden 50-100 µL Kultur oder Kulturüberstand auf eine Polystyrol-Petrischale gegeben und nach ca. einer Minute die Tropfenform betrachtet. Tropfen wässriger Lösungen ohne Tenside bilden einen halbkugelartigen Tropfen. Ist die Oberflächenspannung der Lösung durch Tenside verringert, verteilt sich die Flüssigkeit flach über eine größere Oberfläche. Das *grid assay* wurde in Polystyrol Flachboden-Mikrotiterplatten, unter die ein schwarz-weißes Raster (0,8 mm x 0,8 mm Zellengröße) gelegt wurde, durchgeführt.

Dieses Raster wird durch die in die Vertiefungen gegebene Flüssigkeit betrachtet, wodurch unterschiedliche Formen der Flüssigkeitsoberfläche, bedingt durch verschieden starke Oberflächenspannung, leicht visualisiert werden können. Der optische Effekt ist vergleichbar mit dem Blick durch unterschiedlich geschliffene Linsen. Zur Durchführung des *Assay*s wurden 100 µL Kulturüberstand in ein *Well* gegeben und die optische Verzerrung der Linien im Vergleich zu reinem Medium oder zum Überstand der Leervektorkultur mittels des Imaging System Stella (raytest, Straubenhardt) dokumentiert. Einstellungen: Lichtquelle white light, Apertur 4,0 oder offen, gain 4, binning 2x2, Belichtungszeit 10 ms, Stufe 1, Focus 309.

2.8.3 Extraktion von Serrawettin aus verschiedenen Wirten

Die Isolierung von Serrawettin W1 und Prodigiosin aus *Serratia marcescens* DSM12481 und DSM30121 zur Verwendung als Standard bei Dünnschichtchromatographie-Analyse-Experimenten wurde nach dem in Matsuyama *et al*., 1992 beschriebenen Protokoll durchgeführt: Die *Serratia*-Stämme wurden auf TG-Agar (2.5.1) ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Zellmasse mit einem Spatel von der Platte abgekratzt und mit 10x Volumen Ethanol mittels Vortexer vermischt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3220xg, 20 Min) abgetrennt und verworfen und das Ethanol des Überstandes durch Vakuumzentrifugation (speedvac, eppendorf, Hamburg) verdampft. Das verbliebene trockene Material wurde mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (Verhältnis 2:1, halb so viel Volumen wie im vorhergehenden Schritt an Ethanol eingesetzt wurde) extrahiert, die organische Phase evaporiert und der daraus resultierende Feststoff in Ethanol aufgenommen und bei 4°C gelagert. *E. billingiae* wurde unter denselben Bedingungen auf Blutagarbasis-Festmedium angezogen, die Extraktion erfolgte analog zu der für *S. marcescens* beschriebenen Prozedur.

Zur Analyse der Biotensidproduktion in Flüssigkulturen von *S. marcescens* DSM12481 wurde die Kulturbrühe mit 1 Volumen Chloroform extrahiert, die organische Phase gesammelt und eingedampft, das resultierende Trockenmaterial in Ethanol aufgenommen und per Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die Isolierung von Serrawettin aus Kulturüberständen von *E. coli, E. billingiae* und *P. putida*-Kulturen (2.5.2.2) erfolgte durch Extraktion mit 2x1 Volumen Chloroform. Vollständige Phasentrennung nach Durchmischung der beiden Flüssigkeiten wurde durch zehnminüti-

ge Zentrifugation bei 3220xg erreicht. Die organische Phase wurde abgenommen und evaporiert, das resultierende Trockenmaterial in Ethanol resuspendiert und, falls nicht direkt zu weiteren Analysen verwendet, bei 4°C gelagert.

2.8.4 Isolierung von Acyltyrosinen aus Kulturüberständen von *E. coli*

Die zellfreien Überstände von Acyltyrosinproduktionskulturen (2.5.2.3) wurden mit HCL auf pH ≤3 angesäuert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das aus der folgenden Zentrifugation (1 h, 6500 Upm, 10°C) resultierende Sediment wurde in dem halben Ursprungsvolumen Wasser resuspendiert, nochmals angesäuert, inkubiert und zentrifugiert. Das Sediment aus dieser zweiten Zentrifugation wurde in Wasser (pH 3, in 10% des ursprünglichen Volumens) resuspendiert, eventuell im Zentrifugationsgefäß verbliebene Reste wurden mit etwas Ethylacetat abgespült. Diese wässrige Acyltyrosinlösung wurde mit 2x 1 Volumen Ethylacetat extrahiert, die wässrige Phase wurde verworfen, die organische Phase abgenommen und vollständig verdampft (speedvac, eppendorf,Hamburg oder Rotationsverdampfer). Der resultierende Feststoff wurde in Ethanol (für DC-Analyse) oder Methanol (für NMR-Analyse) aufgenommen oder für tensiometrische Tests noch weiter gereinigt. Hierbei wurde der Feststoff in Petrolether-Ethylacetat-Essigsäuregemisch (80:20:5) aufgenommen und über eine Silicasäule nochmals aufgetrennt. Die Fraktion mit dem gewünschten Produkt wurde eingedampft und der Feststoff für die tensiometrischen Tests in 0,1 M NaOH (pH12) in einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst.

2.8.5 Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden ALUGRAM Kieselgel SIL G-Platten von Macherey-Nagel benutzt, auf welche in Ethanol gelöste Proben 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt auf einer Linie aufgetragen wurden. Als hydrophobes Laufmittel diente bei Acyltyrosinanalysen ein Trichlormethan-Methanol-Essigsäure-Gemisch (65:15:3), gefärbt wurden die Platten nach Abdampfen des Laufmittels mit Iod. Dazu wurde die Platte mit einigen Iodkristallen auf Filterpapier in ein verschließbares Becherglas gegeben und 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei der DC für die Analyse von Serrawettin wurde als Laufmittel nach Matsuyama et al., 1987 ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und 7 M Ammoniak in Methanol (85:26:3)

eingesetzt, visualisiert wurden die Spots nach Abdampfen des Lösungsmittels durch Aufsprühen von Schwefelsäure (62%) mit Hilfe des TLC/HPTLC Sprayers (CAMAG, Berlin) und anschließendem Erhitzen auf 80°C-100°C durch ein Heißluftgebläse.

Die Dokumentation der entwickelten DC-Platten erfolgte mittels Kodak Easy Share-Digitalkamera oder eines Flachbettscanners.

2.8.6 NMR-Analyse

Die Strukturaufklärung und Probenanalyse durch *Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopy* wurde innerhalb einer Kooperation mit dem Institut für bioorganische Chemie der Universität Düsseldorf durchgeführt. ^{1}H und ^{13}C-Spektren von Acyltyrosinen wurden mit Bruker Advance/DRX 60 spectrometer (Frequenzen: ^{1}H-NMR: 600 MHz, ^{13}C-NMR: 150 MHz) in Methanol-d-Lösung aufgenommen. Als interner Standard diente $CDCl_3$ (^{1}H δ 7,26 ppm, ^{13}C δ 77,0 ppm) und MeOD (^{1}H δ 3,31 ppm). Signale von Protonen- und Kohlenstoffresonanzen wurden über 2D-Experimente (gHSQC, gCOSY, gHMBC) zugeordnet.

2.8.7 HPLC-ESI-MS/MS Analyse

Für die Analyse der Cyclodepsipeptide per Elektrosprayionisierung-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS), gekoppelt mit einer High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) wurden die nach (2.8.3) aus 30 mL Expressionskulturen bzw. aus auf Festmedium gewachsenen *S. marcescens* extrahierten und in Ethanol gelösten Serrawettine zu je 50 µl punktförmig auf einer Linie in 2 cm Abstand zum unteren Plattenrand auf eine SIL G-200 DC-Platte (Macherey-Nagel, Düren) aufgetragen. Nach Entwicklung der DC wie in 2.8.5 beschrieben wurden alle Spuren mit Ausnahme der beiden äußersten und einer Spur in der Mitte der Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt , die noch freiliegenden Spuren mit Schwefelsäure besprüht und die Serrawettin-Banden durch Hitzeeinwirkung visualisiert. Anhand der Banden dieser Standards wurde die Laufweite des Serrawettins in den durch die Aluminiumfolie geschützten Spuren markiert und das Kieselgel in diesen Bereichen separat von der DC-Platte entfernt. Zur Gewinnung der enthaltenen *Biosurfactants* wurde das Kieselgel mit einem Spatel zu Pulver zerkleinert und zweimal mit 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die Proben wurden jeweils mehrfach invertiert und anschließend zentrifugiert (5 Min, 3320xg, Raumtemperatur), um das Kieselgel zu sedimentieren. Danach wurden die

Überstände abgenommen, gegebenenfalls vereinigt und anschließend filtriert (Spritzenvorsatzfilter, PTFE-Membran, 0,2 µm Porengröße; VWR International GmbH), um mögliche Kieselgelrückstände zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum vollständig evaporiert und der resultierende Feststoff in 100 µL Methanol gelöst.

Die HPLC-ESI-MS/MS wurde durchgeführt als Auftragsarbeit durch das Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik ZEA-3 des Forschungszentrums Jülich mittels Qtrap4000 (ABSciex, Darmstadt, Germany), gekoppelt mit einer Agilent 1100 HPLC unter Verwendung von Prontosil C8 -Säulen(150 x 2,1 mm) und eines Laufmittelgradienten nach Shanks *et al*., 2013. Die Bestimmung der verschiedenen Serrawettin W1-Spezies mit unterschiedlichen β-Hydroxyfettsäureresten wurde durch Identifizierung der charakteristischen Fragmente im MS-Spektrum nach Dwivedi *et al.*, 2008 durchgeführt (Tabelle 2. 5).

Tabelle 2. 5 Charakteristische Fragmentgrößen bei der Fragmentierung von Serrawettin W1 im MS am Beispiel von Serrawettin mit C_{10}+C_{10} -Hydroxyfettsäuren (Masse 515 Da). Die Fragmente mit der größten Intensität sind hervorgehoben.

Fragmentmasse (Da)	Zerfallsstufe
515,1	Komplettes Molekül
276,2	Serrataminsäure (Halbes Molekül+H_2O)
258,1	Serrataminsäure – H_2O
240,1	**Serrataminsäure - $2H_2O$**
212,2	**Serrataminsäure - $2H_2O$, - C=O**

Bei Serrawettin-Spezies mit anderen Kettenlänge ist das Fragmentmuster dementsprechend analog, alle sind Massen um den entsprechenden Betrag höher und niedriger, z.B. bei C_{12} +2 x CH_2 = + 2 x 14 Da (siehe Anhang).

2.8.8 Bestimmung von physikalischen Eigenschaften des N-Acyltyrosins

Tensiometrische Messungen mit gereinigtem N-Acyltyrosin (2.8.4), in 0,1 M NaOH (pH 12) gelöst, wurden mit dem Langmuir Tensiometer DeltaPi (Kibron Inc, Helsinki) bei 25°C nach der von Padday *et al.*, 1975 beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wird die Spitze eines dünnen Metallstabs (0,54 mm) knapp in einen Tropfen der zu messenden Flüssigkeit auf einer mit Teflon beschichteten Oberfläche getaucht und vorsichtig wieder angehoben. Beim Anheben wird mit dem Metallstab auch ein Teil des Flüssigkeitsfilms mit angehoben, dieser Meniskus übt aufgrund der Oberflächenspannung eine Zugkraft aus, die kurz

vor dem Abreißen des Flüssigkeitsfilms maximal wird. Diese Maximalkraft wird von dem Tensiometer aufgenommen. Sie ist proportional zur Oberflächenspannung.

Die Messungen wurden in einer statischen Messreihe durchgeführt, das heißt es wurden mehrere Tropfen mit jeweils diskreten Konzentrationen an Tensid vermessen (bei einer dynamischen Messreihe würde während der Messung laufend Tensid zur Lösung hinzugegeben). Es wurde die Oberflächenspannung mit Acyltyrosinkonzentrationen zwischen 10^{-8} mg/mL und 10 mg/mL in Dreifachbestimmung ermittelt und gegen die Tensidkonzentration aufgetragen. Die CMC (*critical micelle concentration*) und minimale Oberflächenspannung wurden aus diesem Graphen der tensiometrischen Messungen abgelesen. Kalibriert wurde das Gerät mit 0,1 M NaOH.

Die Kalkulation des HLB (*Hydrophilic-lipophilic balance*)-Wert erfolgte wie vorher publiziert (Davies, 1957; Davis, 1994), die Amidbindung innerhalb des Moleküls wurde zur näherungsweisen Berechnung mit dem Punktwert der Esterbindung (Tabelle 2. 6) in die Rechnung einbezogen. Berechnungsgrundlage ist die Formel:

HLB= ∑hydrophile Gruppenzahlen - ∑hydrophobe Gruppenzahlen + 7

Tabelle 2. 6 Chemische Gruppen und die ihnen für die HLB-Wertberechnung zugeordneten Gruppenzahlen (nach Schmidt, 2013).

Hydrophile Gruppen	Gruppenzahl	Lipophile Gruppen	Gruppenzahl
—O–$SO_3^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	38, 7	—C(H)—	0, 475
—$SO_3^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	37 ,4	—CH_2–	0, 475
—$COO^{\ominus}$ $K^{\oplus}$	21, 1	—CH_3	0, 475
—$COO^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	19, 1	=CH—	0, 475
Ester (Sorbitanring)	6, 8		1, 662
Ester (frei)	2, 4		
—COOH	2, 1		
—OH (frei)	1, 9		
—O—	1, 3		
—OH (Sorbitanring)	0, 3		
—N (tert. Amin)	9, 4		
—(CH_2-CH_2-O)—	0, 33		
—(CH_2-CH(-CH_3)-O)—	0,15		

2.8.9 Nachweis haemolytischer Aktivität (Mulligan *et al.*, 1984)

Einzelkolonien wurden auf Blutagarplatten (40 g/L Blutagarbasis (Roth, Karlsruhe), 5% Schafsblut (Fiebig), gegebenenfalls mit gewünschtem Antibiotikum) übertragen und min-

destens 18 h bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur der Organismen inkubiert (2.5.2).

2.8.10 Nachweis antibiotischer Aktivität (Bauer *et al*., 1966, modifiziert)

Im Kirby-Bauer-*Assay* wurden die jeweiligen zu untersuchenden Bakterienstämme aus einer Zellsuspension in steriler 0,9% NaCl-Lösung (Saline), die mit Zellen aus Übernachtkulturen auf eine OD_{580nm} von 0,15 eingestellt worden war, mittels steriler Wattestäbchen (VWR, Darmstadt) auf Müller Hinton-Agar aufgetragen.

25 µg bis 250 µg gereinigtes Acyltyrosin in 5 µL Ethanol wurden auf 5 mm große Plättchen aus Whatman-Papier gegeben. Nach 2-3 Minuten zum Abdampfen des Ethanols wurden die Plättchen auf die Agarplatten gelegt, auf denen die jeweiligen Kulturen ausgestrichen waren. Als Kontrolle dienten gleichbehandelte Plättchen mit reinem Ethanol. Die Platten wurden, je nach Art, 16 h-24 h bei den jeweiligen von der DSMZ angegebenen optimalen Wachstumstemperaturen der einzelnen Stämme inkubiert, bis sich ein dichter Bakterienrasen gebildet hatte.

2.8.11 *Assay* zur Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* (modifiziert nach Hentzer *et al.*, 2001)

Die Untersuchung der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* als Reaktion auf N-Acyltyrosin erfolgte via *static culture biofilm assay* in 24-Well Polystyrol-Mikrotiterplatten.(Nunc, , Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)). In jede Kavität wurde 1 mL LB-Medium gegeben und aus einer Übernachtkultur auf eine OD_{580nm} von 0,1 inokuliert. Dazu wurden je drei Kavitäten mit 10 µg, 100 µg und 150 µg aufgereinigtem N-Acyltyrosin in Ethanol (2.8.4) versetzt. Als Kontrollen dienten Kulturen mit Zusatz von Ethanol ohne Biotensid sowie LB ohne Zellinokulum. Die Platte wurde ohne Agitation für 16 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kulturen mit 200 µl einer 1% (w/v) Kristallviolett-Lösung in Wasser versetzt und 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte mehrfaches vorsichtiges Waschen mit je 500 µL Wasser, um planktonische Zellen und nicht biofilmgebundenes Kristallviolett zu entfernen. Für die quantitative Messung der Biofilmproduktion wurde das Kristallviolett mit 95% Ethanol bei Raumtemperatur unter

leichtem Schütteln aus den am Polystyrol haftenden Biofilmen gelöst. Diese Lösung wurde in Küvetten überführt und die OD_{595nm} bestimmt.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Löslichkeitsanalyse

Heterolog exprimierte Proteine können nach der Expression in löslicher Form oder in unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*) vorliegen. Zur Analyse der Löslichkeit wurden die Zellen aus 500 µL Kulturbrühe durch Zentrifugation (1 Min 21500xg) pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in 500 µL 0,1 M Tris-HCL (pH 8) resuspendiert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschallpulsen (Bandelin Sonopuls HD2070, 2 × 3 Min, 50 % Zyklen, 50% Leistung) aufgeschlossen und zentrifugiert (10 Min, 21500xg). Überstand mit löslichen Proteinen und Sediment mit den unlöslichen Proteinen sowie Zelltrümmern wurden getrennt und durch SDS-PAGE analysiert.

2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE wurden folgende Puffer verwendet:

5xSDS-Probenpuffer:

50 mMTris/HCl (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,03% (w/v) Bromphenolblau

1x Elektrophorese-Puffer:

25 mMTris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Colloidal Coomassie (Merril, 1990; Neuhoff *et al.*, 1988):

Stammlösung: 10% (w/v) Ammoniumsulfat, 1,2% (v/v) Phosphorsäure (85%), 1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in Wasser

Vor Gebrauch wurde die Färbelösung mit 20% Methanol versetzt.

Die Proben (Zellen einer OD_{580nm} von 0,15 entsprechend in 10 µL TrisHCl, pH 8, resuspendiert) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen 10 Min bei 99 °C aufgekocht. Anschließend wurden sie in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Tabelle 2. 7.) mithilfe der „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) bei einer Spannung von100-200 V aufgetrennt.

Tabelle 2. 7 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	Sammelgel pH 6,8	Trenngel 7,5 % pH 8,8
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Roth, Karlsruhe)	0,83 mL	2,5 mL
Tris-HCl (0,5M bzw- 1,5 M)	1,3 mL	2,5 mL
VE-Wasser	2,8 mL	4,8 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	100 µL
10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	50 µL	100 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µL	10 µL

Die Färbung der Proteine nach Auftrennung im Gel erfolgte mit *Colloidal Coomassie* oder mit der kommerziellen Färbe-Lösung „SimplyBlue^{TM} SafeStain“ (life technologies, Darmstadt). Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit Hilfe des Imaging System Stella (raytest, Straubenhardt).

2.9.3 Western Blot - Immunologischer Nachweis von auf Membran immobilisierten Proteinen (Dunn, 1986).

Blotting und *Blot*-Entwicklung erfolgte in folgenden Puffern:

Dunn-Carbonat-Puffer:

10 mM $NaHCO_3$, 3 mM Na_2CO_3, 20% (v/v) Methanol

TBST:

25 mMTris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0,2% (v/v) Tween20

ECL Detektionskit

Lösung A (bei 4°C gelagert): 200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6), 50 mg Luminol

Lösung B(bei Raumtemperatur dunkel gelagert): 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO gelöst

H_2O_2-Lösung: 35%

Durch SDS-PAGE (2.9.2) aufgetrennte Proteine wurden unter Verwendung der Transferapparatur der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (Mini Trans-Blot Elektrophoretic Transfer Cell) durch Elektroblotting (15 Min bei 150 mA, 30 Min 300 mA) in Dunn-Carbonat-Puffer vom Gel auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad) übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran 5 Minuten in Methanol und 10 Minuten in Wasser äquilibriert.

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4°C mit 3% Skim Milk Pulver (w/v) in TBST abgesättigt. Nach einem Waschschritt (15 Min, TBST, leicht schüt-

teln) wurde die Antikörper-Lösung mit Anti-His(C-term)-HRP-Antikörpern (Invitrogen, life technologies, Darmstadt, 1:5000 in TBST verdünnt) auf die Membran gegeben und bei 30°C eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach fünf weiteren Waschschritten mit TBST (1x 15 Minuten, 4x 5 Minuten) erfolgte die Visualisierung der gebundenen Antikörper und damit des Zielproteins mittels des ECL-Detektionskits unter Verwendung des Chemilumineszenz-Detektors Stella (raytest, Straubenhardt). Unmittelbar vor der Visualisierung wurden die ECL-Detektionslösung aus 2 ml Lösung A, 0,6 µl H_2O_2 (35 %) und 200 µl Lösung B hergestellt und auf die Membran gegeben.

2.10 *In silico* Methoden

Als Datenbank für DNA- und Proteinsequenzen diente GenBank (ncbi, (Benson *et al.*, 2011)), für Proteinstrukturdaten wurde die RSCB Protein Data Base (Berman *et al.*, 2000) herangezogen. *Open reading frame*-Suche, *pairwise alignments* und *Primerdesign* wurden mit Clone Manager 9 (Software for the Molecular Biologist, Scientific & Educational (Sci-Ed)) durchgeführt, Homologievergleiche von Proteinen und Nukleinsäuren erfolgten durch blastp und blastn (Altschul *et al.*, 1990, 1997), bereitgestellt durch NCBI/BLAST. Multiple Alignments wurden mit Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) erstellt. Für Strukturmodeling und strukturelle Alignments von Proteinen wurde auf Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) zurückgegriffen, während zur RNA-Sekundärstrukturvorhersage RNAstructure (Bellaousov *et al.*, 2013) genutzt wurde. Transkriptionsterminatorvorhersage wurde mit dem *Transcription Terminator Prediction Tool* von PePPER, dem TransTermHP (Kingsford *et al.*, 2007) und Glimmer 3 (Delcher *et al.*, 2007) implementiert sind, durchgeführt. Die Substratvorhersage für nonribosomale Peptidsyntethasen erfolgte mittels NRPS predictor (Röttig *et al.*, 2011). Schemata der Domänen-Architektur von Proteinen und zur Organisation von *orfs* auf eDNA-Fragmenten wurden durch das *MyDomains-Tool* von PROSITE (Hulo *et al.*, 2008) erstellt, Molekülstrukturen wurden durch UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) oder Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012) dargestellt.

Zur Dokumentation und Auswertung von Western Blots und *surface activity assays* und wurde das Programm AIDA (raytest, Straubenhardt) verwendet.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

Links zu den im Text erwähnten Datenbanken und Online Tools:

Genbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Protein Database	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Clustal Omega	http://www.clustal.org/omega/
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/,
RNAstructure	http://rna.urmc.rochester.edu
PePPER	http://pepper.molgenrug.nl/
NRPS Predictor	http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de
MyDomain	http://prosite.expasy.org/mydomains/

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Produktion von Lipopeptid-Biotensiden

Ein vielversprechender Weg, weitere Biotenside für potentielle biotechnologische Anwendungen zu erschließen, ist die genauere Untersuchung bereits bekannter *Biosurfactant*-Produzenten, die aber bisher nur wenig aus diesem Blickwinkel betrachtet wurden. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist *Serratia marcescens*, ein weit verbreitetes und, wie viele *Biosurfactant*-Produzenten, opportunistisch humanpathogenes Bakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae* (Mahlen, 2011; Voelz *et al.*, 2010). Diverse Stämme sind als Produzenten unterschiedlicher Lipopeptide, zusammenfassend Serrawettine genannt, beschrieben (Matsuyama *et al.*, 1992; Wasserman *et al.*, 1961). Während Serrawettin W2 und W3 als zyklische Lipopeptide aus mehreren Aminosäuren beschrieben sind, ist Serrawettin W1, mit dem sich dieses Kapitel befasst, ein symmetrisches Cyclodepsipeptid, dass aus zwei Serinresten und zwei (D)-β-Hydroxyfettsäuren gebildet wird (Dwivedi *et al.*, 2008; Nakagawa & Matsuyama, 1993; Wasserman *et al.*, 1962), siehe auch Abb. 1. 5.

Erstmals beschrieben wurde Serrawettin W1 bereits in den 1960er Jahren (Wasserman *et al.*, 1961), trotzdem gibt es im Vergleich zu anderen Biotensiden nur sehr wenige Studien, die die Produktion dieses Lipopeptids zum Focus haben. In jüngerer Zeit wurden neben den bereits seit langem bekannten Eigenschaften Oberflächenaktivität und antimikrobielle Wirkung, u.a. gegen Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (Kadouri & Shanks, 2013), Anwendungen gegen Tumorzellen (Escobar-Díaz *et al.*, 2005; Soto-Cerrato *et al.*, 2005), zum Schutz von Pflanzen vor Oomyceten (Strobel *et al.*, 2005) und in der Abwehr von Nematoden (Pradel *et al.*, 2007) beschrieben. Diese neuen interessanten Charakteristika führten neben der allgemein gestiegenen Aufmerksamkeit gegenüber Biotensiden zu einem wachsenden Interesse an den *Biosurfactants* aus *Serratia*, was durch eine vermehrte Anzahl an Publikationen und Patenten zu Produktion und Anwendung von Serrawettin in den letzten Jahren verdeutlicht wird (Apao *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2013; Kadouri & Shanks, 2013; Kuo *et al.*, 2012; Matsuyama *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2005; Pérez-Armendáriz *et al.*, 2013; Pruthi & Cameotra, 1997; Strobel *et al.*, 2005; Teixidó *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2001), siehe auch Abb. 3.1. 1.

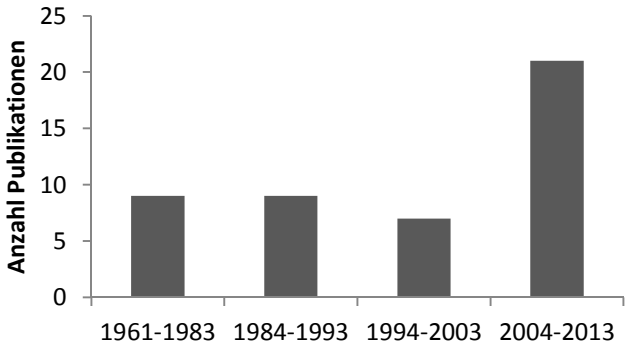


Abb. 3.1. 1 Publikationen zu Serrawettin in den Jahrzehnten seit der Erstbeschreibung. Die Analyse wurde mit Hilfe von Scopus (Elsevier) durchgeführt, einbezogen wurden alle Publikationen mit Nennung der Worte *„Serrawettin“*, *„Serrawettins“* oder *„Serratamolide“* in Titel, *keywords* oder *abstracts*. Stand Juli 2013.

Die Biosynthese dieses sehr einfachen nicht durch Ribosomen gebildeten Peptids wird, anders als bei vielen anderen Vertretern dieser Klasse von Sekundärmetaboliten, von einem einzigen, ca. 130 kDa großen Protein katalysiert, der nonribosomalen Peptidsynthetase SwrW (Apao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005a). Wie charakteristisch für NRPS, beinhaltet dieses Protein mehrere Domänen, welche verschiedene Reaktionen in der Synthese von Serrawettin W1 katalysieren (1.2.3). Darüber hinaus für die Produktion von Serrawettin W1 in *Serratia marcescens* essentiell sind vermutlich Acylcarrierproteine und, nachgewiesenermaßen, die Phosphopantetheinyltransferase PswP (Matsuyama *et al.*, 2011; Sunaga *et al.*, 2004). Die Funktion von PswP ist die posttranslationale Aktivierung von SwrW (1.2.3.1).

3.1.1 Produktion von Serrawettin W1 in *Serratia marcescens* DSM12481

Die Produktion der Biotenside in *S. marcescens* ist, wie es auch für andere Biosurfactant-Produzenten beschrieben ist (Das *et al.*, 2008), komplex reguliert (1.2.3.2) und wird beeinflusst von Wachstumsphase (über *Quorum sensing*) und Kultivierungsbedingungen (Satpute *et al.*, 2010; Shanks *et al.*, 2013; Tanikawa *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2004). Als Beispiel kann die Temperaturabhängigkeit der Produktion von Serrawettin genannt werden, die, vergleichbar zur Produktion des roten Pigmentes Prodigiosin, bei 30°C, jedoch nicht bei 37°C zu beobachten ist (Matsuyama *et al.*, 1986). Auch die Medienzusammensetzung beeinflusst die Biosynthese (Roldán-Carrillo *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2001).

Als möglicher Produktionsstamm wurde der pigmentierte *S. marcescens*-Stamm DSM12481 (alternativ auch mit W225 bezeichnet) aus der Stammsammlung des Instituts

für molekulare Enzymtechnologie (Bezeichnung KE75) evaluiert. Für diesen Stamm sind unserem Wissen nach bisher weder Untersuchungen zur *Biosurfactant*-Produktion noch eine Genomsequenz veröffentlicht worden, deshalb wurde zunächst untersucht, in wie fern dieser Stamm die genomischen Voraussetzungen für die Produktion von Serrawettin W1 besitzt. Dazu wurde eine PCR mit Primern, die von der veröffentlichten Sequenz des Serrawettinsynthetasegens s*wrW* aus *S. marcescens* ATCC274 (Li et al., 2005, Genbank AB193098.2) abgeleitet waren, und genomischer DNA von DSM12481 als *template* durchgeführt, die in einem DNA-Fragment resultierte, das die zu erwartende Größe von ca. 4 kb aufwies. Die Sequenz des Proteins nach Sequenzierung dieses Fragmentes und *in silico*-Translation des *orf* war zu 97% identisch mit SwrW aus ATCC274 (GenBank BAD60917) bei einem Alignment Score von 2575, siehe Anhang, Abb. A. 1. DSM12481 besitzt demnach eine neue Variante der Serrawettinsynthetase und wurde somit als vielversprechend für die Produktion von Serrawettin W1 bewertet.

Aufgrund der beschriebenen Abhängigkeit der Produktion dieses Biotensids von der Medienzusammensetzung wurde zunächst die *Biosurfactant*-Produktion auf verschiedenen Komplexmedien untersucht, um optimale Bedingungen für spätere Produktionsstudien zu ermitteln. Dabei wurden Einzelkolonien auf Festmedien betrachtet, da hierfür mit dem *atomized oil assay* ein einfacher quantitativer Nachweis zur Verfügung stand (Burch *et al.*, 2010). Verglichen wurde Biotensidproduktion auf LB als Standard-Vollmedium, Trypton-Glycerin-Medium (TG), das vergleichbar war zu den in anderen Studien zur Serrawettin-Produktion verwendeten Medien (Matsuyama *et al.*, 1985, 1992), Tributyrin-LB-Agar als Medium mit hohem Anteil an hydrophoben Komponenten und Blutagarbasismedium, sowie Medien unter Zusatz von fettreichem Erdnussmehl (2.5.1). Letztere galten als vielversprechende Kandidaten, da dieser Zusatz zu erhöhter Prodigiosinproduktion führt (Giri *et al.*, 2004) und bekannt ist, dass viele Regulationssysteme für Prodigiosinbiosynthese auch die Serrawettinproduktion beeinflussen (Matsuyama *et al.*, 1986; Shanks *et al.*, 2013; Sunaga *et al.*, 2004; Tanikawa *et al.*, 2006).

Um die *S. marcescens*-Kolonien auf LB- bzw. Tributyrin-Agar herum zeigten sich nach 18 h nur sehr kleine Höfe im a*tomized oil assay* (2.8.1), auf Trypton-Glycerin-Agar sowie den beiden mit Erdnussmehl versetzten Festmedien war eine vergleichbare stärkere *Biosurfactant*produktion detektierbar, zu der stärksten Produktion oberflächenaktiver Substanzen führte das Wachstum auf Blutagarbasismedium (Abb. 3.1. 2). Damit wurde

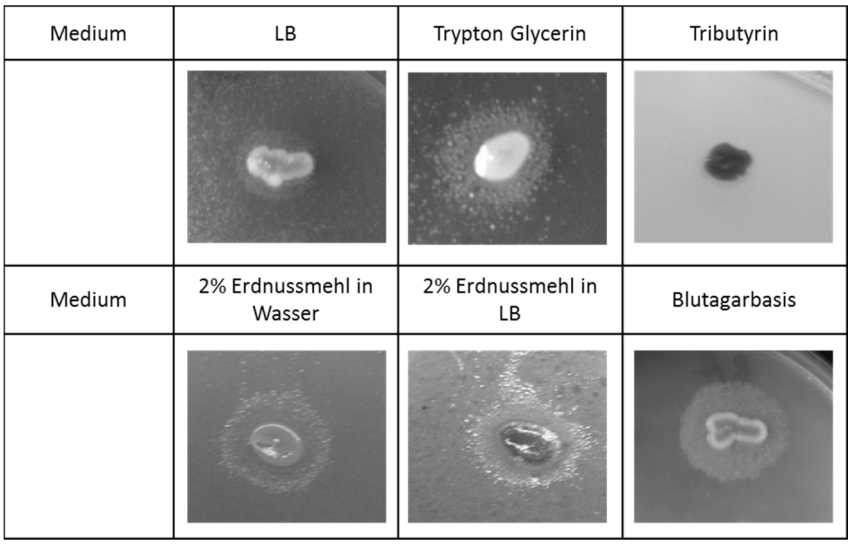


Abb. 3.1. 2 Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *S. marcescens* DSM12481 auf verschiedenen Festmedien. Zellkolonien nach 18 h Inkubation bei 30°C. Der Nachweis der Oberflächenaktivität erfolgte durch *atomized oil assay*, Höfe um die Kolonien indizieren Biotensidproduktion.

gleichzeitg nachgewiesen, dass *S. marcescens* DSM12481 in der Lage ist, Biotensid zu produzieren.

Es wurde dadurch allerdings noch nicht gezeigt, dass dieser Stamm wirklich das gewünschte Biotensid produziert. Durch Vergleich des Signalmusters nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung (DC, 2.8.5) des Extraktes dieses Stammes mit dem des gleichbehandelten Extrakt von *S. marcescens* DSM30121 konnte der Stamm *S. marcescens* DSM12481 jedoch erstmals der Gruppe der Serrawettin W1 produzierenden *Serratia*-Stämme zugeordnet werden (Abb. 3.1. 3A). *S. marcescens* DSM30121 ist ein beschriebener Produzenten von Serrawettin W1 (Matsuyama *et al.*, 1985) und wurde zur Verfügung gestellt seitens der Kooperationspartner in diesem Projekt, der Gruppe um R. Hausmann am Karlsruher Institut für Technologie. Die Extrakte beider Stämme wurden, wie vorher beschrieben (Matsuyama *et al.*, 1992), aus auf Trypton-Glycerin-Agar gewachsenen Bakterienrasen gewonnen (2.8.3).

Trotz einer erheblichen Biotensidproduktion auf Blutagar ließ sich auch nach mehrtägiger Inkubation auf Blutagarplatten, entgegen Literaturangaben (Shanks *et al.*, 2012), keine haemolytische Aktivität von DSM12481 gegenüber Schafsblut nachweisen. In der angeführten Publikation wurde Haemolyse durch Serrawettin-Überexpressionsvarianten anderer *S. marcescens*-Stämme bzw. durch isoliertes Biotensid nachgewiesen. Eventuell waren die dort erreichten Konzentrationen höher als in den hier beschriebenen Experimenten mit wildtypischen *S. marcescens*-Stämmen. Möglicherweise zeigt das von diesen Stämmen produzierte Biotensid auch geringfügige Unterschiede in der Zusammensetzung ge-

genüber dem Serrawettin aus DSM12481, wodurch Erythrozyten empfindlicher auf dieses Biotensid reagierten. Zudem könnten eventuell auch unterschiedliche Anteile der ebenfalls als haemolytisch beschriebenen Serrataminsäure (Miyazaki *et al.*, 1992), vermutlich ein Zerfallsprodukt des Serrawettins W1 (Matsuyama *et al.*, 2011), eine Rolle spielen.

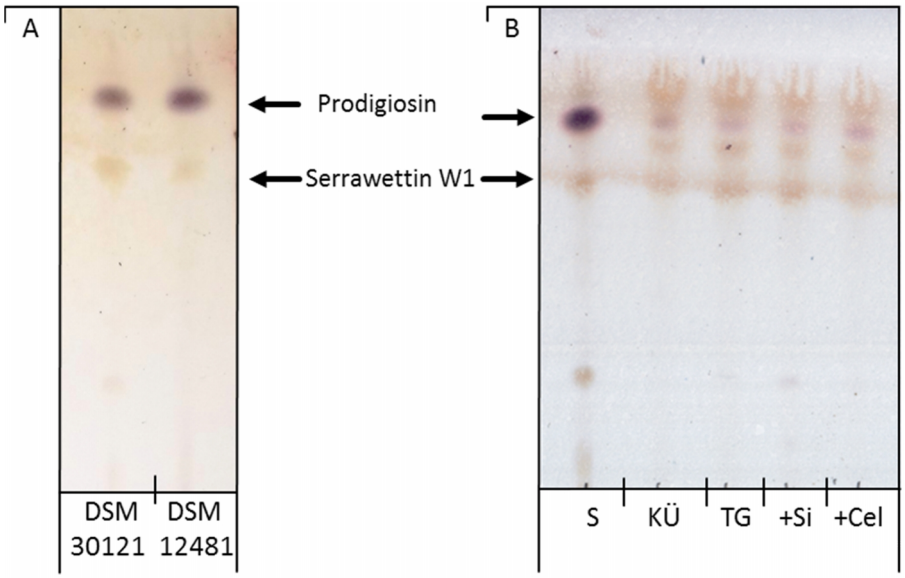


Abb. 3.1. 3 Serrawettin W1-Produktion von *S. marcescens* DSM12481. A Vergleich von Extrakten des bekannten Serrawettin W1-Produzenten *S. marcescens* DSM30121 und *S. marcescens* DSM12481; **B** Serrawettin W1 Produktion in verschiedenen Varianten von Trypton-Glycerin-Flüssigmedium. S: Serrawettin Standard (Extrakt von DSM12481, siehe A), KÜ: Extrakt aus TG-Kulturüberstand ohne Zellen, TG: Extrakt von Trypton-Glycerin-Kultur; +Si: TG-Medium+2 mg/mL Silica, +Cel: TG-Medium+2 mg/mL Celite. Die Experimente wurden zweimal in Doppelbestimmung durchgeführt, in allen Fällen ergaben sich die gleichen Muster; diese DC steht exemplarisch für die vier Versuchsreihen. Visualisiert wurden die Signale mit 60% H_2SO_4.

Der nächste Schritt zur Produktion von Serrawettin W1 mit *S. marcescens* besteht in der Übertragung der mit Festmedien ermittelten Ergebnisse auf Flüssigkulturen. In Überständen von Flüssigkulturen in den positiv evaluierten Nährmedien ließen sich jedoch durch *drop collapsing*- oder *grid assay* (2.8.2) in keinem Fall oberflächenaktive Substanzen detektieren (ohne Abbildung). Da Serrawettin laut Literatur wie das rote Pigment Prodigiosin in extrazellulären Vesikeln zu finden ist (Matsuyama *et al.*, 1986), deren Bildung ebenfalls temperaturabhängig reguliert ist (McMahon *et al.*, 2012), wäre es denkbar, dass durch diese Sekretionsvariante nur wenig freies Serrawettin im Überstand vorliegt. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach Zentrifugation eine dünne rote Schicht auf dem Zellpellet aufliegt, die aus den Vesikeln gebildet werden könnte (ohne Abbildung).

Auf eine weitere Erklärung deutet die bisher beschriebene natürliche Funktion von Serrawettin in der Kolonisierung fester Oberflächen durch Schwärmen (Matsuyama &

Nakagawa, 1996a, b; Matsuyama *et al.*, 1989, 1995) hin. Wenn die Hauptfunktion des *Biosurfactants* assoziiert mit dieser Motilitätsform ist, wäre es denkbar, das bei planktonischer Lebensweise in Flüssigmedien von *S. marcescens* DSM12481 kein oder nur sehr wenig Serrawettin produziert wird, wie es auch bei anderen Biotensidproduzenten beobachtet wurde (Burch *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2001). In Anlehnung an letztere Erklärung wurden, dem Gedanken aus Yamashita *et al.*, 2001 folgend, um die Serrawettinproduktion zu steigern den Flüssigkulturen Partikel mit großer Oberfläche (Silica und Celite (Roth, Karlsruhe), jeweils 2 mg/mL) zugesetzt, an die sich die Bakterien anlagern könnten. Diese Strategie führte auch bei Versuchen zur Surfactinproduktion mit *B. subtillis* zu höheren Ausbeuten (Yeh *et al.*, 2008). Nach einer Inkubation von 16 h wurden die Ansätze auf Oberflächenaktivität hin untersucht und für eine Analyse per DC dann nicht nur der Kulturüberstand, sondern die komplette Kulturbrühe (einschließlich Zellen und gegebenenfalls Partikeln) mit Chloroform extrahiert, um auch Serrawettin aus Zellen oder aus Vesikeln zu lösen, die andernfalls durch Zentrifugation sedimentiert und abgetrennt wurden. Außerdem würde für den Fall, dass Biotensid an die porösen Partikel bindet (vergleichbar zur Bindung von Serrawettin an XAD-16 im Kulturmedium (Dwivedi *et al.*, 2008)), dieses ebenfalls in die organische Phase übergehen. Die Extrakte wurden per DC auf Serrawettin W1-Produktion hin analysiert. Diese Versuche wurden nur in Trypton-Glycerin Flüssigkultur durchgeführt, auch wenn auf Festmedien Blutagarbasis und Erdnussmehl-Medien zu besseren oder gleichwertigen Ergebnissen führten, um eventuelle Interferenzen dieser komplexen Medien, deren genaue Zusammensetzung nicht näher bekannt ist, mit den *Assay*s/Extraktionsmethoden auszuschließen.

Wiederum konnte durch das *grid assay* in keiner der Kulturen eine Veränderung der Oberflächenspannung festgestellt werden, aber durch DC war sowohl in den Kulturextrakten als auch im Überstandextrakt der TG-Kultur ohne Zusatz Serrawettin W1 nachweisbar (Abb. 3.1. 3B). Dabei zeigte sich, dass der Zusatz von Silica oder Celite-Partikeln zum TG-Medium, verglichen mit Medium ohne Zusatz, hier zu keiner deutlichen Veränderung der Serrawettinproduktion dieses Stammes (indiziert durch die Größe der Spots) führte. Diesen Ergebnissen folgend ist zu vermuten, dass die Lokalisierung der Biotenside in Vesikeln oder in den Zellen für die negativen Ergebnisse in den hier verwendeten *Assay*s zur Oberflächenaktivität verantwortlich ist. Da aber auch aus dem zellfreien Kulturüberstand Serrawettin extrahiert werden konnte (Abb. 3.1. 3B, Spur 2), waren diese scheinbar nicht so

schwer, dass sie bei 3320xg vollständig mit den Zellen sedimentierten. Allerdings zeigte sich durch die Kontaminationen im Extrakt, die in der DC erschienen, wie z.B. Prodigiosin, und auch durch mutmaßlichen Verlust des Serrawettins in den Vesikeln, die mit den Zellen sedimentierten (indiziert durch die rote Schicht auf dem Zellpellet), dass *in puncto downstream processing* noch ein starker Optimierungsbedarf besteht.

Nichtsdestotrotz werden basierend auf diesen Ergebnissen durch Kooperationspartner am KIT erste Versuche zur Produktion von Serrawettin W1 mit *S. marcescens* DSM12481 in Batch-Kulturen im Bioreaktor durchgeführt. Generell ist die Bioreaktorkultivierung von *S. marcescens* gut etabliert, bei der überwiegenden Mehrheit dieser Studien lag der Fokus aber auf der Produktion einzelner Enzyme oder aber der Synthese von Prodigiosin (z. B. Long et al., 2007; Chang et al., 2011).

3.1.1.2 Analyse des von *S. marcescens* DSM12481 produzierten Biotensids

Zur Bestätigung der Identität von Serrawettin W1 und zur Analyse der genauen Zusammensetzung des Biotensids wurde von DC-Platte extrahiertes Material in Kooperation mit der Zentralen Analytik des Forschungszentrums Jülich per HPLC-ESI-MS/MS analysiert (2.8.7). Dabei wurden neben dem Serratamolid mit zwei Hydroxydecansäuren (Masse 515 Da) auch Serrawettin W1-Kongenere mit den Massen 487 Da, 501 Da, 529 Da, 543 Da, 557 Da und 571 Da detektiert (Abb. 3.1. 4). Nach weiterer Fragmentierung im

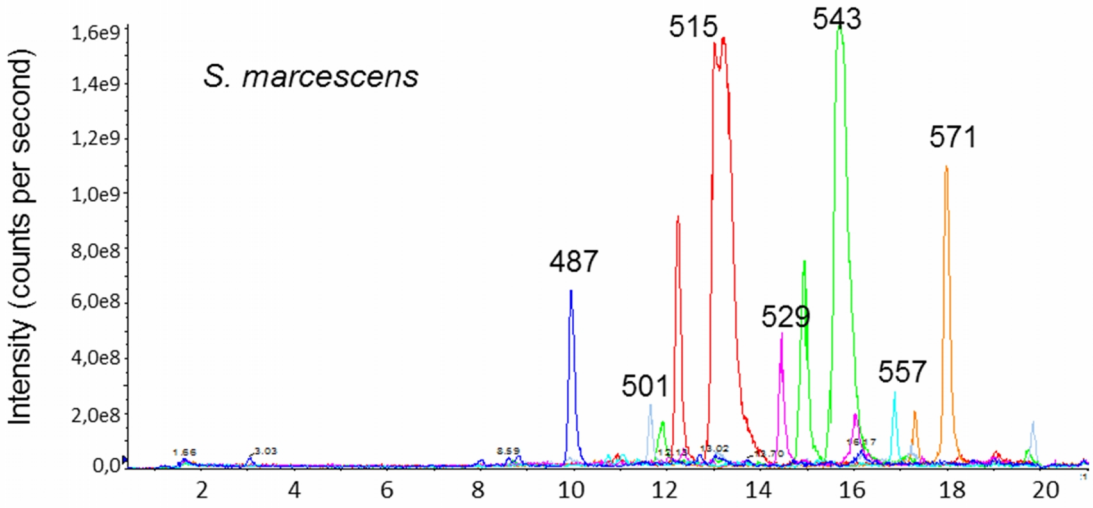


Abb. 3.1. 4 Zusammensetzung des Serrawettin W1 aus *S. marcescens* DSM12481. *Extracted Ion Counts* (XIC) von den über den Signalen in Da angegebenen Massen aus den HPLC-ESI-MS Daten
Den einzelnen Massen sind jeweils unterschiedliche Farben zugeordnet. Die schwächeren Signale jeweils etwa 1 Minute vor dem jeweiligen Hauptsignal konnten aufgrund gleicher Fragmentierungsmuster als Isomersignale identifiziert werden.

Massenspektrometer konnten anhand der in Dwivedi *et al.*, 2008 beschriebenen charakteristischen Zerfallsstufen mehrere Serrawettinspezies identifiziert werden (Tabelle 3.1. 1). Die hier ermittelte Zusammensetzung weist Kongenere auf, die auch in den Extrakten anderer Stämme zu finden waren, nämlich in Extrakt von *S. marcescens* NS38, bei dem als Bestandteile C_{10} und in geringem Maße C_{12}-β-Hydroxyfettsäuren nachgewiesen wurden (Hara-Hotta *et al.*, 1991; Matsuyama & Nakagawa, 1996a), und von *Serratia* spec. mit den Spezies C_{10}+C_8, C_{10}+C_9, C_{10}+C_{10}, C_{10}+C_{11}, C_{10}+C_{12} (Dwivedi *et al.*, 2008). Die Existenz der vier Spezies mit den Massen 557 Da und 571 Da (Tabelle 3.1. 1) wurde jedoch bisher nicht publiziert.

Tabelle 3.1. 1 Kettenlängen der identifizierten Serrawettinspezies im Extrakt von *S. marcescens* DSM12481. Vorherrschende Kongenere, siehe auch Abb. 3.1. 4, sind hervorgehoben.

Masse (Da)	β-Hydroxyfettsäure-Ketten:
487	C_8+C_{10}
501	C_9+C_{10}
515	**C_{10}+C_{10}**
529	*C_{10}+C_{11}*
543	**C_{10}+C_{12}**
557	C_{10}+C_{13}
557	C_{11}+C_{12}
571	C_{10}+C_{14}
571	C_{12}+C_{12}

Es wäre möglich, dass von den verschiedenen *Serratia*-Stämmen unterschiedliche Kongenere produziert werden, vergleichbar mit den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Rhamnolipidgemische aus verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa* (Nitschke *et al.*, 2005). Jedoch konnten damit hier nicht nur längerkettige Kongenere nachgewiesen werden als bisher beschrieben, sondern auch zum ersten Mal Spezies ohne einen β-Hydroxydecansäurerest. Ein Kongener mit β-Hydroxyoctansäure und –dodecansäure (theoretische Masse ebenfalls 515 Da) war allerdings nicht nachweisbar, obwohl beide Fettsäurespezies nachweislich akzeptiert werden und die Affinität der Synthetase vor allem zu letzterer relativ hoch zu sein scheint. Die molekularen Hintergründe dafür blieben unklar.

Generell scheinen C_{12}- und in noch stärkerem Maße C_{10}-Hydroxyfettsäuren bevorzugt zu werden, was dazu passt, dass in den meisten Publikationen Serrawettin W1 bzw. Serra-

tamolid als cyclo-(D-3-hydroxy**decanoyl**-L-seryl)$_2$ beschrieben ist. Nicht in dieses Verteilungsmuster passt das geringe Vorkommen der Spezies mit C_{10}+C_{11}-Ketten, das aber wohl mit der generell deutlich geringeren Bereitstellung an β-Hydroxyfettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Zelle zu erklären ist (Heath & Rock, 1996; Smirnova & Reynolds, 2001).

S. marcescens DSM12481 ist damit ein interessanter Kandidat für die Produktion des Lipopeptid-Biotensids Serrawettin W1. Allerdings erscheint es aufgrund der potentiellen Humanpathogenität dieses Bakteriums (Berthelot *et al.*, 1999; Hejazi & Falkiner, 1997; Mahlen, 2011; Voelz *et al.*, 2010) und seinem Potential, multiresistente Stämme zu entwickeln (Maragakis *et al.*, 2008), sowie der mit diesen Eigenschaften zumindest im europäischen Raum verbundenen Einstufung als S2-Organismus, als sinnvoll nach alternativen Produktionsstämmen zu suchen. Die Produktion von *Biosurfactants* mit humanpathogenen Organismen kann ein Hindernis für biotechnologische Anwendungen darstellen (Toribio *et al.*, 2010).

***S. marcescens* DSM12481 wurde als Produzent des *Biosurfactants* Serrawettin W1 mit einer neuen Variante von SwrW identifiziert. Durch Optimierung von Kultivierungs- und Extraktionsprotokollen wurde der Grundstein für weiterführende Arbeiten zur Produktion dieses Lipopeptids in Bioreaktorkulturen gelegt. Dazu ergaben Analysen des isolierten *Biosurfactants* eine bisher noch nicht publizierte Zusammensetzung des Biotensids mit neuen Serrawettin W1-Spezies.**

3.1.2 Produktion von Biotensiden in *Erwinia billingiae* Eb661

Eine mögliche Alternative zu humanpathogenen Produktionsstämmen für bestimmte Proteine oder Sekundärmetabolite ist die Nutzung von Stämmen, die gleiche oder ähnliche Genprodukte produzieren, aber nicht pathogen sind (Toribio *et al.*, 2010). Im Falle von Serrawettin W1 könnte diese Alternative durch das Enterobacterium *Erwinia billingiae* Eb661 offeriert werden, welches eng mit *Serratia* verwandt ist (Harada & Ishikawa, 1997; Spröer *et al.*, 1999). *E. billingiae* ist eine nicht pathogene, epiphytisch auf Blättern von Obstbäumen zu findende Bakterienspezies, *E. billingiae* Eb661 wurde dementsprechend von Blättern der Birne (*Pyrus communis)* isoliert (Kube *et al.*, 2010; Mergaert *et al.*, 1999).

Durch nach homologen Proteinen zu SwrW (Genbank BAD60917, siehe oben) mittels des blastp-Algorithmus gegen die NCBI-Datenbank konnte eine homologe putative NRPS, annotiert als EbC_06320, (98% *query coverage*/ 59% *identity*/ 72% *similarity*/ 1522 *Score*) im Genom des Enterobacteriums identifiziert werden (Genbank YP_003740023), der einzige Hit mit einem *score* von über 1000 sowie einer *query coverage* von mehr als 80% außerhalb des Taxons *Serratia marcescens*. Besonders im Bereich der für die Aminosäurebindung verantwortlichen Adenylierungsdomäne gibt es eine große Ähnlichkeit in der Sequenz beider Proteine (Abb. 3.1. 5). Durch das Tool "NRPS-Predictor" (Röttig *et al.*, 2011) wurde zudem vorhergesagt, dass die putative NRPS aus *E. billingiae* ein nichtribosomales Peptid einzig mit Serin synthetisiert.

Abb. 3.1. 5 Schematischer Vergleich von SwrW aus *S. marcescens* und der NRPS aus *E. billingiae*. Grau sind Bereiche mit identischen Aminosäuren, rot markiert sind unterschiedliche Aminosäuren, blau bezeichnet Insertionen. Das Alignment beider Aminosäuresequenzen resultiert in 59% Identität bei einem Score von 1522. Graphische Darstellung durch NCBI Graphical Sequence Viewer 2.27.

Bisher ist die Produktion oberflächenaktiver Substanzen für diesen Organismus noch nicht beschrieben worden, das Gen für das SwrW-homologe Protein ist im Rahmen eines bioinformatisch orientierten Genomprojekts als NRPS annotiert worden (Kube *et al.*, 2010) und wurde bisher nicht näher charakterisiert. Aufgrund der relativ hohen Ähnlichkeit zu SwrW wäre es aber denkbar, dass *E. billingiae* ein Serrawettin W1 ähnliches *Biosurfactant* produziert, zumal die häufig (so auch bei *S. marcescens* (Matsuyama *et al.*, 1995)) mit Biotensidproduktion assoziierte Motilitätsform *swarming* auch für *Erwinia billingiae* publiziert ist (Wu *et al.*, 2012). In Experimenten auf verschiedenen Festmedien, analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit *Serratia*, konnte die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *E. billingiae* verifiziert werden (Abb. 3.1. 6). Allerdings produzierte dieses Bakterium *Biosurfactants* unter teilweise anderen Bedingungen als *Serratia*. Zwar war auch hier auf Blutagarbasismedium die Sekretion von oberflächenaktiven Substanzen zu erkennen (wie bei *S. marcescens* wurde aber keine haemolytische Aktivität beobachtet), auf Trypton-Glycerin, LB, sowie den Erdnussmehl haltigen Medien jedoch nicht.

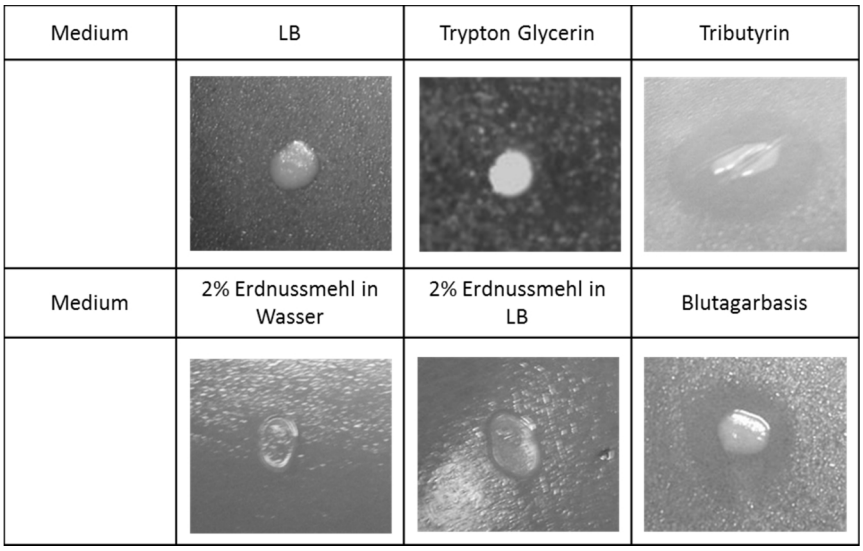


Abb. 3.1. 6 Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *E. billingiae* auf verschiedenen Festmedien. Zellkolonien nach 18 h Inkubation bei 30°C. Der Nachweis der Oberflächenaktivität erfolgte durch *atomized oil assay*, Höfe um die Kolonien indizieren Biotensidproduktion.

Die stärkste *Surfactant*-Produktion zeigte sich bei diesem Stamm auf Tributyrin-Agar. Da für andere Biotenside, wie bereits angesprochen, eine natürliche Funktion in der Motilität auf Oberflächen beschrieben ist (Berti *et al.*, 2007; Matsuyama *et al.*, 1989, 1995), wäre es denkbar, dass *Biosurfactants*, die von *E. billingiae* sekretiert werden, ebenfalls eine Rolle als *wetting agent* in der Motilität im nach bisherigen Kenntnisstand natürlichen Lebensraum spielen, nämlich auf den Blattoberflächen von *Rosaceae* (Gehring & Geider, 2012; Mergaert *et al.*, 1999). Diese sind von einer durch langkettige Alkane und ähnliche Substanzen hydrophoben *Cuticula* überzogen (Jetter & Schäffer, 2001). Adhäsionsmechanismen von epiphytischen Bakterien auf der *Cuticula* sind bisher allgemein beinahe unerforscht (Vorholt, 2012). Es wäre grundsätzlich denkbar, dass durch Sekretion von Biotensiden die Hydrophobizität der Membran erhöht wird -vergleichbar mit Effekten von Rhamnolipiden (Zhong et al., 2008)- und so die Adhäsion an der wachsartigen Oberfläche verbessert wird. Zudem könnte die *Biosurfactant*-Produktion durch epiphytische Bakterien dazu dienen, die hydrophoben Substanzen aus der Blattoberfläche zu lösen und als Kohlenstoffquelle verfügbar zu machen (Schreiber *et al.*, 2005), um das eher knappe Nährstoffangebot dieses Lebensraumes (Lindow & Brandl, 2003) zu verbessern. So ist beschrieben, dass die epiphytische Mikroorganismenpopulation die Hydrophobizität von Blattoberflächen durch Sekretion von w*etting agents* verändern kann (Knoll & Schreiber, 1998). In Betrachtung dieser Punkte könnte die Produktion oberflächenaktiver Substanzen in *E. billingiae* als Reaktion auf eine hydrophobere Umgebung, wie z.B. Tributyrinagar, induziert werden.

Für Experimente zur Biotensidproduktion in Flüssigkultur erwies sich Tributyrinzugabe zum Medium aber als ungeeignet, da für eine Durchmischung beider Phasen Emulgator hinzugegeben werden muss, der mit den Analysemethoden interferiert. Analog zu den *Serratia*-Experimenten konnte die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen in TG-Flüssigkulturen nicht nachgewiesen werden. In per DC analysierten Extrakten von TG-Flüssigkultur und von auf Blutagarbasisagar gewachsenem Rasen, war eine Verbindung nachweisbar, die ein wenig hydrophober zu sein schien als Serrawettin W1 und nach Schwefelsäure und Hitzeeinwirkung purpur wurde (Abb. 3.1. 7; Abb. 3.1. 10). Aufgrund dieser gegenüber dem Braunton des Serrawettins deutlich anderen Färbung und des leicht anderen Laufverhalten, ist auszuschließen, dass es sich hierbei um Serrawettin W1 handelt. Da die Struktur dieses Stoffes in Rahmen dieser Arbeiten aber noch nicht geklärt werden konnte, bleibt unklar, ob es sich hierbei um das gesuchte Produkt der NRPS handelt und inwiefern es Ähnlichkeit zu Serrawettin W1 besitzt.

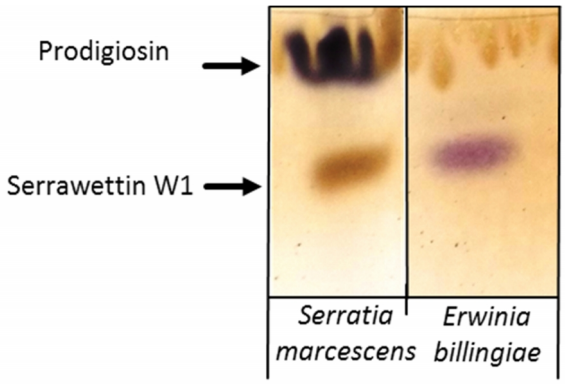


Abb. 3.1. 7 Vergleich der Extrakte von *S. marcescens* DSM12481 und *E. billingiae* Eb661. Analyse durch DC, Visualisiert wurden die Signale mit 60% H_2SO_4.

In dem epiphytisch lebenden Enterobacterium *Erwinia billingiae* Eb661 wurde eine SwrW homologe nonribosomale Peptidsynthetase identifiziert. Es konnten Bedingungen ermittelt werden, unter denen dieses Bakterium oberflächenaktive Substanzen produziert.

3.1.3 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Escherichia coli* BL21 Gold

Eine weitere etablierte Alternative zur Produktion von Sekundärmetaboliten durch pathogene Stämme ist die Nutzung heterologer Expressionssysteme. Durch den Einsatz von S1-Produktionsstämmen kann nicht nur die Pathogenitätsproblematik gelöst werden, in Verbindung mit heterologen Promotoren zur Expression der Synthesegene können auch Einschränkungen durch die komplexen Regulationssysteme in homologen Biotensid-Produzenten vermieden werden (Perfumo *et al.*, 2013; Tiso *et al.*, 2012; Wittgens *et al.*, 2011). Strategien zur Nutzung heterologer Wirte für die Biotensidsynthese wurden bisher hauptsächlich für die Rhamnolipide aus *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben, für deren Produktion sich der nah verwandte Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 als sehr gut geeignet erwiesen hat (Cha *et al.*, 2008; Ochsner *et al.*, 1995; Wittgens *et al.*, 2011).

Als Wirtsorganismus für die heterologe Produktion von Serrawettin W1 wurde zunächst *E. coli* BL21 Gold, nahe verwandt mit *S. marcescens* (Spröer *et al.*, 1999), ausgewählt. Nach unserem Kenntnisstand sind bisher nur wenige Arbeiten zur heterologen Produktion von Lipopeptiden bekannt (Lee *et al.*, 2007; Symmank *et al.*, 2002; Wenzel *et al.*, 2005), die funktionelle Expression von nichtribosomalen Peptidsynthetasen allgemein konnte aber, außer in *P. putida* und *Bacillus*, mehrfach in *Escherichia coli* etabliert werden (Bian *et al.*, 2012a, b; Gruenewald *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Ongley *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2006; Wenzel *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Deshalb galt *E. coli*, der als Produzent des nichtribosomalen Peptides Enterobactin (Rusnak *et al.*, 1991) mit den genetischen und metabolischen Voraussetzungen für die Biosynthese dieser Metabolitklasse ausgestattet ist, als ein vielversprechender Kandidat für die heterologe Produktion von nichtribosomalen Peptiden. Hinzu kommt, dass für dieses Bakterium als Standardexpressionsstamm in Forschung und Biotechnologie eine Vielzahl an Methoden zur Optimierung der Expression oder für *strain engineering* zur Verfügung steht.

Zur Produktion von Serrawettin W1 im Speziellen ist *E. coli* darüber hinaus vielversprechend aufgrund der nahen Verwandtschaft dieses Bakteriums zu *S. marcescens*, wodurch z.B. die Gefahr ineffizienter Expression durch *Codon Bias* minimiert wird. Eine Reihe von Proteinen aus *S. marcescens* wurden dementsprechend bereits sehr erfolgreich in *E. coli* produziert (Braun *et al.*, 1987; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Markert, 2008; Molin *et al.*, 1992). Zudem wurden in Matsuyama *et al.*, 2011 bisher nicht publizierte Arbeiten erwähnt, in denen sich die funktionelle Expression der Biosynthesegene in *E.*

coli JM109 zumindest unter der Kontrolle der natürlichen Promotoren als möglich erwiesen hat.

Zur heterologen Produktion von Serrawettin W1 im für Expressionen optimierten *E. coli*-Stamm BL21 Gold wurde *swrW,* das Gen für die Serrawettinsynthetase, einschließlich eines 70 bp –Bereichs *upstream* des Startcodons inklusive Ribosomenbindestelle, mit den Primern „SwrW up pVLT“ und „SwrW down“ (*template: S. marcescens* DSM12481-DNA) amplifiziert und in den *low copy vector* pVLT33 (de Lorenzo *et al.*, 1993; Morales *et al.*, 1991) kloniert (2.6). Damit stand die Transkription des Gens unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors, der eine Induktion der Genexpression mittels IPTG erlaubt (de Boer *et al.*, 1983). Der resultierende Vektor pVLT-SwrW wurde in *E. coli* BL21 Gold eingebracht und Kulturen des transformierten Stammes nach 16 h Inkubation bei 30°C bzw. 37°C, welche im Anschluss an die Induktion der *swrW*-Expression durch Zugabe von IPTG erfolgte, auf die Produktion oberflächenaktiver Substanzen hin untersucht.

Mittels dieses Systems konnte die Produktion von Biotensiden bei einer Inkubationstemperatur von 30°C sowohl auf Festmedium, indiziert durch Hofbildung um die Kolonien des Expressionsstammes, als auch in Flüssigkultur erreicht werden. Letzteres wurde durch eine veränderte Oberflächenspannung angezeigt (2.8.2), sichtbar gemacht durch die Verzerrung des Rasters im Vergleich zum Leervektorüberstand (Abb. 3.1. 8A+B). Im Gegensatz zu *S. marcescens* war hier im Kulturüberstand *Surfactant*-Aktivität nachweisbar, ein Hinweis darauf, dass Serrawettin W1 in diesem Falle frei im Überstand vorliegt, was das *downstream processing* vereinfachen könnte. Mittels DC von Überstandsextrakten der Expressionskulturen konnte die Produktion von Serrawettin W1 in *E. coli* BL21 Gold mit pVLT-SwrW durch Vergleich mit den Extrakten von *S. marcescens* und *E. coli* mit Leervektor bestätigt werden (Abb. 3.1. 8C). In Kulturen ohne Zugabe von IPTG war keine Bildung von Biotensiden zu beobachten. Das galt für Kolonien auf Festmedien ebenso wie für Flüssigkulturen (ohne Abbildung).

Bei einer für *E. coli* optimalen Wachstumstemperatur von 37°C war ebenfalls keine Oberflächenaktivität nachweisbar (Abb. 3.1. 8A), was sich mit den in Matsuyama et al., 2011 angeführten Beobachtungen zu *E. coli* JM109 deckt. Das ist bemerkenswert, da die regulatorischen Elemente, die in *S. marcescens* für die temperaturabhängige Produktion von Serrawettin W1 (sowie auch z.B. für die des roten Pigmentes Prodigiosin oder für die Vesikelabscheidung) verantwortlich sind, in *E. coli* nicht vorhanden sein sollten bzw. nicht

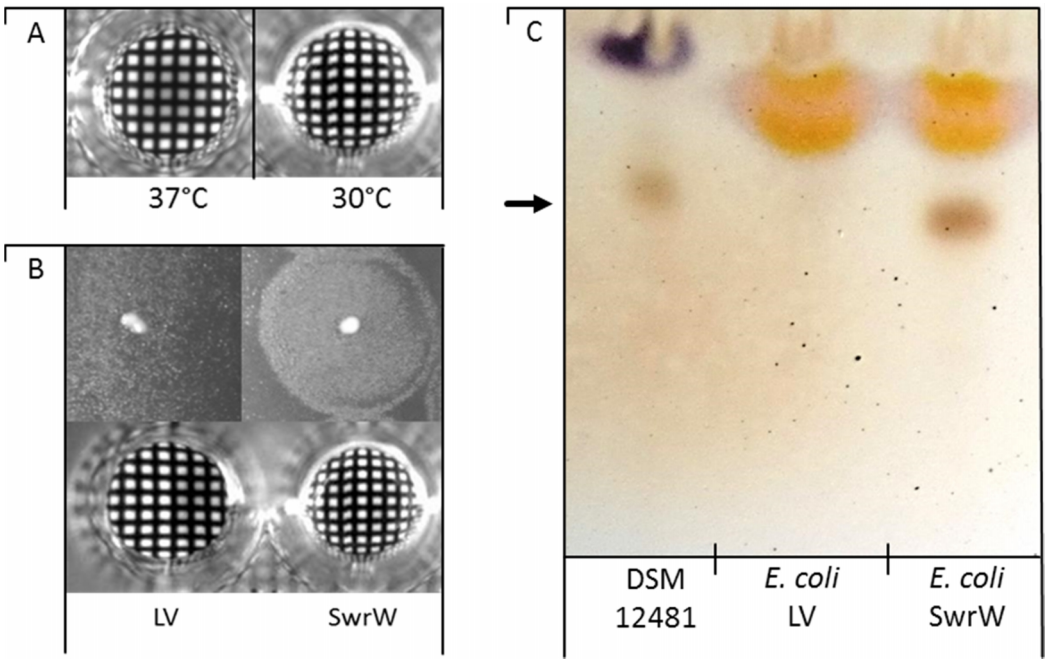


Abb. 3.1. 8 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 *in E. coli* BL21 Gold. **A** Vergleich der Oberflächenaktivität in Überständen von *E. coli* pVLT-SwrW Kulturen, bei 37°C bzw. 30°C inkubiert, durch *grid assay.* Tenside führen zu einer optischen Verzerrung des Rasters; **B** Nachweis der Bildung oberflächenaktiver Substanzen durch *E. coli* pVLTSwrW auf LB-Festmedium (oben) und in LB-Flüssigkultur (unten) im *atomized oil assay* durch Hofbildung bzw. *grid assay*. Als Kontrolle diente *E. coli* mit pVLT33 (LV); **C** DC mit Chloroform-Extrakten von Kulturüberständen der Expressionskultur und Leervektorkontrolle. Als Vergleichsprobe zur Einordnung der Signale diente das Extrakt aus *S. marcescens* DSM12481 (siehe 2.8.3). Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, in allen Fällen ergaben sich die gleichen Signalmuster; diese DC ist exemplarisch für die drei Versuchsreihen. Visualisiert wurden die Signale mit 60% H_2SO_4.

greifen können, wenn die Expression über einen künstlichen Promotor reguliert wird, wie hier der Fall (im Gegensatz zu erwähnten Beobachtungen mit JM109, in dem die Expression unter Kontrolle des natürlichen Promotors stattfand). Eine Simulation der mRNA-Sekundärstrukturen bei 30°C und 37°C durch RNAStructure (Bellaousov *et al.*, 2013) brachte in den 70 bp *upstream* von *swrW* keine Strukturänderungen zu Tage, die auf temperaturinduzierte Effekte ähnlich denen der Riboswitch-induzierten Kälteschock-Proteine (Yamanaka *et al.*, 1999) hindeuteten und die damit eine Translation nur bei 30°C erlaubten (ohne Abbildung). Das spricht eher gegen eine Regulation auf mRNA-Ebene. Die bisher publizierte temperatursensitive Expression von Lipopeptiden (in *Pseudomonas*) ist zudem als durch Transkriptionsstärke reguliert beschrieben (Hockett *et al.*, 2013).

Es wäre aber denkbar, dass die Expression von *swrW* bei optimalen Wachstumsbedingungen effektiver ist, was in höheren intrazellulären Konzentrationen von Serrawettin W1 resultieren kann, die als oberflächenaktive Substanzen toxisch für die Wirtszelle wirken. Deshalb könnte ein Selektionsdruck gegen die funktionelle Expression von SwrW wirken,

der bei geringeren Temperaturen und damit geringeren Wachstumsraten weniger ausgeprägt sein könnte. Funktionelle Expression von potentiell toxischen Proteinen bei reduzierten Wachstumsraten, die mit einer Inkubation bei 30°C einhergehen, und dagegen die Akkumulation der gleichen Proteine in inaktiver Form bei optimaler Wachstumstemperatur ist ein bekanntes Phänomen (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007; Georgiou & Valax, 1996; Yun *et al.*, 2006).

Um zu überprüfen, ob hier tatsächlich eine zu starke Expression in der Inaktivierung des Proteins resultiert, oder ob, im Gegenteil, eine stärkere Expression von *swrW* zu höherer Serrawettin-Produktion führt, wurde *swrW* (amplifiziert mit Swr up pVLT und SwrW histag rev) in den *medium-copy* Vektor pET22b kloniert. Damit ist nicht nur die Gendosis durch eine höhere Kopienzahl des Vektors größer als im pVLT-System, dazu steht die Expression auch unter Kontrolle der hochprozessiven T7-RNA-Polymerase (Baneyx, 1999). Zusätzlich war SwrW mit einem C- terminalen Histidin-*tag* markiert, der es erlaubte, auch inaktives Protein durch Immunoblotting nachzuweisen. Als Expressionswirt diente hier *E. coli* BL21 (DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors besitzt. Wie bei den oben beschriebenen Versuchen wurden die mit dem Plasmid (pETSwrW-CHis) transformierten Zellen nach Induktion der T7-Polymeraseexpression mit IPTG 16 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert und anschließend auf Bildung von Biotensiden und per Immunodetektion auf Präsenz des Proteins SwrW-CHis hin untersucht.

Weder bei einer Inkubationstemperatur von 37°C noch bei 30°C konnte hier Biotensidproduktion nachgewiesen werden, das ca. 150 kDa große Protein konnte aber in beiden Fällen mit markierten Antikörpern gegen den His-*tag* nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass der His-*tag* negative Auswirkungen auf die Proteinaktivität hat, wurde *swrW-CHis* mittels der Primer „Swr up pVLT“ und „SwrW Histag rev“ aus pET22b amplifiziert und in pVLT33 kloniert. Da hier die Produktion von Serrawettin eindeutig detektierbar war, hatte der *tag* wohl keinen inaktivierenden Einfluss auf die Aktivität von SwrW (Abb. 3.1. 9).

Diese Ergebnisse lassen es als wahrscheinlich erscheinen, dass SwrW bei zu hohen Expressionsraten in inaktiver Form akkumuliert. Das wird unterstützt durch die durch per Immunoblot ausgewertete Löslichkeitsanalyse per Zentrifugation (Abb. 3.1. 9C). Dabei wurden die Bestandteile von per Ultraschall aufgeschlossenen Zellen der Expressionskultur von *E. coli* BL21(DE3) mit pETSwrW-CHis durch Zentrifugation in lösliche

und unlösliche Fraktion getrennt. Durch Immunodetektion war hier nur in der unlöslichen Fraktion SwrW-CHis nachweisbar. Da diese sich aus Zelltrümmern und aggregierten unlöslichen Proteinen zusammensetzt, unterstützte dies die Annahme, dass SwrW unter diesen Bedingungen in nicht funktioneller Form aggregiert.

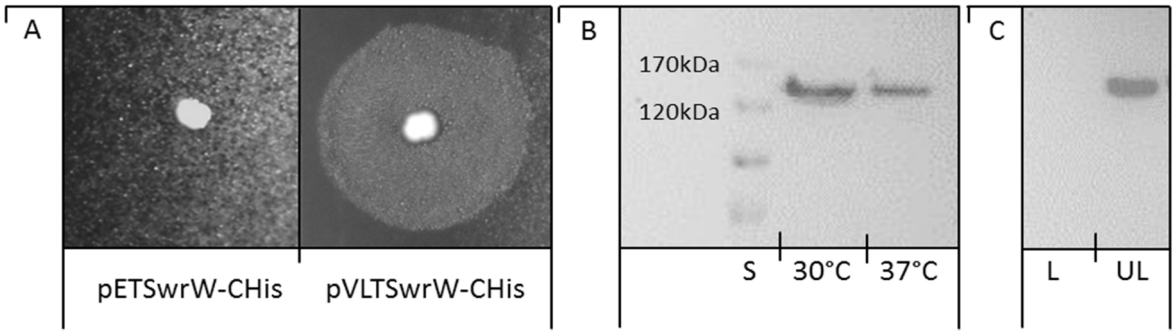


Abb. 3.1. 9 Expression von *swrW* mit C-terminalem His-*tag* in *E. coli* BL21(DE3). A *E. coli* pETSwrW-CHis auf Festmedium nach *atomized oil assay. swrW-Chis*-Expression steht hier unter Kontrolle des P_{T7}. Als Kontrolle für die Funktionalität von SwrW-CHis dient *E. coli* BL21(DE3) mit *swrW-CHis* unter P_{tac}-Kontrolle; **B** Immunologischer Nachweis von SwrW-CHis in Ganzzellextrakten von *E. coli* BL21(DE3) mit pETSwrW-CHis aus Expression bei 30°C und bei 37° mittels Anti-His-*tag* Antikörper. **C** Löslichkeitsanalyse von SwrW aus pETSwrW-CHis-Expressionskultur bei 30°C durch immunologischen Nachweis von SwrW-CHis; L Lösliche Fraktion, UL Unlösliche Fraktion. In beiden Blots (B+C) aufgetragen ist jeweils eine Zellzahl entsprechend einer OD von 0,15.

Gute Bedingungen für die heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *E. coli* sind demnach eine Expression von *swrW* bei 30°C und die Kontrolle der Expression durch einen schwächeren Promotors. Interessant ist dabei, dass offensichtlich die alleinige Expression der Serrawettin –Synthetase ausreichend ist, um die Produktion dieses nichtribosomalen Peptides in *E. coli* BL21 zu bewirken, da diese Metabolite in den meisten Fällen von großen Multienzymkomplexen (1.2.2) synthetisiert werden (Condurso & Bruner, 2012).

Die Rolle der in der Literatur als essentiell für die Produktion von Serrawettin W1 beschriebenen Phosphopantetheinyltransferase (PPT) PswP (Sunaga *et al.*, 2004) scheint von PPT aus *E. coli* übernommen werden zu können, in Abweichung zu der beschriebenen relativ hohen Spezifität der *E. coli* PPT, die in anderen Studien die posttranslationale Modifikation von NRPS oder Polyketidsynthasen anderer Organismen nicht katalysieren konnte (Pfeifer & Khosla, 2001; Pfeifer *et al.*, 2001). In *E. coli* BL21 ist laut BLAST-Analyse kein Protein mit hoher Primärstrukturhomologie zu PswP vorhanden, bester Kandidat für die Aktivierung von SwrW war die an der Enterobactinsynthese beteiligte PPT EntD (Genbank CAQ31055), mit einem Alignment-Score von 81,6 (37% *identity/* 53% *similarity*, aber drei gaps von jeweils einer, drei bzw. vier Aminosäuren). Dazu ist beschrieben, dass die

Sekundärmetabolismus assoziierten PPT (bezeichnet als srf-Typ PPT) in Bakterien allgemein strukturell verwandt sind (Finking *et al.*, 2004) und EntD auch in anderen Studien zur heterologen Expression von (partiellen) NRPS in *E. coli* die posttranslationale Modifikation dieser Proteine zumindest teilweise katalysieren konnte (Samel *et al.*, 2007; Tanovic *et al.*, 2008). Es wäre somit denkbar, dass in Folge der nahen Verwandtschaft von *E. coli* und *S. marcescens* die Tertiärstruktur dieses Proteins ähnlich genug zu PswP ist, um eine funktionelle Interaktion zwischen den Proteinen aus beiden Wirten zu ermöglichen, was im Falle der Polyketidsynthasen aus den weitläufiger mit *E. coli* verwandten Myxobacterien anscheinend nicht der Fall war (Pfeifer & Khosla, 2001). Ein weiteres Indiz für die funktionelle Interaktion der *E. coli* eigenen-PPT mit *Serratia* Metabolitsyntheseproteinen ist die erfolgreiche Produktion von Prodigiosin in *E. coli* (Markert, 2008), bei der ebenfalls auf zusätzliche Expression von *pswP* verzichtet werden konnte, obwohl diese PPT auch für diesen Biosyntheseweg als essentiell in *S. marcescens* beschrieben wurde (Sunaga *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2006).

Die Bereitstellung der aktivierten β-Hydroxyfettsäuren schien ebenfalls durch *E. coli* eigene Systeme ermöglicht zu werden. Falls, wie vermutet, Acylcarrierproteine hier beteiligt sind (Matsuyama *et al.*, 2011), ist es sehr gut vorstellbar, dass *S. marcescens* SwrW mit *E. coli* ACP funktionell interagieren könnte, da die ACP-Familie als hoch konserviert in Primär- und Sekundärstruktur beschrieben wird (Byers & Gong, 2007; Worsham *et al.*, 2003). In früheren Studien wurde gezeigt, dass bei diesen Proteinen allgemein durch strukturelle Flexibilität nicht nur Interaktion mit vielen unterschiedlichen Proteinen einer Spezies möglich ist (Khosla *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2006), sondern sogar mit Proteinen - genauer mit Enzymen aus der Fettsäuresynthese- sehr unterschiedlicher Organismen, nämlich verschiedener Bakterien und Pflanzen (Jha *et al.*, 2007; Simoni *et al.*, 1967).

Eine funktionelle Expression der NRPS aus *E. billingiae* unter gleichen Bedingungen nach Klonierung des annotierten NRPS-Gens (Amplifikation des Gens einschließlich 160 bp *upstream* mit den Primern „EbiNRPS-160“ und „Ebi-NRPS His rev“ und genomischer DNA von *E. billingiae* Eb661 als *template)* in pMMB207 und somit unter Kontrolle des P_{tac} und der natürlichen RBS, gelang nicht, so dass auf diesem Weg nicht gezeigt werden konnte, ob das in 3.1.2 beschriebene Signal auf die Aktivität der NRPS zurückzuführen ist. So sind weitere Analysen notwendig, um sicher zu bestätigen, dass dieses Enzym funktional ist und um die Identität des von diesem produzierten Metaboliten zu klären.

Die Produktion des Lipopeptids Serrawettin W1 wurde erfolgreich in *E. coli* BL21 Gold etabliert. Erreicht wurde dies durch heterologe Expression eines einzigen Gens, *swrW,* unter *tac*-Promotorkontrolle und Kultivierung bei 30°C. Expression unter Kontrolle des starken T7-Promotors oder bei 37°C resultierte in der Produktion von SwrW, aber nicht von Biotensid.

3.1.4 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Erwinia billingiae* Eb661

Als mutmaßlicher Produzent eines Serrawettin-ähnlichen Biotensids ist *E. billingiae* (3.1.2) ebenfalls ein vielversprechender Wirtsorganismus für die heterologe Expression von *swrW*, da hier Potential vorhanden ist, dass Vorläufermetabolitsynthese, eventuelle Sekretionssysteme und Hilfsenzyme besser auf die Lipopeptidsynthese abgestimmt sind. So ist z.B. in diesem Bakterium ein PswP-homologes Protein vorhanden, dass sich mit 37% *identity*/ 52% *similarity* ohne *gaps* in ein Alignment mit der *S. marcescens* PPT einreihen ließ (Score 142), was vermuten lässt, dass die Oberflächenstruktur dieses Proteins ähnlicher zu der von PswP sein könnte als die der *E. coli* PPT. Spezifischere Interaktion von PPT oder auch ACP könnte sich in einer höheren Effektivität der Serrawettin-Synthetase niederschlagen. Für andere Sekundärmetaboliten ist bereits beschrieben, dass Coexpression eines spezifischeren ACP in höheren Ausbeuten resultierte (Brady *et al.*, 2002). Voraussetzung für eine Nutzung von *E. billingiae* als heterologer Produktionsstamm für Serrawettin W1 ist aber die Zugänglichkeit dieses Stammes für molekularbiologische und mikrobiologische Methodik, d.h. die Bakterien müssen stabil mit Expressionsvektoren transformiert werden können, was voraussetzt, dass kompetente Zellen erzeugt werden und Träger eines Plasmids selektiert werden können. Positiv zu bewerten wäre zudem eine zu *E. coli* vergleichbare hohe Teilungsrate unter Laborbedingungen, um effiziente Arbeitsprozesse zu ermöglichen. Dies ist aber keine allgemeine Grundvoraussetzung für eine Eignung als Produktionsstamm, da auch langsamer wachsende Spezies bereits als vielversprechende Expressionswirte beschrieben sind (Drepper *et al.*, 2005; Katzke *et al.*, 2012).

3.1.4.1 Entwicklung mikrobiologischer Methodik für *Erwinia billingiae* Eb661

Obwohl vielleicht aufgrund der bisher angenommenen natürlichen, sessilen Lebensweise nicht zu vermuten, zeigte *E. billingiae* in 10 mL-Flüssigkultur mit LB-Medium bei 30°C ähn-

liche Teilungsraten wie *E. coli* bei gleichen Medium Bedingungen. Nach 16 h unter den genannten Bedingungen besaß die Kultur eine OD_{580nm} von etwa 10. Dieses Bakterium ist damit für Flüssigkultivierung gut geeignet.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *E. coli* wurde auf ein ursprünglich für diese Spezies entwickeltes Protokoll zur Herstellung elektrokompetenter Zellen zurückgegriffen. Dieses beinhaltet drei Waschschritte mit 10% Glycerin-Lösung und Lagerung der kompetenten Zellen bei -80°C in selbiger Lösung. Nach Plasmidzugabe wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend erfolgte die Transformation durch Elektroporation mit 1,25 kV/mm (2.7.3). Dieses Protokoll resultierte in für die in dieser Arbeit vorgesehenen Zwecke, nämlich der Transformation mit einzelnen vollständigen Plasmiden, ausreichenden Transformationseffizienzen. Für eventuelle Anwendungen zur Generierung von (Meta-) Genombanken oder Transformationen mit Ligationsansätzen ist eventuell eine weitere Optimierung des Protokolls, vergleichbar zu den Arbeiten mit *P. putida* KT2440 T7 in Troeschel, 2010, notwendig.

Um stabile Transformation mit Plasmiden zu gewährleisten, werden die Wirtsstämme in den hier verwendeten Systemen unter Selektionsdruck eines Antibiotikums angezogen, gegen welches das verwendete Plasmid eine Resistenz vermittelt. Daher war es wichtig, die Antibiotikakonzentrationen zu ermitteln, die gegen *E. billingiae* Eb661 ohne plasmidvermittelte Resistenz zuverlässig wirksam sind, sodass ein effektiver Selektionsdruck auf die Vermehrung des Plasmids ausgeübt werden kann (Tabelle 3.1. 2).

Tabelle 3.1. 2 Getestete Antibiotika und deren gegen *E. billingiae* Eb661 wirksame Konzentrationen

Antibiotikum	Niedrigste wirksam getestete Konzentration (mg/L)
Kanamycin	50
Tetracyclin	10
Chloramphenicol	50
Ampicillin	Leichtes Wachstum bis zur höchsten Testkonzentration 300 mg/L
Carbenicillin	300 mg/L
Irgasan	Wachstum bei 25 mg/L, nicht bei 50mg/L

Mit Ausnahme des β-Lactamantibiotikums Ampicillin, bei dem ein Wachstum in Biofilmen am Boden des Kulturgefäßes zu erkennen war, sprach *E. billingiae* sehr gut auf die getesteten Antibiotika an. Somit ist eine stabile Transformation mit einer Vielzahl von Plasmiden möglich. Eine Resistenz gegenüber Irgasan in einer Konzentration von 25 mg/L er-

möglicht zudem Konjugation mit F^+-*E. coli*-Stämmen und anschließender Selektion gegen *E. coli* durch eben Irgasan.

Somit konnte gezeigt werden, dass *E. billingiae* für mikrobiologische Methoden zugänglich ist und sich als potentieller Expressionsstamm eignet. Dazu besitzt dieses Bakterium homologe Proteine zu c*atabolite activator proteine* Crp (Genbank YP003743549.1) und *lac repressor* LacI (Genbank YP003742260.1) aus *E. coli*, was vermuten lässt, dass auf dem *E. coli lac*-Operon basierte Expressionssysteme (z.B. pUC oder pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994)) auch in diesem Stamm funktional sind. Ein homologes Protein zur Lactose-Permease LacY konnte hingegen durch BLAST nicht identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings keine weiteren Experimente zur Überprüfung der Funktionalität von *lac*-Promotor basierten Systemen ohne *lac*-Repressor in *trans* durchgeführt, da alle hier vorgenommenen Expressionsversuche mit Vektoren der pVLT-Familie durchgeführt wurden, bei denen das für die Repression des *tac*-Promotors unter nicht-induzierendenden Bedingungen ebenfalls benötigte *lacI*^{q} auf dem Plasmid kodiert ist.

3.1.4.2 Heterologe Expression von *swrW* in *E. billingiae*

Kompetente *E. billingiae*-Zellen wurden mit pVLT-SwrW transformiert und in mit IPTG versetzten Kulturen in Fest- und Flüssigmedien (LB) auf die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen bei einer Kultivierungstemperatur von 30°C hin untersucht. In beiden Fällen konnte *Biosurfactant*-Produktion detektiert werden, oben beschriebene vorangegangene Versuche (3.1.2) bzw. der Vergleich mit Leervektor-Kulturen schließen aus, dass der Stamm unter diesen Bedingungen detektierbar eigenes Biotensid produziert (Abb. 3.1. 10A). Über DC von Überstandsextrakten und Vergleich mit dem *S. marcescens*-Extrakt konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem durch den Expressionsstamm gebildeten Biotensid um Serrawettin W1 handelt (Abb. 3.1. 10B). Demnach schien in diesem Stamm die Interaktion von SwrW mit Wirts-PPT ebenfalls zu funktionieren, ebenso die Bereitstellung von aktivierten Fettsäuren durch den Wirtsorganismus.

Wie bei *E. coli* wurde auch durch diesen Stamm bei 37°C-Inkubation kein Serrawettin produziert (ohne Abbildung). Allerdings entspricht dies nicht, wie bei *E. coli*, der für diesen Stamm von der DSMZ angegebenen optimalen Temperatur (30°C). So scheint es, dass hier Serrawettin unter optimalen Bedingungen gebildet wird, im Gegensatz zu den Ergebnissen zur Expression von *swrW* in *E. coli*, was allein eine oben bereits diskutierte tempe-

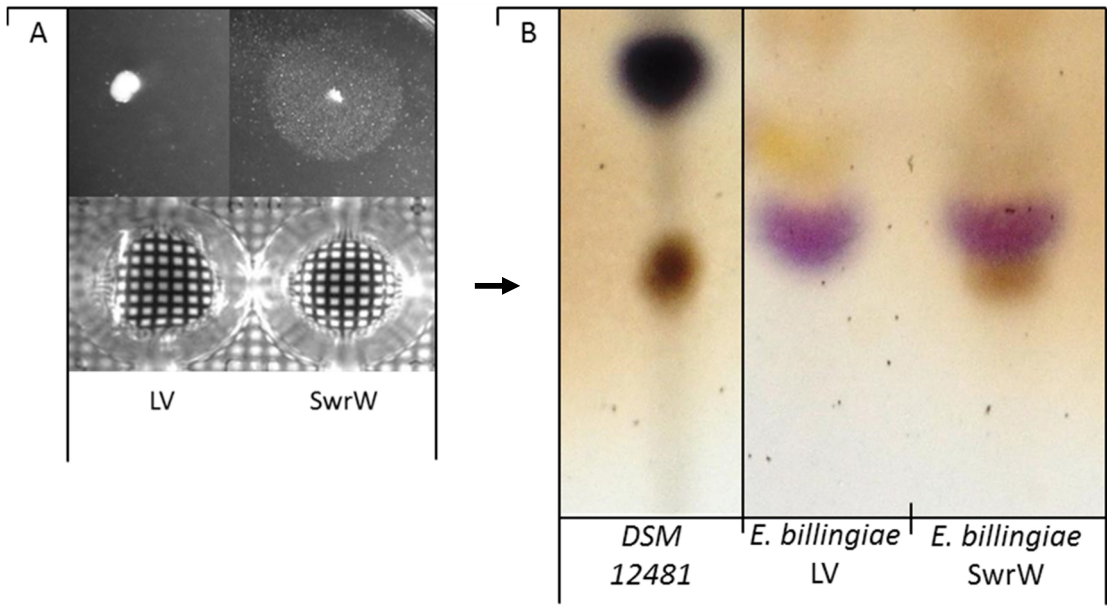


Abb. 3.1. 10 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 *in E. bilingiae* Eb661. A Nachweis der Bildung oberflächenaktiver Substanzen durch *E. billingiae* pVLT-SwrW auf LB-Festmedium (oben) und in LB-Flüssigkultur (unten) per *atomized oil assay* und *grid assay*. Als Kontrolle diente *E. billingiae* mit pVLT33 (LV); **B** DC mit Chloroform-Extrakten der Kulturüberstände von Expressionskultur und Leervektorkontrolle. Als Vergleichsprobe zur Einordnung der Signale diente das Extrakt aus *S. marcescens* DSM12481 (siehe 2.8.3). Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, in allen Fällen ergaben sich die gleichen Signalmuster; diese DC ist exemplarisch für die drei Versuchsreihen. Visualisiert wurden die Signale mit 60% H_2SO_4.

raturabhängige Aktivität von SwrW unterstützen würde. Allerdings war auch zu beobachten, dass das Wachstum der Expressionskultur bei 37°C nach Induktion vollständig zum Erliegen kam, während der Stamm mit Leervektor zwar nicht die hohen Zelldichten einer bei 30°C inkubierten Kultur, aber doch wenigsten eine OD_{580nm} von 4,8 ±1,5 erreichte. Demnach ist zu vermuten, dass in der Expressionskultur toxische Mengen von SwrW oder Serrawettin gebildet werden, die NRPS also bei dieser Temperatur auch aktiv ist sein könnte.

Da bisher keine Charakterisierung von *E. billingiae* bezüglich optimaler Wachstumsbedingungen publiziert worden ist und auch in dieser Arbeit keine Wachstumskurven für diesen Stamm ermittelt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier die höchste metabolische Aktivität bei Temperaturen oberhalb von 30°C vorliegt, auch wenn in allen bisher beschriebenen Kultivierungen dieses Stammes Inkubationstemperaturen zwischen 22°C und 30°C gewählt wurden (Jakovljevic *et al.*, 2008; Mergaert *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2012). Daneben gibt es auch keine Daten zum Temperaturoptimum der NRPS, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese eventuell bei 37°C effektiver arbeitet als bei 30°C und sich deshalb in beiden Stämmen toxische Mengen an Serrawettin anrei-

chern, die den Tod der Zelle bzw. zur Aggregation des Proteins in inaktiver Form bedingen. Es ist nicht selten, dass die Optimumstemperatur eines Enzymes höher liegt, als die optimale Wachstumstemperatur des Stammes, aus dem dieses Protein ursprünglich stammt (Peng *et al.*, 2010; Richter *et al.*, 2009, 2011).

Unabhängig von den molekularen Hintergründen für die temperaturabhängige Produktion des Biotensids in beiden Expressionswirten zeigen die hier dargestellten Ergebnisse aber eindeutig eine Eignung von *E. billingiae* Eb661 als Produktionsstamm für Serrawettin W1, weshalb es sinnvoll sein könnte, weitere Studien zu diesen Regulationsmechanismen durchzuführen. Darüber hinaus könnte dieser mutmaßliche Produzent eines Serrawettin W1 ähnlichen Lipopeptids ein lohnenswertes Ziel für *strain engineering* in Bezug auf die Produktion von Cyclodepsipeptid-*Biosurfactants* sein, da er, wie gezeigt, für molekularbiologische Verfahren zugänglich ist und, wie einleitend bereits beschrieben, über spezifischer an SwrW bindende Transferasen als *E. coli* bzw. über auf Lipopeptidexport abgestimmte Sekretionsmechanismen verfügen könnte.

Das gerade Sekretionsmechanismen ein sehr wichtiger Ansatzpunkt für die Steigerung der Ausbeuten mikrobiologisch produzierter Metaboliten sind, zeigen nicht zuletzt Anwendungen wie die des Sophorolipidtransporters in *S. bombicola* (Soetaert & Van Bogaert, 2012) oder des Lysintransporters in *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic *et al.*, 1996). Durch gezieltes *strain engineering* könnten hier die wohl bereits vorhandenen Stoffwechselwege zur Produktion der Cyclodepsipeptide gestärkt und Regulationsmechanismen umgangen werden, um einen nicht pathogenen Produktionsstamm speziell für diese Biotenside zu generieren.

Für den nicht pathogenen Biotensidproduzenten *Erwinia billingiae* Eb661 wurde molekular- und mikrobiologische Methodik etabliert. Serrawettin konnte mithilfe dieses Stammes heterolog produziert werden, wie in *E. coli* mit Expression des Serrawettinsynthetasegens *swrW* unter P_{tac}-Kontrolle.

3.1.5 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *Pseudomonas putida* KT2440 und Vergleich der verschiedenen Produktionsstämme

Neben den oben ausführlich beschriebenen Produktionssystemen in *E. coli* und *E. billingiae* wurde außerdem als weiterer nicht pathogener Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 auf seine Eignung als Produktionsstamm für Serrawettin W1 hin evaluiert. Dieser Stamm ist zwar nicht so nahe mit *Serratia* verwandt wie *Escherichia* oder *Erwinia*, er ist aber beschrieben als allgemein für die heterologe Produktion von Sekundärmetaboliten sehr gut geeignet. Gute Voraussetzungen für die Nutzung dieses Bakteriums ist seine metabolische Versatilität, die bedingt, dass eine Vielzahl von Vorläufermolekülen bereitgestellt werden kann (Bechthold, 2005; Gross *et al.*, 2006; Wenzel *et al.*, 2005), sowie die Existenz einer Phosphopantetheinyltransferase mit einem breitem Substratspektrum (Gross *et al.*, 2005). In Bezug auf Biotenside im Speziellen ist *P. putida* KT2440 ein bereits gut etabliertes System zur Produktion von Rhamnolipiden (Müller *et al.*, 2012; Ochsner *et al.*, 1995; Wittgens *et al.*, 2011), wobei sich dieser Stamm als toleranter gegenüber auch hohen Konzentrationen des Biotensids im Medium erwiesen hat (bis zu 100 g/L) als *E. coli* oder sogar als der natürlicherweise Rhamnolipide produzierende Stamm *P. aeruginosa* (Wittgens, 2013). Da zur Rhamnolipidsynthese ebenfalls β-Hydroxyfettsäuren mit einer Länge zwischen 8 und 16 C-Atomen benötigt werden (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Passeri *et al.*, 1992), ist sichergestellt, dass diese in ausreichendem Ausmaß für die Synthese von Serrawettin W1 zur Verfügung stehen. Zudem wurde durch Produktion von Prodigiosin prinzipiell gezeigt, dass *P. putida* KT2440 gut geeignet ist, um Biosynthesegene aus *Serratia* funktionell zu exprimieren (Loeschcke *et al.*, 2013; Markert, 2008).

Elektrokompetente *P. putida* wurden mit pVLT-SwrW transformiert, und wie die oben beschriebenen Produktionsstämme in LB unter induzierenden Bedingungen bei 30°C kultiviert. Durch Oberflächenaktivitäts*assay*s und DC, analog zu oben für die anderen heterologen Expressionssysteme beschriebenen Prozeduren, konnte gezeigt werden, dass sich auch dieser Stamm zur Produktion von Serrawettin durch Expression von *swrW* eignet (Abb. 3.1. 11). Auch wenn nähere Untersuchungen zu diesem Expressionssystem in Zusammenarbeit mit dem KIT noch ausstehen, sind diese ersten Ergebnisse ebenfalls vielversprechend.

Um die Produktion des Biotensids in den verschiedenen Stämmen vergleichen zu können, wurden Einzelkolonien der Expressionsstämme auf einer LB-Agarplatte mit IPTG (0,5mM),

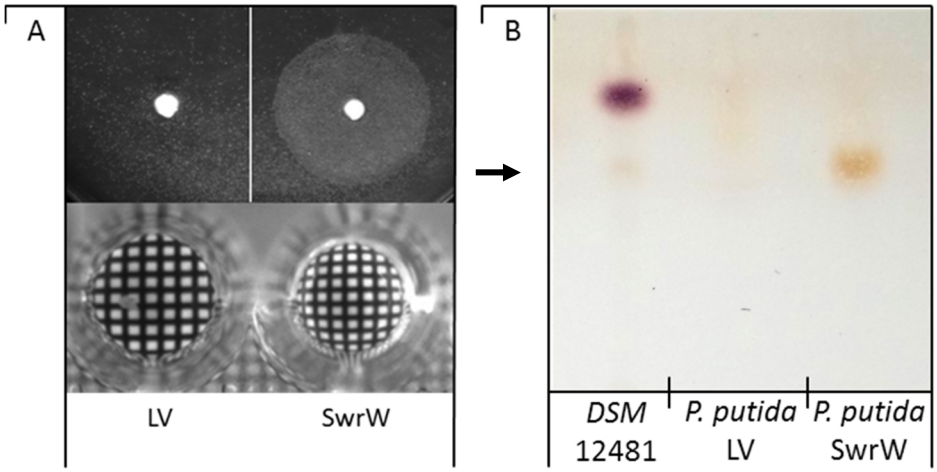


Abb. 3.1. 11 Heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *P. putida* KT2440. A Nachweis der Bildung oberflächenaktiver Substanzen durch *P. putida* pVLT-SwrW auf LB-Festmedium (oben) und in LB-Flüssigkultur (unten) per *atomized oil assay* und *grid assay*. Als Kontrolle diente *P. putida* mit pVLT33 (LV). **B** DC mit Chloroform-Extrakten der Kulturüberstände von Expressionskultur und Leervektorkontrolle. Als Vergleichsprobe zur Einordnung der Signale diente das Extrakt aus *S. marcescens* DSM12481. Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, in allen Fällen ergaben sich die gleichen Signalmuster; diese DC ist exemplarisch für die drei Versuchsreihen. Visualisiert wurden die Signale mit 60% H_2SO_4.

16 h bei 30°C inkubiert und anschließend per *atomized oil assay* analysiert (Abb. 3.1. 12). Hier schien die Serrawettin W1 –Produktion in *E. coli* BL21 (Gold) am effektivsten zu funktionieren.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Stämmen ist dieser allerdings ein Organismus, der auf die Anwendung als heterologer Expressionsstamm hin optimiert worden ist, z.B. durch Deletion bestimmter Proteasegene, deren Genprodukte für den Abbau heterolog exprimierter Proteine verantwortlich sein können. In dem wildtypischen Stämmen *E. billingiae* und *P. putida* sind solche Systeme mutmaßlich aktiv. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich die Unterschiede in der Serrawettin-Produktion darstellen, wenn expressionsoptimierte *P. putida* oder *E. billingiae*-Stämme genutzt werden können.

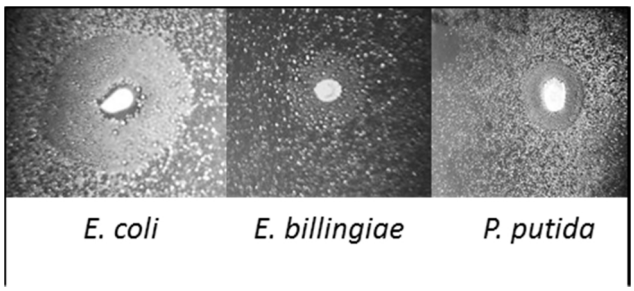


Abb. 3.1. 12 Vergleich der Serrawettinproduktion in *E. coli*, *E. billingiae und P. putida* mit pVLT-SwrW auf LB-Agar mit Kanamycin und IPTG (0,5mM); Die Biotensidproduktion in den drei Produktionsstämmen wurde nach Inkubation bei 30°C über Nacht per *atomized oil assay* analysiert. Die in der Abbildung gezeigten Kolonien sind auf derselben Agarplatte gewachsen, exemplarisch für je drei Kolonien jedes Stammes.

Als weitere Ursache für die unterschiedliche Serrawettin-Produktion der verschiedenen Wirtsstämme wäre denkbar, dass der aktive Transport von IPTG durch LacY in die *E. coli*-Zellen zusätzlich zur weniger effektiven Diffusion des Induktors (Marbach & Bettenbrock, 2012) zu einer höheren Anzahl Zellen führt, bei denen die Expression von *swrW* induziert ist, als in den beiden anderen Stämmen der Fall, bei denen kein homologes Protein zu LacY identifiziert worden ist und bei denen IPTG vermutlich nur über langsamere Diffusionsprozesse in die Zellen gelangt.

Somit konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob *E. coli* BL21 auch über die effektivere Expression von heterologen Proteinen allgemein hinaus besser geeignet ist für die Produktion dieses Lipopeptid-*Biosurfactants* in Bioreaktormaßstab als die anderen beiden Expressionsstämme, nach den hier dargelegten Ergebnissen lässt sich aber vermuten, dass ohne weiteres *strain engineering E. coli* BL21 pVLT-SwrW die größten Ausbeuten verspricht. Weitere Experimente dazu sowie die Entwicklung eines Systems für die präzise Quantifizierung der Serrawettin-Produktion in Flüssigkulturen werden im Rahmen der Kooperation mit dem KIT in Karlsruhe durchgeführt.

Heterologe Serrawettin-Produktion konnte in *Pseudomonas putida* KT2440 erreicht werden. Von den drei hier dargelegten Expressionsstämmen von *E. coli*, *E. billingiae* und *P. putida* zeigte *E. coli* BL21 unter den gegebenen Bedingungen die stärkste *Biosurfactant*-Produktion.

3.1.6 Analyse der Zusammensetzung des heterolog produzierten Serrawettin W1

Während die Analyse des Biotensids aus *P. putida* pVLT-SwrW noch aussteht, wurde die Zusammensetzung von Serrawettin W1, das aus den Überständen der *swrW*-Expressionsstämme von *E. coli* BL21 und *E. billingiae* extrahiert worden war, analog zur Analyse des von *S. marcescens* produzierten Biotensids (3.1.1.2) durch HPLC-MS/MS untersucht. In beiden Fällen stellte das ursprüngliche Serratamolide (C_{10}+C_{10}) die Hauptkomponente dar, doch auch hier konnten verschiedene Kongenere identifiziert werden, im Vergleich mit dem *S. marcescens*-Extrakt fiel jedoch auf, dass sich die chemische Zusammensetzung der unterschiedliche Proben leicht unterschied (Tabelle 3.1. 3, Abb. 3.1.

13). So schien in beiden heterologen Expressionssystemen eine Präferenz für die Spezies mit kürzeren β-Hydroxyfettsäuren (Kettenlängen 8-10 C-Atome) vorzuliegen, während das Biotensid, das aus *S. marcescens* selbst isoliert wurde, hauptsächlich aus den Spezies C_{10}+C_{10} und C_{10}+C_{12} bestand und Kongenere mit C_8 und vor allem C_9 nur in geringem Maße gebildet wurden. Die in *S. marcescens* produzierten Spezies mit C_{13}- oder C_{14}-β-Hydroxyfettsäuren waren dagegen in heterolog produziertem Biotensid nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Wie bei *S. marcescens* gab es keine Hinweise auf C_8+C_{12} Spezies. Es scheint für das Enzym nicht möglich zu sein, nach Einbau der einen β-Hydroxyfettsäure die andere zu binden oder in das Biotensidmolekül zu integrieren.

Tabelle 3.1. 3 Vergleich der durch HPLC-MS/MS identifizierten Serrawettinspezies in Extrakten von *S. marcescens* DSM12481, *E. coli* BL21 pVLT-SwrW und *E. billingiae* pVLT-SwrW. Identifizierte Spezies sind mit ✓ markiert, (✓) zeigt an, dass hier aufgrund der schwachen Signale und, damit einhergehend, einem schlechten *signal/noise*-Verhältnis nicht alle charakteristischen Fragmente identifiziert werden konnten. Vorherrschende Kongenere (siehe auch Abb. 3.1. 12) sind hervorgehoben.

Masse (Da)	β-Hydroxyfettsäure-Ketten:	*S. marcescens*	*E. coli*	*E. billingiae*
487	C_8+C_{10}	✓	✓	✓
501	C_9+C_{10}	✓	✓	✓
515	C_{10}+C_{10}	✓	✓	✓
529	C_{10}+C_{11}	✓	✓	✓
543	C_{10}+C_{12}	✓	✓	✓
557	C_{10}+C_{13}	✓		(✓)
557	C_{11}+C_{12}	✓		✓
571	C_{10}+C_{14}	✓		
571	C_{12}+C_{12}	✓		

Da bisher die genauen Parameter der Reaktion, d.h. ob es Präferenzen gibt, welche β-Hydroxyfettsäuren bevorzugt gebunden und damit mit höherer Wahrscheinlichkeit zuerst mit Serin verknüpft werden, trotz des propagierten Reaktionsschemas (Abb. 1. 6) nicht geklärt sind, sowie die Struktur des Proteins oder seiner Domänen und damit Informationen über mögliche Bindetaschen bisher ebenfalls unbekannt sind, bleiben die molekularen Hintergründe für dieses Phänomen im Dunkeln.

In anderen Arbeiten, die sich mit der heterologen Rhamnolipidproduktion in *P. putida* mit den Enzymen aus unterschiedlichen Organismen befassten, wurde als Ursache für eine

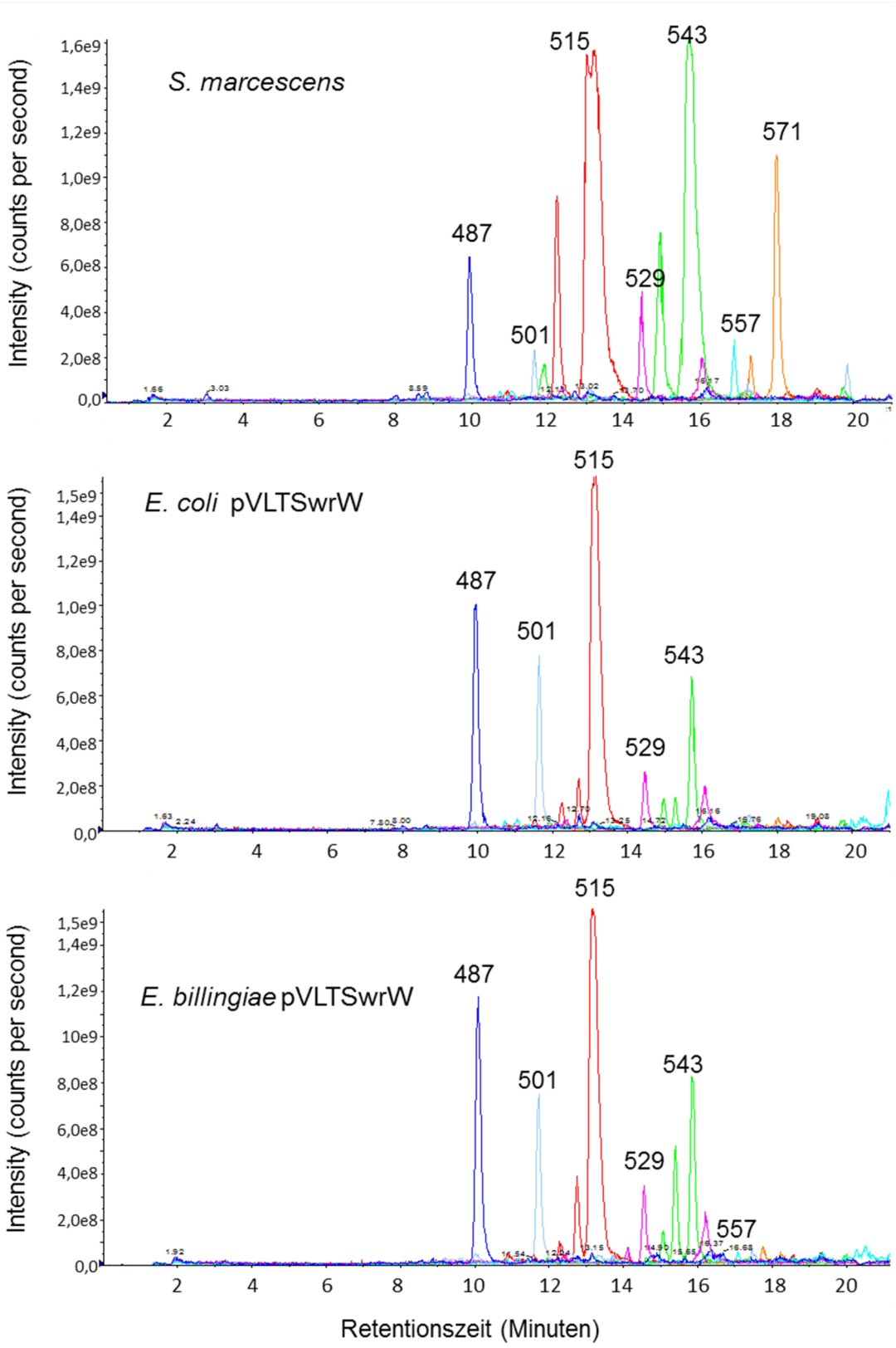


Abb. 3.1. 13 Vergleich der Zusammensetzung von Serrawettin W1 aus unterschiedlichen Produktionsstämmen. *Extracted Ion Counts* (XIC) von den über den Signalen in Da angegebenen Massen aus den HPLC-ESI-MS Daten der Serrawettin-Proben aus den drei Stämmen. Den Massen sind jeweils unterschiedliche Farben zugeordnet. Die schwächeren Signale jeweils etwa 1 Minute vor dem jeweiligen Hauptsignal konnten aufgrund gleicher Fragmentierungsmuster als Isomersignale identifiziert werden.

Bildung unterschiedlicher Kongenerspektren die Spezifität der Syntheseenzyme für bestimmte Hydroxyfettsäuren ermittelt. Die Kongenerenzusammensetzung wurde als ausschließlich abhängig von den beteiligten Enzymen, aber nicht vom Expressionsorganismus beschrieben (Wittgens, 2013). Dies kann hier als Ursache für die unterschiedlichen Spezies-Muster ausgeschlossen werden, da in allen Stämmen dasselbe Enzym, nämlich SwrW aus *S. marcescens* DSM12481, für die Produktion von Serrawettin W1 verantwortlich war. Denkbar wären Unterschiede in der Bereitstellung der verschiedenen aktivierten Fettsäuren. Zumindest für die unterschiedlichen Anteile an C_9+C_{10}-Serrawettin scheint diese Erklärung plausibel, da die Produktion von Fettsäuren mit ungeraden Kettenlängen wohl von der Affinität der am Start der Fettsäuresynthese stehenden Ketoacyl-ACP- Synthasen zu Propionyl-CoA gegenüber Acetyl-CoA, dem Startsubstrat für die Synthese geradzahliger Fettsäuren, abhängt (Heath & Rock, 1996), die sich in den verschiedenen Wirten unterscheiden könnte.

Die längerkettigen C_{12}- und C_{14}-Hydroxyfettsäuren sollten jedoch auch in *E. coli* vorkommen, da in den Zellmembranen, in denen sowohl in *E. coli* als auch in *S. marcescens* (und mutmaßlich auch in *E. billingiae*, auch wenn hier keine Daten vorliegen) C_{16}-Phospholipide die vorherrschende Lipidspezies sind (Cho & Salton, 1966). Somit ist die Synthese weitaus längerer Fettsäuren als C_{14} erforderlich, die kontinuierliche Verlängerung der Fettsäuren während des Synthesezyklus wird auch erst bei Palmitat, also eben jener C_{16}-Kette, durch eine spezifische Thioesterase (Palmityl-ACP-Thioesterase) gestoppt (Volpe & Vagelos, 1973).

Möglicherweise liegen die Unterschiede auch nicht in der Synthese der β-Hydroxyfettsäuren, sondern in mit der Serrawettin-Synthese konkurrierenden Stoffwechselwegen begründet. So könnten in *E. coli* oder *E. billingiae* die längerkettigen Fettsäuren in andere Prozesse abfließen, die in *S. marcescens* nicht so stark ausgeprägt sind, wodurch sich die Pools der für die Serrawettin-Synthese verfügbaren Fettsäuren zwischen den Spezies unterscheiden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre eine schlechtere Sekretion der größeren Spezies durch die heterologen Wirte, so dass diese zwar synthetisiert werden, aber in den Überstandsextrakten nicht zu detektieren sind. Da es aber bisher keine Untersuchungen bezüglich der Sekretionsmechanismen für diese Lipopeptide gibt, bleibt dieser Punkt Spekulation.

Die Ähnlichkeiten der Kongenerspektren von *E. coli* und *E. billingiae* deutet darauf hin, dass beide Spezies physiologisch ähnlicher zueinander sind als zu *S. marcescens*, trotz der identifizierten NRPS in *E. billingiae*. Diese Annahme wird unterstützt durch 16S-rRNA-Analysen verschiedener Enterobacteria, nach denen *Escherichia* und *Erwinia* zueinander eine geringere phylogenetische Distanz aufweisen als zu *Serratia* (Spröer *et al.*, 1999).

Unabhängig von den molekularen Hintergründen dieser unterschiedlichen Zusammensetzungen stellt dieses Ergebnis einen interessanten Ansatzpunkt für biotechnologische Anwendungen dar. Da die chemo-physikalischen Eigenschaften von *Biosurfactants d*urch die chemische Zusammensetzung des Kongenergemisches beeinflusst werden (Nitschke *et al.*, 2005; Soberón-Chávez & Maier, 2011; Youssef *et al.*, 2005), könnten Biotenside mit maßgeschneiderten Eigenschaften durch Auswahl eines bestimmten Produktionsstammes produziert werden, alternativ zu vorgeschlagenen Methoden wie post-fermentativer chemischer Modifikation (Van Bogaert & Soetaert, 2011; Van Bogaert *et al.*, 2011; Langer *et al.*, 2006) oder weiterer molekularbiologischer Manipulation des Stammes (Roelants *et al.*, 2013).

Durch HPLC-MS/MS konnte bestätigt werden, dass die *swrW*-Expressionsstämme von *E. coli* BL21 und *E. billingiae* Eb661 Serrawettin W1 produzieren. Das Spektrum der Kongenere unterschied sich von dem des in *S. marcescens* produzierten Serrawettin W1. In beiden heterologen Produktionsstämmen schien eine Präferenz zu kürzerkettigen Fettsäuren zu bestehen.

3.2 Identifizierung und Produktion neuer metagenomabgeleiteter Biotenside

Neben der optimierten Produktion bereits bekannter Biotenside stellt das *Screening* von Metagenombanken eine weitere Strategie dar, die Zugang zu neuen Biotensiden durch heterologe Expression von Genen aus Umweltisolaten verspricht (1.3.2). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung neuer Sekundärmetabolite und deren Synthesewege etabliert (Brady *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2011; Wenzel & Müller, 2005; Wilson & Piel, 2013).

Bezüglich der Suche nach *Biosurfactants* im Speziellen sind bisher unseres Wissens noch keine Metagenomstudien veröffentlicht worden, *Screening*s von Umweltisolaten auf Biotensidproduktion beschränkten sich bisher darauf, in den Isolaten neue Stämme zu identifizieren, die natürlicherweise Biotenside sekretieren (Belcher *et al.*, 2012; Bodour *et al.*, 2003; Saravanan & Vijayakumar, 2012). Dabei ist es jedoch wahrscheinlich, dass viele Biotenside mit dieser Strategie nicht entdeckt werden, weil die produzierenden Organismen unter den in den jeweiligen Studien gegebenen Bedingungen nicht kultivierbar sind (Soberón-Chávez & Maier, 2011) oder keine Biotenside produzieren (wie z.B. *E. billingiae* auf LB-medium (3.1.2)). Durch Kombination von geeigneten heterologen Expressionssystemen mit in den letzten Jahren entwickelten *high throughput Screening*methoden (Burch *et al.*, 2010) ergeben sich vielversprechende Möglichkeiten für ein erfolgreiches Metagenomscreening.

Daneben kann durch speziell für die Konstruktion und das funktionelle *Screening* von Metagenombanken entwickelten Vektoren und deren Kombination mit verschiedenen Expressionswirten die Wahrscheinlichkeit, in einer Metagenombank Sekundärmetabolitsynthesewege zu identifizieren, erhöht werden (Kennedy *et al.*, 2011; Simon & Daniel, 2011).

3.2.1 Tools für die Konstruktion und Durchmusterung von Metagenombanken auf Biotensidproduktion

3.2.1.1 Ein neuer Vektor für funktionelle Expression von Genclustern - pCEV2

Die Gene, die für Enzyme der Sekundärmetabolit-Synthese kodieren, sind häufig in Genclustern organisiert, d.h. sie liegen, gegebenenfalls in mehreren Operons, in einem distinkten Bereich des Chromosoms, oft auf beiden Strängen der DNA. Beispiele dafür unter

Biosurfactants sind die Gencluster für die Synthese von Sophorolipiden in *Starmerella bombicola* oder von Lipopeptiden wie Surfactin (1.2.2) und Syringafactin in *Bacillus subtilis* bzw. *Pseudomonas syringiae* (Berti *et al.*, 2007; Van Bogaert *et al.*, 2013; Hockett *et al.*, 2013; Peypoux *et al.*, 1999). Funktionelle Expression geclusterter Gene in *Screening*- und Produktionswirten erfordert Expressionssysteme, die die notwendige komplette Transkription beider Stränge der DNA-Fragmente sicherstellen. Eine bereits im TREX-System etablierte Strategie, die dieses gewährleistet, ist die Nutzung der RNA-Polymerase des T7-Phagen in Kombination mit in beide Leserichtungen klonierten T7-Promotorsequenzen (Markert, 2008). Dabei wird ausgenutzt, dass die T7-RNA-Polymerase bakterielle Transkriptionsterminationsstrukturen nicht erkennt und somit die Transkription an diesen Stellen nicht abgebrochen wird, weshalb dieses Enzym für die vollständige Transkription großer DNA-Fragmente gut geeignet ist (Drepper *et al.*, 2005; Terrón-González *et al.*, 2013). Mit diesem System gelang bereits erfolgreich die funktionelle Expression der Biosynthesecluster für Prodigiosin aus *S. marcescens*, für Carotinoide aus *Pantoea ananatis* und des Hydrogenaseclusters aus *Rhodobacter capsulatus* in verschiedenen Expressionsstämmen (Arvani *et al.*, 2012; Loeschcke, 2012; Loeschcke *et al.*, 2013).

Für die Nutzung in Metagenomprojekten wurde dieses Transkriptionssystem mit einem für die Konstruktion von Genombanken etablierten Plasmid kombiniert. Der dadurch erhaltene Vektor kombiniert damit die Eigenschaften der Genclustertranskription mit der einfacheren Handhabung eines Plasmids.

Als Grundlage des neuen *Cluster*expressions- und *Screening*vektors diente pLAFR3, ein 21 kb großer Vektor mit weitem Wirtsbereich, der für die Konstruktion von Bibliotheken mit genomischer DNA entwickelt wurde (Staskawicz *et al.*, 1987; Vanbleu *et al.*, 2004) und damit ein etabliertes System für die Klonierung großer DNA-Fragmenten und die Konstruktion und das *Screening* von Genom- und Metagenombanken darstellt (Krzeslak *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005b; Wilhelm *et al.*, 1999). Zudem bietet dieser Vektor durch die *cos*-Region die Möglichkeit, Vektor einschließlich Ziel-DNA in λ-Phagen zu verpacken und diese über Transduktion in die Wirtszellen zu bringen, eine Methode, die gerade bei großen Konstrukten effektiver sein kann als Transformation über Hitzeschock oder Elektroporation und deshalb auch für die Generierung von Metagenombanken häufiger angewendet wird (Entcheva *et al.*, 2001; Ish-Horowicz & Burke, 1981; Steele *et al.*, 2009). Dazu ist bekannt, dass zur Expression toxischer Proteine (oder eventuell toxischer Metaboliten wie

Biosurfactants) *low copy* Vektoren wie pLAFR3 häufig besser geeignet sind als *high-copy* Plasmide (Kushner, 1991, siehe auch 3.1.3), da das jeweilige Genprodukt in geringerer Dosis produziert wird.

Das zweite Element zur Konstruktion des neuen Vektors ist das DNA-Fragment T7-MCS-T7, das neben den T7-Promotorsequenzen auf beiden Strängen eine *Multiple Cloning Site* mit Schnittstellen für ausgewählte Restriktionsendonukleasen enthält (Abb. 3.2. 1).

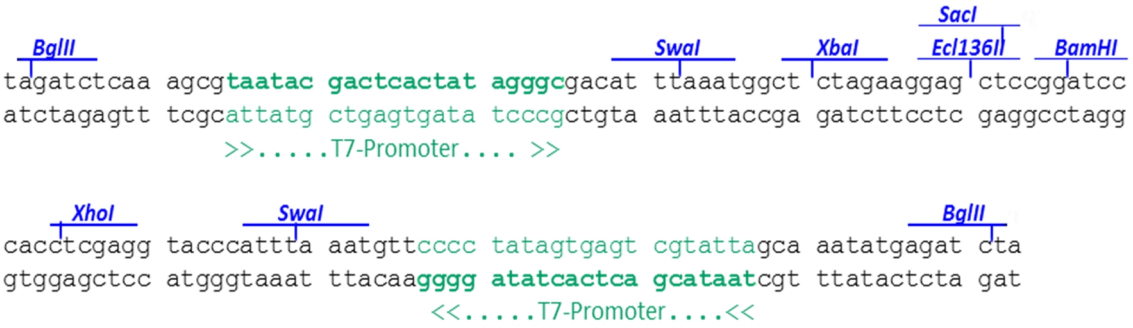


Abb. 3.2. 1 Sequenz des Fragmentes T7-MCS-T7 Das Fragment wurde zur Konstruktion des Screening-Vektors pCEV2 in den Vektor pLAFR3 eingefügt. Es ermöglicht die Klonierung von (Metagenom)DNA-Fragmenten zwischen zwei konvergent orientierten T7-Promotorsequenzen. Grün markiert sind die Erkennungssequenzen für die T7-DNA Polymerase, blau die Erkennungssequenzen der angegebenen Restriktionsendonukleasen.

Die *Bam*HI-Schnittstelle kann für die Klonierung von mit *Sau*A3I oder *Bsp*143I partiell verdauter genomischer oder metagenomischer DNA genutzt werden, *Ecl*136II zur *blunt end* Klonierung. *Xba*I/*Sac*I- bzw. *Xho*I/*Kpn*I-Schnittstellen ermöglichen die Nutzung einer Klonierungsstrategie zur Generierung von Konkatemeren, notwendig für die *in vitro*-Phagenverpackung, die mit dem bereits für pLAFR3 veröffentlichen Protokoll vergleichbar ist (Staskawicz *et al.*, 1987). Mittels der flankierenden *Swa*I (*Smi*I)-Schnittstellen können Inserts bei Bedarf komplett aus dem Vektor isoliert werden, da dieses Enzym aufgrund der acht Basen langen Erkennungssequenz mit geringer Wahrscheinlichkeit in den Insert-Fragmenten schneidet.

Das Fragment T7-MCS-T7 wurde mittels *Bgl*II aus pMA-RQ-T7-MCS isoliert und in den mit *Bam*HI verdauten Zielvektor pLAFR3 ligiert. Dadurch wurde die pLAFR3-eigene *Bam*HI Schnittstelle zerstört. Ergebnis ist der neue Vektor pCEV2 (Abb. 3.2. 2).

Die Funktionalität von pCEV2 für die vollständige Transkription von großen Inserts wurde durch eine Testexpression überprüft. Dazu wurde das ca. 11 kb große eDNA-Fragment aus dem Metagenombankklon TB_{EC} 303 (Tröschel, 2010) in die *Ecl*136II-Schnittstelle des Vek-

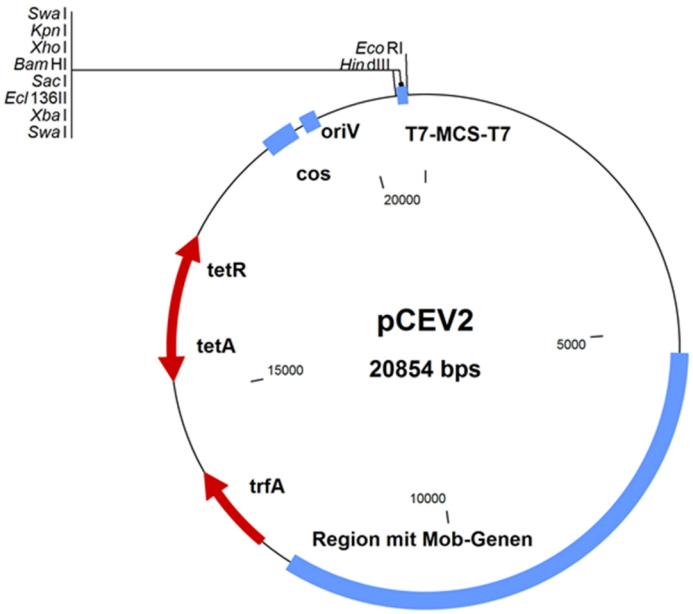


Abb. 3.2. 2 Schematische Darstellung von pCEV2. Mob-Gene: Region, in der sich mehrere für die Mobilisierung des Plasmides wichtige Gene und der *origin of transfer* befinden***; trfA*:** Protein zur oriV Erkennung und Initiation der Replikation; ***tetA**:* Tetracyclin-Resistenzprotein, Efflux-Transporter; t***etR**:* tet-Repressor, reprimiert Transkription von *tetA* und *tetR* in Abwesenheit von Tetracyclin; **cos**: *cos site*, Erkennungssequenz für Phagenverpackung nach Alting-Mees & Short, 1993 inklusive *cosQ*, *cosN*, *cosB;* **oriV**: Bindesstelle für TrfA und *origin of replication* nach Genbank L13843.1.
Eingezeichnet ist aus Gründen der Übersichtlichkeit eine für diese Arbeit relevante Auswahl an auf dem Plasmid identifizierten Genen. Eine detaillierte Auflistung ist Vanbleu et al., 2004 und der Sequenz von pLAFR1 (Genbank AY532632.1) zu entnehmen.

tors kloniert. Das Insert beinhaltet zwölf putative *open reading frames* und mehrere durch das *Transcription Termination Prediction Tool* von PePPER vorhergesagte ρ-Faktor unabhängige Transkriptionsterminatoren (Abb. 3.2. 3).

Mit diesem Konstrukt wurden kompetente Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Zur Überprüfung der vollständigen Transkription des inserierten Fragmentes durch die T7-Polymerase wurde einer der durch lipolytische Aktivität auf Tributyrinagar identifizierten positiven Klone in sechs Kulturen in LB-Medium angezogen, drei unter Expression der T7-Polymerase induzierenden Bedingungen (Zugabe von IPTG bei OD_{580nm} von 0,5) die anderen drei ohne IPTG-Zugabe. 3 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert, diese per Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in eine *real time* qPCR (2.6.6) eingesetzt. Zum Nachweis der T7-Polymerase abhängigen vollständigen Transkription des Metagenomfragmentes wurden die Primer so gewählt, dass zwei Fragmente amplifiziert wurden, die nicht innerhalb eines der vorhergesagten *open reading frames* (*orf*) lokalisiert waren, um Effekte von „natürlicher“ Transkription zu minimieren, da die Promotor der einzelnen auf dem Fragment liegenden Gene wahrscheinlich von *E. coli*-

RNA-Polymerasen erkannt werden können, was für das Esterase-Gen bereits gezeigt wurde (Tröschel, 2010). Eines der Amplikons liegt an einem Ende des Fragmentes (an der 5'-Seite des *sense*-Stranges), das zweite etwa in der Mitte (Abb. 3.2. 3).

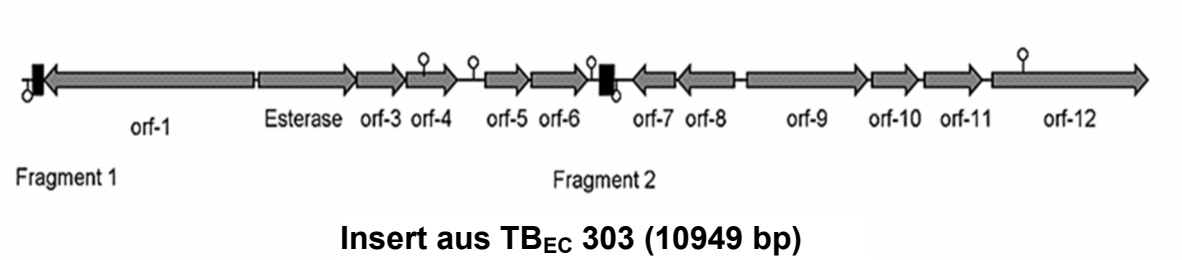


Abb. 3.2. 3 Schematische Darstellung des Metagenomfragmentes aus TB303. Vorhergesagte *open reading frames* sind als graue Pfeile dargestellt (Annotation durch S. Tröschel (nicht publiziert)), die für den Nachweis der vollständigen Transkription der metagenomischen DNA ausgewählten Regionen Fragment 1 und Fragment 2 als schwarze Balken. Vorhergesagte bakterielle ρ -Faktor unabhängige Transkriptionsterminatoren sind durch Schleifen (⚲) gekennzeichnet, nach oben gerichtete Schleifen zeigen Terminatoren auf dem *sense*-Strang, nach unten gerichtete auf dem *antisense*-Strang an.

Um Transkription beider Stränge nachzuweisen, wurde in der Reversen Transkriptionsreaktion jeweils immer nur ein Primer eingesetzt, d.h. es wurde in jeder Reaktion nur ein Strang in cDNA umgeschrieben, die cDNA –Synthese zu *sense*- und *antisense*-Transkript fand somit in getrennten Reaktionen statt. Die Nomenklatur „*sense*" und „*antisense*" dient in diesem Zusammenhang nur der deutlichen Unterscheidung beider Stränge, da in den betrachteten Bereichen ja keine putativen Gene identifiziert wurden, deren Transkript als *sense*-Strang im eigentlichen Sinne bezeichnet würde. Als Primer zum Nachweis des *sense*-Transkripts dienten die Primer RT TB start A1 bzw. RT TB mid S2, für den Nachweis des *antisense*-Transkripts dementsprechend RT TB start A2 bzw. RT TB mid S1 (Tabelle 2. 3).

Durch Vergleich der durch die Methode generierten sogenannten ct-Werte, welche die Transkriptmengen indizieren, von Kulturen, in denen die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert wurde, mit den Werten der uninduzierten Kontrollgruppe, zeigte sich eine induktionsabhängige Transkription von sowohl *sense*- als auch *antisense*-Strang beider Fragmenten (Abb. 3.2. 4). Die Transkriptmenge des jeweils weiter vom Promotor entfernten Fragmentes (Fragment 2 in *sense*-Richtung bzw. Fragment 1 in *antisense*-Richtung) war dabei wohl geringer als die des jeweils anderen Fragmentes, ein sowohl für bakterielle als auch für Phagen-RNA-Polymerasen bereits beschriebenes Phänomen (Loeschcke, 2012; Nishizaki *et al.*, 2007). Der Grund hierfür ist in der statistischen Wahr-

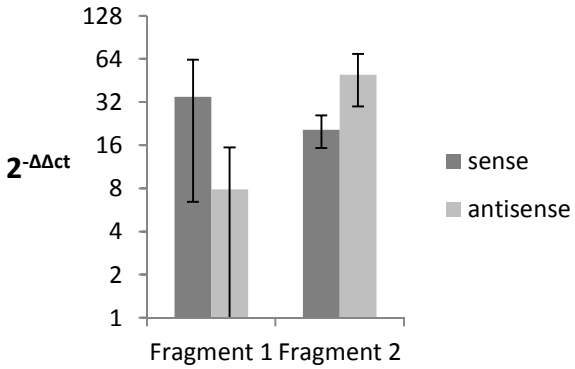


Abb. 3.2. 4 Nachweis der Funktionalität von pCEV2 durch qPCR von *sense*- und *antisense*-Transkript von TB303 in *E coli* BL21(DE3) mit pCEV2 TB303. Dargestellt ist das Verhältnis der Transkript-Mengen von induzierter zu nichtinduzierter Kultur ($2^{-\Delta\Delta ct}$) von *sense* (dunkel) und *antisense* Strang (hell) in beiden Fragmenten. Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten von biologischen Triplikaten mit jeweiligen Standardabweichungen. In allen Proben war $2^{-\Delta\Delta ct}$ größer als 1, die teilweise hohen Standardabweichungen sind durch hohe Abweichungen nach oben begründet. Die Ordinate ist logarithmisch zur Basis 2 skaliert.

scheinlichkeit für die Dissoziation der Polymerase vom DNA-Strang auch ohne Termination zu suchen, die mit steigender Transkriptlänge größer wird, was bedeutet, dass nicht nach jeder Bindung der Polymerase an die Promotorregion ein vollständiges Transkript gebildet wird. Im Falle von Expressionssystemen, die auf gleichzeitiger Transkription beider DNA-Stränge durch die T7-RNA-Polymerase basieren, wie pCEV2 oder TREX, kommt noch hinzu, dass Polymerasen, die von beiden Seiten des DNA-Moleküls transkribieren, miteinander kollidieren. Eine solche Kollision von Phagen-Polymerasen führt nicht notwendigerweise zum Abbruch der Transkription (Ma & McAllister, 2009), aber es wird vermutet, dass in diesem Fall die Bindung der einzelnen Polymerasen an die DNA geschwächt wird und es somit leichter zur Dissoziation kommen kann (Loeschcke, 2012). Außerdem könnte spezifischer Abbau bestimmter Transkripte, initiiert durch Sekundärstrukturelemente der mRNA, zu den unterschiedlichen Transkriptmengen beitragen (Mackie, 2013).

Im Falle von Fragment 1 *antisense*-Transkript könnten zudem noch „natürliche“ Transkripte eine Rolle spielen, da der nächste ρ-unabhängige Transkriptionsterminator erst hinter dem hier nachgewiesenen Fragment liegt. So wäre denkbar, dass das Transkript von *orf-1* auch Fragment 1 *antisense* einschließt. Falls der Promotor dieses *orf* in *E. coli* erkannt wird (was nicht unwahrscheinlich ist, da die Transkription des Esterasegens nachweislich unter Kontrolle das nativen Promotors möglich ist), kann die Präsenz des *orf-1* Transkriptes sowohl in der IPTG-supplementierten als auch in der Kontrollkultur das berechnete Verhältnis der Transkriptmengen beeinflussen, sodass dieses Fragment ge-

genüber den anderen drei untersuchten Transkripten etwas unterrepräsentiert erscheinen könnte.

3.2.1.2 Vektor für simultanes Screening in verschieden Wirtsorganismen- pEBP18

Ein weiterer speziell auf die Anwendung in Konstruktion und *Screening* von Metagenombanken ausgerichteter Vektor ist der im Rahmen der Dissertation von Dr. Sonja Tröschel entwickelte Shuttlevektor pEBP18 (Troeschel *et al.*, 2012; Tröschel, 2010). Dieser Vektor erlaubt simultanes *Screening* einer Metagenombank in verschiedenen Wirtsorganismen, eine vielversprechende Strategie zur Optimierung eines funktionalen *Screening*s, das die Produktion von Proteinen in aktiver Form voraussetzt (Gabor *et al.*, 2007). Auch in Bezug auf Sekundärmetabolitproduktion kann ein *Screening* in verschiedenen Organismen nützlich sein (Martinez *et al.*, 2004), da sich diese in der Bereitstellung von Vorläufermetaboliten, Cofaktoren und –enzymen oder in Widerstandsfähigkeit gegenüber den Metaboliten unterscheiden können. Ein Beispiel dafür sind die in 3.1 bereits angeführten Spezifitäten von Phosphopantetheinyltransferasen zur posttranslationalen Aktivierung von Acyl- bzw. Petidylcarrierdomänen von NRPS und Polyketidsynthasen (Pfeifer & Khosla, 2001; Pfeifer *et al.*, 2001).

Durch Expression des Modellproteins *B. subtilis* LipA in *E. coli* BL21(DE3), *Pseudomonas putida* KT2240T7 und *Bacillus subtilis* TEB1030 wurde gezeigt, dass pEBP18 in verschiedenen Wirten zur Expression von Zielproteinen genutzt werden kann (Abb. 3.2. 5). Durch Lipaseaktivitäts*assay*s wurde in allen Modelstämmen die pEBP18-abhängige Produktion von aktiver Lipase nachgewiesen, in den Gram-negativen Stämmen hauptsächlich im Ganzzellextrakt, bei *B. subtilis* fand sich diese aufgrund der spezifischen Signalsequenz der

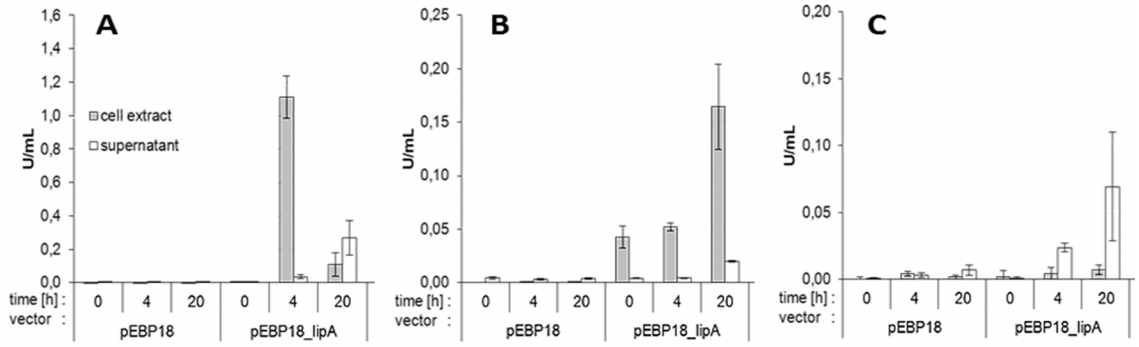


Abb. 3.2. 5 Nachweis der Funktionalität von pEBP18 (nach Troeschel et al., 2012) durch Expression von *B. subtilis* Lipase LipA in **(A)** *E. coli*, **(B)** *P. putida*, **(C)** *B. subtilis*, nachgewiesen durch Lipaseaktivitäts*assay*s in Ganzzellextrakten (graue Balken) bzw. Kulturüberständen (weiße Balken) 0h, 4h und 20h nach Induktion der Lipaseexpression durch Zugabe von IPTG (*E. coli*,. *P. putida*) bzw. Xylose (*B. subtilis*).

Lipase für *Bacillus*-eigene Sekretionssysteme vermehrt im Kulturüberstand (Troeschel *et al.*, 2012).

Neben Regionen, die essentiell sind für die Replikation in den Gram-negativen Wirtsbakterien bzw. zur Integration in das Genom von *B. subtilis*, und den Promotorregionen zur induzierbaren Genexpression in den verschiedenen Expressionswirten verfügt pEBP18 über *gfpmut3** als Reporter für erfolgreiche Transkription, die *cos*-Region des λ-Phagen, um *in vitro*-Phagenverpackung und Transduktion zu ermöglichen, sowie eine *Multiple Cloning Site* einschließlich einer Schnittstelle für *BamHI*, wichtig für die Klonierung von mit *Sau*3AI bzw. *Bsp*143I partiell verdauter metagenomischer DNA (Abb. 3.2. 6).

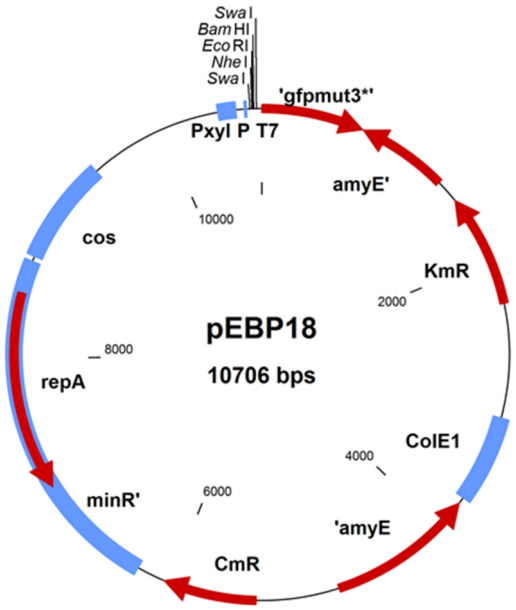


Abb. 3.2. 6 Schematische Darstellung von pEBP18 *gfpmut3:** Variante des *green fluorescent protein*; ***amyE'*** und ***'amyE***: homologe Regionen zu *B. subtilis amyE* zur Integration in das Wirtsgenom; **KmR**: Kanamycinresistenz; **ColE1**: *colicinogenic factor* E1, *origin of replication*; **CmR**: Chloramphenicolresistenz; **minR'**: *truncated minimal region* inklusive *repA* gene für Replikation in *Pseudomonas*; **cos**: *cos site*, Erkennungssequenz für Phagenverpackung inklusive *cosQ*, *cosN*, *cosB;* **Pxyl**: Xylose-Promotor; **P T7**: T7-Promotor

Für die Konstruktion von Metagenombanken und funktionelles Screening auf Biotensidproduktion wurde der neue Vektor pCEV2 auf Basis des pLAFR3 konstruiert, der die komplette Transkription von Genclustern durch T7-Promotorsequenzen auf beiden Strängen des Vektors ermöglicht. pEBP18 wurde für gleichzeitiges funktionelles Screening von Metagenombanken in mehreren Wirtsorganismen entwickelt.

3.2.2 Identifizierung von Biotensid produzierenden Klonen in einer Metagenombank

Die hier untersuchte Metagenombank wurde mit pEBP18 in *E. coli* DH10b im Rahmen vorhergehender Arbeiten konstruiert. Ziel dieser Studien war die Identifizierung neuer Hydrolasen. Die Bank enthält eDNA, die aus Biofilmproben aus dem Blutabfluss eines Schlachthofs (Frenken Vieh- und Fleisch GmbH, Jülich) isoliert wurde. Diese eDNA wurde partiell mit *Sau*3AI verdaut, die Fragmente im gewünschten Größenbereich durch Agarosegelelution isoliert und mit *BamH*I verdautem pEBP18 ligiert. Die vorherrschende Größe der klonierten eDNA-Fragmente lag zwischen 3-6 kb (Tröschel, 2010).

Das Habitat „Schlachthofabfluss“ wurde aufgrund seines Reichtums an Proteinen, Blut, Fetten usw. als sehr aussichtsreich für die Identifizierung neuer Proteasen/Lipasen/Esterasen betrachtet. Als fettreiche Umgebung bietet es aber ebenfalls gute Bedingungen für die Produktion von *Biosurfactants* (Borges *et al.*, 2012) und ist somit vielversprechend für das Vorkommen Biotensid-produzierender Organismen. Damit erschien eine Durchmusterung der Metagenombank hinsichtlich *Biosurfactant*-produzierender Klone, die für den Biosyntheseweg dieser Substanzen kodierende Gene exprimieren, als erfolgsversprechend. Die geringe durchschnittliche Größe der metagenomischen Fragmente in dieser Bank ließ zwar nicht erwarten, dass Klone identifiziert werden, die in der Lage sind, komplexe Lipopeptide wie Surfactin zu synthetisieren, da die Biosynthese-Gencluster ein vielfaches der durchschnittlichen Fragmentgröße betragen (siehe 1.3.2), aber für die Synthesegene von Glycolipiden oder einfachen Lipopeptiden wie Serrawettin W1 ist die Fragmentgröße durchaus ausreichend.

Hinweise auf mögliche Biotensid-Produzenten gaben die innerhalb eines *Screening*s von ca. 170.000 Klonen auf Blutagarplatten als haemolytisch aktiv identifizierten *E. coli* DH10b-Klone BA343 und BA354 (BA= BlutAgar, siehe Troeschel, 2010), da Haemolyse eine häufig vorkommende Eigenschaft von *Biosurfactants* ist (Mulligan *et al.*, 1984; Saravanan & Vijayakumar, 2012). In dieser Arbeit konnten beide *E. coli* DH10b-Klone durch eindeutige Hofbildung im *atomized oil assay* (2.8.1), die in der Leevektorkontrolle nicht zu beobachten war, als Produzenten von oberflächenaktiven Substanzen identifiziert werden (Abb. 3.2. 7). Da DH10b kein Gen für die T7-Polymerase besitzt, erfolgte die Produktion der Tenside unter Kontrolle der nativen Promotoren.

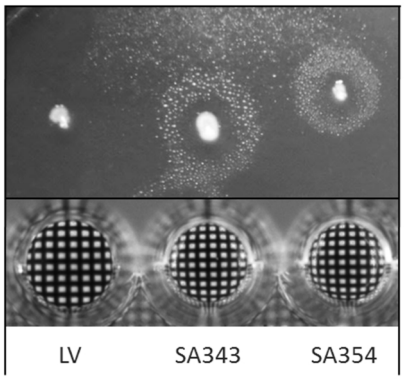
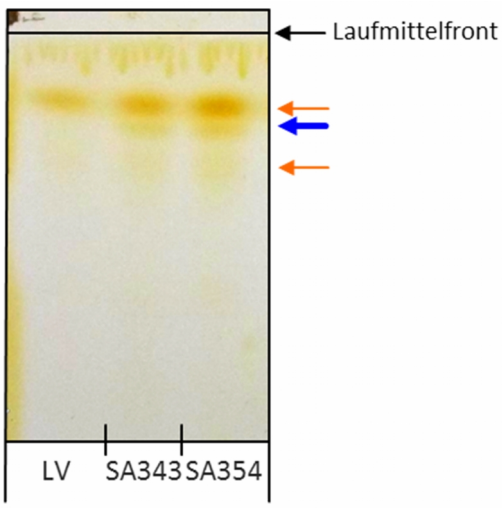


Abb. 3.2. 7 Identifizierung von *Biosurfactant* produzierenden *E. coli* DH10b-Klonen. Zellkolonien auf LB-Agar im *atomized oil assay* nach 18h Inkubation bei 37°C (oben) und Kulturüberstände von Übernachtkulturen (37°C) in LB-Medium (unten). Die Abbildungen stehen exemplarisch für je drei Kulturen jedes Stammes mit den gleichen Phänotypen.

Auch in Flüssigmedium produzierten diese beiden Klone, hier und nachfolgend mit SA343 und SA354 (SA für *„Surface Active“*) präziser benannt, mit einfachen Methoden (*drop collapsing, grid assay*) nachweisbare Mengen an Substanzen, welche die Oberflächenspannung des Mediums verringern und somit oberflächenaktiv waren (Abb. 3.2. 7 unten). Extraktion der Kulturüberstände mit Ethylacetat und anschließende Analyse der Extrakte durch Dünnschichtchromatographie (2.8.5) resultierten in iodgefärbten Signalen mit hohen R_f-Werten, was angesichts des verwendeten Laufmittels auf relativ hydrophobe Substanzen schließen ließ (Abb. 3.2. 8). Färbung der DC-Platte mit Orcinol/H_2SO_4 (reagiert mit Zuckern) statt mit Iod erzeugte keine Signale, was darauf hindeutete, dass es sich bei den hier isolierten Stoffen nicht um Glycolipide handelte.

Außerdem waren die Signale aus den Überständen beider Klone auf identischen Laufhöhen zu finden, ein Hinweis darauf, dass in beiden Kulturen gleichartige Substanzen produziert wurden.

Abb. 3.2. 8 Analyse von Kulturüberstandsextrakten der Biotensid produzierenden DH10b-Klone.
Die Analyse erfolgte per DC. Das Signal des *Biosurfactants*, welches nicht im Extrakt der Leervektorkontrolle (LV) zu finden war, ist mit dem blauen Pfeil markiert. Weitere Signale von kontaminierenden Substanzen, die in allen Kulturen auftraten, sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.
Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, in allen Fällen ergaben sich die gleichen Signalmuster; diese DC ist exemplarisch für die drei Versuchsreihen. Visualisiert wurden die Signale durch Iodbedampfung.



In einer *E. coli* Metagenombank in pEBP18 mit DNA aus einem Schlachthofabfluss-biofilm wurden erstmalig zwei Biotensid produzierende Klone identifiziert. Die aus beiden Klonen isolierten Substanzen zeigten in der DC das gleiche Laufverhalten.

3.2.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls zur Isolierung der *Biosurfactants*

Für die Strukturaufklärung der in 3.2.2 identifizierten Substanz durch NMR-Spektroskopie waren mehrere Milligramm des zu untersuchenden Metaboliten in hoher Reinheit erforderlich. Deshalb musste in Vorbereitung darauf eine Produktions- und Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, die diesen Anforderungen angepasst war.

Zunächst wurden die Überstände von Expressionskulturen (DH10b mit pEBP18-SA343 bzw. -SA354) in 500 mL LB (2.5.2.3) mittels Vakuumpumpe sterilfiltriert. Da eine Extraktion von so großen Volumina mit organischen Lösungsmitteln relativ unhandlich ist, wurde versucht, die für die Isolierung von Rhamnolipiden etablierte Methode der Fällung durch Ansäuern des Überstandes (Banat *et al.*, 2010) mit anschließender Extraktion des Präzipitats hier anzuwenden. Mittels DC-Analyse konnte ermittelt werden, dass diese Methode gut geeignet ist, nicht nur um das *Surfactant* aus dem Medium zu gewinnen, sondern auch die Konzentration von kontaminierenden Artefakten aus der *E. coli*-Kultivierung zu verringern (Abb. 3.2. 9A). Durch eine Wiederholung der Fällung konnten die *Surfactants* in

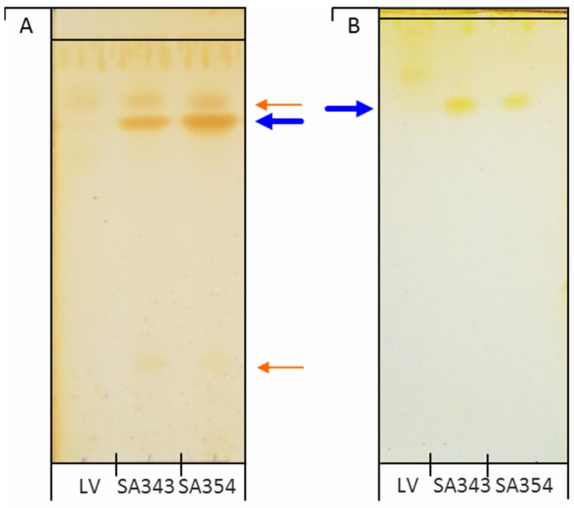


Abb. 3.2. 9 Validierung einer Fällung als Methode zur *Biosurfactant*-Isolation. A Überstände von *E. coli* DH10b-Kulturen mit jeweiligem Plasmid 1x gefällt + extrahiert; **B** Überstände 2x gefällt + extrahiert; Das Zielprodukt ist mit dem blauen Pfeil markiert, kontaminierende Substanzen sind durch rote Pfeile gekennzeichnet, die Laufmittelfront durch eine schwarze Linie. Die Analyse wurde per DC durchgeführt, die Signale wurden durch Bedampfung mit Iod visualisiert.

für NMR-Analysen ausreichend reiner Form gewonnen werden (Abb. 3.2. 9B). Die Ausbeute betrug ca. 60 mg/L Kultur.

3.2.4 Identifizierung des metagenomabgeleiteten Biotensids als N-Acyltyrosin

Mit Hilfe von NMR-Spektroskopie (2.8.6) konnte das gereinigte Biotensid beider Klone in Kooperation mit dem Institut für bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, FZ Jülich) als Tyrosin-Fettsäureverbindung identifiziert werden. Der Hauptbestandteil ist Myristoyltyrosin, d.h. Tyrosin verestert mit einem N-Tetradecansäurerest (Abb. 3.1. 10). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Massenspektrometrie. In Spuren wurden auch andere, teilweise ungesättigte, Fettsäuren detektiert, was nicht ungewöhnlich ist, da die an der Erkennung der Fettsäuren beteiligten Enzyme zwar Präferenzen für bestimmte Fettsäuren aufweisen, aber nicht zu hundert Prozent spezifisch für diese Kettenlängen sind. So findet man auch bei anderen acylierten Metaboliten allgemein

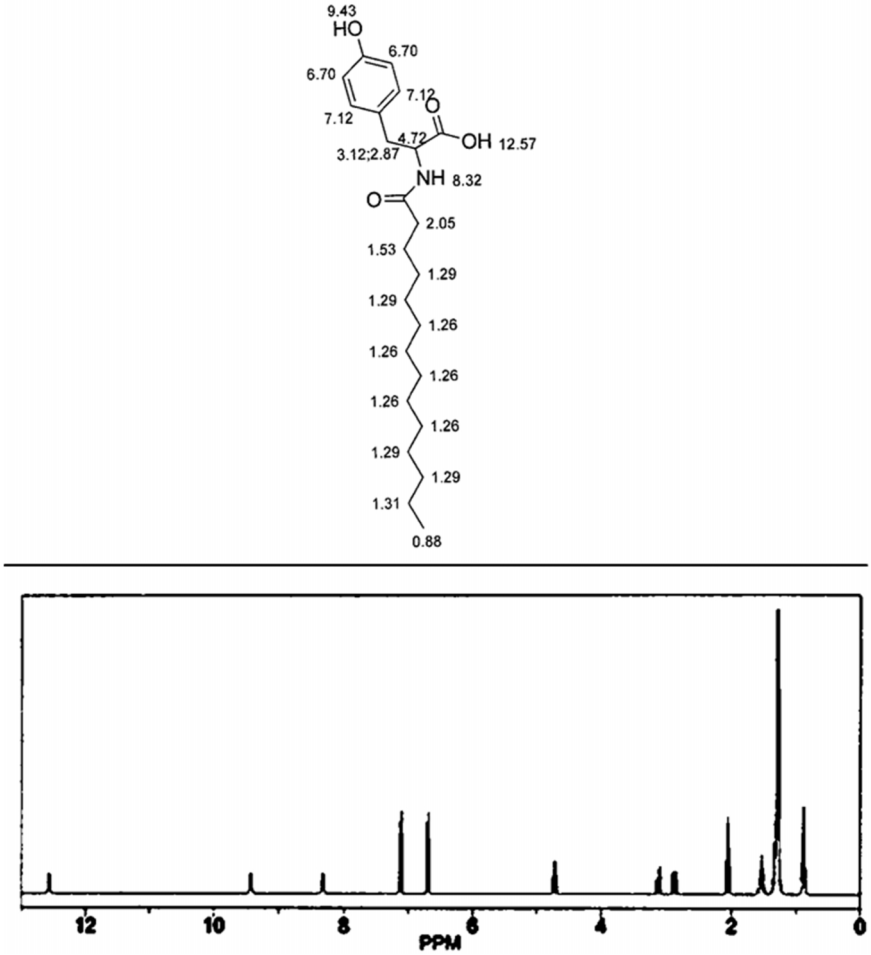


Abb. 3.2. 10 Struktur des von Metagenomklonen produzierten Biotensids Aus den NMR-Daten ermittelte Strukturformel des isolierten *Biosurfactants* (oben), darunter das 1D-^{1}H NMR-Spektrum des SA354 – Isolates. Die Zahlen an den Kohlenstoffatomen bezeichnen die Verschiebung der zugehörigen Protonen im Spektrum in ppm.

(Pearson *et al.*, 1994; Winson *et al.*, 1995) und bei anderen Biotensiden im Speziellen verschiedene Fettsäuren (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Bodour *et al.*, 2004; Déziel *et al.*, 1999; Dwivedi *et al.*, 2008; Youssef *et al.*, 2005), siehe auch Kapitel 3.1.6.

N-Acyl-Aminosäuren im Allgemeinen und N-Acyltyrosine im Speziellen wurden bereits in früheren Studien durch *Screening* von Metagenombanken auf antibiotisch wirksame Substanzen entdeckt (Brady & Clardy, 2000), in dieser Arbeit erfolgte die Detektion aber erstmalig durch ein funktionelles *Screening* auf Biotensid-Eigenschaften.

Nach Etablierung eines Reinigungsprotokolls konnte die Struktur des von den beiden *E. coli*- Klonen mit Schlachthof-eDNA, SA343 und SA354, produzierten Biotensids aufgeklärt werden. Es handelt sich hier um N-Acyltyrosin, überwiegend N-Myristoyltyrosin.

3.2.5 Aufklärung der Biosynthese des N-Acyltyrosins

Zur Aufklärung der N-Acyltyrosin-Biosynthese wurden die metagenomischen Fragmente in beiden Plasmiden sequenziert (Goettingen Genomics Laboratory) und in Kooperation mit Dr. Sonja Tröschel annotiert.

Das metagenomische Fragment in pEBP18-SA343 hatte eine Länge von 3,3 kb, zwei *open reading frames* (*orf*) konnten identifiziert und durch BLAST-gestützte Suche gegen die NCBI-Datenbank annotiert werden (Tabelle 3.2. 1). Beide Treffer deuteten nicht direkt auf ein Enzym zur Biosynthese von N-Acylaminosäuren hin.

pEBP18-SA354 enthielt ein längeres Fragment metagenomischer DNA (8,8 kb), ein Überblick über die identifizierten homologen Gene ließ vermuten, dass dieses Fragment aus einem Bakterium aus der *Sinorhizobium*-Verwandschaft (Gram-negativ, α-Proteobacteria) stammt. Auffällig war dabei, dass auf dem SA354-Fragment zwei *orf* mit Sequenzähnlichkeiten zu den gleichen Genen vorhergesagt werden, die auch auf dem SA343-Fragment identifiziert wurden. Dabei handelte es sich um Proteine der sogenannten der Lysophospholipidacyltransferase (LPLAT)-Familie und putative Peptidasen.

Tabelle 3.2. 1 Identifizierte *orf* und blastn gestützte Vorhersagen zu den Metagenomfragmenten in pEBP18-SA343 und pEBP18-SA354.

SA 343 orf Start	Ende	Beste Treffer nach BLAST gegen GenBank	Hit Protein GenBank ID	Bewertung: *Score/ query covering/Identitiers*
244	1428	LPLAT Familie, viele hyp. Proteine u.a. Daro_0269 [*Dechloromonas aromatica* RCB]	AAZ45028.1	382/58%/70%
2433	1588	Peptidase S1 and S6 Chymotrypsin/Hap [*Alicycliphilus denitrificans* BC]	ADU98537.1	268/ 52%/73%
SA 354 orf **Start**	**Ende**	**Beste Treffer nach BLAST gegen GenBank**	**Hit Protein GenBank ID**	**Bewertung *Score/ query covering/Identitiers***
1622	36	putativer Monosaccharide ABC-Transporter [*Sinorhizobium meliloti Rm41*]	CCM69927.1	1836/100%/83%
2905	1775	ABC-Typ Transportsystem Substratbindung [*Sinorhizobium meliloti SM11*]	CP001831	1450/99%/88%
4868	3243	Glucose-Methanol-Cholin Oxidoreductase [*Sinorhizobium meliloti* SM11]	AEH82634.1	2252/100%/88%
5537	4872	Uracil-DNA Glycosylase Superfamilie [*Sinorhizobium meliloti BL225C*]	AEG07585.1	629/90%/83%
6232	7416	LPLAT Familie, viele hyp. Proteine u.a. Daro_0269 [*Dechloromonas aromatica* RCB]	AAZ45028.1	271/59%/68%
8462	7557	Peptidase S1 and S6 Chymotrypsin/Hap [*Alicycliphilus denitrificans* BC]	ADU98537.1	300/71%/74%

Tatsächlich waren beide Fragmente zwar nicht identisch, wiesen aber große Ähnlichkeiten auf. Die zueinander homologen Bereiche auf beiden Fragmenten (Position 1-2827 auf SA343 und 6000-8800 auf SA354 (Abb. 3.2. 11) waren im Alignment zu 79% identisch, die jeweiligen Gene einzeln betrachtet zu 79% (im Alignment der Peptidase-Gene) bzw. zu 87% im Falle des „LPLAT"-Leserahmens.

Da beide Metagenomklone das gleiche Biotensid produzierten, lag der Schluss nahe, dass sich die für dessen Synthese notwendigen Enzyme auf dem überlappenden Fragment befinden mussten. Damit kamen die als Peptidase bzw. als Mitglied der LPLAT - Familie vorhergesagten *open reading frames* in Frage. Auch wenn mittels Skim Milk-Platten (2.5.1) keine proteolytische Aktivität dieser Klone nachweisbar war und damit die Bestätigung der vorhergesagten Enzymfamilie ausblieb, erschien es als relativ unwahrscheinlich, dass ein Peptidase-ähnliches Enzym direkt an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten betei-

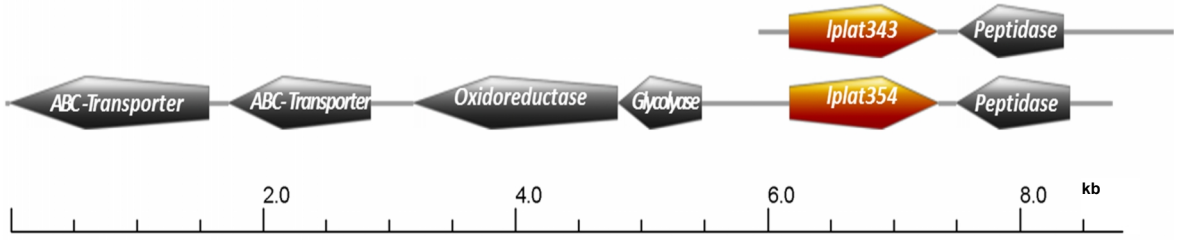
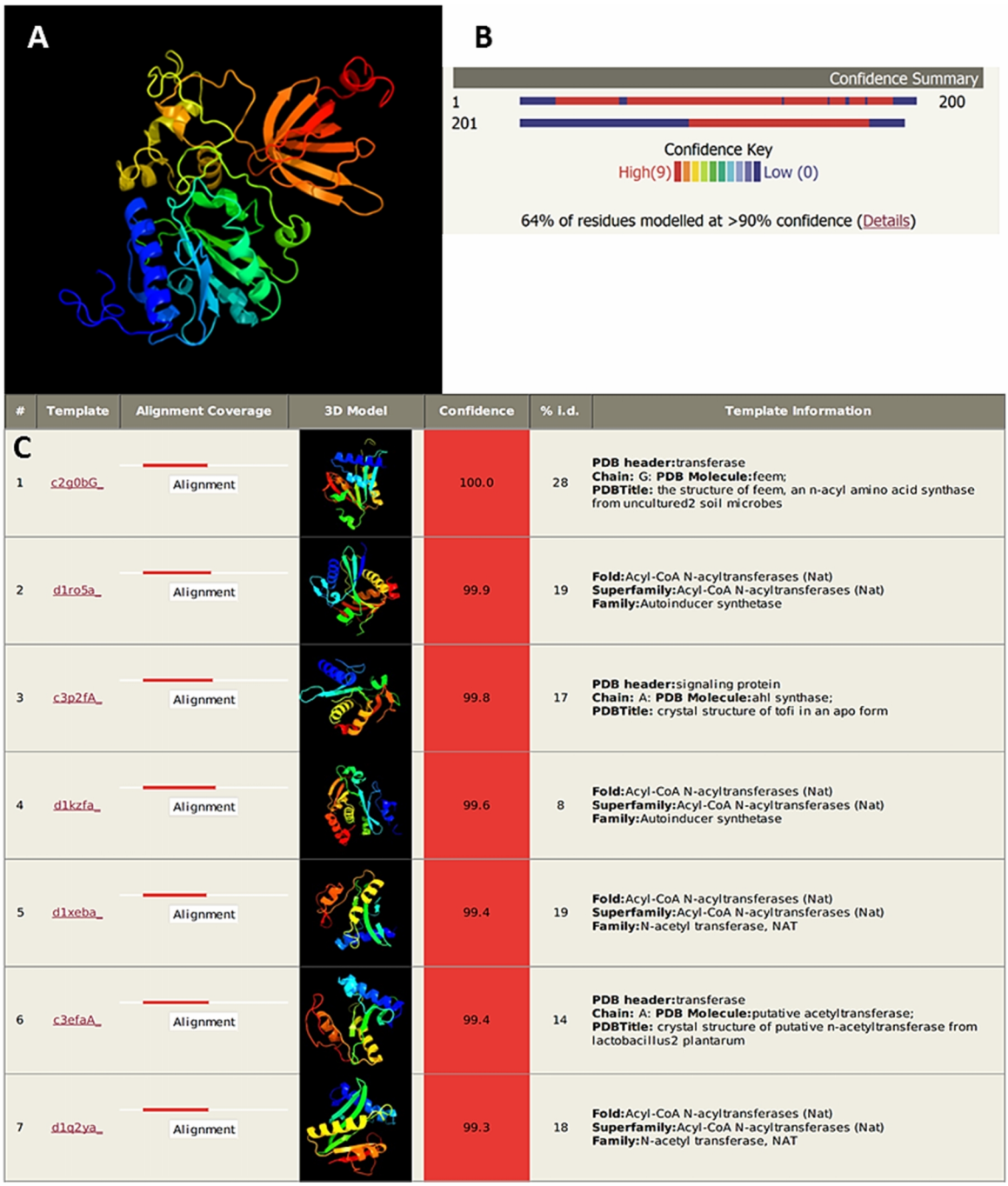


Abb. 3.2. 11 Schematischer Vergleich der Metagenomfragmente SA343 und SA354. Oben SA343 (3,3 kb groß), unten SA354 (8,8 kb groß), die homologen Bereiche sind übereinander gelegt. die *lplat*-Gene sind farblich hervorgehoben. Die auf dem Maßstab angegebenen Werte entsprechen 1000 Basenpaaren. Die Abbildung wurde erstellt mit MyDomains (Hulo *et al.*, 2008).

ligt ist. Deshalb stellten die LPLAT-*orf* das vielversprechendere Ziel für weitere Untersuchungen dar.

Die LPLAT-Gene kodieren für nahezu identische Proteine (95% Identität). Eine Homologiesuche sowohl auf DNA- als auch auf Proteinprimärstruktur-Ebene via BLAST gegen die NCBI-Datenbank brachte keine bekannten Gene/Proteine mit größeren Ähnlichkeiten zu



#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c2g0bG_	Alignment		100.0	28	**PDB header:**transferase **Chain:** G: **PDB Molecule:**feem; **PDBTitle:** the structure of feem, an n-acyl amino acid synthase from uncultured2 soil microbes
2	d1ro5a_	Alignment		99.9	19	**Fold:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Superfamily:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Family:**Autoinducer synthetase
3	c3p2fA_	Alignment		99.8	17	**PDB header:**signaling protein **Chain:** A: **PDB Molecule:**ahl synthase; **PDBTitle:** crystal structure of tofi in an apo form
4	d1kzfa_	Alignment		99.6	8	**Fold:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Superfamily:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Family:**Autoinducer synthetase
5	d1xeba_	Alignment		99.4	19	**Fold:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Superfamily:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Family:**N-acetyl transferase, NAT
6	c3efaA_	Alignment		99.4	14	**PDB header:**transferase **Chain:** A: **PDB Molecule:**putative acetyltransferase; **PDBTitle:** crystal structure of putative n-acetyltransferase from lactobacillus2 plantarum
7	d1q2ya_	Alignment		99.3	18	**Fold:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Superfamily:**Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) **Family:**N-acetyl transferase, NAT

Abb. 3.2. 12 Strukturmodell und strukturelles Alignment von NAS354. A Strukturmodell; **B** Sicherheit der Vorhersage der verschiedenen Sekundärstrukturelemente; **C** beste Treffer im Strukturalignment (Confidence >99%). Abgebildet sind hier nur die Ergebnisse für NAS354, NAS343 führt aber aufgrund der hohen Ähnlichkeit der beiden Proteine zu identischen Resultaten. Im Model ist die N-terminale NAS-Domäne (siehe Text) blau bis gelb gekennzeichnet, die zweite Domäne am C-Terminus ist orange-rot koloriert. Modell und Alignment wurden durch Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) erstellt, gezeigt ist ein Ausschnitt der ausgegebenen Datei.

den beiden LPLATs ans Licht. Mittels Strukturvorhersage durch Phyre2 (Abb. 3.2. 12) und anschließenden Homologievergleichen auf Sekundär- und Tertiärstrukturebene ergaben sich jedoch für die N-Terminale Domäne (in der Abbildung blau bis gelb) sehr große Ähnlichkeiten mit FeeM, einem als N-Acylaminosäure-Synthase (NAS) annotierten Protein, das ebenfalls im Rahmen einer Metagenomstudie identifiziert wurde (Brady *et al.*, 2002; Van Wagoner & Clardy, 2006). Daneben werden hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu den Syntheseenzymen von *Autoinducer*-Molekülen vorhergesagt, kleinen acylierten Molekülen, die zur Zell-Zell-Kommunikation dienen, wie beispielsweise N-Acyl-Homoserinlactone (Galloway *et al.*, 2011).

FeeM katalysiert, wie die in dieser Arbeit identifizierten Proteine, die Synthese von N-Acyltyrosinen (als Hauptbestandteil N-Lauryltyrosin (C_{12})) und wurde bei einem *Screening* einer *E. coli*-Bank auf die Produktion von Substanzen mit antibakterieller Wirkung entdeckt. Angesichts der Ähnlichkeit in Struktur und Funktion zu FeeM werden die beiden hier beschriebenen Proteine nachfolgend als NAS343 bzw. NAS354 bezeichnet.

Durch Subklonierung des mittels der Primer BAec354-LPLAT-fw1 und BAec354-LPLAT-bw1 amplifizierten *nas354*-Gens in pET22b und Expression in BL21(DE3) unter P_{T7}-Kontrolle auf LB- bzw. Blutagar mit IPTG wurde gezeigt, dass NAS354 tatsächlich alleine für Produktion und Sekretion des Biotensids in *E. coli* verantwortlich und ausreichend ist. Beide Phänotypen -sowohl Hämolyse als auch Oberflächenaktivität- konnten beobachtet werden (Abb. 3.2. 13).

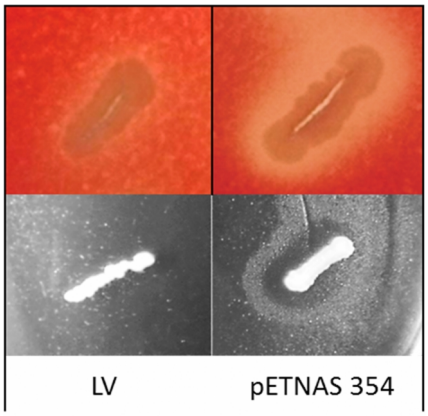


Abb. 3.2. 13 Biotensidproduktion in *E. coli* BL21 (DE3)durch Expression von NAS354. Beide Phänotypen wurden nachgewiesen, sowohl haemolytische Aktivität durch Lysehöfe um die Kolonien auf Blutagar(oben) als auch Sekretion oberflächenaktiver Substanzen durch Hofbildung im *atomized oil assay* (unten). Das Wachstum der Kolonien erfolgte auf Blutagar bzw. LB-Agar mit 0,4 mM IPTG 16 h bei 37°C. Die Abbildungen stehen exemplarisch für je drei Kolonien jedes Stammes mit den gleichen Phänotypen.

N-Acylaminosäure-Synthasen sind ein gutes Beispiel für die Vorteile des Metagenomansatzes bei der Suche nach neuen Sekundärmetaboliten. Diese Familie wurde überhaupt erst durch *Screenings* von metagenomischen Bibliotheken, bei denen nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen gesucht wurde, entdeckt (Brady & Clardy, 2000) und bis heute, da diverse Mitglieder dieser Enzymfamilie beschrieben sind (Brady & Clardy, 2005a; Brady *et al.*, 2002, 2004), konnten nur wenige in als kultivierbar beschriebenen Bakterien identifiziert werden (Brady *et al.*, 2004; Craig *et al.*, 2011). Auch wenn somit in den letzten Jahren einige Arbeiten zu dieser Enzymfamilie durchgeführt wurden, sind Oberflächenaktivität und andere tensidische Eigenschaften der von diesen Enzymen synthetisierten Sekundärmetaboliten unseres Wissens bisher nicht publiziert gewesen.

Die Mitglieder der NAS weisen untereinander nur eine geringe Sequenzähnlichkeit auf (Brady *et al.*, 2004; Van Wagoner & Clardy, 2006), weshalb wie oben beschrieben, durch BLAST-Homologiesuche zu den NAS-Genen keine Treffer auf N-Acylaminosäure-Synthasen hindeuteten. Brady *et al.* konnten durch Proteinsequenzvergleiche zwei Gruppen innerhalb der NAS identifizieren. Gruppe I zeichnet sich durch einige konservierte Motive in der Aminosäuresequenz auf, Gruppe II sind insgesamt relativ ähnlich zueinander (*identity* ≥ 40%) (Brady *et al.*, 2004).

Durch Alignment der Aminosäuresequenzen der NAS-Domänen von NAS343 und NAS354 und beschriebenen NAS-Proteinen, konnten diese beiden Proteine der Gruppe I zugeordnet werden (Abb. 3.2. 14).

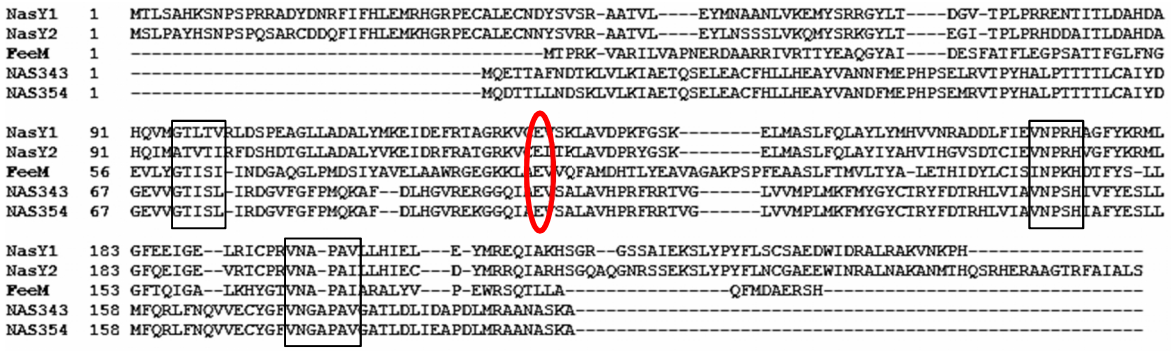


Abb. 3.2. 14 Alignment der AS-Sequenzen von drei Gruppe I N-Acylaminosäure-Synthasen und der Acyltransferasedomänen von NAS343 und NAS354. Schwarze Rahmen zeigen die von Brady *et al.*, 2004 beschriebenen konservierten Motive an, der als katalytisch aktiv vermutete Glutamatrest (Van Wagoner & Clardy, 2006) ist rot markiert.

Als verantwortlich für die Biosynthese des N-Myristoyltyrosins in den Klonen SA343 und SA354 wurde jeweils das Produkt eines einzelnen Gens, das in sehr ähnlichen Varianten auf beiden Metagenomfragmenten zu finden ist, identifiziert. Durch Strukturhomologievergleiche und m*ultiple sequence alignment* konnten die Proteine der Familie der N-Acyl-Aminosäure-Synthasen, Gruppe 1 zugeordnet werden.

3.2.6 Untersuchung des Reaktionsmechanismus der N-Acylaminosäure-Synthase NAS354

Auf Basis von Homologien zu den GCN5-assozierten N-Acyltransferasen (GNATs) wurde ein Reaktionsmechanismus für NAS postuliert (Abb. 3.2. 15), demzufolge ein Glutamatrest (im Falle von FeeM E94) für die Katalyse der Reaktion verantwortlich ist (Van Wagoner & Clardy, 2006). Durch die Säuregruppe in der Seitenkette dieses Glutamatrestes wird ein Wassermolekül deprotoniert. Diese Deprotonierung führt durch schnelle Translokation von Protonen über eine Kette von Wassermolekülen („*proton wire*“, Pomès and Roux, 1996) schließlich zur Deprotonierung der Aminogruppe des im aktiven Zentrum gebunde-

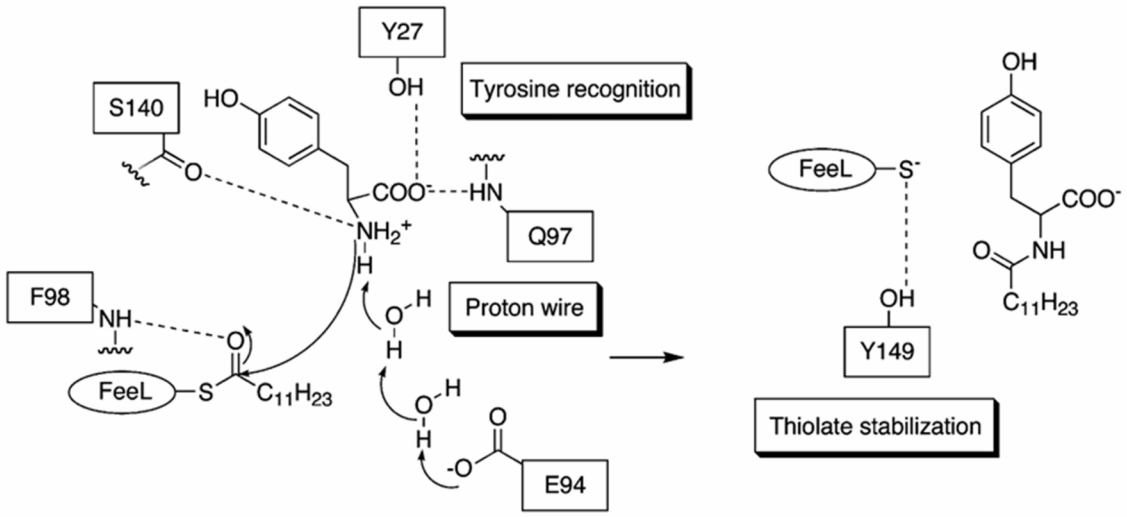


Abb. 3.2. 15 Postulierter Reaktionsmechanismus für die N-Acylaminosäuresynthase FeeM. Das im aktiven Zentrum gebundene Tyrosinmolekül wird an der Aminogruppe durch *proton wire*-Bildung, ausgelöst durch E94, deprotoniert und greift als Nucleophil das Carbonyl-C der aktivierten Fettsäure am Acylcarrierprotein (FeeL) an. Dadurch kommt es zur Verbindung beider Edukte zu N-Acyltyrosin. Die weiteren im Schema angegebenen Aminosäurereste dienen zur Erkennung und Bindung der Substrate. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch den Rechteinhaber modifiziert aus Van Wagoner & Clardy, 2006 (© Elsevier, 2006) entnommen.

nen Tyrosins. Diese greift das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Fettsäure an, die durch ein Acylcarrierprotein (ACP), welches mit der NAS interagiert, bereitgestellt wird. Im Falle von FeeM ist das interagierende ACP, FeeL, mit FeeM in einem Gencluster zu finden (Brady *et al.*, 2002). Experimentelle Hinweise zur Verifizierung dieses Reaktionsweges sind bisher nicht publiziert.

Durch Clustal Omega wurde der Glutamatrest an Position 103 in NAS343 und NAS354 als homolog zu E94 in FeeM (Abb. 3.2. 14) und somit als die mutmaßlich katalytisch aktive Aminosäure vorhergesagt. Per *QuickChange*-PCR mit den Primern QC BA354 E103 Ala und QC BA354 E103 Ala *antisense* wurde in NAS354 dieses Glutamat gegen Alanin ausgetauscht (2.6.5). Die Expression des mutierten Gens *nas*354 E103A in BL21(DE3) analog zu zur oben beschriebenen Expression von nas354 (3.2.5) zeigte einen Verlust der beiden durch das Biotensid hervorgerufenen Phänotypen (Abb. 3.2. 16). Auch wenn es nicht vollständig auszuschließen ist, dass dieser Austausch durch andere Effekte, wie z.B. Veränderungen in der Proteinstruktur, zum Verlust der Aktivität führt, ist dieses Ergebnis doch ein starker Hinweis auf E103 als katalytisch aktive Aminosäure, wie aufgrund der strukturellen Homologien zu anderen N-Acyltransferasen bereits vorhergesagt.

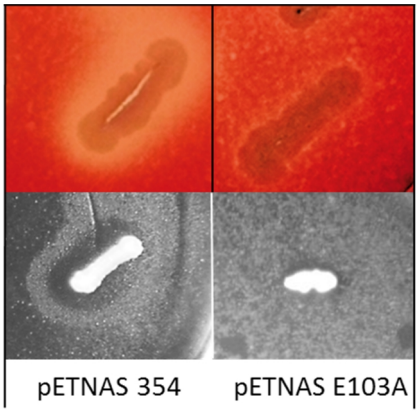


Abb. 3.2. 16 Verlust der *Surfactant*-Produktion durch den Aminosäure-Austausch E103A. *E. coli* BL21(DE3) mit den angegebenen Vektoren auf Blutagar(oben) und auf LB-Agar im *atomized oil assay* (unten). Das Wachstum der Kolonien erfolgte auf Blutagar bzw. LB-Agar mit 0,4 mM IPTG 16 h bei 37°C. Die Abbildungen stehen exemplarisch für je drei Kolonien jedes Stammes mit den gleichen Phänotypen.

Der Austausch des Glutamatrest an Position 103 führt zum Verlust der katalytischen Aktivität von NAS354. Damit ist ein Reaktionsmechanismus wahrscheinlich, bei dem Glutamat 103 beteiligt ist, der vorhergesagte Mechanismus wird damit unterstützt.

3.2.7 Chemo-physikalische Eigenschaften des *Biosurfactants* N-Acyltyrosin

Bei den bisherigen Studien zu N-Acylaminosäuren stand, wie bereits erwähnt, deren antibakterielle Wirkung im Fokus der Untersuchung. Tensidische Eigenschaften dieser Metaboliten wurden bislang unserem Wissen nach nicht betrachtet, sodass in dieser Arbeit erstmals eine initiale chemo-physikalische Charakterisierung des N-Acyltyrosins als Biotensid erfolgte. Wie einleitend beschrieben (1.1.1), sind wichtige Kenngrößen von Tensiden unter anderem Löslichkeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln, *Hydrophillic/lipophillic balance,* Absenkung der Oberflächenspannung und kritische Mizellbildungskonzentration (CMC).

Zunächst wurde das Löslichkeitsverhalten betrachtet. Das Biotensid war gut löslich in organischen Lösungsmitteln wie Ethylacetat und Ethanol/Methanol, die höchste getestete Konzentration betrug 50 mg/mL. In wässrigen Lösungen von pH 10 und höher war es ebenfalls relativ gut zu lösen (mindestens 10 mg/mL), bei sauren und neutralen pH-Werten löste es sich nur sehr schlecht. Dieses Lösungsverhalten in Wasser ist mit den unterschiedlichen Protonierungszuständen des Aminosäureteils im Molekül zu erklären. Im stark sauren Bereich ist das Molekül ungeladen und durch den Myristoylrest sowie dem aromatischen Ring des Tyrosins nahezu wasserunlöslich, weshalb es bei pH-Werten unter 3 sehr gut ausgefällt werden kann. Mit steigendem pH-Wert kommt es zur Deprotonierung zunächst der Säuregruppe und im basischen Bereich des Alkohols an der Seitenkette (pK_S von 2,2 bzw. 10,9 (Berg *et al.*, 2003)), wodurch das Gesamtmolekül zuerst einfach, dann doppelt negativ geladen ist und somit viel polarer und hydrophiler wird. Ähnliche Effekte des pH-Werts auf Aggregation und Löslichkeit in wässrigen Lösungen durch Ladungsveränderungen wurden auch für andere *Biosurfactants* beschrieben (Baccile *et al.*, 2012; Ishigami *et al.*, 1987; Zhang & Miller, 1992).

Der *Hydrophillic/lipophillic balance value* (HLB-Wert) des ungeladenen Myristoyltyrosins, berechnet nach der in Davies, 1957 publizierten Methode unter Verwendung der in Davis, 1994 angegebenen Gruppenzahlen (Tabelle 3.2. 2) beträgt 4,613. Für die Amidbindung zwischen Fettsäure und Aminosäure (siehe Abb. 3.2. 10) wurde der für freie Esterbindungen angegebene Wert angenommen.

Mit diesem HLB kann Myristoyltyrosin als Wasser-Öl-Emulgator eingeordnet werden (Tabelle 3.2. 3), vergleichbar den Rhamnolipiden und den in Nahrungsmitteln sehr häufig

als Emulgator eingesetzten Lecithinen (Tabelle 3.2. 4, S. 105), einem Gemisch aus verschiedenen Phospholipiden (Palacios & Wang, 2005).

Tabelle 3.2. 2 Chemische Gruppen und die ihnen zugeordneten Gruppenzahlen, Ausschnitt aus Tabelle 2. 6

Hydrophile Gruppen	Gruppenzahl	Lipophile Gruppen	Gruppenzahl
—O–$SO_3^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	38, 7	—CH—	0, 475
—$SO_3^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	37 ,4		
—$COO^{\ominus}$ $K^{\oplus}$	21, 1	—CH_2–	0, 475
—$COO^{\ominus}$ $Na^{\oplus}$	19, 1	—CH_3	0, 475
Ester (Sorbitanring)	6, 8	=CH—	0, 475
Ester (frei)	2, 4		
—COOH	2, 1		
—OH (frei)	1, 9		1, 662
—O—	1, 3		

Tabelle 3.2. 3 Empfohlene Einsatzgebiete für Tensiden nach HLB-Werten, Ausschnitt aus Tabelle 1. 1

HLB-Wert des Tensides	Verwendungszweck
3 bis 8	**W/O-Emulgatoren**
7 bis 9	**Netzmittel**
8 bis 18	**O/W-Emulgatoren**
W/O =Wasser in Öl; O/W= Öl in Wasser	

CMC und Reduzierung der Oberflächenspannung wurden durch statische tensiometrische Messungen bestimmt (2.8.8). Dabei wurde die Oberflächenspannung von 0,1 M NaOH-Lösungen mit unterschiedlichen eingestellten (=statischen) Konzentrationen an N-Acyltyrosin mittels eines Tensiometers bestimmt (2.8.8). Die gemessenen Werte für die Oberflächenspannung wurden dann gegen die Tensidkonzentration aufgetragen (Abb. 3.2. 17). Daraus ergab sich eine minimale Oberflächenspannung etwa 34 mN/m. Die aus der Messkurve abgeleitete CMC betrug 0,114%. Die ermittelten Werte gelten für weitestgehend in der zweifach deprotonierten Form vorliegendes Myristoyltyrosin, da der Stoff für diese Messreihe, wie bereits angegeben, in 0,1 M NaOH (pH 12) gelöst wurde. Bei mehr zum neutralen Bereich hin liegenden pH-Werten konnten die für die Messreihe erforderlichen Höchstkonzentrationen von 8-10 mg/mL aufgrund der geringeren Wasserlöslichkeit nicht erreicht werden. Zum Vergleich: Für Tyrosin ohne zusätzlichen hydrophoben Fettsäurerest wird eine Löslichkeit in pH-neutralen wässrigen Lösungen von 0,35-0,38 mg/mL angegeben (Hitchcock, 1924; Merck, 2011).

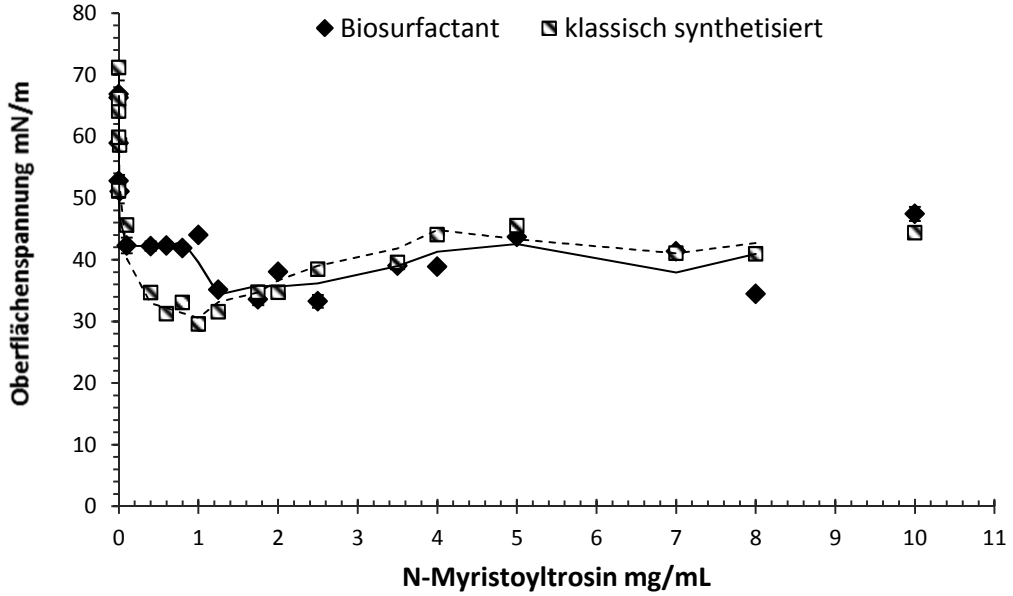


Abb. 3.2. 17 Oberflächenspannung von 0,1 M NaOH bei verschiedenen Konzentrationen von N-Acyltyrosin. Schwarze Karos, durchgezogene Trendlinie: Aufgereinigtes *Biosurfactant*; schraffierte Quadrate, gestrichelte Trendlinie: chemisch synthetisiertes N-Myristoylstyrosin. Beide Substanzen wurden in 0,1 M NaOH-Lösung, pH 12 gelöst. Die Trendlinien zeigen den gleitenden Durchschnitt von jeweils zwei Punkten, jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von drei Messungen

Auffällig war der Verlauf der Messkurve des isolierten Biosurfactants verglichen mit dem reinen, durch klassische organische Synthese produzierten Myristoyltyrosins (bereitgestellt durch das Institut für bioorganische Chemie der HHU Düsseldorf, synthetisiert nach (Aha, 2010)). Im Bereich von 0,1-1,5 mg/mL Tensid zeigten sich hier Unterschiede in der konzentrationsabhängigen Oberflächenspannung. Dies hängt wahrscheinlich mit den in Spuren vorhandenen anderen Fettsäuren (u.a. ungesättigten, siehe 3.2.4.) zusammen, deren Einfluss auf die Oberflächenspannung, eventuell auch durch Wechselwirkungen der verschiedenen Acyltyrosinspezies untereinander, anscheinend in diesem Konzentrationsbereich besonders zum Tragen kam, z.B. durch gemischte Monolayer- und Mizellenbildung. Ähnliche Effekte wurden auch für andere *Surfactant*-Klassen beobachtet und angewendet (Ansari *et al.*, 2013; Naqvi *et al.*, 2012). Durch den unterschiedlichen Kurvenverlauf unterschied sich auch die aus diesem abgeleitete CMC des künstlich synthetisierten N-Myristoyltyrosins (0,06%) von der des Biotensids.

Diese durch die verschiedenen Kongenere hervorgerufenen Effekte könnten eine weitere interessante Eigenschaft von *Biosurfactants* gegenüber „klassischen“ Detergentien darstellen (Soberón-Chávez & Maier, 2011). Die minimale Oberflächenspannung an der Grenzfläche Wasser/Luft von 34 Nm/m fällt in den Bereich von bereits beschriebenen

Biotensiden, die CMC liegt allerdings deutlich höher als beispielsweise die der beiden aufgeführten gut charakterisierten Glycolipide (Tabelle 3.2. 4).

Tabelle 3.2. 4 Übersicht: Physikalische Eigenschaften des aus *E. coli* DH10b-Kultur isolierten N-Acyltyrosins im Vergleich zu gängigen Tensiden und *Biosurfactants*

	N-(Myristoyl-) tyrosine (pH 12)	SDS	Triton-X 100	*S. bombicola* Sophorolipid (Van Bogaert *et al.*, 2007)	*P. aeruginosa* Rhamnolipid (Müller *et al.*, 2012)	Soybean Lecithin
HLB-Wert	4,61	40	13.5	10-13	4-6	4-9
CMC %(w/v)	0,114	0,23	0,02	0,004-0,01	0,001-0,02	1,3-1,6
Min. surface tension	34	40	28	30-40	29	

Das isolierte Biotensid war bei neutralem pH fast unlöslich in Wasser, dafür aber gut löslich in organischen Lösungsmitteln und Alkoholen. Die CMC bei pH 12 wurde mit 0,114% bestimmt, die minimale Oberflächenspannung als 34 mN/m. Ein errechneter HLB-Wert von 8,65 ordnete die Substanz als Öl-Wasser-Emulgator ein.

3.2.8 Biologische Eigenschaften des Biotensids N-Acyltyrosin

Viele *Biosurfactants* haben antimikrobielle Effekte (Banat *et al.*, 2000; Saharan *et al.*, 2012). Im Falle der N-Acylaminosäuren ist eine Wirkung gegen *B. subtilis* bereits beschrieben (Brady & Clardy, 2000), diese war, wie oben (3.2.5) bereits dargelegt, der Auslöser für die Entdeckung dieser Stoffklasse in Metagenomscreenings (Brady & Clardy, 2000).

Zur Untersuchung der antibakteriellen Effekte des von den beiden Metagenomklonen produzierten N-Acyltyrosins wurden im Kirby-Bauer-Test Papierplättchen, getränkt mit N-Acyltyrosin in Ethanol, auf Müller-Hinton-Agarplatten, die mit dem jeweiligen Stamm beimpft waren, aufgebracht (2.8.10). Die Platten wurden über Nacht bei den jeweilis optimalen Wachstumstemperaturen der einzelnen Stämme inkubiert. Hemmende Aktivität des Biotensids gegenüber den jeweiligen Stämmen zeigte sich durch klare Höfe um die Papierplättchen herum. Erwartungsgemäß ließ sich auch im Falle der hier aufgereinigten *Biosurfactants* eine wachstumshemmende Wirkung auf *B. subtilis*. nachweisen. Auf das Wachstum der meisten getesteten *Proteobacteria* (Gram-negativ, *Pseudomonas aerugi-*

nosa PAO1, *Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia glumae* PG1*, Escherichia coli* BL21 sowie *Serratia marcescens* DSM12481) zeigte Myristoyltyrosin keinen Einfluss, letztere Spezies reagierte aber mit erhöhter Produktion von Pigmenten (Prodigiosin) auf die Substanz. Eine Ausnahme waren das β-Proteobacterium *Chromobacterium violaceum* CV026 und das δ-Proteo- und *Myxobacterium Sorangium cellulosum,* welche deutlich Hemmhöfe um die Myristoyltyrosin-Plättchen bildeten. Wachstumshemmenden Einfluss zeigte das *Biosurfactant* über diese und dem bereits erwähnten *B. subtilis* hinaus auf *Corynebacterium glutamicum* (Abb. 3.2. 18).

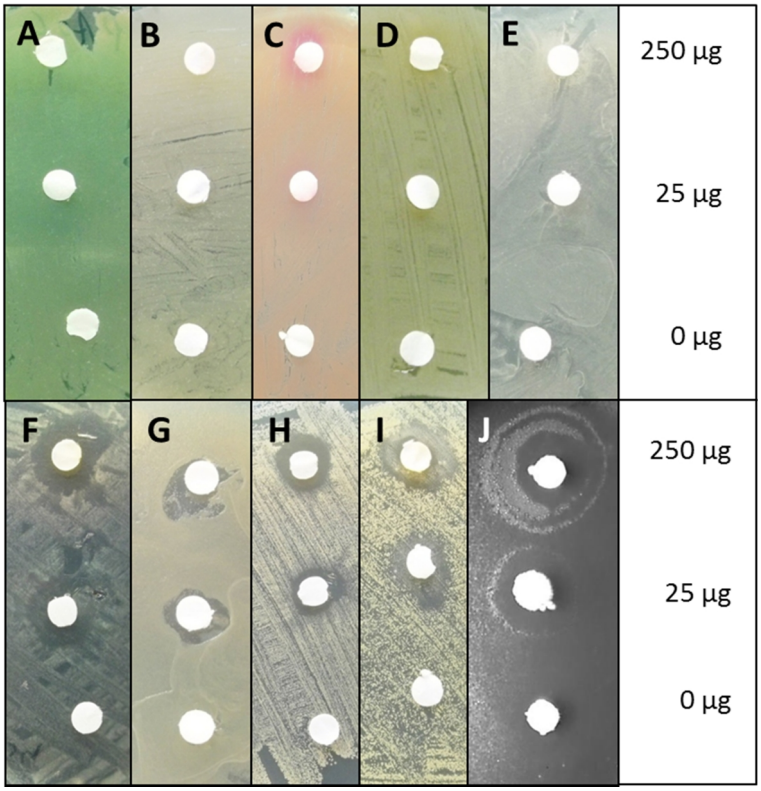


Abb. 3.2. 18 Kirby-Bauer Assay zur Auswirkung von N-Acyltyrosin auf verschiedene Bakterienstämme. durch in Ethanol mit N-Myristoyltyrosin getränktes Whatmanpapier auf Müller-Hinton-Agar mit den nachfolgend angegebenen Stämmen. **A** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; **B** *Pseudomonas putida* KT2440; **C** *Serratia marcescens* DSM12481; **D** *Escherichia coli* BL21; **E** *Burkholderia glumae* PG1; **F** *Bacillus subtilis* TEB1030; **G** *Sorangium cellulosum* DSM53796; **H** *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032; **I** *Chromobacterium violaceum* CV026; **J** *atomized oil assa*y auf Müller-Hinton-Agar. Die rechts angegebenen Werte entsprechen der absoluten Menge an Biotensid, die auf das Papierplättchen gegeben wurde.

Damit zeigte sich ein relativ breites Wirkungsspektrum dieser Metabolite, welches von Gram-negativen Proteobakterien einschließlich *S. cellulosum*, das den *Myxobacteria* zugeordnet ist, über *Firmicuten* (*Bacillus*) bis hin zu den *Mycobacteria* reichte. Hochempfindlich gegenüber bereits geringen Mengen des *Biosurfactants* schien allerdings keiner der getesteten Stämme zu sein, da die durch das *atomized oil assay* indizierte Diffusions-

fläche des N-Acyltyrosins viel größer war als die Hemmhöfe. Gram-negative Bakterien schienen im Allgemeinen unempfindlicher gegenüber diesem *Biosurfactant* zu sein, eine Beobachtung, die auch bereits für andere Biotenside beschrieben ist (Bockmühl, 2012b; Kadouri & Shanks, 2013). Aufgrund des Aufbaus ihrer Zellhülle, besonders gekennzeichnet durch die äußere Membran mit Lipopolysacchariden (LPS), sind diese Bakterien nicht so empfindlich gegenüber Angriffen durch *Surfactants* im Kulturmedium wie die Gram-positive Organismen (Sotirova *et al.*, 2009, 2008). LPS können mit *Biosurfactants* interagieren (Zhong *et al.*, 2008) und die Zelle somit bis zu einer gewissen Konzentration vor den membranlösenden Effekten dieser Metaboliten schützen (Pashynska, 2009; Sotirova *et al.*, 2008). Ähnliche Effekte sind auch für andere potentiell cytotoxische Substanzen publiziert (Denyer & Maillard, 2002). Bei Gram-positiven Bakterien fehlt diese schützende LPS-Schicht jedoch, sodass schon bei geringeren Konzentrationen die Zellmembran angegriffen und zerstört werden kann (Bharali *et al.*, 2013; Sotirova *et al.*, 2012). Auch wenn in den hier angeführten Studien der Fokus hauptsächlich auf Rhamnolipiden lag, sind die Ergebnisse wohl auf N-Acylaminosäuren übertragbar.

Zusätzlich zu den beschriebenen Effekten gegenüber manchen Bakterienstämmen führte N-Myristoyltyrosin, wie oben bereits gezeigt, zur Lysis von Erythrozyten durch Interaktion mit deren Zellmembranen (Abb. 3.2. 7), wie es bei vielen anderen *Surfactants* auch zu beobachten ist, weshalb Haemolyse ein häufig genutztes System zur Untersuchung von Tensid-Membran Interaktionen ist (Tavano *et al.*, 2013).

Die physiologische Bedeutung dieser Metaboliten bzw. der dazu gehörenden Enzymfamilie konnte bis jetzt nicht aufgeklärt werden, was auch der Tatsache geschuldet ist, dass diese hauptsächlich über Metagenomstudien identifiziert wurden. Dadurch können keine Vermutungen angestellt werden, ob N-Acylaminosäuren, vergleichbar zu anderen Biotensiden, für die Kolonisierung fester Oberflächen, zur Utilisierung hydrophober Substrate oder zum Abhalten von Nahrungskonkurrenten genutzt werden (Arino *et al.*, 1998; Matsuyama & Nakagawa, 1996b; Raaijmakers *et al.*, 2010).

Hinweise auf die natürliche Funktion könnte die strukturelle Ähnlichkeit der NAS mit N-Acyl-Homoserinlacton-Synthasen, die bei Gram-negativen Bakterien die Synthese von Signalmolekülen (ebenfalls acylierte Aminosäurederivate) in der Zell-Zell-Kommunikation katalysieren (Miller & Bassler, 2001), liefern. Eine eventuelle Funktion von N-Acylaminosäuren als Signalmoleküle wurde auch schon in anderen Studien diskutiert

(Craig *et al.*, 2011), bislang ist aber keine derartige Wirkung der Acyltyrosine publiziert. Auch in dieser Arbeit konnte eine solche Funktion nicht nachgewiesen werden, da das etablierte System zum Nachweis langkettiger *Quorum sensing* (QS) Signalmoleküle mittels *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClean *et al.*, 1997) aufgrund der Toxizität von N-Myristoyltyrosin gegenüber dem Indikatorstamm nicht anwendbar war. Zudem war keine Auswirkung von Myristoyltyrosin im Kulturmedium auf die (QS-kontrollierte) Biofilmbildung (2.8.11) bei *P. aeruginosa* zu beobachten (ohne Abbildung).

Da die Prodigiosinproduktion ebenfalls als ein QS-regulierter Prozess beschrieben ist (Williamson *et al.*, 2006), könnte die stärkere Pigmentproduktion von *S. marcescens* als Reaktion auf N-Acyltyrosin als Hinweis eine Funktion der N-Acyltyrosine als Signalmoleküle gedeutet werden. Im Kirby-Bauer-*Assay* mit verschiedenen Tensiden reagierte *S. marcescens* aber auch auf andere Tenside mit verstärkter Prodigiosinbildung, hier gezeigt mit SDS und *P. aeruginosa* Rhamnolipiden (Abb. 3.2. 19), was auch mit den Ergebnissen früherer Studien konform geht (Feng *et al.*, 1982). Das legt nahe, dass die erhöhte Pigmentproduktion hier eher als Stressantwort auf Interaktionen der *Biosurfactants* mit der Zellmembran als durch eine Produktionssteigerung in Folge Acyltyrosin-induzierter QS-Prozesse zu erklären ist.

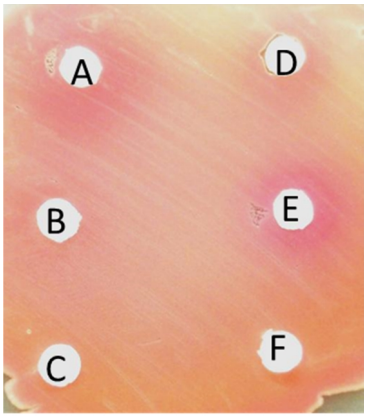


Abb. 3.2. 19 Einfluss verschiedener Tenside auf die Prodigiosinproduktion von *S. marcescens*. Kirby-Bauer-Test mit verschiedenen Tensiden in Whatman-Papier auf Müller-Hinton-Agar mit einem Rasen von *S. marcescens* DSM12481. **A** SDS; **B** *P. aeruginosa* Rhamnolipid; **C** Tween20; **D** N-Acyltyrosin *Biosurfactant*; **E** N-Myristoyltyrosin, chemisch synthetisiert; **F** Negativkontrolle Ethanol. Alle Tenside wurden in Ethanol (SDS: 80% Ethanol) gelöst und je 250 µg aufgetragen. Helligkeit und Kontrast der Abbildung wurden künstlich verstärkt, um die gesteigerte Prodigiosinproduktion zu verdeutlichen.

Eine vorhergesagte hohe strukturelle Ähnlichkeit der C-terminalen Domäne der beiden NAS-Enzyme (in Abb. 3.2. 12 in orange/rot dargestellt) mit c-di-GMP bindenden PilZ-Domänen aus *P. aeruginosa* ist allerdings wiederum ein Hinweis auf eine Funktion inner-

halb *Quorum sensing* assoziierter Prozesse wie Biofilmbildung, Motilität oder Virulenz (Balasubramanian *et al.*, 2013; Hengge, 2009; Ramelot *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2011). Hier besteht eine Ähnlichkeit zu der N-Acylphenylalanin-Synthase NasP, für die ebenfalls eine zweite Domäne neben der NAS beschrieben ist, die cAMP, wie c-di-GMP ein *second messenger*-Molekül, bindet (Clardy & Brady, 2007). NasP wird direkt durch Bindung des *messenger*-Moleküls aktiviert. Ob bei den in dieser Arbeit beschriebenen Enzymen eine vergleichbare direkte Aktivierung durch Bindung von c-di-GMP auftritt, wie es auch für Cellulose- und Alginat-Syntheseenzyme verschiedener Bakterien beschrieben ist (Fujiwara *et al.*, 2013; Hengge, 2009; Merighi *et al.*, 2007), ist bisher nicht experimentell überprüft worden. Wäre dies der Fall, könnte das ein weiterer Anhaltspunkt für eine Rolle der N-Acylaminosäuren innerhalb der Signalkaskade sein. Es wäre aber auch denkbar, dass die Produktion des *Biosurfactants* durch c-di-GMP reguliert wird, ohne dass N-Acyltyrosin eine weitere *messenger*-Funktion innehat, vergleichbar zu anderen in der Synthese direkt von c-di-GMP abhängigen Metaboliten wie den bereits erwähnten Polymeren Alginat und Cellulose (Hengge, 2009), die eine Rolle in Biofilmbildung, Adhäsion oder Motilität spielen (Schirmer & Jenal, 2009). Gerade in der Motilität liegt, wie bereits mehrfach angeführt (1.2.4), wohl eine der Hauptfunktionen von Biotensidsekretion. Weiterführende Studien mit den kultivierbaren Organismen, in denen NAS inzwischen identifiziert wurden, wie *Nitrosomonas* und *Desulfovibrio,* könnten in Zukunft Hinweise auf die natürliche Funktion der N-Acyl Aminosäuren und der zugehörigen Synthasen liefern.

Die dieser Familie zugeordneten Enzyme katalysieren zwar grundlegend sehr ähnliche Reaktionen, unterscheiden sich aber stark in ihrer genetischen Umgebung. In manchen Fällen sind sie Teil eines Biosyntheseclusters, wie es für das bereits mehrfach erwähnte Protein FeeM beschrieben ist (Brady *et al.*, 2002), und katalysieren einen Schritt in der Biosynthese bestimmter Metaboliten, bei anderen Vertretern dieser Enzymfamilie deutet nichts in der genetischen Umgebung auf ein Gencluster hin, die N-Acylaminosäuren scheinen in diesen Fällen die Ziel-Metaboliten darzustellen. Für weitere NAS ist eine Involvierung in putative PEP-CTERM/Exosortase-Systeme (Proteinordnungssysteme (Haft *et al.*, 2006, 2012)) beschrieben, weshalb diese N-Acyltransferasen als ExoAT bezeichnet wurden (Craig *et al.*, 2011). Wie oben beschrieben, gibt es zudem NAS, die Bindedomänen für *secondary messenger*-Moleküle aufweisen.

In der genetischen Umgebung von NAS354, soweit bekannt, waren nach BLAST-Analyse keine Gene zu finden, die einen Zusammenhang mit Sekundärmetabolit-Biosynthesewegen, in denen N-Acylaminosäuren ein Zwischenprodukt darstellen könnten, vermuten lassen (3.2.5). Auch eine mögliche ExoAT-Funktion wurde durch die BLAST-Ergebnisse nicht gestützt. Das deutet darauf hin, dass dieses Enzym, funktionell betrachtet, zur Gruppe der im natürlichen Organismus nicht innerhalb eines Biosyntheseweges angesiedelten NAS gehört. Es besitzt aber, wie bereits dargelegt, eine zweite Domäne, die Ähnlichkeit mit der c-di-GMP bindenden PilZ-Domäne aufweist und könnte damit, vergleichbar zu NasP, durch c-di-GMP-Bindung in der Aktivität beeinflusst werden. Letzteres gilt auch für NAS343, hier können aber bezüglich der genetischen Umgebung aufgrund der Kürze des Fragmentes kaum Aussagen gemacht werden, das einzige zusätzlich zu NAS343 gefundene Gen kodiert für eine putative Peptidase. Aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit des Fragmentes aus SA343 mit Teilen des SA354-Fragmentes kann aber angenommen werden, dass die natürliche genetische Umgebung von NAS343 sehr ähnlich zu der oben beschriebenen von NAS354 ist. Spezifisch mit der NAS interagierende Acylcarrierproteine, wie z.B. im Falle von FeeM das Produkt des in direkter Nachbarschaft gelegenen Gens *feeL* (Van Wagoner & Clardy, 2006), sind bei beiden Enzymen nicht bekannt und auch nicht zwingend notwendig für die Funktionalität der Proteine. Scheinbar können die zur Biosynthese des N-Myristoyltyrosins benötigten aktivierten Fettsäuren von in *E. coli* vorhandenen Systemen bereitgestellt werden. Es ist gut vorstellbar, dass die NAS-Enzyme mit ACP aus anderen Organismen wie hier *E. coli* funktionell interagieren können, da diese Familie als hoch konserviert beschrieben wird (Byers & Gong, 2007; Worsham *et al.*, 2003), wie bereits im Kapitel zur heterologen Produktion von Serrawettin W1 (3.1.3) dargelegt wurde.

Eine Wirkung von N-Myristoyltyrosin als Signalmolekül innerhalb von *Quorum sensing*-Systemen konnte nicht ermittelt werden. Die natürliche Funktion dieser Metaboliten bleibt unklar. Allerdings konnten wachstumshemmende Effekte auf Vertreter der *Firmicutes*, *Myxobacteria*, *Proteobacteria und Mycobacteria* nachgewiesen werden. Das Biotensid wirkt somit gegen ein breites Wirtsspektrum.

3.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

3.3.1 Biotenside aus dem Metagenom

Mit den hier beschriebenen Ergebnissen konnte zum ersten Mal die Detektion von Biotensid-Synthesegenen in einer Metagenombank gezeigt werden. Dabei wurden zwei N-Acylaminosäure-Synthasen identifiziert, welche die Synthese von N-Acyltyrosin in *E. coli* ermöglichen. Wie oben bereits angeführt (3.2.5), stellt die Klasse der N-Acylaminosäure-Synthasen in ihrem vermutlich breiten funktionellen Spektrum ein gutes Beispiel zur Verdeutlichung der Vorteile eines Metagenomansatzes dar, da diese Enzymklasse, wie auch die durch sie synthetisierten Metaboliten, überhaupt erst durch *Screening*s von Banken mit DNA aus Umweltproben entdeckt worden ist (Brady & Clardy, 2000; Brady *et al.*, 2002). Außerdem zeigten sich an den hier identifizierten Proteinen NAS343 und NAS354 auch die Vorteile von funktionsbasierten *Screening*s gegenüber sequenzbasierten Ansätzen, wenn eDNA auf Gene zur Biotensidsynthese hin untersucht werden soll. Aufgrund der großen Unterschiede in der Primärstruktur zwischen den verschiedenen NAS wären die beiden in dieser Arbeit identifizierten Biotensid synthetisierenden Enzyme wohl nach Sequenzierung und Annotierung durch Homologievergleiche nicht als solche identifiziert worden, zumal N-Acylaminosäuren bisher nicht als Biotenside beschrieben waren.

Nach unserem Wissen sind bisher insgesamt nur wenige Beispiele für Biotenside mit einer einzelnen Aminosäure als hydrophiler Komponente bekannt, nämlich Ornithinlipide, die aus Ornithin und zwei (Hydroxy-) Fettsäuren zusammengesetzt sind und von verschiedenen Bakterien produziert werden (Maneerat *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 1993) und Lysinlipide aus *Agrobacterium tumefaciens* mit analogem Aufbau, aber Lysin als Kopfgruppe (Geiger *et al.*, 2010; Tahara *et al.*, 1976).

Damit konnte durch Kombination von Metagenomansatz und funktionellen *Screening*-Methoden für Biotensidproduktion in dieser Arbeit aufbauend auf den Studien von Sonja Tröschel und der Gruppe um Sean F. Brady eine bisher nicht betrachtete Klasse von Biotensiden erschlossen werden.

Darüber hinaus bietet der hier verwendete Vektor die Möglichkeit, schon während des *Screenings* den optimalen Wirt zur heterologen Produktion auszuwählen. Wie wichtig das *Screening* in unterschiedlichen Wirten ist, zeigt sich am Beispiel von Kreuzexpressionsexperimenten mit pEBP18-SA343 (Tröschel, 2010). Das, wie oben aufgeführt, zu haemolyti-

scher Aktivität von *E. coli* führende Plasmid wurde dazu aus diesem Stamm isoliert und in *P. putida* und *B. subtilis* übertragen. In beiden Fällen war keine Aktivität detektierbar, d.h. sehr wahrscheinlich wurde kein N-Acyltyrosin produziert. Dieser *different host-different hit effect* kann im Allgemeinen in Unterschieden der aktiven Expression z.B. durch unterschiedlich effiziente Promotorerkennung und Translation oder Fehlfaltung der Proteine begründet sein. Daneben können auch Probleme bei Cofaktorbeladung, posttranslationaler Modifikation oder, im Falle von Metabolitsynthesewegen, bei der Bereitstellung von Vorläufermetaboliten bzw. Resistenzen gegen toxische Effekte der Metaboliten die Ursache für diesen Effekt sein (Craig *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2004; Troeschel *et al.*, 2012). Bisher kann nicht ohne experimentelle Daten vorhergesagt werden, welcher Expressionswirt am besten geeignet ist für die Produktion eines bestimmtes Genprodukts (Bernaudat *et al.*, 2011; Terpe, 2006). So führt z.B. die Expression eines in dieser Arbeit beschriebenen NAS-Gens in *P. putida* wie erwähnt nicht zur Produktion von Biotensiden, in anderen Fällen funktioniert die Produktion von N-Acylaminosäuren mit NAS in *P. putida* genauso effizient wie in *E. coli* (Craig *et al.*, 2010).

Damit bietet das hier vorgestellte System die Möglichkeit eines umfassenden Ansatzes, der sowohl die Konstruktion der Bank und das *Screening*, als auch Produktion des Metaboliten in größeren Maßstäben in einem Plasmid/Wirtsorganismus-System ermöglicht, ohne dass Amplifizierung und Umklonierung notwendig wären.

Aminosäure basierte Tenside wie N-Acylaminosäuren erfahren steigendes Interesse, da sie aus erneuerbaren Ressourcen hergestellt werden können und biologisch abbaubar sind, somit als *biobased surfactants* dem Gedanken der Nachhaltigkeit Folge leisten (Infante *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2010; Pinazo *et al.*, 2011; Reznik *et al.*, 2010). Dazu besitzen sie vor allem für Anwendungen in Kosmetik, Pharmaka und Nahrungsmitteln interessante Eigenschaften (Pinazo *et al.*, 2011; Tavano *et al.*, 2013), wie auch durch mehrere Patente bezüglich der Verwendung von N-Myristoyltyrosin, also eben jenen in dieser Arbeit behandelten Tensids, in Kosmetika deutlich wird (Breyfogle & Finley, 2012; Doering *et al.*, 2006; Jager *et al.*, 2004).

Bisherige Ansätze für die Produktion dieser Tensidklasse behandelten rein chemische Synthesewege oder Synthese mittels Enzym-Katalyse *in vitro* (Aha, 2010; Clapés & Infante, 2002; Pinazo *et al.*, 2011). Für letztere wurde bisher vor allem auf Lipasen zurückgegriffen, die NAS könnten hier eine sinnvolle Erweiterung der *Toolbox* bieten. Bisher wurden

allerdings noch keine Studien zur *in vitro*-Aktivität von NAS durchgeführt. Ganzzellproduktion für N-Acylaminosäuren in größerem Maßstab ist bisher noch nicht beschrieben, vermutlich da aufgrund des einfachen Aufbaus dieser Moleküle und der damit verbunden unproblematischen Synthese (Aha, 2010; Infante *et al.*, 2004) das Bestreben, Alternativen zu den beschriebenen *in vitro* Methoden zu entwickeln, nicht besonders groß ist.

Allerdings zeigte der Vergleich der tensidischen Eigenschaften zwischen reinem N-Myristoyltyrosin und dem isolierten Biotensid (Abb. 3.2. 17), dass diese sich unterscheiden. Hier könnte ein Ansatzpunkt für den biotechnologischen Einsatz des N-Acyltyrosinbiotensids liegen, falls für spezielle Anwendungen die Eigenschaften des Kongenergemisches im Biotensid interessanter sind als die eines Reinstoffs.

In jedem Fall wäre es aber zunächst interessant, die Ausbeute an N-Acyltyrosin zu verbessern. Da die Ergebnisse des Kirby-Bauer-*Assay*s mit bis zu 250 µg Myristoyltyrosin darauf hindeuten, dass *E. coli* nicht besonders empfindlich gegenüber diesem *Biosurfactant* ist (3.2.8), wird bei 60 mg/L wohl noch keine kritische Konzentration erreicht worden sein.

Acylcarrierproteine bieten einen Ansatzpunkt für eine weitere Optimierung der N-Acyltyrosinproduktion in *E. coli*. Da die *de novo*-Fettsäuresynthese und damit die ACP-Bildung hauptsächlich in der logarithmischen Wachstumsphase stattfindet (Brady *et al.*, 2002; Lennen & Pfleger, 2012), könnte eine zusätzlich Expression von ACPs oder die Expression in zur Fettsäureproduktion optimierten *E. coli*-Stämmen durch eine vermehrte Bereitstellung von Substraten auch während der stationären Phase zu höheren Erträgen führen (Brady *et al.*, 2002). Eine weiteres mögliches Ziel ist die Steuerung von Transkription und Translation (De Mey *et al.*, 2010; Ravasi *et al.*, 2012). In den bisherigen Versuchen zur Produktion wurde *nas343* bzw. *nas354* unter Kontrolle des nativen Promotors und unter Nutzung der eigenen Ribosomenbindestelle (RBS) exprimiert (2.5.2.3, 3.2.2). Optimierung von Promotorsequenzen und RBS können zu erheblichen Steigerungen der Ausbeute an gewünschten Genprodukten führen (Anderson *et al.*, 2010; Wittgens, 2013).

Doch nicht nur von molekularbiologischer Seite gibt es noch Optimierungsmöglichkeiten, auch die Verfahrenstechnik bietet vermutlich Potential, eine Verbesserung der Ausbeuten zu erreichten, z.B. über Optimierung der Kultivierungsbedingungen, ein Punkt der bisher kaum untersucht wurde. So kann beispielsweise das Zufüttern von Vorläufermetaboliten zu höheren Ausbeuten an Sekundärmetaboliten aus heterologer Expression führen (Liu *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2011). Konkret würde dass hier bedeuten, dass eine vermehrte

Zugabe von Tyrosin zum Medium einen positiven Effekt haben könnte. Ob eine Supplementierung des Mediums mit Lipiden oder Fettsäuren ebenfalls Auswirkungen hätte, erscheint fraglich, da für die Produktion des N-Acyltyrosins durch Bindung an Acylcarrierproteine aktivierte Fettsäuren benötigt werden. Vermutlich werden von außen aufgenommene Fettsäuren eher über β-Oxidation (das impliziert Bindung an CoA) abgebaut als an ACP gebunden. Ein Einbau auch von aufgenommenen Fettsäuren in Membranphospholipide ist für mehrere Bakterien wie *Rhodobacter capsulatus* und auch *E. coli* bereits publiziert (Katzke, 2010; Morita *et al.*, 2005), zumindest bei letzterem ist der Einbau aber in der Affinität der Acyltransferasen zur Phospholipidsynthese sowohl zu Acyl-ACP als auch zu Acyl-CoA begründet (Zhang & Rock, 2008). Ob diese Austauschbarkeit der Substrate auch bei anderen Fettsäuren transferierenden Enzymen gegeben ist, erscheint fraglich. In Bezug auf die Rhamnolipidproduktion in *P. aeruginosa* konnte jedoch gezeigt werden, dass Zugabe von Ölen oder Fettsäuren zum Medium nicht nur eine Steigerung der Biotensidproduktion bewirkt, sondern dass die aufgenommen Fettsäuren über einen mutmaßlichen Bypass von der β-Oxidation zur *de novo* Synthese von Fettsäuren teilweise auch in die Rhamnolipide inkorporiert werden (Zhang *et al.*, 2012). Möglicherweise existiert in *E. coli* eine ähnliche Verzahnung beider Stoffwechselwege.

Sofern NAS343 und NAS354 tatsächlich durch die Bindung von c-di-GMP an die C-terminale Domäne aktiviert werden sollten (3.2.8), was bisher noch nicht untersucht worden ist, könnte durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration dieses *messengers* die Produktion von N-Acyltyrosin ebenfalls gesteigert werden. Da die Zugabe von bestimmten Antibiotika (z.B. Ampicillin oder Gentamycin) unterhalb der noch inhibierenden Minimalkonzentration zu einen massiven Anstieg der c-di-GMP-Level in den Zellen führt (Ho *et al.*, 2013), läge hier vielleicht eine weitere relativ einfache Ansatzmöglichkeit, die Ausbeute an Biotensid zu verbessern. Darüber hinaus bieten wahrscheinlich auch Fedbatch-Kultivierungen in Bioreaktoren bessere Bedingungen als die hier durchgeführten Versuche im Schüttelkolben, so dass dadurch ebenfalls eine Ertragsteigerung zu erwarten ist.

Unabhängig vom N-Acyltyrosin im Speziellen konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass durch funktionelles *Screening* von Metagenombanken auf Produktion oberflächenaktiver Substanzen neue Biotenside identifiziert werden können. In Zukunft könnte dazu neben dem hier verwendeten Plasmid der pEBP-Serie (3.2.1.2) auch der Vektor

pCEV2 (3.2.1.1) zur Expression großer Biosynthesecluster für funktionelle *Screenings* eingesetzt werden. Dieser könnte damit zur Entdeckung eines weiten Spektrums interessanter Substanzen einschließlich komplexerer Moleküle wie beispielweise Lipopeptidbiotensiden dienen, da dieser Vektor die Expression größerer Metagenomfragmente als im Rahmen dieser Arbeit genutzt ermöglicht.

Auf diese Weise könnten bei der Durchmusterung von Metagenombanken mit DNA aus weiteren für das Vorkommen biotensidproduzierender Mikroorganismen vielversprechenden Lebensräumen wie Hochmooren, ölkontaminierten Böden und anderen hydrophoben Habitaten oder auch schwermetallreichen Umgebungen (Bodour *et al.*, 2003; Saravanan & Vijayakumar, 2012; Soberón-Chávez & Maier, 2011; Willumsen & Karlson, 1997) neue, auch für biotechnologische oder pharmazeutische Anwendungen interessante Biotenside ans Tageslicht kommen.

- **Erstmals konnte erfolgreich ein funktionales Metagenombankscreening auf Biotensidproduktion durchgeführt werden.**
- **Die identifizierten Biotenside (N-Acylaminosäuren) gehören zu einer bisher nicht unter diesem Gesichtspunkt betrachteten Klasse von Metaboliten.**
- **Biosynthese, Struktur und einige Eigenschaften wurden aufgeklärt, was die Grundlage für künftige heterologe Produktionsprozesse und Anwendungen liefert.**

3.3.2 Produktion des Lipopeptids Serrawettin W1

Bereits für einige Anwendungen als vielversprechend erwiesen hat sich Serrawettin W1, ein Lipopeptid-Biotensid, das durch einige *Serratia marcescens*-Stämme produziert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Biosynthese dieses Biotensids durch *S. marcescens* DSM12481 (3.1.1) erstmals nachgewiesen werden, daneben wurde die heterologe Produktion in *E. coli*, *E. billingiae* und *P. putida* etabliert (3.1.3 bis 3.1.5). Für dieses Biotensid sind neben antimikrobiellen Eigenschaften (Kadouri & Shanks, 2013; Shemyakin *et al.*, 1965; Wasserman *et al.*, 1962; Wieland & Bodanszky, 1991), die für viele Biotenside publiziert worden sind, auch mögliche Anwendungen im Pflanzenschutz

(Strobel *et al.*, 2005) und Apoptose induzierende Effekte bei Tumorzellen (Escobar-Díaz *et al.*, 2005; Soto-Cerrato *et al.*, 2005) beschrieben. Daneben ist von *C. elegans* eine Vermeidung von Serrawettin assoziierten Strukturen publiziert (Pradel *et al.*, 2007), eventuell ergibt sich aus diesem Verhalten eine praktische Anwendung in der Abwehr von Nematoden, die eine bedeutende Klasse von Pflanzen- und Tierparasiten darstellen (Bird & Opperman, 2009; Haegeman *et al.*, 2012).

Dazu gibt es Hinweise auf eine Einsatzmöglichkeit in der Remediation ölkontaminierter Flächen oder in *Microbial Enhanced Oil Recovery* (Anyanwu *et al.*, 2011a; Pérez-Armendáriz *et al.*, 2013). Eine Identifizierung des für die Emulsionen in den genannten Studien verantwortlichen *S. marcescens*-Biotensids wurde in diesen Fällen allerdings nicht durchgeführt, somit bleibt noch unklar, ob hier Serrawettin W1 beteiligt war.

Patente zu einigen Anwendungen dieses Biotensids unterstreichen das biotechnologische Interesse an Serrawettin W1/Serratamolide (Perez *et al.*, 2005; Strobel *et al.*, 2005).

Die molekularen Hintergründe der Biosynthese von Serrawettin sind bislang unklar oder beruhen auf Vermutungen auf Basis von Vergleichen mit der Biosynthese anderer nichtribosomaler Peptide, hier erscheinen weitere Untersuchungen zu Regulation und Biosynthesemechanismus als sinnvoll. So ist z.B. bisher nicht experimentell nachgewiesen, dass aktivierte β-Hydroxyfettsäuren, wie vermutet, durch ACP bereitgestellt werden, wie es für die Synthese anderer Lipopeptide publiziert ist (Chooi & Tang, 2010). Die Anwesenheit des D-Enantiomers der β-Hydroxyfettsäuren spricht für die Herkunft dieser Vorläufermetaboliten aus der Fettsäuresynthese, womit eine Bindung an ACP wahrscheinlich ist (im Gegensatz zu L-β-Hydroxyfettsäuren, die aus dem Fettsäureabbau stammen (Lang & Trowitzsch-Kienast, 2002)). Jedoch ist für die Biosynthese von Surfactin, einem Lipopeptid-Biotensid aus *Bacillus* publiziert, dass die Methyl-(D)-β-Hydroxyfettsäuren, die Bestandteil dieses nichtribosomal gebildeten Peptides sind (Nagal *et al.*, 1996; Pagadoy *et al.*, 2005), durch CoA bereitgestellt werden; es wurden daneben spezifische Fettsäure-CoA-Ligasen identifiziert, welche die Synthese dieses Substrats katalysieren (Chooi & Tang, 2010; Kraas *et al.*, 2010).

Neue Einblicke in die Biosynthese könnte eine Aufklärung der Struktur von SwrW liefern. Die Kristallisierung von SrfAC, der terminalen NRPS in der Synthese von Surfactin (Tanovic *et al.*, 2008), die in Größe und Domänenarchitektur soweit Ähnlichkeiten zu SwrW aufweist, dass durch Phyre2 auf Grundlage dieser Struktur ein Strukturmodel von SwrW be-

rechnet werden kann, zeigt, dass es möglich wäre, ein solch relativ komplexes Protein zu kristallisieren. SrfAC katalysiert den Einbau von Leucin an Position Sieben der Peptidkette, den Ringschluss und die Freisetzung des Moleküls vom NRPS-Komplex. Die Erkennung und Bindung der β-Hydroxyfettsäure an Glutamat1 erfolgt jedoch nicht durch dieses Protein, sondern durch SrfAA. Damit unterscheidet sich dieses Protein funktional von SwrW, dass, wie beschrieben, zwei Serinreste und zwei β-Hydroxyfettäuren erkennt und verknüpft, bevor es zum Ringschluss und Thioesterasereaktion kommt (1.2.3). Deshalb ist ein auf Grundlage von SrfAC erstelltes Modell der Struktur mit einiger Vorsicht zu betrachten und fundiertere Mutmaßungen über mögliche Bindetaschen und den Reaktionsmechanismus von SwrW sind wohl erst nach der Aufklärung der Struktur dieses Proteins möglich.

Weitere Erkenntnisse zu Biosynthese und Sekretion von Serrawettin W1 und deren Regulation in *S. marcescens* könnten in den nächsten Jahren gewonnen werden, da seit kurzem die Genomsequenzen von vier Stämmen dieser Spezies publiziert sind (Aylward *et al.*, 2013; Kuo *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013a; Lucas *et al.*, 2013), von denen drei (*S. marcescens* WW4, *S. marcescens* VGH107 und *S. spec.* AS12) nach BLAST-gestützter Analyse als putative Serrawettin W1-Produzenten eingestuft werden konnten, da sie Gene für SwrW-homologe Proteine besitzen. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt, durch Anwendung von *Polyomics* Einzelheiten zu den in die Synthese involvierten Genen und deren Regulation zu erhalten.

Damit ergäben sich vermutlich auch Ansatzmöglichkeiten zur Optimierung der Ausbeute z.B. durch Stärkung von Sekretionsmechanismen oder Manipulation von regulatorischen Elementen wie Transkriptionsfaktoren. Zur Steigerung der Produktion in *S. marcescens* ist auch eine plasmidgesteuerte Expression von *swrW* unter der Kontrolle künstlicher Promotoren möglich, da für dieses Bakterium bereits mikrobiologische Methodik publiziert ist (Reid *et al.*, 1982; Shanks *et al.*, 2012). Eventuelle posttranskriptionale Regulationsmechanismen, falls vorhanden, können damit allerdings nur eingeschränkt umgangen werden.

Aufgrund des Potentials von *S. marcescens*, nosokomiale Infektionen zu verursachen (Berthelot *et al.*, 1999; Hejazi & Falkiner, 1997; Voelz *et al.*, 2010) und antibiotikaresistente Stämme zu entwickeln (Mahlen, 2011; Maragakis *et al.*, 2008; Suh *et al.*, 2010), erscheint es, wie in 3.1.2ff bereits angeführt, nicht nur zur Umgehung von komplexen Regu-

lationsmechanismen zur Biotensidproduktion als sinnvoll, Alternativen für die Produktion von Serrawettin W1 zu entwickeln. Vielversprechende Strategien sind die Nutzung nicht pathogener natürlicher Produzenten von vergleichbaren Substanzen, sowie die heterologe Produktion in sicheren Produktionsstämmen.

E. billingiae Eb661, ein epiphytisches Bakterium (Kube *et al.*, 2010), besitzt als einziger der in der Genbank hinterlegten Organismen außerhalb des Taxon *S. marcescens* ein zu SwrW über die volle Länge homologes Protein (Abb. 3.1. 5), zu dem allerdings keine weiteren Studien publiziert wurden. Hier konnte erstmals die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch diesen Organismus nachgewiesen werden (3.1.2), allerdings konnte bisher noch nicht gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Serrawettin W1-ähnliches Lipopeptid handelt. Weitere Studien dazu werden in Kooperation mit dem KIT in Karlsruhe und der Universität Hohenheim durchgeführt. Auch die Funktionalität des zu SwrW-homologen Proteins allein konnte noch nicht gezeigt werden, da nach Expression des Gens in *E. coli* keine spezifischen Signale in einer DC-Analyse von Überstandsextrakten zu sehen waren. Die genaueren Hintergründe dafür, z.B. ob das Problem in ineffizienter Expression oder mangelnder Aktivität des produzierten Proteins unter den gegebenen Bedingungen liegt, wurden bisher nicht weiter untersucht.

Dem zu Folge bleibt bislang experimentell ungeklärt, ob durch dieses Enzym tatsächlich β-Hydroxyacylserin-Biotenside synthetisiert werden, wie es durch *in silico*-Analyse (BLAST, NRPS-predictor) nahe gelegt wird. Weitergehende *in silico*-Untersuchungen der genetischen Umgebung des putativen NRPS-Gens (EbC_6320) ergaben aber noch einige interessante Ansatzpunkte für weitergehende Studien. So ist in unmittelbarer Nachbarschaft (EbC_0630 bis EbC_0670) das Gencluster eines ABC-Transportersystems lokalisiert, das laut BLAST Homologien zu Transportsystemen für verzweigte Aminosäuren aufweist. Interessant ist, dass homologe Gene (mit > 80% Identität für das Gen des Substratbindeproteins) auch in den Genomen von *S. marcescens*-Stämmen zu finden war (allerdings nicht in Nachbarschaft zu *swrW*), aber nicht in dem mit *E. billingiae* nach 16S-rRNA-Analyse noch näher verwandten *E. coli*. Es kann spekuliert werden, ob dieses Sekretionssystem in den Transport von Cyclodepsipeptiden involviert ist.

Neben dem Transportsystem fiel bei der Betrachtung der genetischen Umgebung auf, dass augenscheinlich keine Ribosomenbindestelle (RBS) in dem gewöhnlichen Abstand von durchschnittlich 7-8 Nukleotiden vor dem annotierten Startcodon (Berwal *et al.*,

2010) zu finden war, auch nicht in der daraufhin untersuchten 200 bp langen Region *upstream*. Dafür ist eine mutmaßliche RBS unmittelbarvor dem Startcodon zu finden, was vermuten lässt, dass zur Translationsinitation hier nicht ATG/AUG, sondern das 6 Basenpaare *downstream* zu findende alternative Startcodon TTG/UUG (Weyens *et al.*, 1985) genutzt wird (Abb. 3.3. 1).

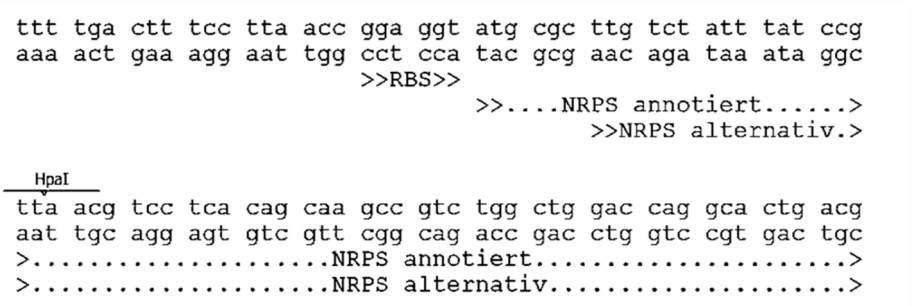


Abb. 3.3. 1 DNA Sequenz um den Start des putativen NRPS-Gens aus *E. billingiae*. Eingetragen sind der annotierte Translationsstart, die mutmaßliche Ribosomenbindestelle (RBS) und ein alternativer Transkriptionsstart.

Auch wenn noch nicht experimentell nachgewiesen werden konnte, das *E. billingiae* natürlicherweise in der Lage ist, ein zu Serrawettin W1 ähnliches Biotensid zu produzieren, die Eignung des Stammes als Produktionsstamm für das *Serratia*-Lipopeptid konnte dagegen eindeutig gezeigt werden (3.1.4.2).

Die hier erstmals systematisch untersuchte heterologe Produktion dieses Biotensids konnte damit in drei unterschiedlichen Spezies erfolgreich etabliert werden, in *E. coli*, *P. putida* und eben *E. billingiae* (3.1.5).

Auch wenn absolute Angaben zur Ausbeute aus den Flüssigkulturen noch nicht verfügbar sind, ist eine Optimierung der Produktionsraten im Rahmen zukünftiger Arbeiten sicherlich als sinnvoll zu bewerten, da das Haupthindernis für einen weitreichenden Einsatz von *Biosurfactants* bisher die geringen Ausbeuten und, damit verbunden, hohe Produktionskosten sind (Soberón-Chávez & Maier, 2011; Syldatk & Hausmann, 2010). Bisher durchgeführte direkte Vergleiche der drei Expressionsstämme durch das *atomized oil assay* deuteten darauf hin, dass *E. coli* BL21 Gold als optimierter Expressionsstamm die besten Ergebnisse verspricht (3.1.5). Es ist aber noch nicht klar, ob diese Beobachtung auf Schüttelkolben- oder Bioreaktorkulturen übertragbar ist. Zunächst ist deshalb grundsätzlich eine weitere Evaluierung der drei Produktionsstämme in Hinsicht auf die Ausbeuten an gewünschtem Biotensid geplant.

Allerdings werden zumindest die beiden genauer betrachteten Stämme *E. coli* und *E. billingiae* durch die Expression von *swrW* und die Produktion von Serrawettin W1 wahrscheinlich sehr starkem Stress ausgesetzt: Eine Expression mit starkem Promotor führte zu unlöslich akkumuliertem Protein (in *E. coli*), eine Kultivierung bei höheren Temperaturen (37°C) hatte vermutlich denselben Effekt (bei *E. coli*) oder resultierte in einem Absterben der Zellen (bei *E. billingiae*), in keinem dieser Fälle wurden oberflächenaktive Substanzen produziert (3.1.3f). So ist klar, dass die Expression der Serrawettinsynthetase wahrscheinlich sorgfältig dosiert werden muss, um optimale Produktion des Biotensids zu gewährleisten. Wie im Ausblick zu den N-Acyltyrosinen (3.3.1) bereits dargelegt, stellen das *Screening* nach optimalen Promotoren und RBS eine sinnvolle Strategie dar, da Promotorstärke in Kombination mit Gendosierungs-Effekten wohl großen Einfluss auf die Effektivität der Serrawettin-Produktion hat. Dies wurde hier bei Anwendung unterschiedlicher Promotoren und Gendosen, resultierend aus der unterschiedlichen Kopienzahl der verwendeten Vektorsysteme pMMB/pVLT und pET, deutlich (3.1.3). Diese Ergebnisse bedeuten auch, dass, wie es auch für andere Proteine beschrieben ist (Georgiou & Valax, 1996; Saïda, 2007; Wagner *et al.*, 2008), ein stärkerer Promotor nicht gleichbeutend ist mit größeren Mengen aktiver Serrawettinsynthetase und schlussendlich mit größeren Ausbeuten des Sekundärmetaboliten. Der optimale Promotor für diese Anwendung müsste demnach noch ermittelt werden, vergleichbar zum pSynPro-*Screening* mit künstlichen Promotorsequenzen, mit dessen Hilfe eine Steigerung der heterologen Rhamnolipidproduktion in *P. putida* etwa um den Faktor drei erreicht werden konnte (Wittgens, 2013). Ähnliche Optimierungsscreenings sind wohl auch für RBS denkbar, wie die im *Registry of Standard Biological Parts* des iGEM-Projekts hinterlegte Anzahl von unterschiedlich aktiven RBS-Sequenzen deutlich macht (http://parts.igem.org/ (Anderson *et al.*, 2010)).

Zudem könnten die Expressionsstämme durch *strain engineering* optimiert werden. So wäre denkbar, die für die Serrawettin-Synthese verfügbare Menge an β-Hydroxyfettsäuren zu erhöhen, in dem die Fettsäuresynthese noch künstlich verstärkt wird. Eine natürliche Hochregulierung der Fettsäuresynthese scheint zumindest in *E. coli* bei heterologer Produktion von β-Hydroxyfettsäure enthaltenden Metaboliten, wie z.B. Rhamnolipid-Vorläufermolekülen, in einem gewissen Maße schon stattzufinden, um die für den wirtseigenen Membranaufbau benötigte Menge bereitzustellen (Zhu & Rock, 2008). Ein weiterer Weg zur Vergrößerung des Fettsäurepools ist das Ausschalten von

anderen um β-Hydroxyfettsäuren konkurrierenden, aber nicht essentiellen Prozessen. Ein gutes Beispiel dafür sind die Polyhydroxyalkanoatsynthese deffizienten *Pseudomonas*-Stämme zur optimierten Rhamnolipidproduktion (Wittgens, 2013; Wittgens *et al.*, 2011). Dazu wird an weiterer Optimierung der Kultivierungsbedingungen durch Zusatz von Vorläufermetaboliten in Kulturmedien (Serin und Lipide/Fettsäuren, wie bereits oben diskutiert (3.3.1)) sowie Bioreaktor- anstelle von Schüttelkolbenkultivierung gearbeitet.

Im Hinblick auf spätere biotechnologische Produktionsprozesse in größeren Skalen wäre die Konstruktion von Produktionsstämmen mit in das Genom integriertem *swrW* einschließlich optimaler *upstream*-Region (s.o.) sinnvoll, um die Notwendigkeit des ständigen Selektionsdrucks durch Antibiotikazugabe bzw. gegebenenfalls auch die Notwendigkeit der Induktion durch IPTG zu umgehen, was die Produktionsprozesse einfacher und kostengünstiger machen würde.

Da die Aufreinigung interessanter bioaktiver Moleküle in vielen Fällen den größten Kostenfaktor bei Produktionsprozessen ausmacht (Mukherjee *et al.*, 2006) und somit einen bedeutenden Punkt auf dem Weg zu biotechnologischen Anwendungen darstellt, ist neben der Optimierung der Produktion auch noch Verbesserungsbedarf im *downstream processing* zu sehen, da bisher unseres Wissens noch kein Verfahren publiziert ist, um Serrawettin W1 in größerem Maßstab ausreichend rein aus Kulturen zu gewinnen, um z.B. die chemo-physikalischen Eigenschaften dieses Biotensids zu untersuchen.

Denn interessanterweise wurden bisher, unserem Wissen nach, kaum Studien zu den Tensideigenschaften von Serrawettin W1 veröffentlicht. Die ermittelte Absenkung der Oberflächenspannung an der Phasengrenze Saline/Luft auf 32,2 mN/m bei einer Konzentration von 0,001 % (Matsuyama *et al.*, 1986) liegt im Bereich anderer Biotenside (Van Bogaert *et al.*, 2011; Lang, 2002; Parkinson, 1985). Bei anderen Studien zu Oberflächenaktivität und Emulsionseigenschaften von *S. marcescens*-produzierten *Biosurfactants* (Anyanwu *et al.*, 2011a; Pérez-Armendáriz *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2004) wurde bisher auf eine genaue Bestimmung der Substanz verzichtet, so das nicht klar wird, ob es sich bei den isolierten Biotensiden um Serrawettin W1, W2, W3 oder um die von manchen *S. marcescens*-Stämmen produzierten Glycolipide (Anyanwu *et al.*, 2011b; Pruthi & Cameotra, 1997) handelte.

Die geringe Anzahl der Studien zu Biotensideigenschaften ist umso bemerkenswerter, da es sich hier um ein nichtionisches Tensid handelt, wohingegen viele andere Biotenside bei

neutralen pH-Werten anionisch sind, wie z.B. Rhamnolipide, Surfactin, die oben beschriebenen N-Acylaminosäuren oder die offene Form der Sophorolipide. Nichtionische Tenside im Allgemeinen machen 44% des weltweiten Tensidmarktes aus (BASF, 2012, Abb. 3.3. 2), mit weiter steigender Tendenz (Ceresana, 2012). Sie sind in ihren Tensideigenschaften, im Gegensatz zu den geladenen Tensiden, unabhängig von Salzkonzentrationen, also der Wasserhärte. Außerdem sind sie oft hautfreundlicher, was für Anwendungen in Kosmetika positiv ist. So wurden, um wieder zu den Biotensiden im Speziellen zurückzukommen, bei Mannosylerythritollipiden, nichtionischen Glycolipiden, exzellente *Moisturizing*-Eigenschaften und haut- sowie haarpflegende Effekte beschrieben (Morita *et al.*, 2010, 2013; Yamamoto *et al.*, 2012).

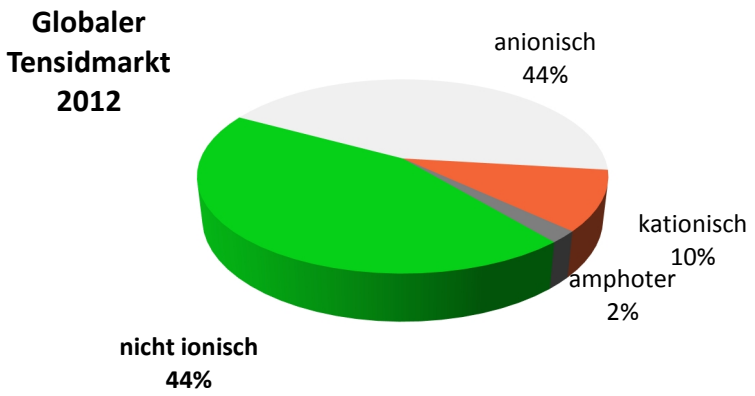


Abb. 3.3. 2 Marktanteile der verschiedenen Tensidarten am globalen Tensidmarkt im Jahr 2012 nach Angaben der BASF (Quelle: www.basf.de/schule, BASF, The Chemical Company).

Die Bestimmung der chemo-physikalischen Eigenschaften von Serrawettin W1 wäre demnach ein wichtiger Schritt, um die potentielle Eignung dieses Biotensids für biotechnologische Anwendungen zu bewerten. Möglicherweise zeigt es aufgrund seines Aufbaus auch Eigenschaften von Gemini-*Surfactants*, Dimeren aus Tensidmolekülen, die in den letzten Jahren in den Fokus der Tensidforschung gelangt sind und in Folge ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften viel Aufsehen erregt haben (Kumar & Tyagi, 2013; Rosen & Tracy, 1998).

Das Produktportfolio zu Serrawettin W1 ließe sich auch noch erweitern, da Serrawettin W1 durch alkalische Hydrolyse sehr einfach in Serrataminsäuren (Abb. 3.3. 3) zu spalten ist (Cartwright, 1955, 1957; Wasserman *et al.*, 1962). Für diese Verbindung sind ebenfalls interessante Eigenschaften beschrieben, wie z.B. Inhibierung von Phagocytose (Miyazaki

et al., 1993). Eine intensivere Charakterisierung dieser Substanz, z.B. bezüglich ihrer tensidischen Eigenschaften, ist in den Jahrzehnten seit der Erstbeschreibung ebenfalls nicht weiter fortgeführt worden; es ist aber zu vermuten, dass dieses kleinere und anionische Molekül ganz andere Eigenschaften aufweist als Serrawettin W1. Vergleichbares ist für Sophorolipide bekannt, die von *Starmerella bombicola* hauptsächlich in der geschlossenen, nichtionischen Lactonform produziert werden (Asmer *et al.*, 1988). Diese Lactonform lässt sich aber, ebenfalls durch alkalische Hydrolyse, in die anionische Säureform konvertieren, die aufgrund veränderter Eigenschaften für viele Anwendungen besser geeignet ist (Van Bogaert & Soetaert, 2011; Van Bogaert *et al.*, 2007; Inoue, 1988). Somit ist es

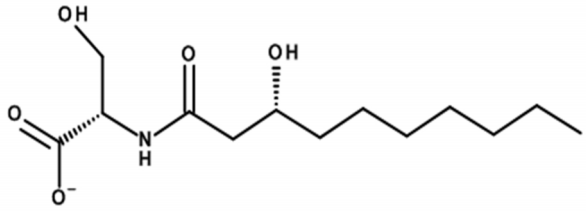


Abb. 3.3. 3 Struktur der Serrataminsäure (N-(3-Hydroxydecanoyl)serin) nach (Cartwright, 1957)

möglich, mit der Produktion eines mikrobiellen Tensides ohne großen zusätzlichen Aufwand, zwei unterschiedliche Biotenside zugänglich zu machen.

Darüber hinaus vergrößern die in 3.1.6 beschriebenen unterschiedlichen Kongenerspektren von Serrawettinen, die aus den Kulturen verschiedener Spezies gewonnen wurden, mutmaßlich die Diversität an Serrawettin W1-Biotensiden. Falls die Unterschiede in der Zusammensetzung auch unterschiedliche chemo-physikalische Eigenschaften der Gemische bedingen, was nach Literaturlage zu vermuten ist (Nitschke *et al.*, 2005; Soberón-Chávez & Maier, 2011; Youssef *et al.*, 2005), könnte nach gewünschten Eigenschaften die Auswahl des Produktionsstamm erfolgen. Sollte eine noch durchzuführende Analyse des von *P. putida*, einem etwas weitläufiger mit *S. marcescens* verwandten Bakteriums, produzierten Serrawettin W1 eine gegenüber den übrigen Wirten wieder abweichende Zusammensetzung ermittelt werden, stünden vier unterschiedliche Systeme für die gezielte Produktion bestimmter Serrawettin W1-:Gemische zur Verfügung: *S. marcescens* DSM12481, *E. coli* BL21 Gold, *E. billingiae* Eb661 und *P. putida* KT2440.

- ***S. marcescens* DSM12481 produziert Serrawettin W1 mit bisher unpublizierten Kongeneren**
- **Mit *E. billingiae* konnte nach Sequenzhomologievergleichen ein bisher unbekannter S1-Biotensidproduzent identifiziert werden.**
- **Heterologe Produktion von Serrawettin W1 zur Umgehung von Pathogenität und natürlicher Regulationsmechanismen konnte in mehreren Stämmen etabliert werden, womit die Grundlage für zukünftige Studien zur Produktion und Anwendung dieses Biotensids gelegt ist.**
- **Die genaue Zusammensetzung des Serrawettins aus den unterschiedlichen Produktionsstämmen unterschied sich geringfügig in den Vorkommen bestimmter Fettsäurespezies.**

4 Zusammenfassung

Tenside sind von immenser Bedeutung für Industrie-, Pharma- und alltägliche Haushaltsanwendungen. Bis heute werden die meisten Tenside auf Basis von Erdöl hergestellt. In Folge des Nachhaltigkeitsgedanken gibt es aber ein steigendes Interesse an auf nachwachsenden Rohstoffen basierenden oberflächenaktiven Substanzen. Zu diesen gehören die mikrobiell, z.B. von Organismen der Gattungen *Starmerella*, *Ustilago*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, produzierten Biotenside, die sich durch gute biologische Abbaubarkeit, geringe Toxizität und ihre strukturelle Mannigfaltigkeit auszeichnen. Diese Eigenschaften führen zu einer Vielzahl von potentiellen Anwendungsmöglichkeiten für Vertreter dieser Klasse von Sekundärmetaboliten. Daher ist es sinnvoll, weitere Biotenside für biotechnologische Prozesse zu entdecken und durch geeignete Produktionsstrategien zu erschließen, um das für bekannte und neue Anwendungen verfügbare Portfolio zu erweitern.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Produktion von Serrawettin W1 auch für *Serratia marcescens* DSM12481, das eine neue Variante der Serrawettinsynthetase SwrW besitzt, gezeigt werden. Serrawettin W1 ist ein rotationssymmetrisches Cyclodepsipeptid aus zwei Serin- und zwei β-Hydroxyfettsäureresten mit hoch interessanten Eigenschaften, für das aber bisher kaum Studien bezüglich der Bereitstellung für die Biotechnologie durchgeführt wurden. Hier konnten im isolierten Biotensid durch HPLC-MS bislang unbekannte Kongenere des Lipopeptids mit längeren Fettsäuren identifiziert werden. Aufgrund der Humanpathogenität des homologen Wirtes *S. marcescens* und der komplexen Regulation der Biotensidproduktion in diesem Stamm wurden hier auch alternative Produktionssysteme evaluiert, um diese möglichen Hindernisse für biotechnologischen Einsatz zu umgehen. Erstmals konnte in dieser Arbeit die Produktion von Serrawettin W1 erfolgreich in den heterologen Wirten *Erwinia billingiae*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* etabliert werden.

Dabei erwies sich die Expression nur eines einzelnen Gens (*swrW*) aus *S. marcescens* DSM12481 als ausreichend zur erfolgreichen heterologen Produktion. Weitere Arbeiten ergaben, dass entscheidende Voraussetzungen für die funktionelle Expression der nichtribosomalen Peptidsynthetase SwrW in allen Expressionssystemen eine Transkriptionskontrolle durch einen schwächeren Promotor und eine Kultivierung bei 30°C waren. Es fiel auf, dass sich die Serrawettin W1-Kongenerzusammensetzung der Isolate aus den verschiedenen Produktionswirten geringfügig unterschieden und so eine weitere Diversifizie-

rung der Biotensid-Palette erreichbar ist. Zudem wurde hier erstmalig gezeigt, *dass E. billingiae* auch selbst oberflächenaktive Substanzen produziert.

Alternativ wurde erstmals ein Metagenomscreening als Strategie zur Detektion gänzlich unbekannter Biotenside durchgeführt. Neben der Herstellung und Etablierung geeigneter molekularer Werkzeuge und *Assay*-Methoden konnten in dieser Arbeit erstmals Biotensid produzierende Klone in einer Metagenombibliothek detektiert werden. Bei zwei Klonen konnte die Produktion von N-Acyltyrosin, hauptsächlich N-Myristoyltyrosin, nachgewiesen werden. Dieser Sekundärmetabolit, der bisher nur für seine antibakteriellen Eigenschaften beschrieben wurde, zeigte nach Analyse der chemo-physikalischen Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit eindeutig Tensidcharakteristika. Auch die heterologe Synthese dieser Biotenside konnte hier aufgeklärt werden und ist katalysiert durch zwei neue Mitglieder der N-Acylaminosäuresynthase-Familie, klassifiziert durch Strukturhomologien. Neben den Tensideigenschaften weist N-Acyltyrosin wachstumshemmende Eigenschaften bei einem breiten Spektrum von Bakterien auf und besitzt somit relevante Charakteristika, auch in Bezug auf eine mögliche biotechnologische Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Biotenside identifiziert, der sinnvolle Einsatz von Metagenomdurchmusterung zur Detektion neuer Biotenside nachgewiesen und die heterologe Produktion von Biotensiden durch Expression einfacher Synthesewege entwickelt.

Die Grundlagen für eine biotechnologische Nutzung von N-Acyltyrosin und Serrawettin W1 wurden gelegt, so dass das bisher Glycolipid-dominierte Spektrum von Biotensiden in der Anwendung erweitert werden kann.

5 Summary

Molecules with surface active properties are of immense importance for industrial, pharmaceutical and everyday household applications. To date, most surfactants are produced from petroleum feedstock. During the last years, there has been a growing interest in surfactants based on renewable raw materials following the concept of sustainability. Among these are the biosurfactants, surfactants of microbial origin that feature good biological degradability, low toxicity and structural diversity These properties lead to various potential applications for compounds from this class of secondary metabolites. Therefore, it is worthwhile to discover and exploit further biosurfactants for biotechnological processes in order to extent the portfolio for biotechnological applications.

In this work, the production of serrawettin W1 was shown for the first time for the strain *Serratia marcescens* DSM12481, which contained a novel variant of the serrawettin synthetase SwrW. Serrawettin W1 is a rotationally symmetric cyclodepsipeptide consisting of two serine molecules and two β-hydroxy fatty acids that shows highly interesting properties and is still nearly unexplored regarding the production for biotechnological purposes. Within this work, previously unpublished congeners of this lipopeptide with longer fatty acids were identified in the isolated biosurfactant by HPLC-MS. Due to the pathogenicity of the homologous production host *S. marcescens* and the complex regulation of biosurfactant production in this organism, alternative production systems were evaluated in order to circumvent these potential drawbacks. For the first time, the production of serrawettin W1 was successfully established in the heterologous host organisms *Erwinia billingiae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. The heterologous expression of a single gene from *S. marcescens* DSM12481, *swrW*, was shown to be sufficient for serrawettin W1 production. Further studies indicated transcriptional control by a rather weak promoter as well as a cultivation temperature of 30°C as prerequisites for the functional expression of the nonribosomal peptide synthetase SwrW in all expression systems. It occurred that the congener compositions of serrawettin W1, which was isolated from the different production hosts, were slightly dissimilar. Moreover, *E. billingiae* was identified as a previously unknown biosurfactant producing strain; according to *in silico* analyzes, it should be able to produce a serrawettin-like peptide itself.

In addition, metagenome screening was evaluated as a strategy for the detection of novel biosurfactants. Besides the establishment of suitable molecular biological tools and as-

says, biosurfactant producing clones could be detected in a metagenomic library for the first time. Two clones from a library that contained DNA originating in a slaughterhouse sink biofilm were identified as producers of N-acyltyrosine, mostly N-myristoyltyrosine. This secondary metabolite, which has been described previously only for its antibacterial properties, showed definitely surfactant characteristics after chemo-physical analysis. Furthermore, the heterologous synthesis of these biosurfactants was elucidated; it is catalyzed by two novel members of the N-acyl amino acid synthase family, classified by structural homologies. Beyond surfactant properties, N-acyltyrosine showed growth-inhibiting properties towards a wide range of bacteria and thus has relevant characteristics in respect to possible biotechnological applications.

Within the scope of this work, novel biosurfactants were identified, the utility of metagenomic library screening for the detection of new biosurfactants was demonstrated and strategies for heterologous production of biosurfactant were developed. Hence, both N-Acyltyrosin and serrawettin W1 are now accessible for variety of interesting biotechnological applications.

6 Literaturverzeichnis

Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1323–36.

Abe, S., Takayama, K.-I. & Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**, 279–301.

Acosta, E. J., Yuan, J. S. & Bhakta, A. S. (2008). The Characteristic Curvature of Ionic Surfactants. *J Surfactants Deterg* **11**, 145–158.

Aha, B. S. (2010). Biologisch abbaubare Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen: N-Acylaminosäuren - Synthesen und Tensideigenschaften. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal.

Akondi, K. B. & Lakshmi, V. V. (2013). Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *OMICS* **17**, 61–70.

Al-Sulaimani, H. & Joshi, S. (2011). Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. *Biotechnol Bioinf Bioeng* **1**, 147–158.

Alting-Mees, M. A. & Short, J. M. (1993). Polycos vectors: a system for packaging filamentous phage and phagemid vectors using lambda phage packaging extracts. *Gene* **137**, 93–100.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–402.

Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143–169.

Anatrace Inc. (2008). Detergents and their use in membrane protein science. Anatrace, Inc: Maurnee, USA.

Anderson, J. C., Dueber, J. E., Leguia, M., Wu, G. C., Goler, J. A., Arkin, A. P. & Keasling, J. D. (2010). BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. *J Biol Eng* **4**, 1.

Ansari, W. H., Noori, S., Naqvi, A. & Kabir-ud- Din. (2013). Interaction between Zwitterionic Surfactants and Amphiphilic Drug: A Tensiometric Study. *Zeitschrift für Phys Chemie* **227**, 441–458.

Anton, C. & Steinick, H. (2012). Bioenergie: Möglichkeiten und Grenzen. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina. http://www.leopoldina.org/de/publikationen/detailansicht/?publication[publication]=433&publication[action]=show&cHash=261b2bd7d895c330a2a68c6893c109b7. Halle a. d. Saale.

Anyanwu, C. U., Obi, S. K. C. & Okolo, B. N. (2011a). Lipopeptide Biosurfactant Production by *Serratia marcescens* NSK-1 Strain Isolated from Petroleum-contaminated Soil. *J Appl Sci Res* **7**, 79–87.

Anyanwu, C. U., Obi, S. K. C. & Okolo, B. N. (2011b). Production of Surface Active Glycolipid by *Serratia marcescens* NSK-1 Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *Our Nat* **8**, 1–11.

Apao, M. M. N., Teves, F. G. & Madamba, M. R. S. B. (2012). Sequence analysis of putative swrW gene required for surfactant serrawettin W1 production from *Serratia marcescens*. *African J Biotechnol* **11**, 12040–044.

Arima, K., Kakinuma, A. & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* **31**, 488–94.

Arino, S., Marchal, R. & Vandecasteele, J. P. (1998). Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J Appl Microbiol* **84**, 769–76.

Arutchelvi, J. & Doble, M. (2011). Mannosylerythritol Lipids: Microbial Production and Their Applications. In *Biosurfactants*, pp. 145–177. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelberg.

Arutchelvi, J. I., Bhaduri, S., Uppara, P. V. & Doble, M. (2008). Mannosylerythritol lipids: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 1559–70.

Arvani, S., Markert, A., Loeschcke, A., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012). A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *J Biotechnol* **159**, 162–71.

Aşçi, Y., Nurbaş, M. & Sağ Açikel, Y. (2010). Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Manage* **91**, 724–31.

Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F. & Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J Am Oil Chem Soc* **65**, 1460–6.

Aylward, F. O., Tremmel, D. M., Starrett, G. J., Bruce, D. C., Chain, P., Chen, A., Davenport, K. W., Detter, C., Han, C. S. & other authors. **(2013).** Complete Genome of *Serratia sp.* Strain FGI 94, a Strain Associated with Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens. *Genome Announc* **1**, e0023912.

Baccile, N., Babonneau, F., Jestin, J., Pehau-Arnaudet, G. & Van Bogaert, I. N. A. (2012). Unusual, pH-induced, self-assembly of sophorolipid biosurfactants. *ACS Nano* **6**, 4763–76.

Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**, 130–97.

Baeurle, S. A. & Kroener, J. (2004). Modeling Effective Interactions of Micellar Aggregates of Ionic Surfactants with the Gauss-Core Potential. *J Math Chem* **36**, 409–21.

Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* **41**, 1–20.

Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresour Technol* **51**, 1–12.

Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 495–508.

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 427–444.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411–421.

Banik, J. J. & Brady, S. F. (2008). Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17273–7.

Bar-Ness, R., Avrahamy, N., Matsuyama, T. & Rosenberg, M. (1988). Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* NS 38 mutant lacking wetting activity. *J Bacteriol* **170**, 4361–4.

BASF. **(2012).** Tenside. http://www.basf.com/group/corporate/site-ludwigshafen/de_DE/function/conversions:/publish/content/about-basf/worldwide/europe/Ludwigshafen/Education/Lernen_mit_der_BASF/tenside/data/Tenside.pdf. BASF SE: Ludwigshafen.

Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R. & Tótola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol* **97**, 868–75.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* **45**, 493–6.

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G. & Broda, P. (1977). Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol Gen Genet* **154**, 203–4.

Beazley, M. J., Martinez, R. J., Rajan, S., Powell, J., Piceno, Y. M., Tom, L. M., Andersen, G. L., Hazen, T. C., Van Nostrand, J. D. & other authors. **(2012).** Microbial community analysis of a coastal salt marsh affected by the Deepwater Horizon oil spill. *PLoS One* **7**, e41305 (M. R. Liles, Ed.).

Bechthold, A. (2005). Exploiting *Pseudomonas putida* for drug development. *Chem Biol* **12**, 261.

Belcher, R. W., Huynh, K. V, Hoang, T. V & Crowley, D. E. (2012). Isolation of biosurfactant-producing bacteria from the Rancho La Brea Tar Pits. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 3261–7.

Bellaousov, S., Reuter, J. S., Seetin, M. G. & Mathews, D. H. (2013). RNAstructure: web servers for RNA secondary structure prediction and analysis. *Nucleic Acids Res*.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Res* **39**, D32–7.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2003). Biochemie (German Edition)., 4th edn. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg -Berlin.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235–42.

Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., Rioux, J.-B., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D. & other authors. **(2011).** Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS One* **6**, e29191.

Berthelot, P., Grattard, F., Amerger, C., Frery, M. C., Lucht, F., Pozzetto, B. & Fargier, P. (1999). Investigation of a nosocomial outbreak due to *Serratia marcescens* in a maternity hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**, 233–6.

Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H. & Thomas, M. G. (2007). Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae pv. tomato* YDC3000. *J Bacteriol* **189**, 6312–23.

Berwal, S. K., Sreejith, R. K. & Pal, J. K. (2010). Distance between RBS and AUG plays an important role in overexpression of recombinant proteins. *Anal Biochem* **405**, 275–7.

Bharali, P., Saikia, J. P., Ray, A. & Konwar, B. K. (2013). Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: a novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids Surf B Biointerfaces* **103**, 502–9.

Bian, X., Huang, F., Stewart, F. A., Xia, L., Zhang, Y. & Müller, R. (2012a). Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering. *Chembiochem* **13**, 1946–52.

Bian, X., Plaza, A., Zhang, Y. & Müller, R. (2012b). Luminmycins A-C, cryptic natural products from *Photorhabdus luminescens* identified by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J Nat Prod* **75**, 1652–5.

Binks, B. P. (1993). Emulsion type below and above the CMC in AOT microemulsion systems. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* **71**, 167–172.

Bird, D. M. & Opperman, C. H. (2009). The secret(ion) life of worms. *Genome Biol* **10**, 205.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513–23.

Bockmühl, D. P. (2012a). Biosurfactants as Antimicrobial Agents — A Class of their Own? *SÖFW-Journal* **138**, 44–8.

Bockmühl, D. (2012b). Biosurfactants as Antimicrobial Ingredients for Cleaning Products and Cosmetics. *Tenside Surfactants Deterg* **2012**, 196–8.

Bodour, A. A., Drees, K. P. & Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3280–7.

Bodour, A. A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B. V, Malcomson, M. E., Paull, A. K., Somogyi, A., Trinh, L. N., Bates, R. B. & Maier, R. M. (2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium sp.* strain MTN11. *Appl Environ Microbiol* **70**, 114–20.

De Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 21–5.

Van Bogaert, I. N. A. & Soetaert, W. (2011). Sophorolipids. In *Biosurfactants*, pp. 179–210. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelberg.

Van Bogaert, I. N. A., Saerens, K., De Muynck, C., Develter, D., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. (2007). Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 23–34.

Van Bogaert, I. N. A., Holvoet, K., Roelants, S. L. K. W., Li, B., Lin, Y.-C., Van de Peer, Y. & Soetaert, W. (2013). The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. *Mol Microbiol* **88**, 501–9.

Van Bogaert, I., Fleurackers, S., Van Kerrebroeck, S., Develter, D. & Soetaert, W. (2011). Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates. *Biotechnol Bioeng* **108**, 734–41.

Borges, W. da S., Cardoso, V. L. & Resende, M. M. de. **(2012).** Use of a greasy effluent floater treatment station from the slaughterhouse for biosurfactant production. *Biotechnol Appl Biochem* **59**, 238–44.

Brady, S. F. & Clardy, J. (2000). Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J Am Chem Soc* **122**, 12903–04.

Brady, S. F. & Clardy, J. (2004). Palmitoylputrescine, an antibiotic isolated from the heterologous expression of DNA extracted from bromeliad tank water. *J Nat Prod* **67**, 1283–6.

Brady, S. F. & Clardy, J. (2005a). N-acyl derivatives of arginine and tryptophan isolated from environmental DNA expressed in *Escherichia coli*. *Org Lett* **7**, 3613–6.

Brady, S. F. & Clardy, J. (2005b). Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 7063–5.

Brady, S. F., Chao, C. J., Handelsman, J. & Clardy, J. (2001). Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org Lett* **3**, 1981–4.

Brady, S. F., Chao, C. J. & Clardy, J. (2002). New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J Am Chem Soc* **124**, 9968–9. American Chemical Society.

Brady, S. F., Chao, C. J. & Clardy, J. (2004). Long-chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6865–70.

Brady, S. F., Simmons, L., Kim, J. H. & Schmidt, E. W. (2009). Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat Prod Rep* **26**, 1488–503.

Braun, V., Neuss, B., Ruan, Y., Schiebel, E., Schöffler, H. & Jander, G. (1987). Identification of the *Serratia marcescens* hemolysin determinant by cloning into *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 2113–20.

Breyfogle, L. E. & Finley, R. A. (2012). Personal-care composition comprising oil-soluble solid sunscreens. *WO Pat 2,010,108,085* WO Patent 2,010,108,085. USA.

Burch, A. Y., Shimada, B. K., Browne, P. J. & Lindow, S. E. (2010). Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5363–72.

Burch, A. Y., Browne, P. J., Dunlap, C. a, Price, N. P. & Lindow, S. E. (2011). Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. *Environ Microbiol* **13**, 2681–91.

Burkhart, B. M., Gassman, R. M., Langs, D. A., Pangborn, W. A., Duax, W. L. & Pletnev, V. (1999). Gramicidin D conformation, dynamics and membrane ion transport. *Biopolymers* **51**, 129–44.

Byers, D. M. & Gong, H. (2007). Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem Cell Biol* **85**, 649–62.

Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R. A. & Reid, G. (2008). Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4645–9.

Cagri-Mehmetoglu, A., Kusakli, S. & van de Venter, M. (2012). Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *J Dairy Sci* **95**, 3643–9.

Cameotra, S. S. & Makkar, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 520–9. Springer-Verlag.

Cameotra, S. & Makkar, R. (2010). Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure Appl Chem* **82**, 97–116.

Cameotra, S. S., Makkar, R. S., Kaur, J. & Mehta, S. K. (2010). Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv Exp Med Biol* **672**, 261–80.

Cartwright, N. J. (1955). Serratamic acid, a derivative of L-serine produced by organisms of the *Serratia* group. *Biochem J* **60**, 238–42.

Cartwright, N. J. (1957). The structure of serratamic acid. *Biochem J* **67**, 663–9.

Ceresana. **(2012).** Marktstudie Tenside. http://www.ceresana.com/de/marktstudien/chemikalien/tenside/.

Cha, M., Lee, N., Kim, M., Kim, M. & Lee, S. (2008). Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol* **99**, 2192–9.

Chan, D. I. & Vogel, H. J. (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem J* **430**, 1–19.

Chang, C.-C., Chen, W.-C., Ho, T.-F., Wu, H.-S. & Wei, Y.-H. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng* **111**, 501–11.

Chang, F.-Y. & Brady, S. F. (2013). Discovery of indolotryptoline antiproliferative agents by homology-guided metagenomic screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2478–83.

Chen, C.-Y., Baker, S. C. & Darton, R. C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J Microbiol Methods* **70**, 503–10.

Chen, K. & Pachter, L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput Biol* **1**, 106–12.

Cho, K. Y. & Salton, M. R. (1966). Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. *Biochim Biophys Acta* **116**, 73–9.

Chooi, Y.-H. & Tang, Y. (2010). Adding the lipo to lipopeptides: do more with less. *Chem Biol* **17**, 791–3.

Chow, J., Kovacic, F., Dall Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., Lauinger, B., Bongen, P., Pietruszka, J. & other authors. **(2012).** The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS One* **7**, e47665.

Christensen, D., Korsholm, K. S., Andersen, P. & Agger, E. M. (2011). Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* **10**, 513–21.

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł. & Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 401–19.

Churaev, N. V. **(2003).** Surface forces in wetting films. *Adv Colloid Interface Sci* **103**, 197–218.

Clapés, P. & Infante, M. R. (2002). Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. *Biocatal Biotransformation* **20**, 215–33.

Clardy, J. & Brady, S. F. (2007). Cyclic AMP directly activates NasP, an N-acyl amino acid antibiotic biosynthetic enzyme cloned from an uncultured beta-proteobacterium. *J Bacteriol* **189**, 6487–9.

Colwell, R. R. & Mandel, M. (1965). Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **89**, 454–61.

Condurso, H. L. & Bruner, S. D. (2012). Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat Prod Rep* **29**, 1099–110.

Cortés-Sánchez, A. de J., Hernández-Sánchez, H. & Jaramillo-Flores, M. E. (2013). Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol Res* **168**, 22–32.

Costa, S. G. V. A. O., Déziel, E. & Lépine, F. (2011). Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett Appl Microbiol* **53**, 620–7.

Coulthurst, S. J., Williamson, N. R., Harris, A. K. P., Spring, D. R. & Salmond, G. P. C. (2006). Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* **152**, 1899–911.

Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3670–95.

Craig, J. W., Chang, F.-Y., Kim, J. H., Obiajulu, S. C. & Brady, S. F. (2010). Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **76**, 1633–41.

Craig, J. W., Cherry, M. A. & Brady, S. F. (2011). Long-chain N-acyl amino acid synthases are linked to the putative PEP-CTERM/exosortase protein-sorting system in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **193**, 5707–15.

Czaplicka, M. & Chmielarz, A. (2009). Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. *J Hazard Mater* **163**, 645–9.

D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E. & Höfte, M. (2010). Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ Microbiol Rep* **2**, 359–72.

Das, P., Mukherjee, S. & Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnol Genet Eng Rev* **25**, 165–85.

Das, P., Mukherjee, S. & Sen, R. (2009). Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties. *Bioresour Technol* **100**, 4887–90.

Daverey, A. & Pakshirajan, K. (2010). Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 2090–2101.

Davies, J. T. (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. In *Proc 2nd Int Congr Surf Act*, pp. 426–38. London.

Davis, H. T. (1994). Factors determining emulsion type: Hydrophile—lipophile balance and beyond. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* **91**, 9–24.

Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C. & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**, 673–9.

Denyer, S. P. & Maillard, J.-Y. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* **92 Suppl**, 35S–45S.

Desai, J. D. & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 47–64.

Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A. & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* **1440**, 244–52.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005–13.

Djamei, A. & Kahmann, R. (2012). *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog* **8**, e1002955.

Doering, T., Traeger, A. & Kainz, S. (2006). Self-tanning composition having a UV protective effect. DE10 2005 026 164 A1. Germany.

Drepper, T., Arvani, S., Rosenau, F., Wilhelm, S. & Jaeger, K.-E. (2005). High-level transcription of large gene regions: a novel T(7) RNA-polymerase-based system for expression of functional hydrogenases in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* **33**, 56–8.

Dunn, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**, 144–53.

Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M. & other authors. **(2008).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* **190**, 2597–606.

Dwivedi, D., Jansen, R., Molinari, G., Nimtz, M., Johri, B. N. & Wray, V. (2008). Antimycobacterial serratamolides and diacyl peptoglucosamine derivatives from *Serratia sp*. *J Nat Prod* **71**, 637–41.

Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J. D., Steele, H. L., Reymond, J.-L. J.-L., Jaeger, K.-E. & Streit, W. R. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3637–45.

Endres, A. (2011, February 17). Palmöl aus Indonesien: Abholzung und Vertreibung sind ein lohnendes Geschäft. *ZEIT ONLINE* http://www.zeit.de/wirtschaft/2011-02/palmoel-studie.

Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T. & Streit, W. R. (2001). Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol* **67**, 89–99.

Erich, S., Böhmer, N., Meyer, S. & Fischer, L. (2012). Laktosefreie Milchprodukte durch β-Galaktosidasen der nächsten Generation. *BIOspektrum* **18**, 668–69.

Escobar-Díaz, E., López-Martín, E. M., Hernández del Cerro, M., Puig-Kroger, A., Soto-Cerrato, V., Montaner, B., Giralt, E., García-Marco, J. A., Pérez-Tomás, R. & Garcia-Pardo, A. (2005). AT514, a cyclic depsipeptide from *Serratia marcescens*, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells: interference with the Akt/NF-kappaB survival pathway. *Leukemia* **19**, 572–9.

Fabry, B. (1991). Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie unserer Zeit* **25**, 214–22.

Feng, J. S., Webb, J. W. & Tsang, J. C. (1982). Enhancement by Sodium Dodecyl Sulfate of Pigment Formation in *Serratia marcescens* O8. *Appl Environ Microbiol* **43**, 850–3.

Fernández-Álvaro, E., Kourist, R., Winter, J., Böttcher, D., Liebeton, K., Naumer, C., Eck, J., Leggewie, C., Jaeger, K.-E. & other authors. **(2010).** Enantioselective kinetic resolution of phenylalkyl carboxylic acids using metagenome-derived esterases. *Microb Biotechnol* **3**, 59–64.

Ferrer, M., Martínez-Abarca, F. & Golyshin, P. N. (2005). Mining genomes and "metagenomes" for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 588–93.

Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2009). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**, 109–23.

Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* **10**, 208–17.

Finking, R., Mofid, M. R. & Marahiel, M. A. (2004). Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition. *Biochemistry* **43**, 8946–56.

Fisch, K. M., Gurgui, C., Heycke, N., van der Sar, S. A., Anderson, S. A., Webb, V. L., Taudien, S., Platzer, M., Rubio, B. K. & other authors. **(2009).** Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat Chem Biol* **5**, 494–501.

Foley, P., Kermanshahi pour, A., Beach, E. S. & Zimmerman, J. B. (2012). Derivation and synthesis of renewable surfactants. *Chem Soc Rev* **41**, 1499–518.

Francis, D. M. & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 5**, Unit 5 24 1–29.

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik. **(2013).** Biotenside – Herstellung und Optimierung. http://www.igb.fraunhofer.de/de/kompetenzen/molekulare-biotechnologie/weisse-biotechnologie/biotenside.html.

Freeman, M. F., Gurgui, C., Helf, M. J., Morinaka, B. I., Uria, A. R., Oldham, N. J., Sahl, H.-G., Matsunaga, S. & Piel, J. (2012). Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides. *Science (80-)* **338**, 387–90.

Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I. & Yao, M. (2013). The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit A. *Biochem Biophys Res Commun* **431**, 802–7.

Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. & Lorenz, P. (2007). Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnol J* **2**, 201–6.

Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M. & Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**, 28–67.

Galvão, T. C., Mohn, W. W. & de Lorenzo, V. (2005). Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol* **23**, 497–506.

Garneau-Tsodikova, S., Dorrestein, P. C., Kelleher, N. L. & Walsh, C. T. (2006). Protein assembly line components in prodigiosin biosynthesis: characterization of PigA,G,H,I,J. *J Am Chem Soc* **128**, 12600–1.

GE Healthcare Bio-Sciences AB. **(2007).** Purifying Challenging Proteins. GE Healthcare Bio-Sciences AB: Uppsala.

Gehring, I. & Geider, K. (2012). Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. *J Microbiol Methods* **89**, 57–62.

Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M. & Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Prog Lipid Res* **49**, 46–60.

Georgiou, G. & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 190–7.

Giri, A. V, Anandkumar, N., Muthukumaran, G. & Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol* **4**, 11.

Gorkovenko, A. (1999). Control of unsaturated fatty acid substituents in emulsans. *Carbohydr Polym* **39**, 79–84.

Gross, F., Gottschalk, D. & Müller, R. (2005). Posttranslational modification of myxobacterial carrier protein domains in *Pseudomonas* sp. by an intrinsic phosphopantetheinyl transferase. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 66–74.

Gross, F., Ring, M. W., Perlova, O., Fu, J., Schneider, S., Gerth, K., Kuhlmann, S., Stewart, A. F., Zhang, Y. & Müller, R. (2006). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for methylmalonyl-CoA biosynthesis to enable complex heterologous secondary metabolite formation. *Chem Biol* **13**, 1253–64.

Gruenewald, S., Mootz, H. D., Stehmeier, P. & Stachelhaus, T. (2004). In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3282–91.

Gudina, E., Rodrigues, L. & Teixeira, J. (2012). Biosurfactant Producing Microorganisms and Its Application to Enhance Oil Recovery at Lab Scale. In *SPE EOR Conf Oil Gas West Asia*, p. SPE 154598. Society of Petroleum Engineers: Muscat, Oman.

Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R. & Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* **81**, 316–22.

Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T. & Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* **492**, 19–31.

Haft, D. H., Paulsen, I. T., Ward, N. & Selengut, J. D. (2006). Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol* **4**, 29.

Haft, D. H., Payne, S. H. & Selengut, J. D. (2012). Archaeosortases and exosortases are widely distributed systems linking membrane transit with posttranslational modification. *J Bacteriol* **194**, 36–48.

Hamed, B. S., Smii, L., Ghram, A. & Maaroufi, A. (2012). Screening of potential biosurfactant-producing bacteria isolated from seawater biofilm. *African J Biotechnol* **11**, 14153–158.

Van Hamme, J. & Urban, J. (2009). Biosurfactants in Bioremediation. In *Adv Appl Bioremediation*. Edited by A. Singh, R. C. Kuhad & O. P. Ward. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelberg.

Hamze, K., Julkowska, D., Autret, S., Hinc, K., Nagorska, K., Sekowska, A., Holland, I. B. & Séror, S. J. (2009). Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for phrC. *Microbiology* **155**, 398–412.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–80.

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* **5**, R245–9.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 669–85.

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E. & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**, 17.

Harada, H. & Ishikawa, H. (1997). Phylogenetical relationship based on groE genes among phenotypically related *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Erwinia* species. *J Gen Appl Microbiol* **43**, 355–361.

Hara-Hotta, H., Miyazaki, Y., Yano, I., Matsuyama, T. & Cotter, R. J. (1991). Mass spectrometry with soft ionization techniques for structural analysis of lipids in *Serratia* species. *Anal Chim Acta* **247**, 283–93.

Harrington, E. D., Singh, A. H., Doerks, T., Letunic, I., von Mering, C., Jensen, L. J., Raes, J. & Bork, P. (2007). Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13913–8.

Hauthal, H. G., Wagner, G., Glassl, B., Gutschebauch, C., Klüppel´, H. J., Roth, E., Schaffrath, N., Steber, J. & Wildbrett, G. (2003). Household Cleaning, Care, and Maintenance Products: Chemistry, Application, Ecology, and Consumer Safety. (H. G. Hauthal, Ed.). Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky GmbH: Augsburg.

Heath, R. J. & Rock, C. O. (1996). Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 10996–1000.

Hejazi, A. & Falkiner, F. R. (1997). Serratia marcescens. *J Med Microbiol* **46**, 903–12.

Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263–73.

Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**, 5395–401.

Hewald, S., Josephs, K. & Bölker, M. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3033–40.

Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J. & Bölker, M. (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5469–77.

Hitchcock, D. I. (1924). The solubility of tyrosine in acid and in alkali. *J Gen Physiol* **6**, 747–57.

Ho, C. L., Chong, K. S. J., Oppong, J. A., Chuah, M. L. C., Tan, S. M. & Liang, Z.-X. (2013). Visualizing the perturbation of cellular cyclic di-GMP levels in bacterial cells. *J Am Chem Soc* **135**, 566–9.

Hockett, K. L., Burch, A. Y. & Lindow, S. E. (2013). Thermo-Regulation of Genes Mediating Motility and Plant Interactions in Pseudomonas syringae. *PLoS One* **8**, e59850 (B. A. Vinatzer, Ed.).

Hoefler, B. C., Gorzelnik, K. V, Yang, J. Y., Hendricks, N., Dorrestein, P. C. & Straight, P. D. (2012). Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13082–7.

Hofmann, A. F. & Borgstroem, B. (1964). The intraluminal phase of fat digestion in man: the lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *J Clin Invest* **43**, 247–57.

Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**, 73–102.

Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuche, B. A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P. S. & Sigrist, C. J. A. (2008). The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* **36**, D245–9.

Ibrahim, M. L., Ijah, U. J. J., Manga, S. B., Bilbis, L. S. & Umar, S. (2013). Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Int Biodeterior Biodegradation* **81**, 28–34.

Infante, M. R., Pérez, L., Pinazo, A., Clapés, P., Morán, M. C., Angelet, M., García, M. T. & Vinardell, M. P. (2004). Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim* **7**, 583–92.

Inoue, S. (1988). Biosurfactants in cosmetic applications. In *Proc World Conf Biotechnol Fat Oils Ind*, pp. 206–210. Edited by T. Applewhite. American oil Chemists' Society.

Iqbal, H. A., Feng, Z. & Brady, S. F. (2012). Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. *Curr Opin Chem Biol* **16**, 109–16.

Ish-Horowicz, D. & Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**, 2989–98.

Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H. & Kamata, T. (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. *Chem Lett* 763–66.

Jacques, P. (2011). Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus spp*. In *Biosurfactants*, pp. 57–92. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelberg.

Jager, L. A., Jager, L. J., Jager, E. P. & Brand, H. M. (2004, June 9). Tanning preparation for the skin. EP1255531 B1. European Union.

Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H. & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* **13**, 271–79.

Jakovljevic, V., Jock, S., Du, Z. & Geider, K. (2008). Hypersensitive response and acyl-homoserine lactone production of the fire blight antagonists *Erwinia tasmaniensis* and *Erwinia billingiae*. *Microb Biotechnol* **1**, 416–24.

Janek, T., Lukaszewicz, M. & Krasowska, A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf B Biointerfaces* **110**, 379–86.

Jang, J. Y., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Lee, C. W., Park, M. S., Kim, J. C. & Kim, I. S. (2013). Identification of Orfamide A as an Insecticidal Metabolite Produced by *Pseudomonas protegens* F6. *J Agric Food Chem* **61**, 6786–91.

Jenkinson, H. F. & Lappin-Scott, H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol* **9**, 9–10.

Jetter, R. & Schäffer, S. (2001). Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiol* **126**, 1725–37.

Jha, J. K., Sinha, S., Maiti, M. K., Basu, A., Mukhopadhyay, U. K. & Sen, S. K. (2007). Functional expression of an acyl carrier protein (ACP) from Azospirillum brasilense alters fatty acid profiles in *Escherichia coli* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol Biochem* **45**, 490–500.

Joshi, S. J. & Desai, A. J. (2013). Benchscale production of biosurfactants and its potential in ex-situ meor application. *Soil Sediment Contam An Int J* **22**, 701–15. Taylor & Francis.

Kadouri, D. E. & Shanks, R. M. Q. (2013). Identification of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inhibitory compound isolated from *Serratia marcescens*. *Res Microbiol* **Epub.**

Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G. & Arima, K. (1969). Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric Biol Chem* **33**, 971–972.

Kanlayavattanakul, M. & Lourith, N. (2010). Lipopeptides in cosmetics. *Int J Cosmet Sci* **32**, 1–8.

Katzke, N. (2010). Entwicklung eines *Rhodobacter*-basierten Systems zur Synthese wirtsfremder Proteine und Phospholipide. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Katzke, N., Bergmann, R., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012). Heterologous high-level gene expression in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Methods Mol Biol* **824**, 251–69.

Kawase, T., Nishioka, Y. & Oida, T. (2010). Novel synthesis of N-alkoxycarbonyl amino acids and surfactant properties of their sodium salts. *J Oleo Sci* **59**, 191–201.

Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363–71.

Kennedy, J., O'Leary, N. D., Kiran, G. S., Morrissey, J. P., O'Gara, F., Selvin, J. & Dobson, A. D. (2011). Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J Appl Microbiol* **111**, 787–799.

Khosla, C., McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Torres, R., Sherman, D. H., Bibb, M. J. & Hopwood, D. A. (1993). Genetic construction and functional analysis of hybrid polyketide synthases containing heterologous acyl carrier proteins. *J Bacteriol* **175**, 2197–204.

Kim, Y., Kovrigin, E. L. & Eletr, Z. (2006). NMR studies of *Escherichia coli* acyl carrier protein: dynamic and structural differences of the apo- and holo-forms. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 776–83.

Kingsford, C. L., Ayanbule, K. & Salzberg, S. L. (2007). Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome Biol* **8**, R22.

Kinsinger, R. F., Shirk, M. C. & Fall, R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J Bacteriol* **185**, 5627–31.

Kishimoto, N., Adachi, K., Tamura, S., Nishihara, M., Inagaki, K., Sugio, T. & Tano, T. (1993). Lipoamino Acids Isolated from *Acidiphilium organovorum*. *Syst Appl Microbiol* **16**, 17–21.

Knoll, D. & Schreiber, L. (1998). Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytol* **140**, 271–82.

Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1993). Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**, 2329–42.

Koumoutsi, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J. & Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* **186**, 1084–96.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., Peterson, K. M. & Roop 2nd, R. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800–2.

Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M. & Marahiel, M. A. (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* **17**, 872–80.

Krzeslak, J., Gerritse, G., van Merkerk, R., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2008). Lipase expression in *Pseudomonas alcaligenes* is under the control of a two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1402–11.

Kube, M., Migdoll, A. M., Gehring, I., Heitmann, K., Mayer, Y., Kuhl, H., Knaust, F., Geider, K. & Reinhardt, R. (2010). Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. *BMC Genomics* **11**, 393.

Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E. M., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J. & Bloemberg, G. V. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* **51**, 97–113.

Kumar, N. & Tyagi, R. (2013). Industrial Applications of Dimeric Surfactants: A Review. *J Dispers Sci Technol* **Epub.**

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A. & other authors. **(1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–56.

Kuo, P.-A., Kuo, C.-H., Lai, Y.-K., Graumann, P. L. & Tu, J. (2013). Phosphate limitation induces the intergeneric inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by *Serratia marcescens* isolated from paper machines. *FEMS Microbiol Ecol* **84**, 577–87.

Kuo, Y.-H., Hsu, H.-C., Chen, Y.-C., Liang, T.-W. & Wang, S.-L. (2012). A novel compound with antioxidant activity produced by *Serratia ureilytica* TKU013. *J Agric Food Chem* **60**, 9043–7.

Labbate, M., Zhu, H., Thung, L., Bandara, R., Larsen, M. R., Willcox, M. D. P., Givskov, M., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2007). Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* **189**, 2702–11.

Labrum, E. L. & Bunting, M. I. (1953). Spontaneous and induced color-variation of the HY strain of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **65**, 394–404.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.

Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Colloid Interface Sci* **7**, 12–20.

Lang, S. & Trowitzsch-Kienast, W. (2002). Biotenside. Vieweg+ Teubner Verlag: Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden.

Langer, O., Palme, O., Wray, V., Tokuda, H. & Lang, S. (2006). Production and modification of bioactive biosurfactants. *Process Biochem* **41**, 2138–45.

Larson, R. (2013). Molecular dynamic simulations of commercial dispersant Corexit composed of Tween 80 and Aerosol OT in oil/water mixtures. In *2013 Gulf Mex Oil Spill Ecosyst Sci Conf*. New Orleans.

Lee, Y.-K., Yoon, B.-D., Yoon, J.-H., Lee, S.-G., Song, J. J., Kim, J.-G., Oh, H.-M. & Kim, H.-S. (2007). Cloning of srfA operon from Bacillus subtilis C9 and its expression in <i>E. coli<i>. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 567–72.

Lennen, R. M. & Pfleger, B. F. (2012). Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. *Trends Biotechnol* **30**, 659–67.

Li, H., Tanikawa, T., Sato, Y., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. (2005a). *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to nonribosomal peptide synthetase family. *Microbiol Immunol* **49**, 303–10.

Li, S., Lin, K., Pang, H., Wu, Y. & Xu, J. (2013). Production, characterization, and application of an organic solvent-tolerant lipase present in active inclusion bodies. *Appl Biochem Biotechnol* **169**, 612–23.

Li, X.-Y., Mao, Z.-C., Wang, Y.-H., Wu, Y.-X., He, Y.-Q. & Long, C.-L. (2012). ESI LC-MS and MS/MS characterization of antifungal cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* XF-1. *J Mol Microbiol Biotechnol* **22**, 83–93.

Li, Y., Wexler, M., Richardson, D. J., Bond, P. L. & Johnston, A. W. B. (2005b). Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned *trp* genes. *Environ Microbiol* **7**, 1927–36.

Lima, T. M. S., Procópio, L. C., Brandão, F. D., Carvalho, A. M. X., Tótola, M. R. & Borges, A. C. (2011). Simultaneous phenanthrene and cadmium removal from contaminated soil by a ligand/biosurfactant solution. *Biodegradation* **22**, 1007–15.

Lindow, S. E. & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1875–83.

Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998). N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384–8.

Liu, C. C., Cellitti, S. E., Geierstanger, B. H. & Schultz, P. G. (2009a). Efficient expression of tyrosine-sulfated proteins in *E. coli* using an expanded genetic code. *Nat Protoc* **4**, 1784–9.

Liu, H., Jiang, H., Haltli, B., Kulowski, K., Muszynska, E., Feng, X., Summers, M., Young, M., Graziani, E. & other authors. **(2009b).** Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli-Streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC. *J Nat Prod* **72**, 389–95.

Liu, P.-Y., Huang, Y.-T., Lin, S.-Y., Chang, G.-C. & Chen, J.-W. (2013a). Draft Genome Sequence of the *Serratia marcescens* Strain VGH107, a Taiwanese Clinical Isolate. *Genome Announc* **1**.

Liu, X., Wang, Y., Sun, S., Zhu, C., Xu, W., Park, Y. & Zhou, H. (2013b). Mutant breeding of *Serratia marcescens* strain for enhancing prodigiosin production and application to textiles. *Prep Biochem Biotechnol* **43**, 271–84.

Loeschcke, A. (2012). Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2013). TREX: a universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth Biol* **2**, 22–33.

Long, P. F., Dunlap, W. C., Battershill, C. N. & Jaspars, M. (2005). Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. *Chembiochem* **6**, 1760–5.

Long, Z.-D., Xu, J.-H. & Pan, J. (2007). Significant improvement of *Serratia marcescens* lipase fermentation, by optimizing medium, induction, and oxygen supply. *Appl Biochem Biotechnol* **142**, 148–57.

De Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. & Timmis, K. N. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/Ptrp-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**, 17–24.

Lourith, N. & Kanlayavattanakul, M. (2009). Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int J Cosmet Sci* **31**, 255–61.

Lucas, S., Han, J., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Goodwin, L., Pitluck, S., Peters, L., Ovchinnikova, G., Chertkov, O. & other authors. **(2013).** *Serratia sp.* AS12 chromosome, complete genome Genbank NC_015566. US DOE Joint Genome Institute: Walnut Creek, California, USA.

Ma, N. & McAllister, W. T. (2009). In a head-on collision, two RNA polymerases approaching one another on the same DNA may pass by one another. *J Mol Biol* **391**, 808–12.

Mackie, G. A. (2013). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol* **11**, 45–57.

Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**, 755–91.

Mandal, S. M., Barbosa, A. E. A. D. & Franco, O. L. (2013). Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnol Adv* **31**, 338–45.

Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H. & Kawai, F. (2006). A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides sp. strain* SM1. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 254–9.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V & other authors. **(2012).** Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 614–29.

Maragakis, L. L., Winkler, A., Tucker, M. G., Cosgrove, S. E., Ross, T., Lawson, E., Carroll, K. C. & Perl, T. M. (2008). Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**, 418–23.

Marbach, A. & Bettenbrock, K. (2012). *lac* operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol* **157**, 82–8.

Marchant, R. & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett* **34**, 1597–1605.

Markert, A. (2008). Etablierung eines neuen T7 RNA-Polymerase-abhängigen Expressionssystems zur koordinierten Expression aller Gene einer Genregion. *Math Fak*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf: Düsseldorf.

Martinez, A., Kolvek, S. J., Yip, C. L. T., Hopke, J., Brown, K. A., MacNeil, I. A. & Osburne, M. S. (2004). Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2452–63.

Matsuyama, T. & Nakagawa, Y. (1996a). Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J Microbiol Methods* **25**, 165–75.

Matsuyama, T. & Nakagawa, Y. (1996b). Bacterial wetting agents working in colonization of bacteria on surface environments. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **7**, 207–14.

Matsuyama, T., Fujita, M. & Yano, I. (1985). Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* **28**, 125–29.

Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S. & Yano, I. (1986). Extracellular Vesicle Formation and Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* **132**, 865–75.

Matsuyama, T., Sogawa, M. & Yano, I. (1987). Direct Colony Thin-Layer Chromatography and Rapid Characterization of *Serratia marcescens* Mutants Defective in Production of Wetting Agents. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1186–8.

Matsuyama, T., Sogawa, M. & Nakagawa, Y. (1989). Fractal spreading growth of *Serratia marcescens* which produces surface active exolipids. *FEMS Microbiol Lett* **61**, 243–6.

Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. & Yano, I. (1992). A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **174**, 1769–76.

Matsuyama, T., Bhasin, A. & Harshey, R. M. (1995). Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol* **177**, 987–91.

Matsuyama, T., Tanikawa, T. & Nakagawa, Y. (2011). Serrawettins and Other Surfactants Produced by *Serratia*. In *Biosurfactants*, pp. 93–120. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin / Heidelberg.

McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S. & other authors. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143 (Pt 1**, 3703–11.

McMahon, K. J., Castelli, M. E., Garcia Vescovi, E. & Feldman, M. F. (2012). Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J Bacteriol* **194**, 3241–3249.

McNaught, A. D. & Wilkinson, A. (1997). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology., 2nd edn. Blackwell Scientific Publications: Oxford, GB.

Merck. **(2011).** Sicherheitsdatenblatt Tyrosin. Merck-chemicals: Darmstadt.

Mergaert, J., Hauben, L., Cnockaert, M. C. & Swings, J. (1999). Reclassification of non-pigmented Erwinia herbicola strains from trees as *Erwinia billingiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 377–83.

Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**, 876–95.

Merril, C. R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477–88.

De Mey, M., Maertens, J., Boogmans, S., Soetaert, W. K., Vandamme, E. J., Cunin, R. & Foulquié-Moreno, M. R. (2010). Promoter knock-in: a novel rational method for the fine tuning of genes. *BMC Biotechnol* **10**, 26.

Meyer, J. M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* **174**, 135–42.

Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165–99.

Miyazaki, Y., Hara-Hotta, H., Matsuyama, T. & Yano, I. (1992). Hemolysis of phosphatidylcholine-containing erythrocytes by serratamic acid from *Serratia marcescens*. *Int J Biochem* **24**, 1033–8.

Miyazaki, Y., Oka, S., Hara-Hotta, H. & Yano, I. (1993). Stimulation and inhibition of polymorphonuclear leukocytes phagocytosis by lipoamino acids isolated from *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **6**, 265–71.

Moldes, A. B., Paradelo, R., Vecino, X., Cruz, J. M., Gudiña, E., Rodrigues, L., Teixeira, J. A., Domínguez, J. M. & Barral, M. T. (2013). Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Biomed Res Int* **2013**, Epub.

Molin, S., Givskov, M. & Riise, E. (1992). Production in *Escherichia coli* of extracellular *Serratia spp.* hydrolases. *US Pat 5,173,418*.

Morales, V. M., Bäckman, a & Bagdasarian, M. (1991). A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**, 39–47.

Morandat, S. & El Kirat, K. (2007). Solubilization of supported lipid membranes by octyl glucoside observed by time-lapse atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* **55**, 179–84.

Morita, N., Ichise, N., Yumoto, I., Yano, Y., Ohgiya, S. & Okuyama, H. (2005). Cultivation of microorganisms in the cultural medium made from squid internal organs and accumulation of polyunsaturated fatty acids in the cells. *Biotechnol Lett* **27**, 933–41.

Morita, T., Kitagawa, M., Yamamoto, S., Sogabe, A., Imura, T., Fukuoka, T. & Kitamoto, D. (2010). Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair. *J Oleo Sci* **59**, 267–72.

Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T. & Kitamoto, D. (2013). Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4691–700.

Mukherjee, A. K. (2007). Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett Appl Microbiol* **45**, 330–5.

Mukherjee, A. K. & Das, K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *Adv Exp Med Biol* **672**, 54–64.

Mukherjee, S., Das, P. & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* **24**, 509–15.

Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C. & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids-Next generation surfactants? *J Biotechnol* **162**, 366–80.

Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* **133**, 183–98.

Mulligan, C. N., Cooper, D. G. & Neufeld, R. J. (1984). Selection of Microbes Producing Biosurfactants in Media without Hydrocarbons. *J Ferment Technol* **62**, 311–4.

Nagal, S., Okimura, K., Kaizawa, N., Ohki, K. & Kanatomo, S. (1996). Study on surfactin, a cyclic depsipeptide. II. Synthesis of surfactin B2 produced by *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **44**, 5–10.

Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. (1993). Chromatographic determination of optical configuration of 3-hydroxy fatty acids composing microbial surfactants. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 102–99.

Nakar, D. & Gutnick, D. L. (2001). Analysis of the wee gene cluster responsible for the biosynthesis of the polymeric bioemulsifier from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *Microbiology* **147**, 1937–1946.

Nakar, D. & Gutnick, D. L. (2003). Involvement of a Protein Tyrosine Kinase in Production of the Polymeric Bioemulsifier Emulsan from the Oil-Degrading Strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *J Bacteriol* **185**, 1001–1009.

Naqvi, A. Z., Al-dahbali, G. A. & Akram, M. (2012). Adsorption and Micellization Behavior of Cationic Surfactants (Gemini and Conventional)—Amphiphilic Drug Systems. *J Solution Chem* **42**, 172–189.

Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M. & other authors. **(2002).** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**, 799–808.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262.

Nguyen, T. T. & Sabatini, D. A. (2011). Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. *Int J Mol Sci* **12**, 1232–44.

Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N. & Yanagawa, H. (2007). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1355–61.

Nitschke, M. & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Technol* **18**, 252–9.

Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O. & Contiero, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog* **21**, 1593–600.

Ochsner, U. A., Reiser, J., Fiechter, A. & Witholt, B. (1995). Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3503–6.

Ochsner, U. A., Hembach, T. & Fiechter, A. (1996). Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **53**, 89–118.

Ongena, M. & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* **16**, 115–25.

Ongley, S. E., Bian, X., Neilan, B. A. & Müller, R. (2013). Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep* **30**, 1121–38.

Otto, R. T., Daniel, H. J., Pekin, G., Müller-Decker, K., Fürstenberger, G., Reuss, M. & Syldatk, C. (1999). Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 495–501.

Owen, J. G., Robins, K. J., Parachin, N. S. & Ackerley, D. F. (2012). A functional screen for recovery of 4'-phosphopantetheinyl transferase and associated natural product biosynthesis genes from metagenome libraries. *Environ Microbiol* **14**, 1198–1209.

Padday, J. F., Pitt, A. R. & Pashley, R. M. (1975). Menisci at a free liquid surface: surface tension from the maximum pull on a rod. *J Chem Soc Faraday Trans 1* **71**, 1919.

Pagadoy, M., Peypoux, F. & Wallach, J. (2005). Solid-Phase Synthesis of Surfactin, a Powerful Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis*, and of Four Analogues. *Int J Pept Res Ther* **11**, 195–202.

Palacios, L. E. & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J Am Oil Chem Soc* **82**, 571–8.

Papworth, C., Bauer, J., Braman, J. & Wright, D. (1996). Site-directed mutagenesis in one day with> 80% efficiency. *Strategies* **9**.

Parkinson, M. (1985). Bio-surfactants. *Biotechnol Adv* **3**, 65–83.

Partington, J. R. (1999). A History of Greek Fire and Gun Powder. Johns Hopkins University Press: Baltimore, Maryland, USA.

Partridge, J. D. & Harshey, R. M. (2013). Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol* **195**, 909–18.

Pashynska, V. (2009). Mass spectrometric study of rhamnolipid biosurfactants and their interactions with cell membrane phospholipids. *Biopolym Cell* **25**, 504–8.

Passeri, A., Lang, S., Wagner, F. & Wray, V. (1991). Marine biosurfactants, II. Production and characterization of an anionic trehalose tetraester from the marine bacterium *Arthrobacter* sp. EK 1. *Z Naturforsch C* **46**, 204–9.

Passeri, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S. & Wagner, F. (1992). Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 281–6.

Pauwelyn, E., Huang, C.-J., Ongena, M., Leclère, V., Jacques, P., Bleyaert, P., Budzikiewicz, H., Schäfer, M. & Höfte, M. (2013). New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 585–98.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 197–201.

Peng, R., Lin, J. & Wei, D. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 733–43.

Perez, T. R., Montaner, R. B., Giralt, L. E., Martinell, P. M. & Vilaseca, C. M. (2005). Use of cyclic depsipeptide as a chemotherapeutic agent against cancer. EP1553080.

Pérez-Armendáriz, B., Mauricio-Gutiérrez, A., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A. & Santiesteban-López, A. (2013). Emulsification of Hydrocarbons Using Biosurfactant Producing Strains Isolated from Contaminated Soil in Puebla, Mexico. In *Biodegrad - Eng Technol*, pp. 25–46. Edited by R. Chamy & F. Rosenkranz. InTech: New York.

Perfumo, A., Rancich, I. & Banat, I. M. (2010). Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv Exp Med Biol* **672**, 135–45.

Perfumo, A., Rudden, M., Smyth, T. J. P., Marchant, R., Stevenson, P. S., Parry, N. J. & Banat, I. M. (2013). Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: implications for their biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7297–306.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–12.

Peypoux, F., Bonmatin, J. M. & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 553–63.

Pfeifer, B. A. & Khosla, C. (2001). Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 106–18.

Pfeifer, B. A., Admiraal, S. J., Gramajo, H., Cane, D. E. & Khosla, C. (2001). Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* **291**, 1790–2.

Piel, J. (2011). Approaches to capturing and designing biologically active small molecules produced by uncultured microbes. *Annu Rev Microbiol* **65**, 431–53.

Pietruszka, J. (2012). Research on industrial biotechnology within the CLIB-Graduate Cluster - Part I. *J Biotechnol* **159**, 121–2.

Piljac, A., Stipcević, T., Piljac-Zegarac, J. & Piljac, G. (2008). Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamnolipid ointment. *J Cutan Med Surg* **12**, 142–6.

Pinazo, A., Pons, R., Pérez, L. & Infante, M. R. (2011). Amino Acids as Raw Material for Biocompatible Surfactants. *Ind Eng Chem Res* **50**, 4805–17.

Pinzon, N. M. & Ju, L.-K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 975–81.

Plinius Secundus d. Ä., G. (79AD). Naturalis Historia XXVIII. *Nat Hist* Kapitel 51, 1994th edn. Oldenbourg Akademieverlag; De Gruyter: Berlin.

Pomès, R. & Roux, B. (1996). Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H+ translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel. *Biophys J* **71**, 19–39.

Pradel, E., Zhang, Y., Pujol, N., Matsuyama, T., Bargmann, C. I. & Ewbank, J. J. (2007). Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2295–300.

Price, N. P. J., Manitchotpisit, P., Vermillion, K. E., Bowman, M. J. & Leathers, T. D. (2013). Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *Carbohydr Res* **370**, 24–32.

Pruthi, V. & Cameotra, S. S. (1997). Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. *World J Microbiol Biotechnol* **13**, 133–5.

Pruthi, V. & Cameotra, S. S. (2000). Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. *J Surfactants Deterg* **3**, 533–7.

Raaijmakers, J. M. & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **50**, 403–24.

Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O. & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 1037–62.

Ramelot, T. A., Yee, A., Cort, J. R., Semesi, A., Arrowsmith, C. H. & Kennedy, M. A. (2007). NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* **66**, 266–71.

Ravasi, P., Peiru, S., Gramajo, H. & Menzella, H. G. (2012). Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* **11**, 147.

Reid, J. D., Stoufer, S. D. & Ogrydziak, D. M. (1982). Efficient transformation of *Serratia marcescens* with pBR322 plasmid DNA. *Gene* **17**, 107–112.

Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C. & Freire, D. M. G. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Bioresour Technol* **102**, 6377–84.

Reznik, G. O., Vishwanath, P., Pynn, M. A., Sitnik, J. M., Todd, J. J., Wu, J., Jiang, Y., Keenan, B. G., Castle, A. B. & other authors. **(2010).** Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1387–97.

Ribeiro, I. A., Bronze, M. R., Castro, M. F. & Ribeiro, M. H. L. (2013). Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 1875–87.

Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T. & Hummel, W. (2009). Characterisation of a recombinant NADP-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and its application in the production of L-glyceraldehyde. *Chembiochem* **10**, 1888–96.

Richter, N., Gröger, H. & Hummel, W. (2011). Asymmetric reduction of activated alkenes using an enoate reductase from *Gluconobacter oxydans* . *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 79–89.

Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* **57**, 609–18.

Roelants, S. L. K. W., Saerens, K. M. J., Derycke, T., Li, B., Lin, Y.-C., Van de Peer, Y., De Maeseneire, S. L., Van Bogaert, I. N. A. & Soetaert, W. (2013). *Candida bombicola* as a platform organism for the production of tailor-made biomolecules. *Biotechnol Bioeng* **110**, 2494–503.

Roldán-Carrillo, T., Martínez-García, X., Zapata-Peñasco, I., Castorena-Cortés, G., Reyes-Avila, J., Mayol-Castillo, M. & Olguín-Lora, P. (2011). Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. *Colloids Surf B Biointerfaces* **86**, 384–9.

Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* **3**, 229–36.

Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Fact* **8**, 41.

Rosen, M. J. & Tracy, D. J. (1998). Gemini surfactants. *J Surfactants Deterg* **1**, 547–554.

Rosen, M. & Kunjappu, J. (2012). Surfactants and Interfacial Phenomena., 4th edn. John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey.

Rosenberg, E. & Ron, E. Z. (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 313–6.

Rosenberg, E. & Ron, E. (2013). Biosurfactants. In *The Prokaryotes*, pp. 281–294. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Springer: Berlin, Heidelberg.

Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011). NRPSpredictor2 - a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res* **39**, W362–7.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365–86.

Rusnak, F., Sakaitani, M., Drueckhammer, D., Reichert, J. & Walsh, C. T. (1991). Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **30**, 2916–27.

Ryall, J. (2012, February). On the rise. *SPC (Soap,Perfumery Cosmet* http://www.cosmeticsbusiness.com/news/article_page/On_the_rise/75304. Cosmetic Business: London.

Sachdev, D. P. & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 1005–16.

Saharan, B., RK, S. & Sharma, D. (2012). A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genet Eng Biotechnol Journal,* **2011**.

Saïda, F. (2007). Overview on the expression of toxic gene products in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 5**, 5.19.1–5.19–13.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–91.

Saini, H. S., Barragán-Huerta, B. E., Lebrón-Paler, A., Pemberton, J. E., Vázquez, R. R., Burns, A. M., Marron, M. T., Seliga, C. J., Gunatilaka, A. A. L. & Maier, R. M. (2008). Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *J Nat Prod* **71**, 1011–5.

Salager, J., J, M., RS, S., WH, W. & E, V. (1979). Optimum formulation of surfactant/water/oil systems for minimum interfacial tension or phase behavior. *Soc Pet Eng J* **19**, 107–15.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.

Samel, S. A., Schoenafinger, G., Knappe, T. A., Marahiel, M. A. & Essen, L.-O. (2007). Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **15**, 781–92. Elsevier.

Sánchez, L., Ruiz, N., Leranoz, S., Viñas, M. & Puig, M. (1997). The role of outer membrane in *Serratia marcescens* intrinsic resistance to antibiotics. *Microbiologia* **13**, 315–20.

Saravanan, V. & Vijayakumar, S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *J Acad Ind Res* **1**, 1–5.

Satpute, S. K., Bhuyan, S. S., Pardesi, K. R., Mujumdar, S. S., Dhakephalkar, P. K., Shete, A. M. & Chopade, B. A. (2010). Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. *Adv Exp Med Biol* **672**, 14–41.

Schirmer, T. & Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7**, 724–35.

Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 303–10.

Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* **6**, 229.

Schmeisser, C., Stöckigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., Flemming, H.-C. C., Liesegang, H., Schmitz, R. A. & other authors. **(2003).** Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Env Microbiol* **69**, 7298–7309.

Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 955–962.

Schmidberger, A., Henkel, M., Hausmann, R. & Schwartz, T. (2013). Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 5779–91.

Schmidt, A. (2013). Oligosaccharid-basierte Tenside− Synthese und Analytik einer Bibliothek von Glykolipiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, O., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M. O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S. & other authors. **(2007).** Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol* **25**, 1281–9.

Scholz-Schroeder, B. K., Hutchison, M. L., Grgurina, I. & Gross, D. C. (2001). The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae pv. syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 336–48.

Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. & Kroppenstedt, R. M. (2005). Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* **166**, 589–94.

Schubert, H. (2005). Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen., 1st edn. Behr's Verlag: Hamburg.

Sen, R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Prog Energy Combust Sci* **34**, 714–724.

Seth-Smith, H. (2010). “Slick” operation. *Nat Rev Microbiol* **8**, 538.

Seydlová, G. & Svobodová, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent Eur J Med* **3**, 123–133.

Shanks, R. M. Q., Stella, N. A., Lahr, R. M., Wang, S., Veverka, T. I., Kowalski, R. P. & Liu, X. (2012). Serratamolide is a hemolytic factor produced by *Serratia marcescens*. *PLoS One* **7**, e36398.

Shanks, R. M. Q., Lahr, R. M., Stella, N. A., Arena, K. E., Brothers, K. M., Kwak, D. H., Liu, X. & Kalivoda, E. J. (2013). A *Serratia marcescens* PigP Homolog Controls Prodigiosin Biosynthesis, Swarming Motility and Hemolysis and Is Regulated by cAMP-CRP and HexS. *PLoS One* **8**, e57634.

Shao, Z. (2011). Trehalolipids. In *Biosurfactants*, pp. 121–143. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelber.

Shemyakin, M. M., Vinogradova, E. I., Feigina, M. Y., Aldanova, N. A., Loginova, N. F., Ryabova, I. D. & Pavlenko, I. A. (1965). The structure-antimicrobial relation for valinomycin depsipeptides. *Experientia* **21**, 548–552.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M. & other authors. **(2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539.

Simon, C. & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1153–61.

Simoni, R. D., Criddle, R. S. & Stumpf, P. K. (1967). Fat metabolism in higher plants. XXXI. Purification and properties of plant and bacterial acyl carrier proteins. *J Biol Chem* **242**, 573–81.

Singh, A., Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* **25**, 99–121.

Singh, A. K. & Cameotra, S. S. (2013). Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**, 7367–76.

Singh, P. & Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol* **22**, 142–6.

Siširak, M. & Hukić, M. (2013). An outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*: The importance of continuous monitoring of nosocomial infections. *Acta Med Acad* **42**, 25–31.

Smirnova, N. & Reynolds, K. A. (2001). Branched-chain fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 246–51.

Smyth, T., Perfumo, A. & McClean, S. (2010). Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In *Handb Hydrocarb Lipid Microbiol*, pp. 3687–3704. Edited by K. N. Timmis. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.

Soberón-Chávez, G. & Maier, R. (2011). Biosurfactants: A General Overview. In *Biosurfactants*, pp. 1–11. Edited by G. Soberón-Chávez. Springer Berlin Heidelberg: Berlin; Heidelberg.

Soetaert, W. & Van Bogaert, I. N. A. (2012). Sophorolipid Transporter Protein. United States Patent Application 20120311741. USA.

Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Zerkowski, J. A. & Foglia, T. a. (2007). Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett* **29**, 1341–7.

Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E. & Galabova, D. (2009). Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* **164**, 297–303.

Sotirova, A. V, Spasova, D. I., Galabova, D. N., Karpenko, E. & Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr Microbiol* **56**, 639–44.

Sotirova, A., Avramova, T., Stoitsova, S., Lazarkevich, I., Lubenets, V., Karpenko, E. & Galabova, D. (2012). The importance of rhamnolipid-biosurfactant-induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Curr Microbiol* **65**, 534–41.

Soto-Cerrato, V., Montaner, B., Martinell, M., Vilaseca, M., Giralt, E. & Pérez-Tomás, R. (2005). Cell cycle arrest and proapoptotic effects of the anticancer cyclodepsipeptide serratamolide (AT514) are independent of p53 status in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **71**, 32–41.

Spröer, C., Mendrock, U., Swiderski, J., Lang, E. & Stackebrandt, E. (1999). The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1433–8.

Srivastava, D., Harris, R. C. & Waters, C. M. (2011). Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **193**, 6331–41.

Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. & Napoli, C. (1987). Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**, 5789–94.

Steele, H. L., Jaeger, K.-E., Daniel, R. & Streit, W. R. (2009). Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**, 25–37.

Stipcevic, T., Piljac, A. & Piljac, G. (2006). Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns* **32**, 24–34.

Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**, 492–498.

Strobel, G. A., Morrison, S. L. & Cassella, M. (2005). Protecting plants from oomycete pathogens by treatment with compositions containing serratamolide and oocydin a from *Serratia marcescens*. Patent US6926892. USA.

Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113–130.

Suh, B., Bae, I. K., Kim, J., Jeong, S. H., Yong, D. & Lee, K. (2010). Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* comediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5057–61.

Sunaga, S., Li, H., Sato, Y., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. (2004). Identification and characterization of the pswP gene required for the parallel production of prodigiosin and serrawettin W1 in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol* **48**, 723–8.

Sunde, M., Kwan, A. H., Templeton, M. D., Beever, R. E. & Mackay, J. P. (2008). Structural analysis of hydrophobins. *Micron* **39**, 773–784.

Syldatk, C. & Hausmann, R. (2010). Microbial biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 615–616.

Symmank, H., Franke, P., Saenger, W. & Bernhard, F. (2002). Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Eng* **15**, 913–21.

Tahara, Y. & Kameda, M. (1976). A new lipid; the ornithine and taurine-containing "cerilipin." *Agric Biol Chem* **40**, 243–244.

Tahara, Y., Yamada, Y. & Kondo, K. (1976). A new lysine-containing lipid isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. *Agric Biol Chem*.

Takahashi, M., Morita, T., Wada, K., Hirose, N., Fukuoka, T., Imura, T. & Kitamoto, D. (2011). Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *J Oleo Sci* **60**, 267–73.

Tanikawa, T., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. (2006). Transcriptional downregulator hexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol* **50**, 587–96.

Tanovic, A., Samel, S. A., Essen, L.-O. & Marahiel, M. A. (2008). Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* **321**, 659–63.

Tavano, L., Infante, M. R., Riya, M. A., Pinazo, A., Vinardell, M. P., Mitjans, M., Manresa, M. A. & Perez, L. (2013). Role of aggregate size in the hemolytic and antimicrobial activity of colloidal solutions based on single and gemini surfactants from arginine. *Soft Matter* **9**, 306–19.

Teixidó, M., Caba, J. M., Prades, R., Zurita, E., Martinell, M., Vilaseca, M., Albericio, F. & Giralt, E. (2007). Does the Solid-Phase Synthesis of a Tetrapeptide Represent a Challenge at the Onset of the XXI Century? The Case of Cyclo [(3R)-3-hydroxydecanoyl-l-seryl-(3R)-3-hydroxydecanoyl-l-seryl]. *Int J Pept Res Ther* **13**, 313–27.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 211–222.

Terrón-González, L., Medina, C., Limón-Mortés, M. C. & Santero, E. (2013). Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Sci Rep* **3**, 1107.

Tiso, T., Wittgens, A., Rosenau, F. & Blank, L. M. (2012). Biotensid-Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen mit rekombinanten Mikroorganismen. In *Chemie Ing Tech 84*, p. 1196.

Toribio, J., Escalante, A. E. & Soberón-Chávez, G. (2010). Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**, 1082–7.

Transparency Market Research. **(2012).** Biosurfactants Market - Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecasts, 2011 - 2018. http://www.culrav.org/pr/global-biosurfactants-market-will-reach-usd-2210-5-million-in-2018-transparency-market-research.php.

Trauger, J. W., Kohli, R. M., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T. (2000). Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **407**, 215–8.

Troeschel, S. C., Drepper, T., Leggewie, C., Streit, W. R. & Jaeger, K.-E. (2010). Novel tools for the functional expression of metagenomic DNA. *Methods Mol Biol* **668**, 117–39.

Troeschel, S. C., Thies, S., Link, O., Real, C. I., Knops, K., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2012). Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. *J Biotechnol* **161**, 71–9.

Tröschel, S. C. (2010). Entwicklung neuartiger Wirt - Vektor Systeme mit breitem Wirtsspektrum zum funktionsbasierten Screening von Metagenombanken. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115.

Vanbleu, E., Marchal, K. & Vanderleyden, J. (2004). Genetic and Physical Map of the pLAFR1 Vector. *DNA Seq - J Seq Mapp* **15**, 225–227.

Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F. & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *Int J Mol Sci* **11**, 5095–108.

Vecino, X., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M. & Moldes, A. B. (2013). Evaluation of biosurfactant obtained from *Lactobacillus pentosus* as foaming agent in froth flotation. *J Environ Manage* **128C**, 655–660.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E. & other authors. **(2004).** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66–74.

Voelz, A., Müller, A., Gillen, J., Le, C., Dresbach, T., Engelhart, S., Exner, M., Bates, C. J. & Simon, A. (2010). Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. *Int J Hyg Environ Health* **213**, 79–87.

Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.-E. & Streit, W. R. (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6235–42.

Volpe, J. J. & Vagelos, P. R. (1973). Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* **42**, 21–60.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**, 828–40.

Vrljic, M., Sahm, H. & Eggeling, L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **22**, 815–26.

Wadekar, S., Kale, S., Lali, A., Bhowmick, D. & Pratap, A. (2011). Sophorolipid Production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from Virgin and Waste Frying Oils, and the Effects of Activated Earth Treatment of the Waste Oils. *J Am Oil Chem Soc* **89**, 1029–39.

Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K. J., Slotboom, D. J. & other authors. (2008). Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14371–6.

Van Wagoner, R. M. & Clardy, J. (2006). FeeM, an N-acyl amino acid synthase from an uncultured soil microbe: structure, mechanism, and acyl carrier protein binding. *Structure* **14**, 1425–35.

Wang, G. Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R. J. & Davies, J. (2000). Novel natural products from soil DNA libraries in a *streptomycete* host. *Org Lett* **2**, 2401–4.

Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195–9.

Wasserman, H. H., Keggi, J. J. & McKeon, J. E. (1961). Serratamolide, a metabolic product of *Serratia*. *J Am Chem Soc* **83**, 4107–8.

Wasserman, H. H., Keggi, J. J. & McKeon, J. E. (1962). The Structure of Serratamolide. *J Am Chem Soc* **84**, 2978–82.

Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A. P., Koketsu, K., Migita, A., Boddy, C. N., Wang, C. C. C., Oguri, H. & Oikawa, H. (2006). Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **2**, 423–8.

Wei, Y.-H., Lai, H.-C., Chen, S.-Y., Yeh, M.-S. & Chang, J.-S. (2004). Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SMdeltaR defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. *Biotechnol Lett* **26**, 799–802.

Wenzel, S. C. & Müller, R. (2005). Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 594–606.

Wenzel, S. C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A. F. & Müller, R. (2005). Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombineering. *Chem Biol* **12**, 349–356.

Weyens, G., Rose, K., Falmagne, P., Glansdorff, N. & Piérard, A. (1985). Synthesis of *Escherichia coli* carbamoylphosphate synthetase initiates at a UUG codon. *Eur J Biochem* **150**, 111–5.

Wieland, T. & Bodanszky, M. (1991). The World of Peptides. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep* **64**, 1020–37.

Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K.-E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **181**, 6977–86.

Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* **4**, 887–99.

Willumsen, P. A. & Karlson, U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* **7**, 415–423.

Wilson, M. C. & Piel, J. (2013). Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. *Chem Biol* **20**, 636–47.

Winkler, U. & Timmis, K. (1973). Pleiotropic mutations in *Serratia marcescens* which increase the synthesis of certain exocellular proteins and the rate of spontaneous prophage induction. *MGG Mol Gen Genet* **124**, 197–206.

Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. & Bycroft, B. W. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9427–31.

Wittgens, A. (2013). Konstruktion neuer Produktionsstämme für die heterologe Rhamnolipidsynthese in dem nicht-pathogenen Wirt *Pseudomonas putida* KT2440. Dissertation, Universität Ulm.

Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M. & other authors. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* **10**, 80.

Witthayapanyanon, A., Harwell, J. H. & Sabatini, D. A. (2008). Hydrophilic-lipophilic deviation (HLD) method for characterizing conventional and extended surfactants. *J Colloid Interface Sci* **325**, 259–66.

Woesten, H. A. & Wösten, H. A. (2001). Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* **55**, 625–46.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469–78.

Worsham, L. M. S., Earls, L., Jolly, C., Langston, K. G., Trent, M. S. & Ernst-Fonberg, M. Lou. (2003). Amino acid residues of *Escherichia coli* acyl carrier protein involved in heterologous protein interactions. *Biochemistry* **42**, 167–76.

Wu, Z., Kan, F. W. K., She, Y.-M. & Walker, V. K. (2012). Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw protection in an epiphyte community. *Appl Biochem Microbiol* **48**, 363–70.

Xiong, F., Mi, Z. & Gu, N. (2011). Cationic liposomes as gene delivery system: transfection efficiency and new application. *Pharmazie* **66**, 158–64.

Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Moore, E. R., Abraham, W. R., Lünsdorf, H. & Timmis, K. N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**, 339–48.

Yamamoto, S., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Yanagidani, S., Sogabe, A., Kitamoto, D. & Kitagawa, M. (2012). The moisturizing effects of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, on human skin. *J Oleo Sci* **61**, 407–12.

Yamanaka, K., Mitta, M. & Inouye, M. (1999). Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 6284–91.

Yamashita, M., Nakagawa, Y., Li, H. & Matsuyama, T. (2001). Silica Gel-Dependent Production of Prodigiosin and Serrawettins by *Serratia marcescens* in a Liquid Culture. *Microbes Environ* **16**, 250–4.

Yeh, M.-S., Wei, Y.-H. & Chang, J.-S. (2008). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. *Biotechnol Prog* **21**, 1329–1334.

Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D. B., Halpern, A. L., Williamson, S. J., Remington, K., Eisen, J. A., Heidelberg, K. B., Manning, G. & other authors. **(2007).** The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol* **5**, e16.

Youssef, N. H., Duncan, K. E. & McInerney, M. J. (2005). Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7690–5.

Yun, C.-H., Yim, S.-K., Kim, D.-H. & Ahn, T. (2006). Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. *Curr Drug Metab* **7**, 411–29.

Zezzi do Valle Gomes, M. & Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control* **25**, 441–7.

Zhang, H., Boghigian, B. A., Armando, J. & Pfeifer, B. A. (2011). Methods and options for the heterologous production of complex natural products. *Nat Prod Rep* **28**, 125–51.

Zhang, L., Veres-Schalnat, T. A., Somogyi, A., Pemberton, J. E. & Maier, R. M. (2012). Fatty acid cosubstrates provide β-oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8611–22.

Zhang, Y. & Miller, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* **58**, 3276–82.

Zhang, Y.-M. & Rock, C. O. (2008). Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *J Lipid Res* **49**, 1867–74.

Zheng, C., Zhao, Z., Li, Y., Wang, L. & Su, Z. (2011). Effect of IPTG amount on apo- and holo- forms of glycerophosphate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **75**, 133–7.

Zhong, H., Zeng, G. M., Liu, J. X., Xu, X. M., Yuan, X. Z., Fu, H. Y., Huang, G. H., Liu, Z. F. & Ding, Y. (2008). Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 671–7.

Zhu, K. & Rock, C. O. (2008). RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 3147–54.

Zuckerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D. L. & Rosenberg, E. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* **37**, 414–20.

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S. & Meda, P. (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**, 3134–47.

7 Anhang

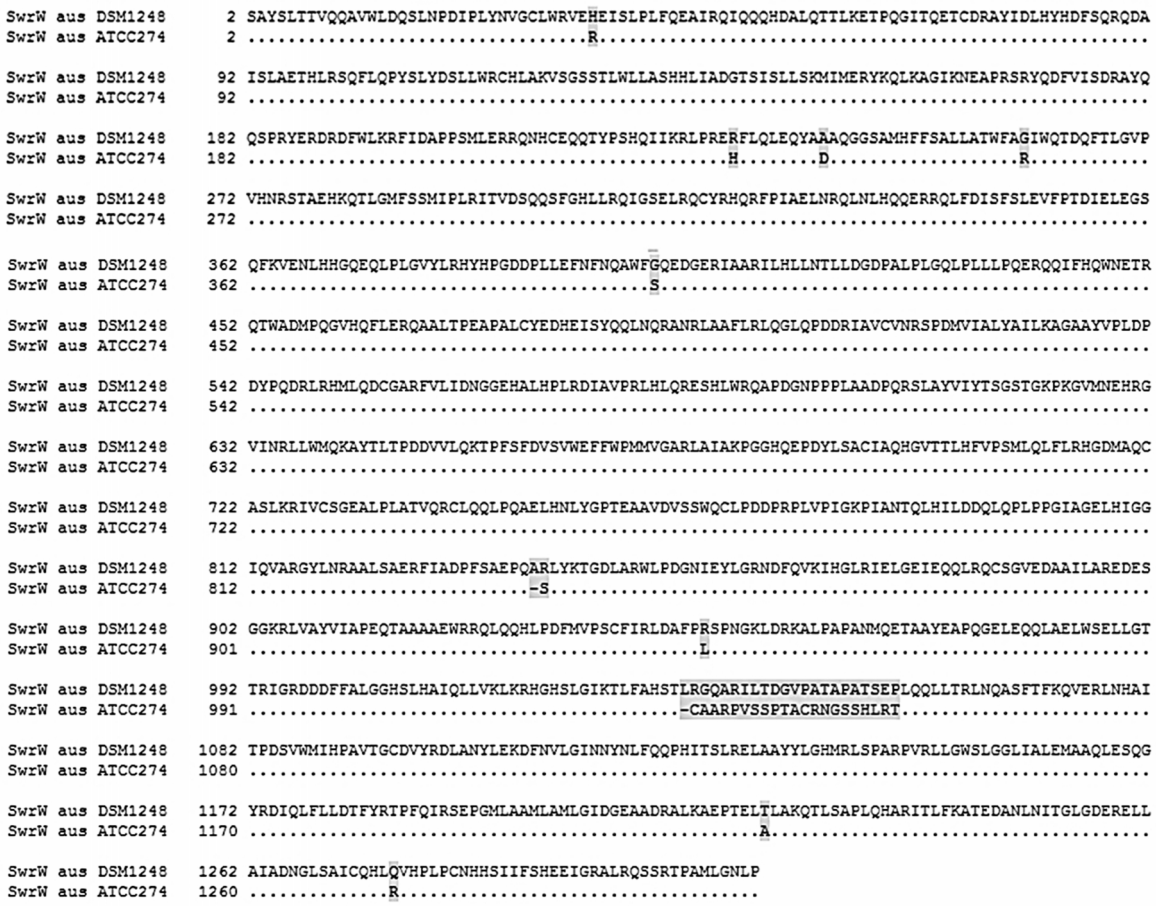


Abb. A. 1 Alignment der Aminosäuresequenzen von SwrW aus DSM12481 und ATCC274. Letztere ist der NCBI Datenbank entnommen (Accession-Nr. BAD60917.1). Die Sequenz des Proteins aus DSM12481 wurde durch *in silico* Translation des sequenzierten Gens ermittelt. Sequenziert wurde *swrW* in pET22b mit den Primern T7-Prom und T7 term (entsprechend Sequenzierung des Gens ab Position 1 und Position 3938C), sowie ST SwrW seq 1, 2 und 3, die an den Positionen 843, 1473 und 4942C binden, als Auftragsarbeit durch lgc genomics. Die resultierenden Sequenzen der einzelnen Sequenzierungen wurden zum vollständigen Gen assembliert.

Tabelle A. 1 Charakteristische Fragmente der einzelnen Kongenere in Fortführung der in Dwivedi *et al*., 2008 beschriebenen Fragmentierung des C_{10}+C_{10}-Kongeners. Die Fragmente mit der größten Intensität (siehe auch Beispiel in Abb. A. 2) sind hervorgehoben.

Kongener	Masse Da)	Massen der charakteristischen Fragmente (Da)
C_8; + C_{10}	487	248, 230, **212,** 184 276, 258, **240**, 212
C_9 + C_{10}	501	262, 244, **226,** 198 276, 258, **240**, 212
C_{10}+ C_{10}	515	276, 258, **240**, 212
C_{10} + C_{11}	529	276, 258, **240**, 212 290, 272, **254**, 226
C_{10} + C_{12}	543	276, 258, **240**, 212 304, 286, **268**, 240
C_{11} + C_{12}	557	290, 272, **254**, 226 304, 286, **268**, 240
C_{10} + C_{13}	557	276, 258, **240**, 212 318, 300, **282**, 254
C_{12}+C_{12}	571	304, 286, **268**, 240
C_{10} + C_{14}	571	276, 258, **240**, 212 332, 314, **296**, 268

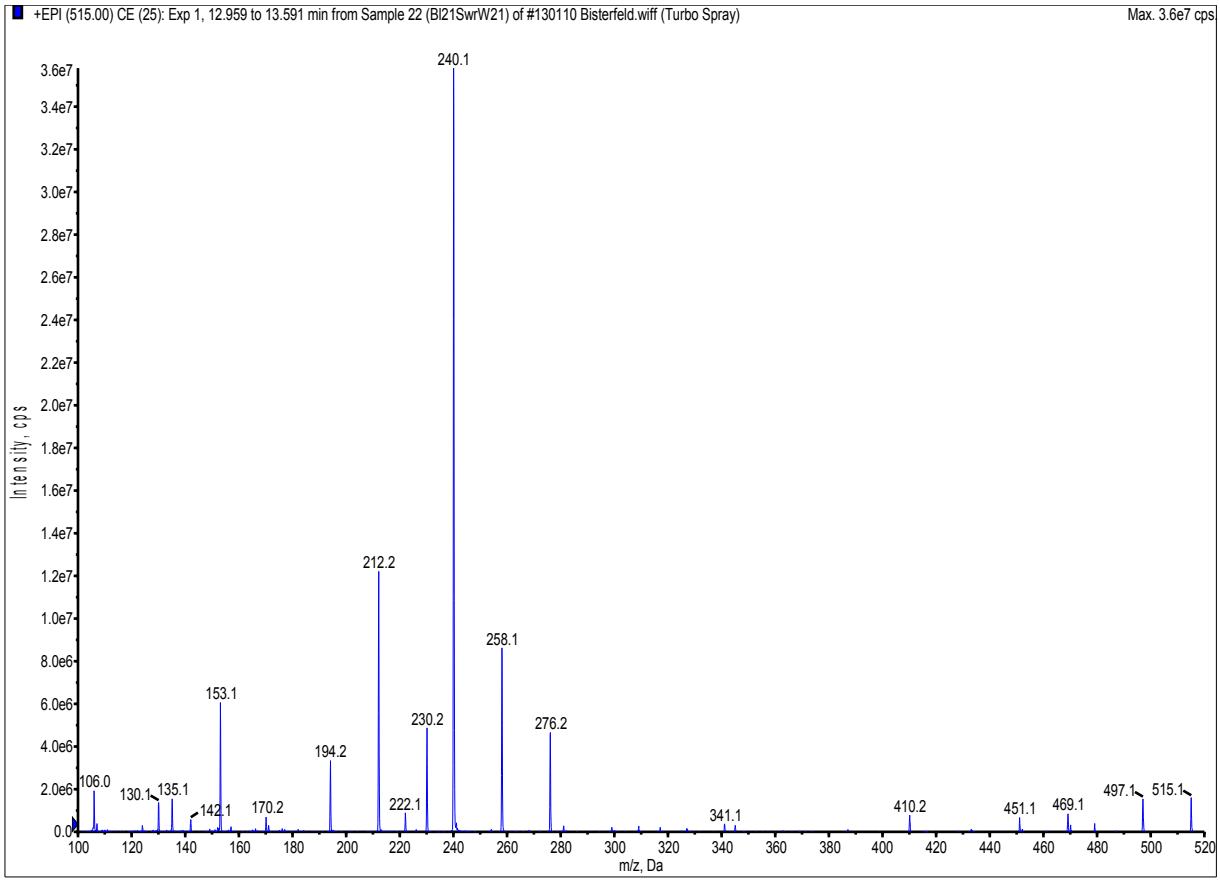


Abb. A. 2 Massenspektrum von Serrawettin W1 C_{10} + C_{10} (515 Da), exemplarisch für die Massenspektren aller Kongenere. Aufgetragen ist die Intensität in *counts per second* gegen m/z in Dalton. Eindeutig sind die in Tabelle A.1 aufgeführten Fragmente auszumachen. In Massenspektren von Kongeneren mit unterschiedlichen Fettsäuren bzw. von zwei Kongeneren derselben Masse sind im Spektrum dementsprechend die charakteristischen Fragmente mehrerer Spezies zu identifizieren.

NMR-Daten zu N-Myristoyltyrosin:

^{1}HNMR (600 MHz, MeOD):

δ (ppm): 0.90 (t, $^{3}J_{14',13'}$ = 7.2 Hz, 3H, H-14'), 1.29 (br, 22H, H-13'-H-3'), 1.50 (2t, $^{3}J_{3',4'}$ = 7.2 Hz, $^{3}J_{2',3'}$ = 7.36 Hz, 2H, H-3'), 2.15 (t, $^{3}J_{2',3'}$ = 7.36 Hz, 2H, H-2'), 2.84 (dd, $^{2}J_{5a,5b}$ = 13, 75 Hz, dd, $^{2}J_{5a,5b}$ = 13, 75 Hz, $^{3}J_{5a,6}$ = 4.64 Hz, 1H, H-5a), 3.11 (dd, $^{2}J_{5b,5a}$ = 13, 75 Hz, $^{3}J_{5b,6}$ = 4.64 Hz, 1H, H-5b), 4.61 (m, 1H, H-6), 6.69 (d, $^{3}J_{2,3}$ =8.0 Hz, $^{3}J_{2'',3''}$ = 8.0 Hz, 2H, H-2, H-2''), 7.04 (d, $^{3}J_{3,2}$ =8.0 Hz, $^{3}J_{3'',2''}$ = 8.0 Hz, 2H, H-3, H-3'').

^{13}CNMR (150 MHz, MeOD):

14.32 (1C, C-14'), 23.64 (1C, alkyl-chain), 26.83 (1C, C-3'), 30.07, 30.41, 30.51 (3C, alkyl-chain), 30.70 (2C), 30.74, 33.01 (2C, alkyl-chain), 36.75 (1C, C-2'), 37.57 (1C, C-5), 55.08 (1C, C-6), 116.07 (2C, C-2, C-2''), 131.12 (2C, C-3, C-3''), 157.26 (1C, C-1), 174.95 (1C, C-7), 176.05 (1C, C-1').

IR:

□ = 3311 (-OH), 3233 (NHCO), 2915 (-CH_3), 2849 (>CH_2), 1704 (-COOH), 1644 (CONH), 1602, 1614, 1539 (CONHR), 1515 (COO^-), 1455 (>CH_2), 1229 (OH-phenol), 824 (>CH_2).

Lebenslauf

Stephan Thies
geboren am 21.05.1984 in Neuss

wissenschaftlicher Werdegang

10.2009-09.2013	PhD-Stipendium im Rahmen des CLIB-Graduate Cluster am Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05.2008-03.2009	Diplomarbeit am Institut für molekulare Enzymtechnologie Titel: „Charakterisierung von Foldase/Lipase-Komplexen“
10. 2004 –04.2008	Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufserfahrung

05.2009-09.2009	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der HHU Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich. Expression und Aufreinigung von Membranproteinen
11.2007-12.2007	wissenschaftliche Hilfskraft an der HHU Düsseldorf, Institut für Neurobiologie, AG Sinnesökologie. Extraktion und Analyse von Oberflächenlipiden von verschiedenen Insekten.
07.2007-11.2007	wissenschaftliche Hilfskraft am Forschungszentrum Jülich, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, im Rahmen „Transregional Collaborative Research Center 32“. Erfassung und statistische Auswertung von Umweltdaten
09.2003-06.2004	Zivildienst am Uniklinikum der HHU Düsseldorf (OP-Bereich der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie)

Schulischer Werdegang

1994-2003	Norbert Gymnasium Knechtsteden, Dormagen
1990-1994	Grundschule Rommerskirchen

Erklärung

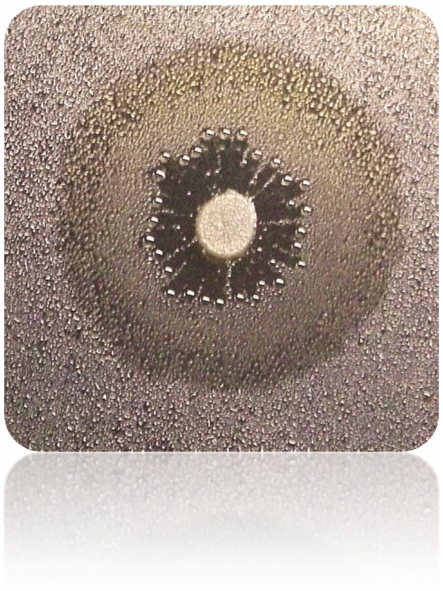
Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der„Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“erstellt worden ist.“

Diese Dissertationsschrift wurde in der vorliegenden oder einer ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Rommerskirchen, den

Ort, Datum

Stephan Thies



Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.
Johann Wolfgang von Goethe

Vielleicht sind alle Drachen unseres Lebens Prinzessinnen,
die nur darauf warten, uns einmal schön und mutig zu sehen.
Rainer Maria Rilke