

Etablierung von *Ustilago maydis* für den Einsatz in der industriellen Biotechnologie: Abbau pektinreicher Biomasse und Optimierung der Produktion von Ustilaginsäure

Establishing *Ustilago maydis* for the use in the industrial biotechnology: Degradation of pectin rich biomass and optimizing the ustilagic acid production

Inaugural-Dissertation

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

**Vorgelegt durch Peter Stoffels
Geboren in Düsseldorf**

11.08.2020

aus dem Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Zweitgutachter: Prof. Dr. Julia Frunzke

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2020

Eidesstattliche 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. Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer vergleichbaren Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 11.08.2020

Peter Stoffels

Förderung und wissenschaftlicher Beitrag

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2016 bis Februar 2020 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität im Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen der Projekte „Pektilyse - *Activation of intrinsic enzymes for degradation of plant biomass side-streams.*“ und „CombiCom - *Combinatorial creation of structural diversity for novel high-value compounds.*“, gefördert durch das Strategiprojekt BioSC (No.313/323-400-002 13), durchgeführt. Ich bedanke mich herzlich für die Förderung.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung im *Journal of Biotechnology*

Peter Stoffels*, **Markus Jan Müller***, **Sarah Stachurski**, **Marius Terfrüchte**, **Sebastian Schröder**, **Nina Ihling**, **Nick Wierckx**, **Michael Feldbrügge**, **Kerstin Schipper** und **Jochen Büchs (2020)**. *Complementing the intrinsic repertoire of Ustilago maydis for degradation of the pectin backbone polygalacturonic acid. Journal of Biotechnology*, 307 (2020) 148–163, sowie im *Journal of Biological Engineering* eingereicht.

Markus Jan Müller, **Sarah Stachurski**, **Peter Stoffels**, **Kerstin Schipper**, **Michael Feldbrügge** und **Jochen Büchs (2018)**. *Online evaluation of the metabolic activity of Ustilago maydis on (poly)galacturonic acid. Journal of Biological Engineering.*, 12, 34 (2018)

* geteilte Erstautorenschaft

Weiterer wissenschaftlicher Beitrag:

Jörn Aschenbroich, **Kai Philipp Hussnaetter**, **Peter Stoffels**, **Thorsten Langner**, **Sabrina Zander**, **Björn Sandrock**, **Michael Bölker**, **Michael Feldbrügge** und **Kerstin Schipper**. (2018). *The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in Ustilago maydis. Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics.*, 1867 (12), 140154.

Die in Stoffels und Müller *et al.* (2020) publizierten Ergebnisse wurden in enger Kollaboration mit der Aachener Verfahrenstechnik am Institut für Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen, unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs, durchgeführt. Für eine ganzheitliche Betrachtung der für die Hydrolyse von pektinreicher Biomasse hergestellten Stämme wurden Teile dieser Ergebnisse auch hier aufgeführt. Entsprechend wurden die in Kapitel 2.1.6 durchgeführten RAMOS-Analysen (speziell Abbildung 16 und 17) im Rahmen dieser Kollaboration durch Dr. Markus Jan Müller und mit Assistenz von Sarah Stachurski (Institut für Bioverfahrenstechnik, RWTH Aachen) im Rahmen dieser Kollaboration durchgeführt.

Summary

Utilizing plant biomass to replace fossil-based chemicals and products is a strong driver of a sustainable bioeconomy. Optimally, waste side-streams are exploited since they are not competing with arable land that could be used for food production. One possibility is microbial conversion based on effective fermentation hosts with a broad metabolic spectrum to decompose the plant biomass to produce valuable compounds. One promising microorganism for consolidated bioprocessing is the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*. In this work, two separate work packages were conducted to genetically modify and adapt the fungus towards use in bioprocessing: i) degradation of pectin-rich biomass and ii) optimization of ustilagic acid production.

i) As a biotrophic fungus, *U. maydis* possesses a limited but promising set of pectinolytic enzymes. These intrinsic CAZymes were constitutively overexpressed in the yeast-like growth form of AB33P5ΔR, a strain lacking five harmful proteases and therefore showing reduced proteolytic activity. The activity of one of these, an intrinsic endo-polygalacturonase was complemented by strains expressing potent heterologous polygalacturonases from other biomass-degrading fungi and bacteria. For functional export of bacterial enzymes the unconventional secretion pathway was exploited. CAZymes expressing strains were cultivated and analysed in offline and online measurements. Importantly, a co-fermentation strategy led to effective hydrolysis of poly-galacturonic acid as well as total consumption of the liberated galacturonic acid.

ii) As a naturally produced secondary metabolite *U. maydis* secretes ustilagic acid, a cellobiose lipid biosurfactant with antibacterial and antifungal properties. This biosurfactant is produced along with mannosyl erythritol lipids (MELs) when *U. maydis* is suffering from nitrogen starvation. To optimize production, a strategy for generation of an uncoupled strain without nitrogen dependency and lacking dispensable by-products was employed. By upregulating the gene for the transcription factor Rua1 in this background, ustilagic acid production was uncoupled from nitrogen dependency. The desired production background was generated in a step-by-step gene deletion series using both CrispR-Cas9 technology and homologous recombination. The optimized strain was deficient in MELs and itaconic acid production and accumulated high amounts of ustilagic acid in flask culture as well as lab scale fermentation.

In summary, important steps towards first consolidated bioprocessing strategies for pectin-derived production of glycolipids using *U. maydis* were successfully implemented.

Zusammenfassung

Die Verwendung von pflanzlicher Biomasse für die Produktion von andernfalls ölbasierten Chemikalien und Produkten ist eine der treibenden Kräfte einer nachhaltigen Bioökonomie. Vorteilhaft ist dafür die Verwendung von pflanzlichen Produktionsrückständen, da dadurch eine Konkurrenz mit Agrarflächen für die Produktion von Lebensmitteln vermieden wird. Eine Möglichkeit die pflanzliche Biomasse zu zersetzen und wertvolle Metabolite zu produzieren, ist die mikrobielle Umwandlung durch die Nutzung von effektiven fermentativen Mikroorganismen mit einem breiten Stoffwechselspektrum. Der Basidiomycet *Ustilago maydis* stellt einen vielversprechenden Kandidaten für die Etablierung eines solchen konsolidierten Prozesses dar. In dieser Arbeit wurde der Pilz durch genetische Modifikationen für die Nutzung in der Bioprozessierung in zwei separaten Arbeitspaketen angepasst: i) Etablierung des Abbaus pektinreicher Biomasse und ii) Optimierung der Ustilaginsäureproduktion.

i) Als biotropher Pilz besitzt *U. maydis* ein unvollständiges, aber vielversprechendes Set pektinolytischer Enzyme. Diese intrinsischen CAZymes wurden in der Hefeform des Stammes AB33P5 Δ^R , der durch die Deletion von fünf Proteasen eine reduzierte proteolytische Aktivität aufweist, konstitutiv überexprimiert. Die pektinolytische Aktivität eines dieser Enzyme, einer intrinsischen Endo-Polygalakturonase, wurde durch heterologe Polygalakturonasen aus Biomasse-abbauenden Pilzen und Bakterien komplementiert. Der funktionelle Export bakterieller Enzyme wurde durch den Einsatz des unkonventionellen Sekretionsmechanismus ermöglicht. Kulturen CAZymes-exprimierender Stämme wurden sowohl in *offline*-, als auch *online*-Messungen analysiert. Durch einen Co-Fermentationsansatz konnte eine effektive Hydrolyse von Polygalakturonsäure und die komplette Verstoffwechslung der freigesetzten Galakturonsäure erzielt werden.

ii) Als natürlich produziertes Sekundärmetabolit sekretiert *U. maydis* das Cellobioselipid Ustilaginsäure, welches oberflächenaktive und antimikrobielle Wirkung gegen Pilze und Bakterien zeigt. Dieses Biotensid wird neben Mannosylerythritollipiden (MELs) unter Stickstoffmangelbedingungen produziert. Um die Produktion zu optimieren, wurde die Herstellung eines entkoppelten Stammes ohne Stickstoffabhängigkeit und ohne unnötige Nebenprodukte angestrebt. Durch die Hochregulation des Gens für den Transkriptionsfaktor Rua1 wurde die Ustilaginsäuresynthese von der Stickstoffabhängigkeit entkoppelt. Der Produktionshintergrund wurde durch eine schrittweise Deletionsstrategie erstellt, in der sowohl die CRISPR-Cas9 Technik als auch homologe Rekombination verwendet wurden. Der optimierte Stamm zeigte keine Synthese von MELs oder Itakonsäure, jedoch erhöhte Mengen an Ustilaginsäure, die in Kulturen im Schüttelkolben- und Laborfermentermaßstab produziert werden konnten.

Auf diese Weise konnten wichtige Schritte auf dem Weg zu einer ersten konsolidierten Bioprozessstrategie für die pektinbasierte Produktion von Glykolipiden mit *U. maydis* erfolgreich implementiert werden.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin	Ip/ ip	engl. <i>Iron-sulphur protein</i>
APEX	engl. ammonia fiber explosion	Kb	Kilobasen
APS	Ammoniumperoxodisulfat	L	Liter
AS	Aminosäure	MEL	Mannosylerythritolipide
ATP	Adenosintriphosphat	MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Bp	Basenpaar	MeOH	Methanol
BSA	'bovine serum albumin'	Mg	Milligramm
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
Cbx	Carboxin	mL	Milliliter
clonNAT	Nourseothricin	MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
CM	Complete medium	mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
C-Quelle	(engl. <i>carbon</i>) Kohlenstoffquelle	N-terminal	Aminoterminal
CAZyme	engl. <i>carbohydrate active enzyme</i>	OD	optische Dichte
CMC	engl. <i>critical micelle concentration</i>	ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	OTR	Sauerstofftransferrate (engl. <i>oxygen transfer rate</i>)
C-terminal	Carboxyterminal	p.a.	<i>pro analysis</i> , Klassifikation der Reinheitsstufe
Da	Dalton	PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PEG	Polyethylenglykol
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
H₂O_{bid.}	doppelt destilliertes Wasser	PNGaseF	Peptid-N-Glykosidase F
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	PI	Propidiumiodid
DIG	Digoxigenin	PolyGalA	Polygalakturonsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäuren	PVDF	Polyvinylidenfluorid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PVP	Polyvinylpyrrolidon
DTT	Dithiothreitol	RAMOS	engl. Respiration Activity MO nitoring S ystem
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	RG	Rhamnogalakturonan
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence-Lösung</i>	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s	Sekunde
EtAc	Essigsäureethylester/ Ethylacetat	SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
et al.	(lat.) und Andere	SHH-Tag	Strep-TripleHA-Decahistidin-Tag
EtOH	Ethanol	SP	Signalpeptid
FLP	Flippase Rekombinase	TCA	Trichloressigsäure
g	Schwerebeschleunigung	TEMED	Tetramethylethylendiamin
G418	Geneticin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GalA	Galakturonsäure	Upm	Umdrehungen pro Minute
gDNA	Genomische DNA	UTR	untranslatierte Region
Gfp	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>	UV	ultraviolettes Licht
GH	Glykosylhydrolase	v/v	Volumenprozent
Glc	Glukose (engl. <i>glucose</i>)	w/v	Gewichtszent
h	Stunde	WT	Wildtyp

HA-Tag	engl. <i>Human influenza hemagglutinin-Tag</i>	XG	Xylogalakturonan
HCl	Salzsäure (engl. <i>Hydrochloric acid</i>)	z. B.	zum Beispiel
HG	Homogalakturonan	α	Anti
HRP	Meerrettichperoxidase	Δ	Deletion
Hyg	Hygromycin	μL	Microliter
Hz	Hertz		

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	13
1.1	Die Rolle von pflanzlicher Biomasse in mikrobiologischen Bioprozessen	13
1.2	Enzymatische Hydrolyse von Pektin	18
1.3	<i>Ustilago maydis</i> als vielseitiger Modellorganismus	20
1.3.1	Das biotechnologische Potential von <i>Ustilago maydis</i>	21
1.3.1.1	Abbau pectinreicher Biomasse mit <i>Ustilago maydis</i>	22
1.3.1.2	Sekretion heterologer Proteine mittels unkonventioneller Sekretion	23
1.3.1.3	Primär und Sekundärmetabolite	25
1.4	Glykolipide als Gruppe der Biotenside	26
1.4.1.1	Sophorolipide	28
1.4.1.2	Rhamnolipide	28
1.4.1.3	Trehaloselipide	31
1.4.2	Glycolipide in <i>Ustilago maydis</i>	31
1.4.2.1	Mannosylerythritollipide	32
1.4.2.2	Ustilaginsäure	33
1.4.2.3	Die Regulation der Glycolipidsynthese in <i>Ustilago maydis</i>	35
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	36
2	ERGEBNISSE	37
2.1	Genetische Optimierung von <i>Ustilago maydis</i> für den Abbau von Pektinbestandteilen	37
2.1.1	Evaluierung von Pektin als Substrat für <i>Ustilago maydis</i>	37
2.1.2	Pektinolytisches Potential von <i>Ustilago maydis</i>	39
2.1.3	Herstellung pektinolytischer <i>Ustilago maydis</i> Stämme	43
2.1.4	Erweiterung des pektinolytischen Potentials von <i>Ustilago maydis</i> durch heterologe Enzyme	44
2.1.5	Co-Fermentation von CAZyme produzierenden <i>Ustilago maydis</i> Stämmen	49
2.1.6	Wachstum von CAZyme produzierenden <i>Ustilago maydis</i> Stämmen auf PolyGalA	52
2.1.7	Pektinolytisches Potential co-kultivierter Überstände	58
2.2	Effektive Produktion von Ustilaginsäure in <i>Ustilago maydis</i>	59
2.2.1	Etablierung einer großvolumigen Produktion von Ustilaginsäure	59
2.2.1.1	Produktion durch Fermentation im Labormaßstab	60
2.2.2	Entwicklung eines Ustilaginsäure Produktionsstammes	63
2.2.2.1	Herstellung eines Produktionsstammes für reine Ustilaginsäure	63
2.2.3	Charakterisierung des Produktionsstammes auf stickstoffunabhängige Ustilaginsäureproduktion	68
3	DISKUSSION	72
3.1	Etablierung von Pektinabbau in <i>Ustilago maydis</i>	73
3.1.1	Potentielle GalA Versoffwechslung mit <i>Ustilago maydis</i>	73

3.1.2	<i>Ustilago maydis</i> weist pektinolytisches Potential mit Einschränkungen auf	75
3.1.3	Abbau von PolyGalA durch Komplementation mit heterologen Enzymen	79
3.1.4	Wachstum auf PolyGalA durch Co-Fermentation	84
3.1.5	Komplexere Substrate erfordern ein ausgeweitetes Co-Kultivierungskonzept	89
3.2	Produktion von Ustilaginsäure in <i>Ustilago maydis</i>	93
3.2.1	Produktion von Ustilaginsäure im Laborfermentermaßstab und deren Isolierung	94
3.2.2	Kontinuierliche Produktion mit reduzierten Nebenprodukten - ein Produktionsstamm	96
4	AUSBLICK	100
5	MATERIAL UND METHODEN	104
5.1	Materialien	104
5.1.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	104
5.1.1.1	Chemikalien	104
5.1.1.2	Enzyme und Kits	104
5.1.2	Lösungen und Medien	105
5.1.2.1	Puffer und Lösungen	105
5.1.3	Medien	105
5.1.4	Oligonukleotide	108
5.1.5	Plasmide	110
5.1.6	Stämme	115
5.1.7	Computerprogramme und Bioinformatik	117
5.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	118
5.2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	118
5.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	118
5.2.1.2	Bestimmung der Zelldichte von <i>Escherichia coli</i> Kulturen	118
5.2.1.3	RbCl-Transformation von <i>Escherichia coli</i>	118
5.2.2	Arbeiten mit <i>Ustilago maydis</i>	119
5.2.2.1	Kultivierung von <i>Ustilago maydis</i>	119
5.2.2.2	Bestimmung der Zelldichte von <i>Ustilago maydis</i> Kulturen	119
5.2.2.3	Transformation von <i>Ustilago maydis</i>	120
5.2.2.4	<i>Ustilago maydis</i> Fermentation	120
5.2.3	RAMOS-Kultivierung für <i>Ustilago maydis</i>	121
5.2.4	Wachstumsanalysen von <i>Ustilago maydis</i> im BioLector I System	122
5.3	Molekularbiologische Methoden	123
5.3.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	123
5.3.2	Isolierung von Nukleinsäuren	123
5.3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> :	123
5.3.2.2	Phenolfreie DNA-Isolierung aus <i>Ustilago maydis</i>	124
5.3.3	PCR-Techniken	124
5.3.3.1	Standard-PCR-Ansätze:	124
5.3.3.2	Gibson Assembly	125

5.3.3.3	Golden-Gate-Klonierung	126
5.3.3.4	Genomische Deletion mittels CRISPR–Cas9 System	126
5.3.3.5	FLP/FRT-Resistenzmarker-Recycling	127
5.3.3.6	Herstellung genspezifischer DNA-Sonden	128
5.3.4	Sequenz- und Strukturanalyse	128
5.3.5	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	128
5.3.5.1	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	128
5.3.5.2	Transfer von DNA (Southern Blot-Analyse)	129
5.3.5.3	Der spezifische Nachweis immobilisierter DNA	129
5.4	Biochemische Methoden	130
5.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	130
5.4.2	Proteinisolierung	131
5.4.2.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	131
5.4.2.2	Proteinfällung aus zellfreien Überständen	131
5.4.2.3	Deglykosylierung von Proteinen	132
5.4.3	Elektrophoretische-Auftrennung und Nachweis von Proteinen	132
5.4.3.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	132
5.4.3.2	Transfer von Proteinen (Western Blot-Analysen)	133
5.4.3.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen	133
5.4.3.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen	134
5.4.3.5	Zuckeranalysen mittels HPAEC-PAD	134
5.4.4	Enzymaktivitätstests	135
5.4.4.1	Vorbereitung von zellfreien Überständen	135
5.4.4.2	DNS-Assay für die Messung von Galakturonsäure und Arabinose	136
5.4.4.3	Analyse der Polygalakturonase-Aktivität von Kulturüberständen	137
5.5	Analyse von Glykolipiden	138
5.5.1	Isolierung von Glykolipiden	138
5.5.1.1	Isolierung von Glykolipiden aus kleinen und mittleren Volumina	138
5.5.1.2	Isolierung von Glykolipiden aus Großvolumina	139
5.5.2	Struktur- und biochemische Analysen von Glykolipiden	140
5.5.2.1	Dünnschichtchromatographie	140
5.5.2.2	HPLC-Analyse des Itakonsäuregehaltes von Kulturüberständen	140
5.6	Mikroskopie	141
5.6.1	Vorbereitung und Färbung von Präparaten	141
5.6.2	Fluoreszenzmikroskopie	142
5.6.3	Bearbeitung mikroskopischer Daten	142
6	LITERATURVERZEICHNIS	143
7	APPENDIX	170

1 Einleitung

1.1 Die Rolle von pflanzlicher Biomasse in mikrobiologischen Bioprozessen

Pflanzliche Biomasse ist der meist verfügbare, erneuerbare Rohstoff unseres Planeten und besteht hauptsächlich aus pflanzlichen Zellwandkomponenten (Loqué *et al.*, 2015), darunter die Polysaccharide Zellulose, Hemizellulose, Lignin, Pektin und strukturelle Proteine. Die Zusammensetzung der Zellwände kann dabei zwischen den Pflanzenspezies variieren, aber auch innerhalb einer Spezies vom Gewebetyp, dessen Entwicklungsstand und der pflanzlichen Reaktion auf abiotischen Stress abhängig sein (Pauly und Kezegstra, 2010; Le Gall *et al.*, 2015). Die hohe Diversität in der Zusammensetzung von pflanzlichen Zellwänden macht sie interessant als vielseitigen Ausgangsstoff für die Herstellung von Energieträgern und Treibstoffen, aber auch für die Veredlung zu wertvollen Plattformchemikalien. Gleichzeitig erfordert diese strukturell diverse Biomasse aber auch sehr spezialisierte Prozesse, um effektiv umgewandelt werden zu können (Pauly und Keegstra, 2008; Wendisch *et al.*, 2016). Bei der Umwandlung der Biomasse wird der Fokus meist auf die Lignozellulose, also die Bestandteile Zellulose, Hemizellulose und Lignin gelegt. Für ihre Weiterverarbeitung werden sowohl thermochemische als auch biologisch, fermentative Methoden verwendet (Galbe und Zacchi, 2012). Thermochemische Verfahren schließen Pyrolyse, Gasifizierung und Verbrennung von biologischen Ausgangsmaterialien mit ein. Produkte aus diesen Prozessen sind Pyrolyseöl, Kohle und Syngas, die in katalytischen Verfahren weiterverarbeitet werden, aber auch große Mengen an Wärme, die direkt für die Generierung von Elektrizität verwendet werden oder in den Prozess rückgeführt wird (Kang *et al.*, 2020; Tanger *et al.*, 2013). Die fermentativen Methoden beschreiben die Umsetzung von Zellwandbestandteilen unter der Verwendung von Mikroorganismen. Als klassisches Beispiel ist hier die Herstellung von Bioethanol zu nennen, die nicht zuletzt durch die Maßnahmen der Europäischen Union zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen an wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Bedeutung gewonnen hat (*Richtlinie 2009/28/EG*). Für die Herstellung von Bioethanol werden verschiedene Quellen von Biomasse genutzt und in einem Bioraffineriekonzept umgewandelt (Abbildung 1). Bioethanol der ersten Generation (1G Bioethanol) wird in industriellem Maßstab durch die Fermentation von Glukose und Saccharose erreicht, die aus Getreide, Zuckerrohr und Zuckerrüben isoliert werden (Ruchala *et al.*, 2020). Die weltweite Bioethanolproduktion steigt stetig, zuletzt um 7 % im Jahre 2018 mit den Hauptanteilen produziert in Brasilien und den USA (REN., 2019). Allerdings ist der Anbau der Rohstoffe für 1G Bioethanol nicht ohne Kritik, da er mit den Anbauflächen für die Lebensmittelproduktion konkurriert (Cherubini, 2010). Eine vorteilhafte Alternative stellt die Herstellung von Bioethanol der zweiten Generation (2G Bioethanol) dar, die mit komplexeren

Polymeren wie Lignozellulose, aus nicht-Nahrungsmittel Quellen gespeist wird (Cherubini, 2010; Macrelli *et al.*, 2014). Die Technologien, 2G Bioethanol herzustellen, existieren und werden auch in kleinerem Maßstab in Pilot Anlagen durchgeführt (Rødsrud *et al.*, 2012; Bacovsky *et al.*, 2013; Lennartsson *et al.*, 2014), sind jedoch häufig nicht rentabel genug, um in den industriellen Maßstab übertragen zu werden. Trotz des günstigen Preises der pflanzlichen Biomasse sind es oft die Transportkosten, die der Rentabilität im Weg stehen (Lennartsson *et al.*, 2014). Eine weitere Hürde bei der Verwendung von Lignozellulose als Ausgangsmaterial ist die Komplexität des Polymers und die daraus resultierende Unzugänglichkeit der monomeren Zuckermoleküle für den Fermentationsprozess (Mussatto *et al.*, 2008; Ruchala *et al.*, 2020). Durch die Anwendung verschiedener Vorbehandlungen (*Pretreatments*) wird versucht, die Zugänglichkeit des Lignozelluloseverbunds für die enzymatische Hydrolyse zu erhöhen. Mögliche Vorbehandlungen schließen mechanische Reduzierung der Partikelgröße, sowie thermochemische Behandlungen mit Säuren oder Laugen, physiochemische Behandlungen wie *ammonia fiber expansion* (APEX) oder Autohydrolyse unter Heißwasserbehandlung und hohem Druck, sowie die Behandlung mit organischen Lösemitteln mit ein (da Costa Sousa *et al.*, 2009; Rastogi und Shrivastava, 2017). Nachteile von thermochemischen Vorbehandlungen sind die Bildung von unerwünschten, die Fermentation inhibierenden Nebenprodukten, nötige pH-Adjustierungen, sowie hohe Kosten für die Beschaffung und Rückgewinnung von organischen Lösemitteln und anderen Chemikalien. Vorbehandlungen mit Säuren oder Laugen, sowie extremen Temperaturen und Drücken stellen zudem höhere Ansprüche an die verwendeten Geräte und Anlagen (Xu und Huang, 2014; Ruiz *et al.*, 2020). Biologische Vorbehandlungen werden meist durch die Zugabe von hydrolytischen Enzymen durchgeführt, oder durch die Inokulation der Lignozellulose mit Mikroorganismen, häufig Basidiomyceten und Actinomyceten, die durch die Sekretion von Lignin-Peroxidasen und Laccasen die Ligninstruktur aufbrechen (Lee, 1997). Da die Enzymcocktails, welche für die Hydrolyse von Lignozellulose verwendet werden, komplexer sind, als die für Zellulose verwendeten, können auch an dieser Stelle höhere Kosten entstehen (Lennartsson *et al.*, 2014).

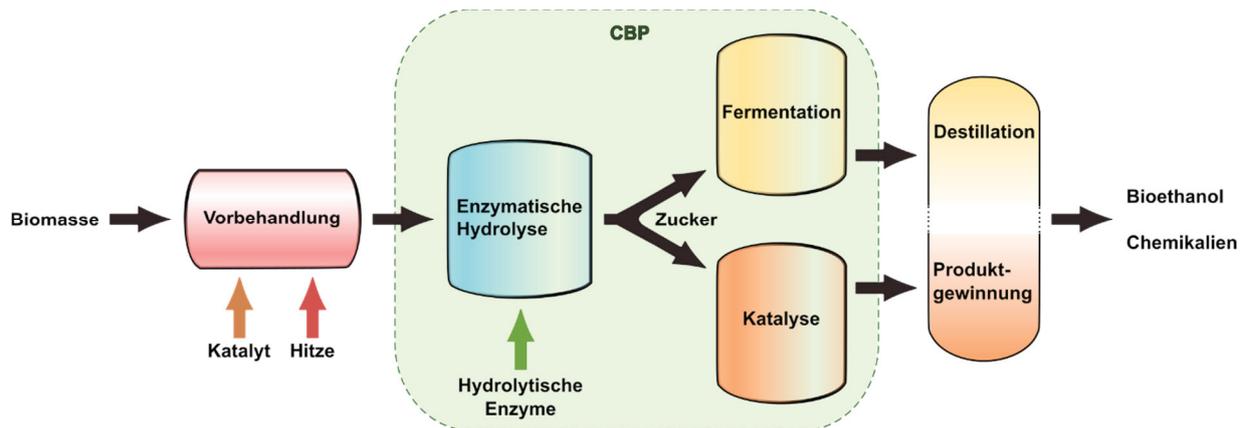


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Veredlungskonzeptes für pflanzliche Biomasse. Die Biomasse wird durch initiale Vorbehandlungsprozesse für die nachfolgende enzymatische Hydrolyse zugänglicher gemacht. Abhängig von dem gewünschten Produkt werden die freigesetzten Zuckermonomere durch Mikroorganismen zu Bioethanol fermentiert, oder durch den Einsatz katalytischer Verfahren weiterverarbeitet. Das Produkt wird destilliert, bzw. in einem abschließenden Aufreinigungsschritt gewonnen. Das Konzept des Konsolidierten Bioprozesses (engl.: consolidated bioprocess, CBP) kombiniert die Schritte der enzymatischen Hydrolyse und der Fermentation/ (Bio-)Katalyse durch den Einsatz von spezialisierten Mikroorganismen, oder mikrobiellen Konsortien. Abbildung verändert nach Payne *et al.* (2015).

Ein weiterer Ansatz sieht vor, die Lignin- und Hemizellulosekomposition bereits in der Pflanze anzupassen und somit Vorbehandlungsprozesse zu minimieren (Loqué *et al.*, 2015; McCann und Carpita, 2015). Diese Strategien zielen auf die Reduzierung des Ligningehaltes, bzw. die Manipulation der Ligninstruktur, um eine verbesserte enzymatische Hydrolyse zu ermöglichen (Eudes *et al.*, 2015; Wilkerson *et al.*, 2014). Auch die Erhöhung von fermentierbaren Zuckern in der Zellwand durch gezielte Manipulation von Synthesewegen konnte gezeigt werden (Zhang *et al.*, 2013). Nach erfolgreicher Hydrolyse der Lignozellulose stellen die verschiedenen Zuckermonomere besondere Ansprüche an die fermentierenden Mikroorganismen. Beispielsweise ist die häufig genutzte Hefe *S. cerevisiae* in der Lage, Glukose und Mannose effektiv zu verstoffwechseln, der Galaktoseimport wird allerdings durch vorhandene Glukose gehemmt. Ebenso sind Wildtypstämme von *S. cerevisiae* nicht in der Lage, Pentosen, wie Xylose oder Arabinose zu verstoffwechseln (Ruchala *et al.*, 2020). Gezielte genetische Manipulation und die Integration von ganzen heterologen Stoffwechselwegen stellen jedoch Möglichkeiten dar, diese komplexen Hydrolysate dennoch zu 2G Bioethanol zu fermentieren (Ostergaard *et al.*, 2001; Cunha *et al.*, 2019; Ye, Kim und Kim, 2019).

Neben der Verwendung von Lignozellulose hat auch pektinreiche Biomasse als erneuerbarer Rohstoff an Bedeutung gewonnen. Dieser Rohstoff fällt in großen Mengen als Abfall der Agrarindustrie, oder der Lebensmittel-herstellenden Industrie an und beinhaltet als prominente Beispiele Apfeltrester und Zitrusabfälle aus der Saffherstellung, sowie Zuckerrübenschnitzel aus der Zuckerraffinerie (Doran *et al.*, 2000; Edwards und Doran-Peterson, 2012). Die verfügbaren Quellen pektinreicher Biomasse sind je nach landesspezifischer Produktion und

Verarbeitung von Agrarprodukten unterschiedlich und so sind lokal auch andere Agrarabfälle wie Oliventrester, Sojähüllen und Kartoffelrückstände von Interesse (Babbar *et al.*, 2016). Die zurzeit verbreitetste Verwendung der pektinreichen Biomasse ist die Nutzung als Tierfutter (Edwards und Doran-Peterson, 2012), speziell in Europa und den USA die Verfütterung von getrockneten Zuckerrübenpellets (Feedimpex 2020). Die Kosten für den Transport und die Trocknung der Biomasse sind allerdings hoch und somit auch das Interesse der produzierenden Industrien, kosteneffizientere Anwendungen für die Biomasseverarbeitung zu finden (Doran *et al.*, 2000). Eine Alternative kann hier die Nutzung von Pektin-reicher Biomasse in mikrobiologischen Prozessen sein. Durch den geringen Anteil von Lignin ist die Vorbehandlung von pektinreicher Biomasse weniger aufwändig und kostengünstiger (Zhou *et al.*, 2007; Edwards und Doran-Peterson, 2012). Bei der Fermentation von Zuckerrübenschnitzeln kann auf eine thermochemische Vorbehandlung gänzlich verzichtet werden und nach einer enzymatischen Hydrolyse die Fermentation durchgeführt werden (Edwards und Doran-Peterson, 2012). Die Aufwertung von pektinreicher Biomasse durch Fermentationsprozesse stellt somit eine vielversprechende Methode dar, aus einem Reststoff wertgesteigerte Produkte zu produzieren.

Pektin stellt mit 12-35 % einen Hauptbestandteil von pektinreicher Biomasse dar (Edwards und Doran-Peterson, 2012). In Pflanzen ist es vor allem in primären Zellwänden zu finden, wo es für die Stabilität und Wasserhaltekapazität sorgt (Pauly und Keegstra, 2008; Larsen *et al.*, 2011). Industriell wird Pektin als Geliermittel und als Zusatzstoff (E440) in Nahrungsmitteln und kosmetischen Zubereitungen eingesetzt, findet aber auch im biomedizinischen und pharmazeutischen Sektor Anwendung, zum Beispiel bei der Verabreichung von Medikamenten, oder als Bestandteil von Wundheilstoffen (Munarin *et al.*, 2012; Günter und Popeyko, 2016). Die industriellen Quellen, aus denen Pektin isoliert wird, sind Apfel- und Zitruschalen, aber auch Zuckerrübenpektine sind kommerziell erhältlich (Mellinas *et al.*, 2020). Pektin ist ein Heteropolysaccharid und kann in vier strukturelle Einheiten unterteilt werden. Homogalakturonan (HG), Rhamnogalakturonan I (RG-I), Rhamnogalacturonan II (RG-II) und Xylogalakturonan (XG), die in ihren Anteilen stark variieren können. HG (Abbildung 2, links) stellt mit ca. 65 % den Hauptanteil des Pektins dar und besteht aus α -1-4-glykosidisch verknüpfter D-Galakturonsäure (GalA) (Mohnen, 2008). Es kommt in Strängen von bis zu 100 GalA Einheiten vor (Yapo *et al.*, 2007) und kann Methylester an dem C-6 Carboxylrest, bzw. Acetylgruppen an den Positionen O-2 und O-3 tragen (Ridley *et al.*, 2001; Ralet *et al.*, 2005). RG-I (Abbildung 2, rechts) ist die zweithäufigste Struktur in Pektin und besteht aus einem Rückgrat aus [D-GalA-1,2- α -L-Rha-1,4- \rightarrow]-Wiederholungen. Seitenketten bestehend aus Arabinan, Galaktan und Arabinogalaktan können an der C-4 Position der Rhamnose substituiert sein (Glass *et al.*, 2013). Kleinere Anteile in der Pektinstruktur bilden das Xylogalakturonan, bestehend aus Galakturonaneinheiten substituiert mit D-Xylose an der C-3

Position und RG-II (Caffall und Mohnen, 2009). Ähnlich der Fermentation von Hemizellulose Bestandteilen stellt die Fermentation von Pektinbestandteilen besondere Ansprüche an die verwendeten Mikroorganismen, da diese in der Lage sein müssen, Pentosen effektiv zu verstoffwechseln. Speziell GalA als Kohlenstoffquelle erfordert den Einsatz spezialisierter, oder biotechnologisch veränderter Mikroorganismen (Protzko *et al.*, 2018; van Maris *et al.*, 2006). Jüngste Entwicklungen zeigen, dass durch die Integration von GalA Stoffwechselwegen und effektiven Transportern die GalA-Fermentation durch *S. cerevisiae* deutlich gesteigert werden kann (Biz *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2020; Protzko *et al.*, 2018). Voraussetzung für die effektive fermentative Nutzung ist die möglichst komplette Hydrolyse von Pektin. Diese kann durch den Einsatz von spezifisch wirkenden, hydrolytischen Enzymen erreicht werden (Voragen *et al.*, 2009).

Die an Bedeutung gewinnende Methode des konsolidierten Bioprozesses kombiniert die Schritte der Produktion hydrolytischer Enzyme, der Hydrolyse der Polysaccharide und der Fermentation der monomeren Zucker (Abbildung 1, grüner Bereich). Dies hat vor allem den Vorteil, dass die Produktions- oder Beschaffungskosten für hydrolytische Enzyme entfallen, und für die Reaktion lediglich ein Reaktionsgefäß benötigt wird (Lynd *et al.*, 2005). Optimale Mikroorganismen für solche Prozesse sollten in der Lage sein, hydrolytische Enzyme zu sekretieren und möglichst alle freigesetzten, monomeren Zucker zu verstoffwechseln (Parisutham *et al.*, 2014). Für die Produktion von Bioethanol kann dafür die Sekretion der nötigen Enzyme in Hefen wie *S. cerevisiae* zielführend sein (Valenzuela-Ortega und French, 2019). Fortgeschrittene Konzepte beinhalten die Konstruktion von rekombinanten Zellulosomkomplexen, bestehend aus Gerüstproteinen und zellulolytischen Enzymen, wie es in der Hefe *Pichia pastoris* durch Shin *et al.* (2015) gezeigt werden konnte. Durch die Expression eines Mini-Zellulosoms, bestehend aus dem Gerüstprotein CbpA aus *Clostridium cellulovorans*, sowie einer rekombinanten Xylanase und Endoglukanase konnte so auf vorbehandelter *Miscanthus*-Biomasse 1,9-fach mehr Ethanol produziert werden als bei freier Sekretion der hydrolytischen Enzyme. Neben der Bioethanolproduktion kann auch die effektive Produktion von Sekundärmetaboliten gezeigt werden. So konnten Zhao *et al.* (2018) durch die Integration des Gens für die *cis*-Aconitsäure Decarboxylase (CAD) in *Neurospora crassa* in einem konsolidierten Bioprozess die Synthese von Itakonsäure aus dem polymeren Substrat Avicel, sowie Maisschrot und Rutenhirse zeigen. Ein weiteres Beispiel zeigt den effektiven Einsatz von mikrobiologischen Konsortien zu Herstellung von Milchsäure. Shahab *et al.* (2018) zeigten dies durch die Verwendung der spezialisierten Organismen *Trichoderma reesei* und *Lactobacillus pentosus*. Auch pektinreiche Biomasse findet Verwendung in konsolidierten Bioprozessen. Die Verwendung von filamentösen Pilzen als pektinolytische Organismen (Schmitz *et al.*, 2019) ermöglicht die effektive Hydrolyse und simultane Produktion von

monomeren Zuckern, sowie Sekundärmetaboliten wie Ascorbinsäure (Kuivanen *et al.*, 2014; 2015; Kuivanen und Richard, 2016).

1.2 Enzymatische Hydrolyse von Pektin

Enzyme, involviert in den Aufbau und die Aufspaltung komplexer Kohlenwasserstoffe und Glykokonjugate, werden als *carbohydrate active enzymes* (CAZymes) bezeichnet und anhand ihrer Aminosäuresequenz und funktionellen Domänen in verschiedenen Klassen eingeordnet (Cantarel *et al.*, 2009). Als stark vernetzte Superstruktur wird für die Hydrolyse von Pektin ein potentes Set an komplementär wirkenden hydrolytischen CAZymes benötigt (Jayani *et al.*, 2005). Für das Rückgrat des HG werden Glykosyl Hydrolasen (GH Familie) und Polysaccharid Lyasen (PL Familie) benötigt (van den Brink und de Vries, 2011). Speziell das Zusammenwirken von Exo- und Endo-Polygalakturonasen (GH 28 Familie) setzt monomere GalA frei, indem die α -1,4 glykosidische Bindung hydrolysiert wird. Pektin- und Pektatlyasen (PL Familie) hingegen bilden 4,5-ungesättigte (Methyl)-Galakturonsäureoligomere über eine β -Eliminierungsreaktion (Yadav *et al.*, 2009) und zeigen Substratspezifität zu stärker bzw. schwächer Methyl-verestertem HG (Mayans *et al.*, 1997). Methylveresterungen und O-Acetylierungen des HG benötigen zudem die hydrolytische Aktivität von Pektin Methylesterasen und Pektin Acetylerasen (CE Familie), um aus HG Polygalakturonsäure (PolyGalA) zu produzieren (Sénéchal *et al.*, 2014; Yadav *et al.*, 2009). Die komplette enzymatische Hydrolyse der komplexeren Strukturen des Pektins (RG-I, RG-II und XG) erfordert eine Vielzahl weiterer hydrolytischer Enzyme (Glass *et al.*, 2013) (Abbildung 2). So können durch den Einsatz sogenannter akzessorischer Enzyme wie Arabinofuranosidasen, Arabinasen, Galaktasen, β -Galaktosidasen, β -Xylosidasen α -Rhamnosidasen und Glukuronyl Hydrolasen weitere fermentierbare Monosaccharide verfügbar gemacht werden (de Vries und Visser, 2001).

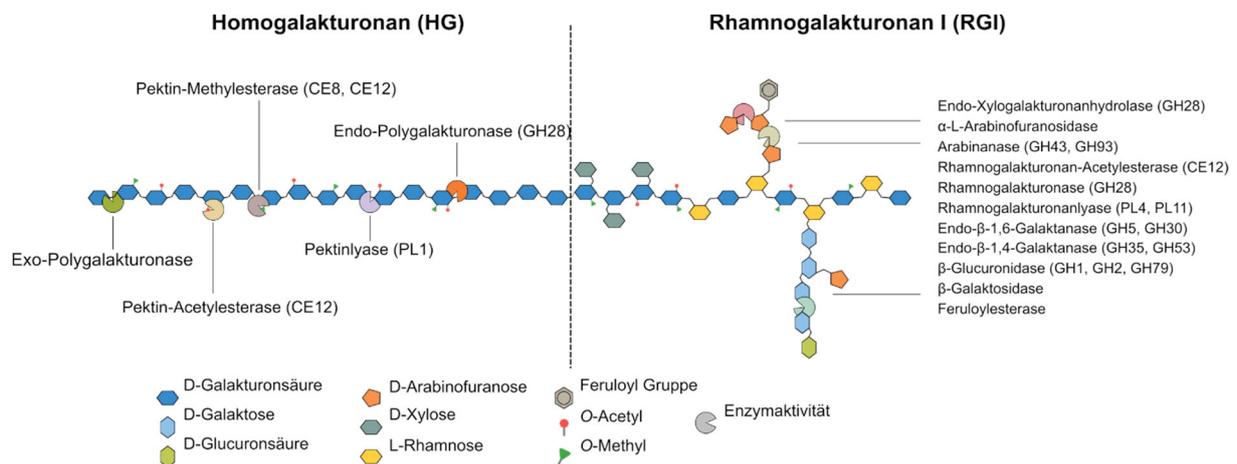


Abbildung 2: Schematische Darstellung der häufigsten Pektinstrukturen von Homogalakturonan (HG) und Rhamnogalakturonan (RGI) und der für den Abbau relevanten Enzyme. HG zeichnet sich durch ein Rückgrat von α -1-4-glycosidisch verknüpfter D-Galakturonsäure (GalA) aus, das an der C-6 Position Methyl-, bzw. an der O2 oder O3 Position Acetylcyster tragen kann. RGI besteht aus einem Rückgrat aus [D-GalA-1,2- α -L-Rha-1,4- \rightarrow]-Wiederholungen. Assoziierte Seitenketten an der C-4 Position der Rhamnose beinhalten Arabinan, Galaktan und Arabinogalaktan. Als eingeschnittene Kreise werden die Enzyme mit der entsprechenden Position der Reaktion im Pektinmolekül gezeigt. Neben der Enzymbezeichnung wird die Enzymklasse in Klammern angegeben. (Abbildung verändert nach Stoffels und Müller *et al.*, 2020)

Pektinolytische Enzyme werden meist in filamentösen Pilzen produziert. Ascomyceten wie *Aspergillus niger* und *Penicillium spezies*, aber auch Basidiomyceten wie *Schizophyllum* und *Fusarium* sind bekannte Produzenten (de Vries, 2003; Ohm *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2009). Diese Pilze gehören zu den natürlichen Destruenten von pflanzlicher Biomasse und produzieren spezialisierte Sets von hydrolytischen Enzymen für das jeweilige Material (Martens-Uzunova *et al.*, 2006). Auch bakterielle Spezies wie *Erwinia*, *Klebsiella* oder *Bacillus* produzieren eine Vielzahl pektinolytischer Enzyme (Shevchik *et al.*, 1998; Jayani *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2012; Remoroza *et al.*, 2014). Die Identifizierung und Charakterisierung neuer pektinolytischer Enzyme ist von großem Interesse und vor allem die industrielle Anwendung erfordert Enzyme mit hohen Aktivitäten unter extremen Bedingungen (Elleuche *et al.*, 2014). Eine der wichtigsten Anwendungen, die Fruchtsaft Herstellung und Klärung, erfordert beispielsweise Pektinasen mit niedrigen Temperaturoptima um eine produktschonende Verarbeitung zu gewährleisten. Auch bei der Herstellung von Wein sind diese Pektinasen gefragt (Adapa *et al.*, 2014). Weitere Anwendungen von pektinolytischen Enzymen sind die Öl-Extraktion, die Waschung von Kaffeebohnen oder die Tee-Fermentation (Blanco *et al.*, 1999; Kashyap *et al.*, 2001).

1.3 *Ustilago maydis* als vielseitiger Modellorganismus

Ustilago maydis ist ein biotropher Basidiomycet aus der Familie der *Ustilaginales* und bekannt als der Verursacher des Maisbeulenbrandes in seinem natürlichen Wirt *Zea mays* und dessen wildem Vorfahren Teosinte (*Zea mays* subsp. *parviglumis*) (Banuett, 1992). Er besitzt einen biphasischen Lebenszyklus, der sich in eine nicht infektiöse Phase außerhalb des Wirtes und eine biotrophe Phase in Abhängigkeit von der Wirtspflanze einteilen lässt. Die nicht infektiöse Phase zeichnet sich durch eine haploide, sich vegetativ durch Knospung teilende, hefeähnliche Wuchsform aus (Banuett & Herskowitz, 1994). Die infektiöse Phase beginnt, sobald haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps über Konjugationshyphen miteinander zu einem dikaryotischen Filament verschmelzen (Spellig *et al.*, 1994). Zellen kompatiblen Paarungstyps erkennen sich über ein Pheromonsystem, welches auf dem biallelischen *a*-Lokus, kodierend für ein Pheromon und einen Pheromonrezeptor, beruht (García-Muse *et al.*, 2003). Die Ausbildung des dikaryotischen Filaments wird im Folgenden durch die Expression des multiallelischen *b*-Lokus erreicht. Dieser kodiert für einen heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktor, der durch die Untereinheiten *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) gebildet wird (Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990) und nur dann funktionell ist, wenn die Untereinheiten von haploiden Zellen unterschiedlichen Paarungstyps stammen (Kämper *et al.*, 1995). Die dikaryotische, filamentöse Wuchsform kann dann über die Bildung eines Appressoriums in die Wirtspflanze eindringen (Snetselaar *et al.*, 1992). Ein wichtiges Werkzeug stellt der Laborstamm AB33 dar, der über einen durch Nitrat induzierbaren Promotor einer Nitratreduktase (P_{nar}) ein funktionelles *bW2bE1*-Heterodimer exprimiert (Banks *et al.*, 1993; Brachmann *et al.*, 2001). So kann über einen Wechsel der Stickstoffquelle im Medium filamentöses Wachstum, unabhängig von der Pflanzeninfektion, induziert werden.

Von wissenschaftlichem Interesse ist *U. maydis* bereits seit der Entdeckung der homologen Rekombination als DNA-Reparaturmechanismus durch Holliday (1974). Heutzutage richtet sich das Forschungsinteresse vorwiegend auf die Untersuchung von Pflanze-Pathogen Wechselwirkungen (Brefort *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2012; Djamei und Kahmann, 2012; Matei und Doehlemann, 2016), Zellbiologie und den mikrotubuliabhängigen Transport von mRNA (Göhre *et al.*, 2012; Zander *et al.*, 2016; Haag *et al.*, 2019; Jankowski *et al.*, 2019; Olgeiser *et al.*, 2019). Ein wichtiger Schritt für das effektive molekularbiologische Arbeiten mit *U. maydis* war dabei das ab dem Jahr 2006 verfügbare, sorgfältig annotierte 20,5 Mb Genom (Kämper *et al.*, 2006). Die effektive homologe Rekombination kombiniert mit einer Vielzahl an etablierten molekularbiologischen Methoden macht es möglich, gezielt genetische Modifikationen durchzuführen (Feldbrügge *et al.*, 2004; Kämper, 2004; Terfrüchte *et al.*, 2014), wozu Reporter-gen-Fusionen, sowie stabile genomische Integrationen und Deletionen gehören (Brachmann *et al.*, 2004; Brachmann *et al.*, 2001; Spellig *et al.*, 1994). Die Anzahl verfügbarer

Selektionsmarker für *U. maydis* ist begrenzt, allerdings können durch die Verwendung des FLP/FRT-Systems zur Regeneration von Resistenzkassetten, Selektionsmarker mehrfach verwendet werden, oder durch die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems in *U. maydis* genetische Modifikationen ohne die dauerhafte Verwendung von Selektionsmarkern durchgeführt werden (Khrunyk *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2016; Zuo *et al.*, 2020). Ein häufig genutzter Locus für die stabile Integration ist der *ip^S*-Locus, der für die Eisen-Schwefel Untereinheit der Succinatdehydrogenase kodiert, einem Enzym der Atmungskette. In seiner *ip^S*-Variante wird die Succinatdehydrogenase in Anwesenheit von Carboxin bei der Übertragung von Elektronen auf Ubiquinon inhibiert. Eine Mutation resultierend in einem Aminosäureaustausch an Position 253 hat den Verlust der Sensitivität gegen Carboxin (*ip^R*) zur Folge. Werden bei der genomischen Integration in den *ip^S*-Locus homologe Sequenzen verwendet, in denen dieser Aminosäureaustausch kodiert ist, entsteht bei erfolgreicher Integration ein Carboxinresistenz vermittelnder *ip^R*-Locus auf den selektiert werden kann (Broomfield und Hargreaves, 1992; Stock *et al.*, 2012).

1.3.1 Das biotechnologische Potential von *Ustilago maydis*

In den letzten Jahren hat sich *U. maydis* zu einem biotechnologisch vielversprechenden Organismus entwickelt (Klement *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2012; Feldbrügge *et al.*, 2013; Sarkari *et al.*, 2014; Geiser *et al.*, 2016; Terfrüchte *et al.*, 2017). Kultivierbar ist *U. maydis* in beiden beschriebenen Wuchsformen, sowohl auf Fest-, als auch in Flüssigmedien, was eine einfache Handhabung im Labor ermöglicht. Die haploide Wachstumsform zeigt sich robust gegenüber mechanischem und osmotischem Stress und anders als bei filamentösen Pilzen ist die axenische Kultur im Fermenter unproblematisch (Carstensen *et al.*, 2013; Klement *et al.*, 2012). Die Verdopplungszeit beträgt bei einer Kultivierung auf Glukose als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) in der Hefeform ca. zwei Stunden und auch eine Kultivierung auf anderen Hexosen und Pentosen, sowie Glycerin und Ethanol Supplementierung konnte gezeigt werden (Hartmann *et al.*, 1999; Cano-Canchola *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011; Feldbrügge *et al.*, 2013; Terfrüchte *et al.*, 2018). Die vielseitige biotechnologische Anwendbarkeit von *U. maydis* wurde in den vergangenen Jahren mehrfach gezeigt. Große Fortschritte wurden beispielsweise bei der Sekretion heterologer Proteine mittels konventioneller und unkonventioneller Sekretion gemacht. Dies stellte die Flexibilität von *U. maydis* als Expressionsplattform unter Beweis und die Aufschlüsselung des unkonventionellen Sekretionsweges wird folglich fortlaufend angetrieben (Reindl *et al.*, 2019; Sarkari *et al.*, 2014; Stock *et al.*, 2012; Terfrüchte *et al.*, 2017). Weitere Fortschritte zeigten sich im Bereich der Prozessoptimierung, was die Ausbeuten sekretierter Proteine erhöhte (Terfrüchte *et al.*, 2018). Neben der Sekretion von heterologen

Proteinen ist Produktion von Sekundärmetaboliten interessant, da *U. maydis* bereits ein großes Repertoire natürlicherweise herstellt (Bölker *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2020). Die Identifizierung von Zellwand-abbauenden Enzymen eröffnete zudem die Möglichkeit, *U. maydis* für den Abbau und die Veredlung von pflanzlicher Biomasse in Betracht zu ziehen (Couturier *et al.*, 2012; Döhlemann, 2010; Kämper *et al.*, 2006).

1.3.1.1 Abbau pektinreicher Biomasse mit *Ustilago maydis*

Das Genom von *U. maydis* kodiert für 33 hydrolytische Enzyme, die dem Abbau von pflanzlichen Zellwänden zugeordnet werden können (Kämper *et al.*, 2006). Dieses im Vergleich zu bekannten CAZyme-produzierenden Pilzen wie *A. niger* und *T. reesei* (de Vries und Visser, 2001; Glass *et al.*, 2013) kleine Set an zellwandabbauenden Enzymen wird mit seiner biotrophen Lebensweise und dem erleichterten Eindringen in die Wirtspflanze in Verbindung gebracht (Doehlemann *et al.*, 2008). Unter den hydrolytischen Enzymen finden sich zellulolytische und hemizellulolytische Enzyme wie Xylanasen, Endo-Glukanasen, β -Glukosidasen und Oxidoreduktasen (Cano-Canchola *et al.*, 2000; Couturier *et al.*, 2012; Doehlemann *et al.*, 2008; Geiser *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2008), deren Expression sich durch die Kultivierung auf Zellwandbestandteilen wie Maisschrot induzieren lässt (Couturier *et al.*, 2012). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde durch die Erstellung von Expressionsprofilen die Induktion von Zellwand-degradierenden Enzymen während des Infektionsstadiums bestätigt. Maissetzlinge wurden mit einer Mischung der kompatiblen, haploiden Stämme FB1 und FB2 (Banuett und Herskowitz, 1989) infiziert und RNA Proben aus Tumorgewebe nach drei, fünf und 12 Tagen nach der Infektion präpariert und mit RNA Proben von FB1 inokulierten Pflanzen 16 Stunden nach der Innokulation verglichen. Über eine *Microarray*-Analyse wurden die Expressionsprofile gegen die 6200 annotierten Gene abgeglichen. Die Analyse zeigte, dass die Expression von 15 der 27 auf den *Microarray* vorhandenen Gene zellwanddegradierender Enzyme während der infektiösen Phase hochreguliert war. Diese Gene sind involviert in (Hemi-)Zelluloseabbau (β -Glukanasen, β -1,4-Endo-Glukanasen, Endo-Xylanasen und α -L-Arabinofuranosidase), Pektinabbau (Endo-Polygalakturonase, Pektin Lyase und Pektin Methylsterase) und Galaktomannanabbau (β -Mannosidase, Endo-Mannanase und α -Galaktosidase) (Doehlemann *et al.*, 2008). Dieses kleine, aber vielseitige Set an hydrolytischen Enzymen demonstriert die Eignung von *U. maydis* für den Abbau von pflanzlicher Biomasse, wird jedoch nicht in der biotechnologisch favorisierten Hefeform exprimiert. Ein erster Versuch dieses Problem zu adressieren, war der Austausch der nativen Promotoren der Gene von vier ausgewählten zellulolytischen Enzymen (die Endo-1,4- β -Xylanase Xyn11a, die vermeintliche β -Glukosidase Bgl1, die Endo-Glukanase Egl1 und der vermeintliche Endo-Glukanase umag_02523) gegen die künstlichen,

konstitutiven Promotoren P_{otef} und P_{oma} (Geiser *et al.*, 2016), deren Expressionsstärke in axenischer Kultur bereits zuvor untersucht wurde (Hartmann *et al.*, 1999; Hußnätter, 2015; Reindl, 2013; Spellig *et al.*, 1994). Alle Überexpressionsstämme, die den P_{oma} Promotor trugen, zeigten eine signifikante Erhöhung der Expression der hoch regulierten Gene. Die Kulturüberstände wurden auf mehr oder weniger komplexen, den Polymeren von (Hemi-)Zellulose ähnlichen Substraten getestet (β -Xylanase, Birkenxytan; β -Glucosidase, Cellobiose; Endo-Glucanase, Carboxymethylzellulose) und waren in der Lage, diese in ihre monomeren Bestandteile zu hydrolysieren. Dieses Ergebnis demonstriert, dass der Austausch von Promotoren eine effektive Möglichkeit sein kann, intrinsische, hydrolytische Enzyme auch in der Hefeform nutzbar zu machen.

Neben dem Potential für den Abbau von (Hemi-)Zellulose bietet die enzymatische Ausstattung von *U. maydis* auch pektinolytisches Potential. Die Zellwände von Mais beinhalten nur einen geringen Pektinanteil (Carpita *et al.*, 2001), dennoch wurden unter den hochregulierten Enzymen eine Endo-Polygalakturonase, eine Pektinlyase und eine Pektin Methylesterase und damit Schlüsselenzyme für den Abbau des (GalA)-Rückgrats identifiziert. Eine biologische Funktion während der Infektion von Wirtspflanzen konnte nicht belegt werden (Doehlemann *et al.*, 2008). Im Hinblick auf eine biotechnologische Anwendung könnten diese Enzyme jedoch auf pektinreicher Biomasse ggf. zur Freisetzung von GalA dienen. Die identifizierte Endo-Polygalakturonase Pgu1 gehört als hydrolytisches Enzym der GH28 Familie zu den Enzymgruppen, die mit der effektiven Hydrolyse des GalA-Rückgrats in HG in Verbindung stehen. Sequenzvergleiche zeigten darüber hinaus starke Ähnlichkeit zu den Endo-Polygalakturonasen I und II aus *A. niger* und einer Endo-Polygalakturonase aus *Colleotrichum lupini* (Castruita-Domínguez *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu vielen nekrotrophen Pilzen (Sprockett *et al.*, 2011), besitzt *U. maydis* mit der Pgu1 nur ein Enzym, das der GH 28 Familie zuzuordnen ist. Die Expression einer für den effektiven Abbau von HG benötigten heterologen Exo-Polygalakturonase könnte das Enzymset jedoch mit nur einem Schritt komplementieren. Sekretomstudien zeigten zudem bereits drei verfügbare α -L-Arabinofuranosidasen und zwei β -Galaktosidasen, die die Hydrolyse von Seitenketten des RGI katalysieren könnten (Doehlemann *et al.*, 2008).

1.3.1.2 Sekretion heterologer Proteine mittels unkonventioneller Sekretion

Neben dem Signalpeptid-vermittelten, konventionellen Sekretionsmechanismus über das Endomembransystem wurde in *U. maydis* mit der Identifizierung der Chitinase Cts1 ein alternativer, unkonventioneller Sekretionsmechanismus entdeckt, der für die Sekretion von heterologen Proteinen genutzt werden kann (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Cts1

besitzt kein konventionelles Signalpeptid, weist aber dennoch extrazelluläre Aktivität auf und kann im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Stock *et al.*, 2012). Zellen in der Hefeform zeigen einen klaren Teilungsdefekt, wenn Cts1 und eine weitere, konventionell sekretierte Chitinase, Cts2, deletiert sind (Aschenbroich *et al.*, 2019; Langner *et al.*, 2015). Dies deutet auf eine Rolle bei der Zellseparierung hin. Hierzu passend wurde beobachtet, dass Cts1 während der Knospung ausgehend von der Tochterzelle zum primären Septum transportiert wird und schließlich in der komplett gebildeten Fragmentierungszone akkumuliert (Abbildung 3 A, B) (Aschenbroich *et al.*, 2019; Langner *et al.*, 2015).

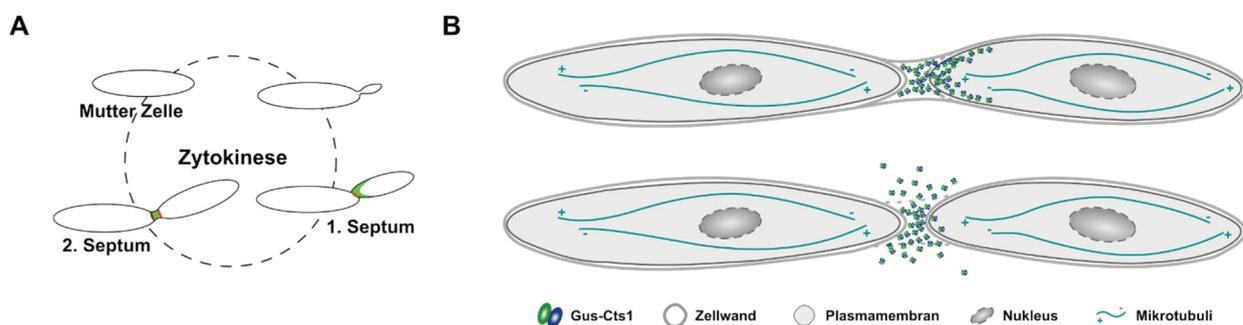


Abbildung 3: Übersicht zur Anwendung des unkonventionellen Sekretionsmechanismus in *U. maydis*. A, Darstellung der Lokalisierung von Cts1 (grün) während der Bildung des ersten und zweiten Septums über den Prozess der Knospung (Verändert nach Reindl *et al.*, 2019). B, Schematische Darstellung der Lokalisierung des Gus-Cts1 Fusionsproteins während der Bildung des primären und sekundären Septums. Die Akkumulierung geschieht in Form eines Gradienten von der Tochterzelle zur Fragmentierungszone. Nach dem bilden des sekundären Septums wird das Fusionsprotein aus der Fragmentierungszone freigesetzt (verändert nach Terfrüchte, 2016).

Weitere Untersuchungen bestätigten, dass dieser Sekretionsmechanismus mit der Zytokinese in Hefezellen in Verbindung steht. Der genaue Mechanismus der Lokalisation von Cts1 in der Fragmentierungszone ist nicht abschließend geklärt und bleibt Ziel weiterer Untersuchungen. Es kann aber postuliert werden, dass bei korrekter Assemblierung der Fragmentierungszone Cts1 bei der Zellteilung wie beim Öffnen einer Schleuse freigesetzt wird (Aschenbroich *et al.*, 2019; Reindl *et al.*, 2019). Dieser Mechanismus eignet sich hervorragend für das Ausschleusen heterologer Proteine, die über translationale Fusion an Cts1 als Trägerprotein angehängt werden. Gegenüber der konventionellen Sekretion hat dies den entscheidenden Vorteil, dass das Endomembransystem mit den dort stattfindenden Modifizierungen wie N-Glykosylierung umgangen wird. Dies ermöglicht zum Beispiel das Sekretieren von bakteriellen Proteinen wie der β -Glukuronidase Gus aus *Escherichia coli*, die sonst durch artifizielle Modifizierung mit Zuckerketten inaktiviert würden (Abbildung 3 B) (Iturriaga *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 2012). Erste Erfolge in der biotechnologischen Nutzung des unkonventionellen Sekretionsmechanismus konnten bereits mit der Sekretion von funktionellen Nanobodies gezeigt werden. Sowohl α Gfp-Nanobodies (α GfpNB), als auch pharmazeutisch relevante

Nanobodys, gerichtet gegen das Botulinumtoxin A, wurden über eine Cts1-Fusion funktionell in den Kulturüberstand sekretiert. (Terfrüchte *et al.*, 2017). Es wurde zudem beobachtet, dass Cts1 an Chitin bindet, was mögliche Aufreinigungsstrategien von Cts1-Fusionsproteinen erleichtern kann. Es war zudem möglich, über an eine Chitin-Matrix gebundenes α GfpNB-Cts1-Fusionprotein, freies Gfp zu isolieren (Terfrüchte *et al.*, 2017). In Bezug auf die Größe der ausgeschleusten Proteine unterliegt das System keinen bekannten Limitierungen. Bislang durchgeführte Studien zeigten die unkonventionelle Sekretion von Cts1-Fusionsproteinen von bis zu mindestens 173 kDa, ohne dass eine Maximalgröße festzustellen war (Stock *et al.*, 2012). Die anfänglich geringen Mengen an sekretiertem Protein wurden über die Verwendung des starken, konstitutiven P_{oma} -Promotors erhöht (Sarkari *et al.*, 2014). Zusätzlich dazu wurde die effektive Proteinsekretion durch die schrittweise Deletion mehrerer Aspartat- und Serinproteasen sowie Serin-Carboxypeptidasen optimiert. Angefangen mit einer fünffachen Deletionsmutante (AB33P5 Δ^R) wurde die Anzahl der deletierten Proteasen auf acht erhöht (AB33P8 Δ^R), ohne die Fitness der Zellen zu beeinflussen. Die proteolytische Aktivität von Kulturüberständen konnte so in Kombination mit pH-Stabilisierung um ca. 80 % reduziert werden (Sarkari *et al.*, 2014; Terfrüchte *et al.*, 2018). Durch die Nutzung des etablierten FLP/FRT-Systems konnten die Deletionen ohne die dauerhafte Integration von Selektionsmarkern durchgeführt werden, was die resultierenden Stämme zu exzellenten Produktionsplattformen für heterologe Proteine macht.

1.3.1.3 Primär und Sekundärmetabolite

Neben der Proteinsekretion zeichnet sich *U. maydis* durch die natürliche Produktion verschiedener wertvoller Primär- und Sekundärmetabolite aus. Zum produzierten Spektrum gehören organische Säuren, wie Itakonsäure, 2-Hydroxyparaconat und Itaweinsäure, Polyole, intrazelluläre Triacylglycerole und die Glykolipide Ustilaginsäure (UA) und Mannosylerythritollipide (MEL) (Guevarra und Tabuchi, 1990; Bölker *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2010; Feldbrügge *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2017). Besonders bei der Produktion von Itakonsäure wurden jüngst große Fortschritte gemacht. Das für die Itakonsäuresynthese verantwortliche Gencluster wurde charakterisiert und die Synthese durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors Ria1 konstitutiv aktiviert. Die P450 Monooxygenase Cyp3, die die Katalyse von Itakonsäure zu 2-Hydroxyparakonat vermittelt, wurde deletiert und durch die gezielte Abschaltung weiterer Metabolitwege (Malat, Ustilaginsäure, MELs, Triacylglyceride) ergänzt. Gekoppelt mit einer *in situ* Produktkristallisation konnten so Itakonsäuretitere von bis zu 220 g/L erreicht werden (Becker *et al.*, 2020; Geiser *et al.*, 2016; Geiser *et al.*, 2015; Hosseinpour Tehrani *et al.*, 2019). Weiterhin konnte durch Lee *et al.* (2020) erstmals die Produktion von Sesquiterpenen in

U. maydis gezeigt werden. Durch die gezielte überexpression von Genen des Melavolat-, Prenylphosphat-, und Carotinoidsynthesewegs konnte so die Produktionsleistung der kombinierten Synthese über Lycopren ausgelesen werden. Die heterologe Expression einer pflanzlichen (+) - Valencensynthase und einer pilzlichen Sesquiterpenoidsynthase ermöglichten letztlich die Produktion von (+) - Valencen and α - Cuprenen.

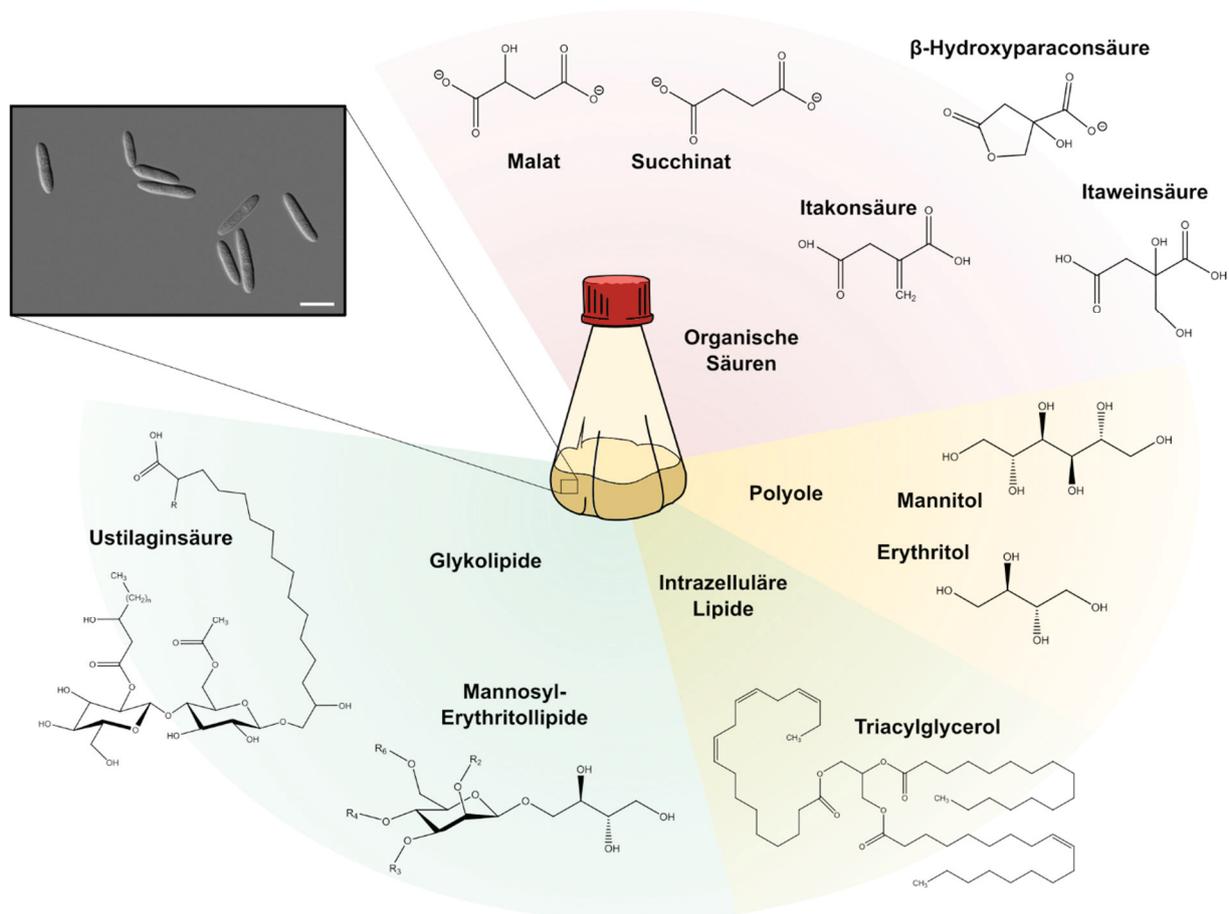


Abbildung 4: Vom *U. maydis* Stamm MB215 natürlich synthetisierte Metabolite. Die für die biotechnologische Nutzung bevorzugte Hefeform des Stamms ist mikroskopisch dargestellt (Größenmarker 10 μ m). Abbildung verändert nach Becker *et al.* (2020).

1.4 Glykolipide als Gruppe der Biotenside

Biotenside sind eine Gruppe von Molekülen biologischen Ursprungs, die durch ihre Struktur amphipatische Eigenschaften besitzen. Diese Charakteristik teilen sie mit den Erdöl-basierten Tensiden, die aufgrund ihrer oberflächenaktiven und emulgierenden Eigenschaften in vielen Bereichen des täglichen Lebens Anwendung finden. Aufgebaut sind Tenside aus einem hydrophoben Rest, meist ein Kohlenwasserstoff unterschiedlicher Länge, und einer polaren Kopfgruppe, deren Ladung die Einteilung des Tensids in nicht-ionisch, anionisch, kationisch und zwitterionisch bestimmt. Die meisten Biotenside sind anionisch oder neutral,

mit einigen kationischen Amingruppen beinhaltenden Ausnahmen (Mulligan, 2005). Als amphiphatische Moleküle lagern sich (Bio)Tenside an Oberflächen oder Grenzflächen von Flüssigkeiten an und beeinflussen die intermolekularen, kohäsiven Kräfte zwischen den Molekülen. Das macht sie effektiv beim Lösen und Binden von hydrophoben Molekülen in wässrigen Lösungen. Die emulgierenden Eigenschaften werden durch die kritische Mizellenkonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) bestimmt, also der Konzentration des (Bio)Tensids, bei der sich die Monomere zu Mizellen zusammenfügen (Satpute *et al.*, 2010). Biotenside werden von einer Reihe von Mikroorganismen, darunter Bakterien, Pilze und Hefen produziert. Die Produktion wird mit verschiedenen physiologischen Bedeutungen, wie der verbesserten Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Erhöhung der Benetzbarkeit von Oberflächen zwecks besserer Ausbreitung oder der extra- bzw. intrazellulären Speicherung von Nährstoffen in Verbindung gebracht (Kitamoto *et al.*, 2002). Von besonderem Interesse sind Biotenside vor allem durch ihr Potential Erdöl basierte Tenside zu ersetzen. Sie zeichnen sich durch leichtere biologische Abbaubarkeit, geringere Toxizität, Biokompatibilität und die mögliche Konsumierbarkeit aus. Die strukturelle Diversität macht sie zudem effektiv in extremen Bedingungen (Desai und Banat, 1997; Silva *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2020). Die Nachfrage nach Biotensiden steigt stetig, da nahezu alle Lebensbereiche den Einsatz von Emulgatoren und Detergenzien erfordern und die nachhaltige Produktion von ökologischem Interesse ist. Dennoch bestehen für eine Kommerzialisierung vieler Biotenside ökonomische Hindernisse. Speziell die geringen Ausbeuten und die hohen Kosten für Ausgangsmaterialien und die Weiterverarbeitung verhindern die Wirtschaftlichkeit der Produktion und sind im Fokus konstanter Optimierungsstrategien (Nitschke *et al.*, 2005; Helmy *et al.*, 2011; Alcantara *et al.*, 2013). Interessanterweise gelingt die Produktion von Biotensiden auf einer Vielzahl von biologischen Abfällen aus der Öl-, Zucker- und Stärkeindustrie, sowie auf Gemüse- und Obstabfällen. Auch die Produktion auf Frittieröl und tierischen Fetten wurde beschrieben (Domínguez Rivera *et al.*, 2019). Diese Ressourcen stellen günstige, verfügbare und umweltfreundliche Substrate dar (Banat *et al.*, 2014).

Glykolipide gehören zur Klasse der Biotenside und tragen eine hydrophile Kohlenhydrat-Kopfgruppe und eine lange Fettsäurekette als hydrophoben Rest, die aliphatisch, hydroxyliert oder ungesättigt sein kann (Mnif und Ghribi, 2016; Paulino *et al.*, 2016). Glycolipide verfügen über niedrige CMC Werte, hohe Oberflächenaktivitäten und zeichnen sich durch hohe Stabilität gegenüber extremen pH-Werten, hohen Temperaturen, sowie extremen Salzkonzentrationen aus (Kitamoto *et al.*, 2002; Mnif und Ghribi, 2016). Die Anwendungsgebiete von Glycolipiden sind vielseitig und decken den industriellen Einsatz in Reinigern und Kosmetika, aber auch Anwendungen im Agrar- und Umweltsektor, der Verwendung in Lebensmitteln, der Biomedizin und der ölfördernden Industrie ab (Banat *et al.*,

2000; Mnif und Ghribi, 2016; Naughton *et al.*, 2019). Bereits im industriellen Maßstab produziert werden Sophoro- und Rhamnolipide (Jimoh und Lin, 2019).

1.4.1.1 Sophorolipide

Sophorolipide bestehen aus einer Sophorose als polarer Gruppe und einer langen Fettsäurekette (meist C16-C18) und können in linearer Säurekonfiguration oder ringförmiger, lactonischer Form vorliegen (Abbildung 5 A) (de Oliveira *et al.*, 2015). Der bekannteste Organismus für die Produktion von Sophorolipiden ist die Hefe *Starmerella bombicola* (ehemals *Candida bombicola*), für welche Produktionsmengen von bis zu 300 g/L Sophorolipide bekannt sind (Davila *et al.*, 1997). Auch einige andere *Candida* Spezies gehören zu den Produzenten von Sophorolipiden (Claus und Van Bogaert, 2017). Die großen natürlich produzierten Mengen führten allerdings dazu, dass speziell *S. bombicola* über die letzten Jahre intensiv in Bezug auf Kultivierungsoptimierung und alternative Substrate, neue Anwendungen für Sophorolipide und die Entwicklung strukturell neuer Varianten untersucht wurde (De Graeve *et al.*, 2018)). Die Möglichkeit, Sophorolipide mit diversen Modifikationen zu produzieren (Baccile *et al.*, 2019), ermöglicht ein breites Anwendungsspektrum. So sind die Säureformen der Sophorolipide besser geeignet für die Anwendung in kosmetischen Produkten, der Lebensmittelindustrie und der Bioremediation, während die Lactonform hydrophober ist und eine erhöhte biozide und anti-Tumor Wirkung zeigt (de Oliveira *et al.*, 2015). Eine interessante Spezialform der in *S. bombicola* produzierten Sophorolipide sind die Bolaform Sophorolipide (Van Bogaert *et al.*, 2016). Bolaform (Bio)Tenside haben die besondere Eigenschaft, Monoschicht-Membranen mit geringerer Permeabilität zu bilden, was sie für medizinische Anwendungen im Bereich der Wirkstoffverabreichung interessant macht (Van Renterghem *et al.*, 2018).

1.4.1.2 Rhamnolipide

Rhamnolipide gehören zu den potentesten Glykolipiden in Bezug auf Oberflächen-aktive Eigenschaften und CMC (Paulino *et al.*, 2016). Sie sind aufgebaut aus einer Rhamnose enthaltenden polaren Gruppe (mono- oder di-Rhamnose) und einem hydrophoben Rest aus einer oder zwei β -Hydroxyfettsäureketten, die mit der polaren Gruppe verestert sind (Abbildung 5 B) (Suh *et al.*, 2017). In der fermentativen Produktion durch den bekanntesten Produzenten *Pseudomonas aeruginosa* werden vier Hauptkongenere gefunden (di-Rhamno-di-Fettsäure, mono-Rhamno-di-Fettsäure, di-Rhamno-mono-Fettsäure und mono-Rhamno-mono-Fettsäure). Untersuchungen von alternativen Produzenten zeigten jedoch eine Vielzahl

von ca. 60 produzierten Kongeneren (Arino *et al.*, 1996; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). In verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen wurden unter gleichen Kulturbedingungen Titer zwischen 7 g/L und 36 g/L erreicht (Müller *et al.*, 2012). Zhu *et al.* (2012) zeigten unter optimierten *Fed Batch* Fermentationsbedingungen Konzentrationen von bis zu 70 g/L. Da *P. aeruginosa* ein opportunistisches Pathogen ist, ist auch die heterologe Produktion in nicht pathogenen Organismen, wie zum Beispiel *Pseudomonas putida* und *Burgholderia* Spezies, von Interesse, auch wenn die produzierten Mengen denen in *P. aeruginosa* nachstehen (Toribio *et al.*, 2010; Wittgens *et al.*, 2011; Wittgens und Rosenau, 2018). Die Produktion von Rhamnolipiden findet unter der Kontrolle von zwei *Quorum sensing* Prozessen statt, wenn *P. aeruginosa* unter Phosphat und Stickstoffmangel kultiviert wird. Die Möglichkeit durch die heterologe Expression der für die Synthese relevanten Gene auch andere bakterielle Produzenten nutzen zu können, ist ein weiterer Vorteil (Wittgens *et al.*, 2011). Weitere Bemühungen das Spektrum der produzierten Varianten einzuengen und maßgeschneiderte Rhamnolipide zu produzieren, sind durch Manipulation des Stoffwechselweges möglich und werden derzeit untersucht (Tiso *et al.*, 2017). Industriell produzierte Rhamnolipide finden Anwendung in der chemischen, kosmetischen, pharmazeutischen und der Nahrungsmittelindustrie (Banat *et al.*, 2000) Ein besonderes Einsatzfeld ist zudem die Bioremediation von belasteten Böden und Eindämmung von marinen Kontaminationen mit Öl, häufig durch die Anwendung von bakteriellen, Rhamnolipide produzierenden Stämmen. Öle, organische und industrielle Rückstände und Schwermetalle können durch den Einsatz von Rhamnolipiden gebunden werden. Dies ermöglicht mikrobiellen Populationen den biologischen Abbau der Verschmutzung, wobei im gleichen Schritt auch das Biotensid mit abgebaut werden (Vipulanandan *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2018; Jimoh und Lin, 2019).

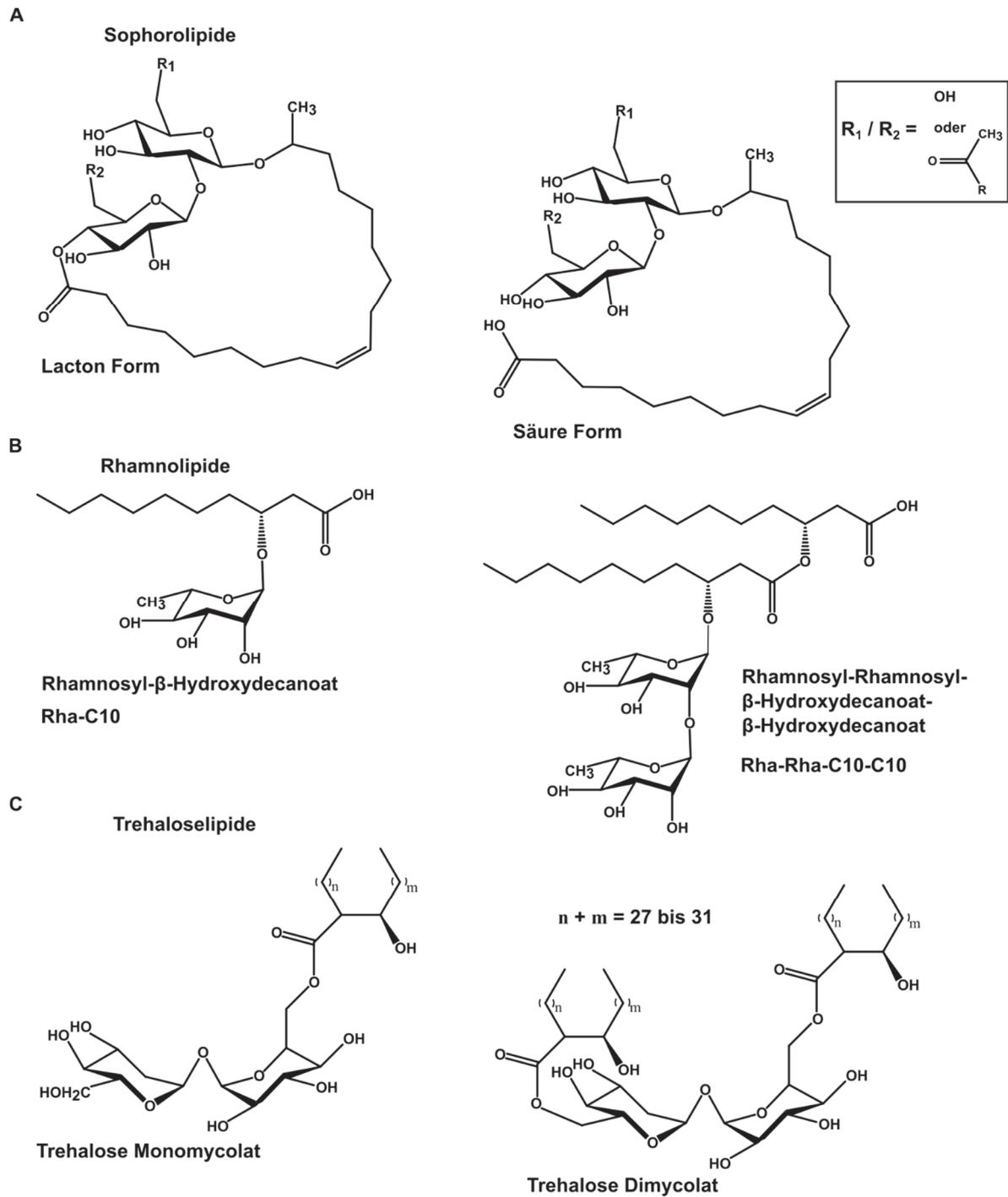


Abbildung 5: Übersicht mikrobieller Glykolipidklassen. **A**, Sophorolipide hergestellt durch *Candida* Spezies. Sophorolipide treten in einer geschlossenen Laktonform (links) und einer offenen Säureform (rechts) auf. **B**, Rhamnolipide, wie sie produziert von *Pseudomonas* Spezies gefunden werden. Hier abgebildet sind die eine Rha-C10 und Rha-Rha-C10-C10 Form. In fermentativen Prozessen werden ebenfalls Rha-Rha-C10 und Rha-C10-C10 Formen gefunden. **C**, Trehaloselipide produziert in *Mycobacterium* Spezies. Abbildung verändert nach Paulino *et al.*, (2016).

1.4.1.3 Trehaloselipide

Trehaloselipide sind eine Gruppe von Glykolipiden, die von verschiedenen Actinomyceten wie *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Nocardia* sp., *Gordonia* sp., *Dietzia* sp., *Tsukamurella* sp., *Skermania* sp., *Williamsia* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacteria* sp. *Arthrobacter* sp und *Rhodococcus* sp. produziert werden, mit *R. erythropolis* als einer der am besten untersuchten Organismen (Franzetti *et al.*, 2010; Marqués *et al.*, 2009). Trehalose ist ein Disaccharid bestehend aus zwei α,α -1,1-glykosidisch verbundenen Glukosemolekülen. In Form eines Trehaloselipids kann sich je am C6 Atom verestert Bernsteinsäure, Caprylsäure, Caprinsäure oder Mykolsäure (Abbildung 5 C) befinden (Paulino *et al.*, 2016). Der Großteil der in *Rhodococcus* und verwandten Spezies synthetisierten Trehaloselipide ist Zell-gebunden, was die Isolierung und die industrielle Produktion erschwert, es wurden jedoch auch extrazellulär produzierte Trehaloselipide gefunden (Franzetti *et al.*, 2010). Neben der erschwerten Isolierung der Trehaloselipide behindern auch die niedrigen Ausbeuten die Kommerzialisierung. Zwar konnten in einer Studie in *R. erythropolis* unter der Verwendung von n-Hexadecan und stark osmotischen Bedingungen Mengen von bis zu 40 g/L produziert werden (Uchida *et al.*, 1989). Die meisten aktuelleren Studien erreichen jedoch weitaus geringere Titer (Franzetti *et al.*, 2010; Paulino *et al.*, 2016). Trotz geringer Ausbeuten zeigen Trehaloselipide vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten im Gebiet der Bioremediation von Öl belasteten Böden und bei der Biodegradation von Rückständen industriellen Ursprungs in Böden und Gewässern (Kundu *et al.*, 2013; Kuyukina *et al.*, 2005). Eine vielversprechende Anwendung im medizinischen Bereich zeigt die hemmende Wirkung von künstlich hergestellten Trehaloselipid/ α -dimyristoylphosphatidylcoline (DMPC) Hybridliposomen auf Tumore, verursacht durch akute lymphoblastische Leukämie (Matsumoto *et al.*, 2016).

1.4.2 Glycolipide in *Ustilago maydis*

Die von *U. maydis* produzierten Glykolipide Ustilaginsäure und Mannosylerythritollipide (MELs) wurden erstmals in den Jahren 1950 und 1955 in Form von wasserunlöslichen Kristallen und einem extrazellulären Öl, die sich bei der Kultivierung von *U. maydis* aus dem Kulturmedium abschieden, beschrieben (Haskins, 1950; Lemieux, 1953). Beide Glykolipide werden natürlicherweise unter stickstofflimitierenden Bedingungen produziert und als Mischung von jeweils vier Varianten in das Außenmedium sekretiert. Das Verhältnis der MEL zu Ustilaginsäureproduktion hängt von der verfügbaren C-Quelle ab. So konnte gezeigt werden, dass unter der Verwendung von Kokosnussöl oder Glukose die Produktion von MELs bzw. Ustilaginsäure begünstigt ist (Hewald *et al.*, 2006; Spoekner *et al.*, 1999).

1.4.2.1 Mannosylerythritollipide

MELs bestehen aus einem Mannosylrest, der glykosidisch mit einem Erythritolmolekül verbunden ist. Das Mannosylerythritol Disaccharid ist mit kurzen (C_2 - C_8) und mittellangen (C_{10} - C_{18}) Fettsäuren am Mannosylrest acyliert (R_2 oder R_3 , Abbildung 6). Die vier verschiedenen Varianten kommen durch die Anzahl der Acetylgruppen zu Stande, wobei Mel-A vollständig (R_4, R_6), MEL-B und -C teilweise acetyliert (R_4 oder R_6) und MEL-D frei von Acetylgruppen ist (Kim *et al.*, 1999; Kitamoto *et al.*, 1990; Kurz *et al.*, 2003). Die fünf relevanten Gene für die Synthese von MELs wurden in *U. maydis* in einem Cluster nahe des Telomers von Chromosom 7 identifiziert (Abbildung 6 B) (Hewald *et al.*, 2006; Kämper *et al.*, 2006). Sequenzvergleiche dieses MEL-Clusters mit dem in *Pseudozyma* Spezies zeigten neben hohen Sequenzhomologien auch eine ähnliche Anordnung der in die Biosynthese von MELs involvierten Gene (Saika *et al.*, 2016). Für die Synthese der verschiedenen MEL Varianten ist die Acetyltransferase Mat1 maßgeblich verantwortlich, welche die Acetylierung von R_4 und R_6 der Mannose katalysiert (Hewald *et al.*, 2006). Zu den effektiven MEL Produzenten gehören neben *U. maydis* und *Pseudozyma* Spezies, wie *P. antarctica* und *P. aphidis* auch weitere Produzenten wie *Schizonella melanogramma*, *Geotrichum candidum* und *Kurtzmanomyces* sp. (Jeziarska, Claus und Van Bogaert, 2018). Bezogen auf die Produktionsleistung ist *U. maydis* den *Pseudozyma* Spezies eher untergeordnet, produziert allerdings alle natürlich bekannten MEL Varianten MEL-A, -B, -C und MEL-D. Die größten natürlichen Produktionsmengen von 165 g/L wurden für den Stamm *P. aphidis* mit einem großen Anteil an MEL-A bestätigt (Morita *et al.*, 2007; Rau *et al.*, 2005). *P. tsukubaensis* hingegen synthetisiert große Mengen einer besonderen Form von MEL-B, die eine Diastereomere Form des Zuckerrestes (4-O- β -D-Mannopyranosyl-(2R, 3S)-Erythritol) trägt (Fukuoka *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2010). Diese spezielle Form von MEL-B findet bereits Anwendung in Kosmetikartikeln, weswegen *P. tsukubaensis* zu den industriell genutzten MEL-Produzenten gehört. In *U. maydis* wurden erste Manipulationen des Biosynthesewegs bereits während der Identifizierung des Genclusters unternommen. So zeigte sich, dass durch die Deletion des Gens für die Acetyltransferase Mat1 gezielt MEL-D hergestellt werden kann. Diese Methode konnte mit zunehmender Aufschlüsselung der Gencluster in *Pseudozyma* Spezies für diese Stämme adaptiert werden (Hewald *et al.*, 2006; Saika *et al.*, 2018). Konishi und Makino (2018) konnten auf diese Weise in *P. hubeiensis* bis zu 91 g/L MEL-D in 7 Tagen herstellen. Die mikrobielle Direktsynthese ist ein wichtiger Schritt, da die Herstellung von MEL-D gewöhnlich über eine aufwendige chemische Synthese, oder die Deacetylierung von zuvor aufgereinigtem MEL-B über einen zusätzlichen enzymatischen Schritt erreicht wird (Fukuoka *et al.*, 2011; Konishi und Makino, 2018). Die effektive Produktion von MEL-D ist vor allem aufgrund der

höheren Hydrophilie und der dadurch erleichterten Anwendung in wässrigen Formulierungen interessant (Saika *et al.*, 2018).

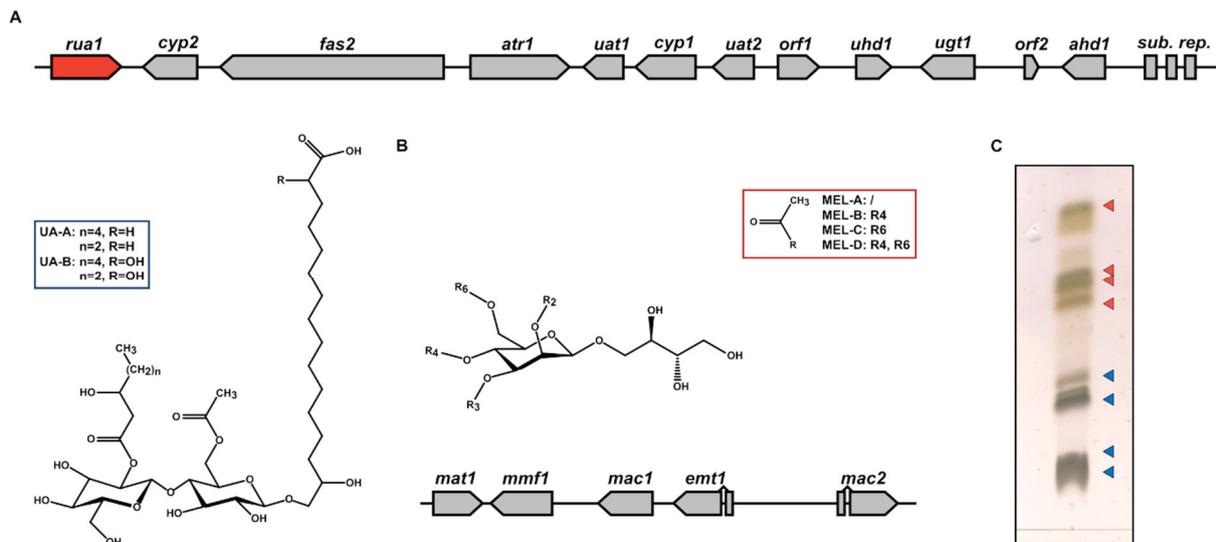


Abbildung 6: Darstellung der Gencluster involviert in die Glykolipidsynthese in *U. maydis*. **A**, Gencluster der Ustilaginsäuresynthese, bestehend aus 12 co-regulierten Genen unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Rua1. Ustilaginsäure besteht aus einem Cellobioserest, der glykosidisch an eine 15, 16-Dihydroxyhexadecansäure bzw. der 2, 15, 16-Trihydroxyhexadecansäure gebunden ist. Der Cellobioserest trägt eine β -Hydroxyfettsäure der Länge C_6 oder C_8 und eine Acylgruppe (verändert nach Teichmann *et al.*, 2010). **B**, Darstellung des Genclusters der Mannosylerythritolipid-synthese. und des MEL-Aufbaus aus einem Mannosylerythritol Disaccharid, welches mit ($C_2 - C_8$) und ($C_{10} - C_{18}$) Fettsäuren am Mannosylrest acyliert ist (verändert nach Hewald *et al.*, 2006). **C**, Nachweis der vier natürlichen Ustilaginsäure- (blaue Pfeile) und MEL-Varianten (rote Pfeile) nach Auftrennung über eine Dünnschichtchromatographie.

1.4.2.2 Ustilaginsäure

Ustilaginsäure besteht aus einem Cellobioserest, der glykosidisch an die ω -Hydroxylgruppe der 15, 16-Dihydroxyhexadecansäure bzw. der 2, 15, 16-Trihydroxyhexadecansäure gebunden ist. Zusätzlich ist die Cellobioseuntereinheit mit einer Acylgruppe und einer kurzketigen β -Hydroxyfettsäurekette verestert. Die vier natürlich auftretenden Varianten ergeben sich aus dem Vorhandensein der α -Hydroxylgruppe (Abbildung 6 A, D) und der Länge der kurzen β -Hydroxyfettsäure (Lemieux, 1953). Die Produktion des Cellobioselipids Ustilaginsäure ist auf genomischem Level in einem 45 kb großen Cluster von 12 offenen Leserahmen nahe des Telomers von Chromosom 23 organisiert (Kämper *et al.*, 2006; Teichmann *et al.*, 2007). Der Gencluster umspannt 12 co-regulierte Gene und darauffolgende subtelomerische *repeat*-Sequenzen (Abbildung 6 A). Die Synthese der Ustilaginsäure beginnt mit der ω -Hydroxylierung der Hexadecansäure (Palmitylsäure) durch die P450 Monooxygenase Cyp1. Nach einer zweiten Hydroxylierung von 16-Hydroxy Hexadecansäure (Junipersäure) zu 15,16-Dihydroxy Hexadecansäure durch eine weitere P450 Monooxygenase Cyp2 werden in zwei konsekutiven Reaktionen 2 UDP-Glukose Moleküle durch die Glykosyltransferase Ugt1 mit der 15,16-Dihydroxy Hexadecansäure glykosidisch verknüpft (Saerens *et al.*, 2011; Teichmann *et al.*, 2007). Der Cellobioserest ist mit einer kurzen β -

Hydroxyfettsäurekette und einer proximalen Acetylgruppe dekoriert. Die Acetylierungsreaktion wird durch die Acetyltransferase Uat1 vermittelt, wobei die kurze Fettsäurekette durch die Fettsäuresynthase Fat2 synthetisiert wird und die Hydroxyltransferase Uhd1 die β -Hydroxylierung der kurzen Fettsäurekette durchführt (Teichmann *et al.*, 2011). Da Ustilaginsäure im Überstand als Mixtur mehrerer Varianten gefunden wird und diese sich in der α -Hydroxygruppe der 15,16-Dihydroxyhexadecansäure unterscheiden können, wird dieser Schritt als einer der Letzten im Syntheseweg postuliert. Die Hydroxylgruppe wird dabei von der Hydroxyltransferase Ahd1 katalysiert. Sekretiert wird die Ustilaginsäure höchstvermutlich durch den ABC Transporter Atr1 (Teichmann *et al.*, 2007). Zu weiteren Ustilaginsäureproduzenten neben *U. maydis* werden die Hefen *P. fusiformata*, *P. graminicola*, *Cr. humicola*, sowie *P. hubeiensis* und *P. aphidis* gezählt (Kulakovskaya *et al.*, 2003; Golubev *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2013; Kulakovskaya *et al.*, 2014). Eine weitere strukturell ähnliche Variante, das Flocculosin, wird durch *P. flocculosa* produziert (Mimee *et al.*, 2005). Die produzierten Mengen an produziertem Cellobioselipid in *Cr. humicola* reichen bis zu 250 mg/L, während Mengen von produzierter reiner Ustilaginsäure kaum beschrieben sind (Kulakovskaya *et al.*, 2014). Lemieux *et al.* (1951) beschreiben 3 - 4,5 g/L eines weißlich bis gelblichen, kristallinen Pulvers und auch in späteren Studien wurde die Produktion auf ähnliche Mengen geschätzt, meist jedoch als Gemisch mit MELs (Spoeckner *et al.*, 1999).

Von biotechnologischem Interesse ist Ustilaginsäure, da sie oberflächenaktive Eigenschaften zeigt und ein breites antimikrobielles Spektrum besitzt. Dieses wurde bereits kurz nach ihrer Entdeckung positiv gegenüber Pilzen und Gram-positiven, wie Gram-negativen Bakterien getestet. Dabei zeigte sich Ustilaginsäure äußerst robust gegenüber Hitzebehandlungen ohne die Bioaktivität zu verlieren (Haskins und Thorn, 1951). Aktuellere Anwendungen zeigten, dass *U. maydis* in der Lage ist, Infektionen des Pflanzenpathogens *Botrytis cinerea* zu inhibieren. Deletionsstudien konnten diese Wirkung mit der Fähigkeit der verwendeten Stämme, Ustilaginsäure herzustellen, in Verbindung bringen (Teichmann *et al.*, 2007). Ustilaginsäuren, produziert von der Hefe *P. fusiformata*, zeigen eine erhöhte Bioaktivität gegen verschiedene Hefen und Pilze. Diese konnte auf die Permeabilisierung der Zellmembran durch die Ustilaginsäure und dem folgenden ATP-Verlust zurückgeführt werden (Kulakovskaya *et al.*, 2003). Diese stark fungizide Wirkung zeigt sich besonders bei niedrigen pH-Werten (Kulakovskaya *et al.*, 2014). Das der Ustilaginsäure ähnliche Cellobioselipid, Flocculosin, zeichnet sich durch seine Bioaktivität gegen humanpathogene Hefen und eine kombinatorische Wirkung mit AMB, einem gebräuchlichen Mykotikum aus (Mimee *et al.*, 2005). Weitere Tests bestätigten das breite antimikrobielle Spektrum, welches für Ustilaginsäure durch Haskins and Thorn (1951) festgestellt wurde und zeigten, dass die antimikrobielle Wirkung mit einer Schädigung der Zellmembran betroffener Organismen einhergeht (Mimee *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass *U. maydis* ein natürlicher Produzent der

Ustilaginsäure ist und durch gezielte Manipulation des Synthesewegs einfach strukturelle Änderungen durchgeführt werden könnten (Mueller *et al.*, 2008), machen dieses Molekül zu einem interessanten Sekundärmetabolit für zukünftige Studien.

1.4.2.3 Die Regulation der Glycolipidsynthese in *Ustilago maydis*

Die Regulation der zwei Glykolipid-Gencluster in *U. maydis* ist stickstoffabhängig. Dies wurde bereits früh an der starken Induktion der Expression der P450 Monooxygenase Cyp1, involviert in die Synthese von Ustilaginsäure, und der Glykosyltransferase Emt1, beteiligt an der Synthese von MELs, unter Stickstoffmangel beobachtet (Hewald *et al.*, 2005). Später konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Ustilaginsäureclusters durch das Produkt des ersten offenen Leserahmens gesteuert wird. Dieser kodiert für den Regulator der Ustilaginsäureproduktion *rua1*, der einer Klasse von C₂H₂-ähnliche Zink-Finger (Znf) Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden kann. Zwei Znf-Motive nahe des C-Terminus des 757 AS langen Proteins ermöglichen die Bindung an kurze Konsensussequenzen, die in den 5'-untranslatierten Regionen der im Cluster befindlichen Gene identifiziert wurden (Teichmann *et al.*, 2010). Während die Regulation von *rua1* selbst nicht vollständig geklärt ist, erfährt das Gen eine 9,9-fach erhöhte Expression bei Stickstoff limitierenden Bedingungen und scheint ebenfalls selbstregulierende Funktionen zu haben. Eine konstitutive Überexpression von *rua1* hatte die stickstoffunabhängige Produktion von Ustilaginsäure zur Folge (Teichmann *et al.*, 2007, 2010). Im Gegensatz dazu ist die Regulation der MEL Synthese nicht vollständig erforscht und konservierte Sequenzmotive, die an einer Co-Regulation beteiligt sein könnten, fehlen in den Promotoren der MEL-spezifischen Gene. Es konnten allerdings GATA Sequenzen innerhalb aller Promotoren des Genclusters gefunden werden (Hewald *et al.*, 2005). In *Aspergillus nidulans* werden über 100 Gene des Stickstoffmetabolismus über den GATA spezifischen Regulator AreA reguliert (Ravagnani *et al.*, 1997). Ein Homolog zu *areA* findet sich auch in *U. maydis* und könnte in die Regulation involviert sein (Hewald *et al.*, 2006). In *Pseudozyma* Spezies findet die Produktion von MELs in definierten Medien statt, die lediglich 0,3 % NaNO₃ als Stickstoffquelle beinhalten. Ein starker Anstieg der MEL Produktion wird meist beobachtet, wenn sich die Kultur in der stationären Phase befindet, bedarf aber lediglich einer initialen N-Limitierung und wird durch die Zugabe von Pflanzenöl stark gesteigert. Die weitere Kultivierung unter *Fed Batch* Bedingungen resultiert in weiterer Produktion trotz NaNO₃ Zugabe (Rau *et al.*, 2005). Transkriptomstudien in *P. aphidis* zeigten, dass unter Produktionsbedingungen die Gene des MEL Produktionsclusters, aber auch Gene involviert in den Stickstoffstoffwechsel hochreguliert werden. Unter den stark induzierten Genen wurde PaG_00705 gefunden, welches der Gruppe der pilzlichen Znf-Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden kann (Günther *et al.*, 2015).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

U. maydis ist ein vielseitiger Modellorganismus, der in den letzten Jahren mit dem Fokus auf potentielle biotechnologische Anwendungen stetig optimiert wurde. Diese Arbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag zur Etablierung eines konsolidierten Bioprozesses zu leisten. Im ersten Teil der Arbeit sollten die Möglichkeiten, pflanzliche Zellwandbestandteile mit *U. maydis* abzubauen, weiter ausgebaut werden. Hierfür wurde als komplexeres Substrat der Zellwandbestandteil Pektin gewählt und die pektinolytische Ausstattung von *U. maydis* diesbezüglich evaluiert. Intrinsische Enzyme für den Abbau von PolyGalA, dem Hauptbestandteil von Pektin, sollten aktiviert und das pektinolytische Repertoire durch potente hydrolytische Enzyme komplettiert werden. Diese heterologen Enzyme sollten sowohl aus Pilzen, mittels konventioneller Sekretion, als auch aus Bakterien, mittels unkonventioneller Sekretion, exportiert und vergleichend getestet werden. Die vielversprechendsten Expressionsstämme sollten unter co-fermentativen Bedingungen auf ihre zusammenwirkende pektinolytische Aktivität evaluiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Fokus auf die Produktion von Ustilaginsäure als wertvolles Sekundärmetabolit und mögliches Zielmolekül eines konsolidierten Bioprozesses gelegt. Vorhergegangene Studien zeigten bereits die stickstoffunabhängige Produktion dieses Glykolipids durch die konstitutive Überexpression des Gens für den Rua1 Transkriptionsfaktor. In dieser Arbeit sollte die Produktion von Ustilaginsäure nach Entkopplung von der Stickstofflimitation weiter optimiert werden. Weiterhin sollten Protokolle für die effiziente Produktion bis hin zum Tischbioreaktor sowie die Reinigung etabliert werden. Um die Herstellung von möglichst reiner Ustilaginsäure zu gewährleisten, sollte ein Produktionsstamm generiert werden, der frei von weiteren Sekundärmetaboliten wie MELs und Itakonsäure ist.

2 Ergebnisse

Um die Umsetzung von pektinreicher Biomasse in Ustilaginsäure in *U. maydis* zu etablieren, wurden zwei Arbeitspakete durchgeführt. Zunächst wurde der Pilz genetisch für die Nutzung von Pektin optimiert, wobei der Fokus auf dem Hauptbestandteil Polygalakturonsäure lag (2.1). Parallel dazu wurde ein Produktionsstamm entwickelt, der konstitutiv in großen Mengen Ustilaginsäure synthetisiert. Außerdem wurden Protokolle zur Aufreinigung und Analytik etabliert (2.2).

2.1 Genetische Optimierung von *Ustilago maydis* für den Abbau von Pektinbestandteilen

2.1.1 Evaluierung von Pektin als Substrat für *Ustilago maydis*

Die Zusammensetzung von Pektinen ist eng verknüpft mit ihrer strukturellen Funktion für die Integrität der Zellwand (Caffall und Mohnen, 2009) und zeigt somit Unterschiede zwischen Organismen und den Gewebearten, aus denen das Pektin isoliert wurde. Zu Beginn der Studien lagen sechs verschiedenen Pektine unterschiedlicher Anbieter und Pflanzenquellen vor, die als Testsubstrate zur Verfügung standen. Um die Zusammensetzung der Substrate zu vergleichen sowie einschätzen zu können, welche Substrate sich besonders für die Metabolisierung durch *U. maydis* eignen, wurden die enthaltenen Einzelzucker analysiert. Die Analyse wurde über HPLC Messungen der Komponenten nach vollständiger Hydrolyse der Pektinproben mittels Trifluoressigsäure (TFA) durchgeführt (Abbildung 7).

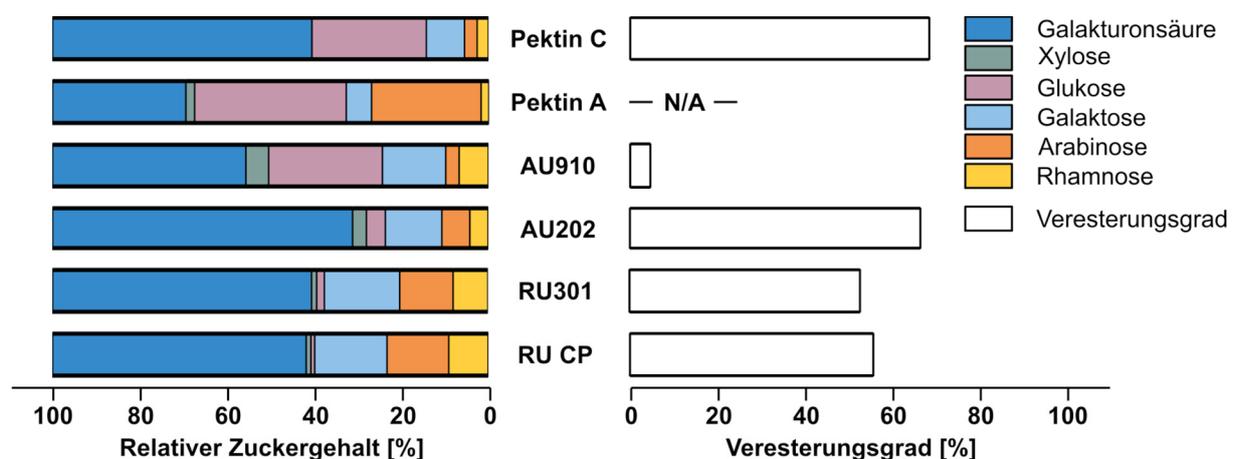


Abbildung 7: Darstellung der relativen Einzelzuckergehälter der untersuchten Pektine. Untersucht wurden sechs Pektine verschiedener Herkunft von verschiedenen Herstellern. Apfelpektin: AU202, AU910, Pektin A; Zuckerrübenpektin: RU301, RU CP; Zitruspektin Pektin C. Mit Ausnahme von Pektin A zeigen alle Pektine Galakturonsäure als Hauptbestandteil gefolgt von Arabinose und Galaktose. Pektin A, Pektin C und AU910 weisen zusätzlich einen hohen Gehalt an Glukose auf. Der Veresterungsgrad (weiße Balken) entspricht den vom Hersteller angegebenen Werten.

Die Pektine sind nach Hersteller und Herkunft geordnet. Angegeben sind die Anteile der Einzelzucker relativ zum gemessenen Gesamtgehalt. Ebenfalls abgebildet sind der prozentuale Veresterungsgrad der Pektine nach Herstellerangaben. Die Veresterung kann Einfluss auf die Zugänglichkeit des Pektinrückgrats (Limberg *et al.*, 2000) oder der Seitenketten für hydrolytische Enzyme haben und so die Eignung als Kohlenstoffquelle in einem Bioprozess ohne vorherige Vorbehandlung beeinträchtigen.

Die Analyse der Einzelzucker zeigte, dass in allen Pektinen Galakturonsäure (GalA) der abundanteste Einzelzucker ist, aber auch höhere Anteile an Galaktose und Arabinose vorhanden sind. Die Pektine C und A, sowie das Apfelpektin AU910 zeigen zudem hohe Gehalte an Glukose. Schwankungen im Gehalt an neutralen Zuckern (Fukose, Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Glukose, Xylose und Mannose) können durch die Art der Pektinisolierung und das Ausgangsmaterial entstehen (Christiaens *et al.*, 2015; Yapo *et al.*, 2007).

Hydrolytische Enzyme, die auf das Homogalakturonan (HG) wirken, setzen oft GalA frei. Als Hauptbestandteil von Pektinlysaten (Caffall und Mohnen, 2009) ist die Verstoffwechslung der GalA Mono- oder Multimere durch *U. maydis* somit eine erste wichtige Voraussetzung für das Wachstum auf Pektin. In *Aspergillus niger* wurde ein solcher Stoffwechselweg bereits beschrieben. Hier wird die Umsetzung der D-Galakturonsäure zu Pyruvat und L-Glyzeraldehyd in drei enzymatischen Schritten erzielt. L-Glyzeraldehyd wird anschließend zu Glycerin reduziert (Martens-Uzunova und Schaap, 2008). Ausgehend von den Aminosäuresequenzen der beteiligten *A. niger* Enzyme wurden via BlastP-Analyse Homologe in *U. maydis* identifiziert. Homologe aller Enzyme konnten identifiziert werden und die Sequenzidentitäten betragen dabei zwischen 38% und 60 % (Abbildung 8). Ausgehend von den vorhandenen, eindeutigen Homologen sollte *U. maydis* in der Lage sein, GalA durch einem *A. niger* ähnlichen Stoffwechselweg zu verstoffwechseln.

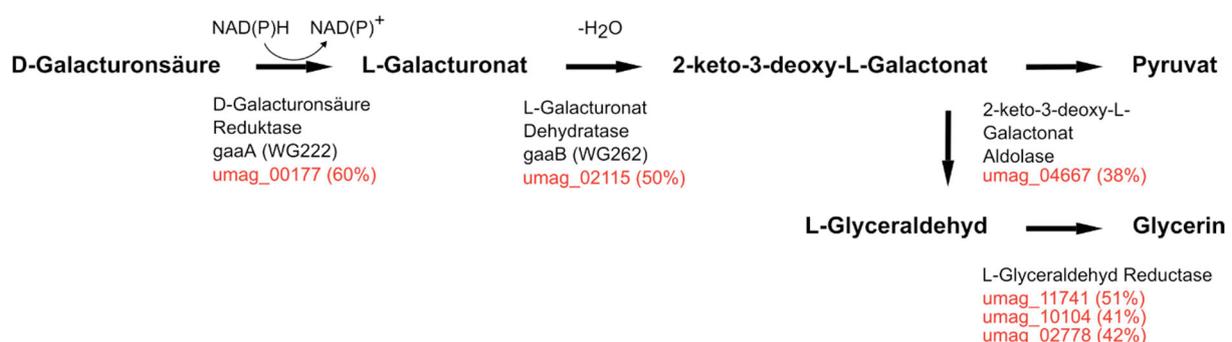


Abbildung 8: Vergleich des katabolischen Galakturonsäure-Stoffwechselwegs zwischen *A. niger* und *U. maydis*. In Rot angegeben werden die entsprechenden Homologe in *U. maydis* in Form der umag-Identifikationsnummer gemäß EnsemblFungi *Ustilago maydis* Genomdatenbank oder der NCBI-Datenbank. In Prozent ist der Anteil der konservierten Aminosäuren zwischen den Homologen angegeben. *A. niger* Stoffwechselweg angepasst nach Martens-Uzunova und Schaap, 2008.

2.1.2 Pektinolytisches Potential von *Ustilago maydis*

Vorhergegangene Studien zeigten bereits Hinweise auf ein pektinolytisches Potential für *U. maydis* (Cano-Canchola *et al.*, 2000; Doehlemann *et al.*, 2008; Kämper *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2008). Um ein erweitertes Verständnis für die vorhandene enzymatische Ausstattung zu erlangen, wurden potentielle CAZymes aus den vorhergegangenen Studien identifiziert und einer genaueren bioinformatischen Analyse unterzogen. Ziel war es, mögliche bereits charakterisierte Homologe zu identifizieren, konservierte Glykosid Hydrolase (engl. *glycoside hydrolase*, GH) Domänen, bzw. Domänen mit denen anderer CAZyme Familien zu vergleichen und den Grad der Identität zu *U. maydis* CAZymes zu analysieren. Durch die Vorhersage mittels SignalP 4.1 wurde zudem eine Aussage über die mögliche konventionelle Sekretion der identifizierten Homologe getroffen. So konnten zehn weitere potenziell pektinolytische Enzyme identifiziert werden. Damit weist *U. maydis* pektinolytisches Potential sowohl für die (Teil)Hydrolyse von HG, als auch von RG I auf. Darunter fallen beispielsweise auf das GalA-Rückgrat wirkende Enzyme wie eine Endo-Polygalakturonase, eine Pektinlyase, sowie eine Pektin-Methylesterase, die die Aktivität der vorhergegangenen unterstützen kann (Limberg *et al.*, 2000). Im Bereich des RG wurden vor allem hydrolytische Enzyme erkannt, die potentielle Seitenkettenaktivität zeigen. So sind drei α -L-Arabinofuranosidasen, zwei Arabinasen und ebenfalls zwei β -Galaktosidasen im Genom von *U. maydis* kodiert (Abbildung 9).

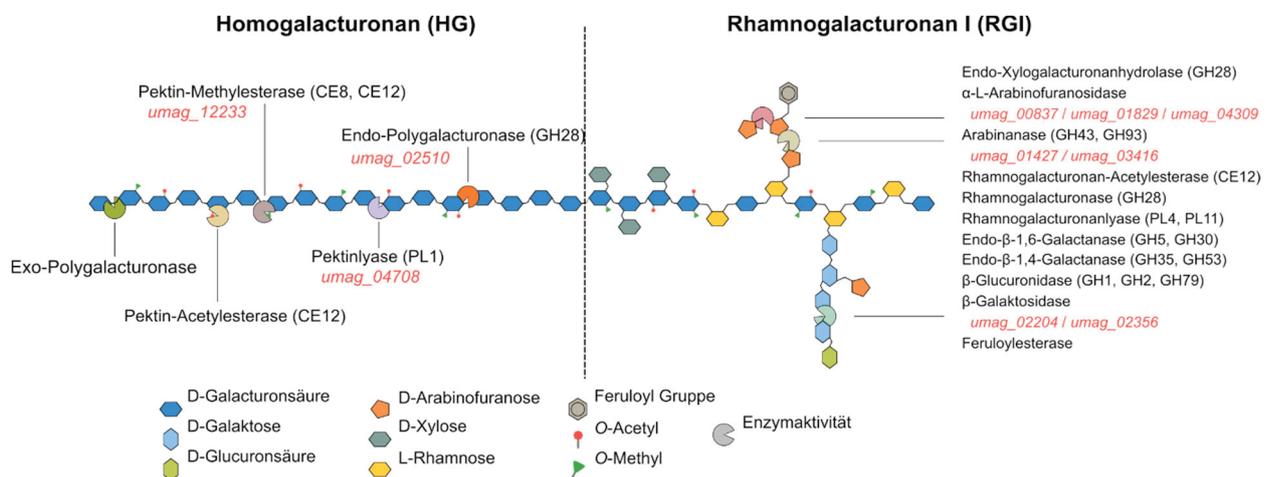


Abbildung 9: Schematische Darstellung der häufigsten Pektinstrukturen von Homogalakturonan (HG) und Rhamnogalakturonan (RGI) und der für den Abbau relevanten Enzyme. Gezeigt werden die Enzyme, die für den Abbau des Pektinmoleküls benötigt werden. Homologe in *U. maydis* werden in Rot in Form der umag Identifikationsnummer dargestellt. Obwohl für die komplette Hydrolyse von Pektin Enzyme fehlen, besitzt *U. maydis* ein vielversprechendes Set von Enzymen speziell für die Hydrolyse des HG-Rückgrats und von Arabinose-Seitenketten des RGI. Die enzymatischen Domänen wurden gemäß der CAZy-Datenbank in Klammern angegeben. GH, *glycoside hydrolase* Domäne; PL, *polysaccharide lyase* Domäne; CE, *carbohydrate esterase* Domäne (NCBI Datenbank und CAZy.org (Cantarel *et al.*, 2009)). Abbildung modifiziert nach Glass *et al.*, 2013.

Weitere bioinformatische Untersuchungen unterstützten die vorhergesagten Rollen der identifizierten CAZymes durch Vergleiche mit bereits charakterisierten Homologen aus Basidio- und Ascomycota sowie aus Proteobakterien (Tabelle 1).

Tabelle 1: Bioinformatische Analyse der pektinolytischen Enzyme in *U. maydis*.

Gen ID ¹	Protein ²	Vorhergesagte Funktion und Hauptsubstrat (potential CAZy Familie)	Charakterisiertes Homolog (% Identität)	Signalpeptid-vorhersage (SignalP4.1) ³	Anmerkung
<i>umag_02510</i> ; Accession Nummer KIS69158.1	Pgu1	Endo-Polygalakturonase/HG (GH28/PL6)	<i>Fusarium moniliforme</i> Pga (Federici <i>et al.</i> , 2001); Accession Nummer Q07181.1 (Gesamtidentität 46%/Identität ohne N-terminales Signal Peptid 45%) (Fig. 2)	Ja	
<i>umag_04708</i> ; Accession Nummer KIS66646.1	Pel1	ähnlich Pektinlyase B Vorläufer/HG (PL6)	<i>Aspergillus niger</i> Pectinlyase PNL-ZJ5A (Gesamtidentität 22%; 40.2% Identität in 387 Aminosäure langen C-terminalen Überhang) (Abbildung 30) (Xu <i>et al.</i> , 2015); Accession Nummer KM588308.1	Ja	Pektin oder Pektatylase möglich; enthält verlängerten N-Terminus (ca. 340 Aa) verglichen zu Homologen in Ascomyceten, Fehlannotation möglich
<i>umag_12233</i> ; Accession Nummer KIS68427.1	Pme1	Putative Pektinesterase/Pectin Methylesterase/HG (CE8)	Pectin-Methylesterase PME-ZJ5A aus <i>Aspergillus niger</i> (Gesamtidentität 24%/Identität in 397 Aminosäure langem Überhang 28%) (Abbildung 31) (Kent <i>et al.</i> , 2016); Accession Nummer MG397069.1	Ja	Aminosäurereste des aktiven Zentrums weitestgehend konserviert (Kent <i>et al.</i> , 2016)
<i>umag_01829</i> ; Accession Nummer KIS70669.1	Afu1	α -L-Arabinofuranosidase/RGI and II, XG (GH51)	<i>Pleurotus ostreatus</i> PoAbf (Gesamtidentität 28%/Identität ohne N-terminales Signalpeptid 27%) (Abbildung 32) (Amore <i>et al.</i> , 2015); Accession Nummer CCC33068.1	Ja	Aminosäurereste des aktiven Zentrums weitestgehend konserviert (Amore <i>et al.</i> , 2015)
<i>umag_00837</i> ; Accession Nummer KIS70909.1	Afu2	α -L-Arabinofuranosidase/RGI and II, XG (GH51)	<i>Pleurotus ostreatus</i> PoAbf (Gesamtidentität 32%/Identität ohne N-terminales Signalpeptid 32%) (Abbildung 32) (Amore <i>et al.</i> , 2015); Accession Nummer CCC33068.1	Ja	Aminosäurereste des aktiven Zentrums weitestgehend konserviert (Amore <i>et al.</i> , 2015)

<i>umag_04309</i> ; Accession Nummer KIS67202.1	Afu3 [publiziert als UmAbf6 2A]	α -L- Arabinofuranosidase/ RGI and II, XG (GH62_2)	N/A ⁴	Ja	Aktivität bestätigt und charakterisiert durch Siguier <i>et al.</i> (2014)
<i>umag_03416</i> ; Accession Nummer KIS68317.1	Afu4	α -1,5-Arabinanase/ RGI und II (GH43)	<i>Cellvibrio japonicus</i> Arb43A (Gesamtidentität 17%/Identität ohne N-terminales Signal Peptide 18%) (Nurizzo <i>et al.</i> , 2002) ; Accession Nummer WP_012486466	Ja	Aktive Aminosäurerest e nur teilweise konserviert (Nurizzo <i>et al.</i> , 2002)
<i>umag_01427</i> ; Accession Nummer KIS71533.1	Afu5	α -1,5-Arabinanase/ RGI und II (GH43)	<i>Cellvibrio japonicus</i> Arb43A (Gesamtidentität 18%/Identity ohne N- terminales Signal Peptide 17%) (Nurizzo <i>et al.</i> , 2002); Accession Nummer WP_012486466	Ja	Aktive Aminosäurerest e nur teilweise konserviert (Nurizzo <i>et al.</i> , 2002)
<i>umag_02356</i> ; Accession Nummer KIS69834.1	LacZ	β - Galactosidase/RGI, XG (GH42)	N/A	Ja	
<i>umag_02204</i> ; Accession Nummer KIS69673.1	LacZ	β - Galactosidase/RGI, XG (GH42)	N/A	Ja	

1 MycoCosm Datenbank

2 Proteinamen angegeben in der MycoCosm oder NCBI Datenbank wurden verwendet, wenn nicht anders angegeben. Hypothetische Proteine wurden neu benannt

3 Die Vorhersage bezieht sich lediglich auf N-Terminale Signalpeptide für die konventionelle Sekretion (SignalP4.1)

4 Nicht weiter analysiert, da funktionelle Information bereits vorhanden.

Die identifizierte und bereits durch Castruita-Domínguez *et al.* (2014) beschriebene Endo-Polygalakturonase UmPgu1 (Accession Nummer KIS69158.1) bildet einen Teil des enzymatischen Sets, um GalA effektiv aus HG freizusetzen. Sequenzvergleiche des Enzyms zeigten eine 45 % Aminosäure-Identität von UmPgu1 mit einer charakterisierten Endo-Polygalakturonase aus dem Basidiomyceten *Fusarium moniliforme* (FmPga; Accession Nummer Q07181.1) (Federici *et al.*, 2001) (Tabelle 1, Abbildung 10). Weitere bioinformatische Analysen von UmPgu1, FmPga und einer weiteren Endo-Polygalakturonase aus *Aspergillus aculeatus* (AaPgu1; Accession Nummer O74213.1) (Cho *et al.*, 2001) zeigten konservierte Bereiche in Domänen involviert in Substratbindung und Katalyse, die darauf hindeuten, dass es sich um eine funktionelle Polygalakturonase handelt (Abbildung 10). Für weitere identifizierte CAZymes konnten charakterisierte Homologe mit Sequenzidentitäten von 17 % bis 32 % bestätigt werden. Besonders Pme1 und die α -L-Arabinofuranosidasen Afu1 und Afu2 zeigen häufigere identische

Bereiche und weitestgehend konservierte funktionelle Reste mit den gefundenen Homologen aus *Aspergillus niger* (PME-ZJ5A; Accession Nummer MG397069.1) (Abbildung 31) und der einer α -L-Arabinofuranosidase aus *Pleurotus ostreatus* (PoAbf; Accession Nummer CCC33068.1) (Abbildung 32). Die dritte identifizierte α -L-Arabinofuranosidase Afu3 wurde bereits zuvor unter der Bezeichnung UmAbf62A von Siguier *et al.* (2014) publiziert und ist sehr gut charakterisiert, weswegen keine weitere Untersuchung durchgeführt wurde.

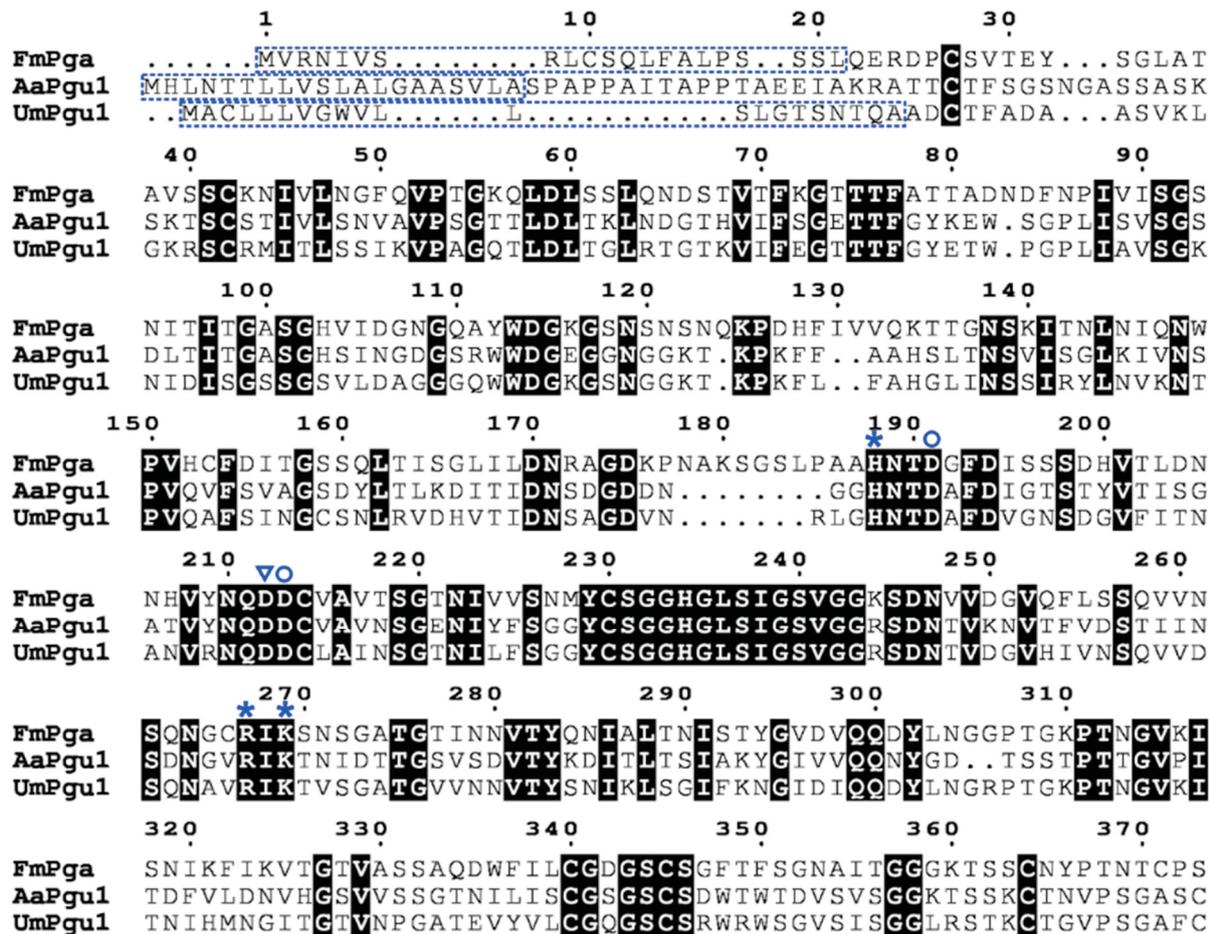


Abbildung 10: Konservierte Sequenzbereiche der vermeintlichen Endo-Polygalakturonase UmPgu1 (Accession Nummer KIS69158.1) aus *U. maydis*. Das Aminosäure-Sequenzalignment mit charakterisierten Endo-Polygalakturonasen aus *Fusarium moniliforme* Pga (FmPga; Accession Nummer Q07181.1), *Aspergillus aculeatus* Pgu1 (AaPgu1; Accession Nummer O74213.1) zeigt konservierte Sequenzbereiche in wichtigen funktionellen Domänen. Sterne: funktionelle Reste der Substratbindung, Dreieck: Aspartat Rest, der vermutlich als Protonendonator für den glykosidischen Sauerstoff fungiert, Kreise: Reste, die H₂O für den nukleophilen Angriff aktivieren (Federici *et al.*, 2001) N-terminale Signalpeptide für die konventionelle Sekretion sind durch gestrichelte Boxen markiert. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt.

Die bioinformatischen Analysen zeigen, dass *U. maydis* einen Teil der nötigen Enzyme für die Hydrolyse von Pektin besitzt. Ausgehend von den Studien von Prof. Dr. Gunther. Döhlemann ist jedoch zu erwarten, dass diese nicht in der hefeartigen Wachstumsform von *U. maydis* exprimiert werden (Doehlemann *et al.*, 2008). Aus vorhergegangenen Arbeiten ist zudem bekannt, dass *U. maydis* in der hefeartigen Wachstumsform nicht in der Lage ist, auf Polygalakturonsäure (PolyGalA), einer weder methylierten noch acetylierten Form des HG, zu wachsen (Müller *et al.*,

2018). Da eine Kultivierung in der hefeartigen Wachstumsform für biotechnologische Prozesse angestrebt wurde, sollte die Expression der benötigten Gene daher künstlich in der Hefephase angeschaltet werden.

2.1.3 Herstellung pektinolytischer *Ustilago maydis* Stämme

Um eine konstitutive Expression von CAZyme-Genen zu erreichen, wurden mittels homologer Rekombination die jeweiligen Promotoren ausgetauscht und durch den starken, konstitutiven Promotor P_{oma} ersetzt (Abbildung 11; (Geiser *et al.*, 2016). Durch den Einsatz von homologen Sequenzflanken können stabile Integrationen in das Genom von *U. maydis* erreicht werden (Feldbrügge *et al.*, 2004). Die Sequenzflanken (UF, stromaufwärts Flanke; DF, stromabwärts Flanke) wurden bei einer ungefähren Länge von 1 kb so konzipiert, dass die Nourseothricin Resistenzkassette gefolgt von der Sequenz des P_{oma} Promotors direkt stromaufwärts des Startkodons integriert wurde. Dabei wurden abhängig von der Positionierung der UF der Sequenzbereich des nativen Promotors (teilweise) deletiert (Abbildung 11 A). Dieses Prinzip wurde für die Überexpression aller intrinsischen pektinolytischen Enzyme verwendet. Für jeden Stamm wurde nur ein Überexpressionskonstrukt eingefügt, um Rekombinationsereignisse durch die Kreuzrekombination von mehreren integrierten P_{oma} -Sequenzen auszuschließen. Die generierten Stämme wurden über Southern Blot Analysen auf ihre korrekte Integration überprüft (Tabelle 10). Die Aktivierung der CAZymes wurde im Protease-reduzierten Stammhintergrund AB33P5 Δ^R durchgeführt (Sarkari *et al.*, 2014). Die Produktion von sekretierten Proteinen sollte so durch eine Verringerung der extrazellulären Degradierung stabilisiert werden. Die mikroskopische Untersuchung der generierten UmPgu1-Stämme zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten verglichen mit dem Vorgängerstamm (Abbildung 29).

Um die Enzymaktivität nachzuweisen, wurden die Stämme in Verduyn C1 Medium inokuliert und zellfreie Überstände nach 24 h geerntet. Als polymeres und für *U. maydis* unzugängliches Substrat wurde PolyGalA eingesetzt. Das Potential der CAZmes im Kulturüberstand PolyGalA zu hydrolysieren, wurde über den zuvor für GalA validierten Dinitrosalicylsäure (DNS) Assay gemessen (Abbildung 24). Dieser Assay ermöglicht es, reduzierende Gruppen als Spaltprodukte von Oligosacchariden quantitativ nachzuweisen (Miller, 1959) und konnte bereits für die Hydrolyse von (hemi)zellulolytisch aktiven *U. maydis* Stämmen erfolgreich eingesetzt werden (Geiser *et al.*, 2016) (Abbildung 11). Über den Verlauf des Assays zeigte der aktivierte Stamm UmPgu1 im Vergleich zum Vorläuferstamm AB33P5 Δ^R eine signifikant höhere Freisetzung von reduzierenden Gruppen. Der zum 24 h Messpunkt ermittelte Wert 6,39 mM (+/- 0,74 mM) entspricht einer 30-fach höheren Freisetzung (Abbildung 11 B).

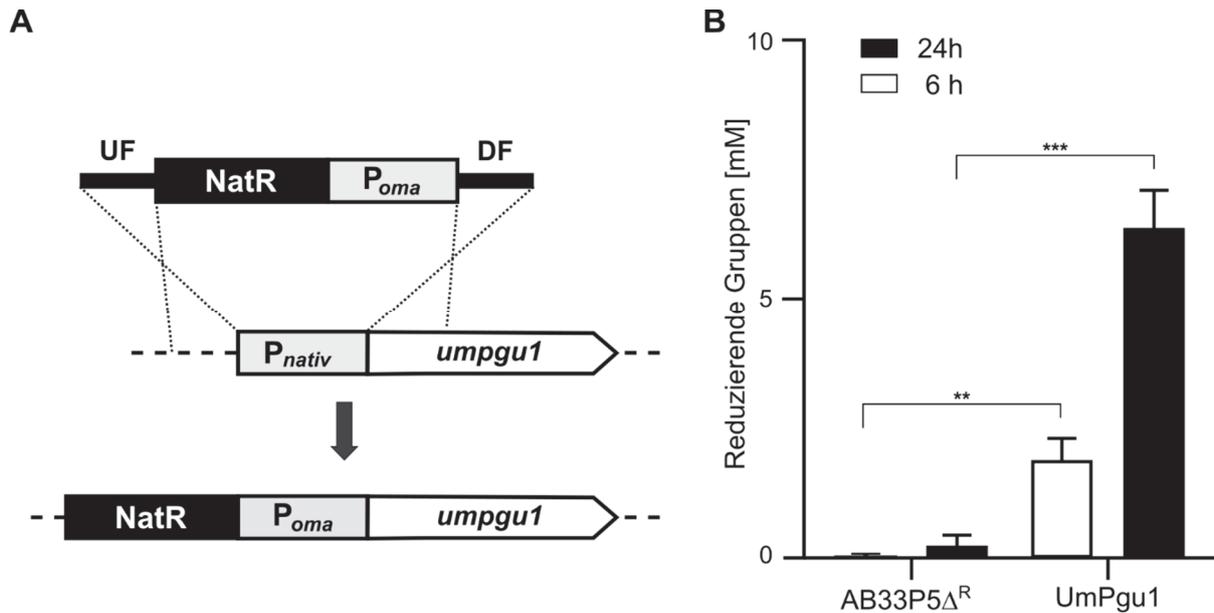


Abbildung 11: Aktivierung der intrinsischen Endo-Polygalakturonase Pgu1. **A**, Schematische Darstellung der Aktivierungsstrategie des *Pgu1* Gens (Geiser *et al.*, 2016). Der native Promotor des Gens *umpgu1* (*umag_02510*) wurde durch den starken konstitutiven Promotor *P_{oma}* ersetzt. Zwecks Selektion wurde stromaufwärts eine Nourseothricin Resistenzkassette (*NatR*) eingesetzt. **B**, Ergebnis des DNS-Assays zur Darstellung der enzymatischen Aktivität der konstitutiv aktivierten Endo-Polygalakturonase Pgu1. Nach Inkubation in 0,5% Polygalakturonsäure in 0,1 M NaAc Puffer, pH 5,5, zeigt der Überstand des aktivierten Stammes UmPgu1 eine erhöhte Freisetzung reduzierender Gruppen. Der Vorläuferstamm AB33P5 Δ^R dient als Kontrolle, ohne signifikante enzymatische Aktivität. Das Diagramm zeigt den Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **, p-Wert < 0,01; ***, p-Wert < 0,001 (Zwei Stichproben t-Test).

2.1.4 Erweiterung des pektinolytischen Potentials von *Ustilago maydis* durch heterologe Enzyme

Die vorgegangenen Analysen zeigten, dass mit den intrinsisch vorhandenen Enzymen theoretisch sowohl Teile des HG-Rückgrats, als auch Arabinose-haltige Seitenketten hydrolysiert werden können. Die effektive Freisetzung von kultivierungsrelevanten monomeren Zuckern wird auf diesem Substrat jedoch erst durch die vollständige Hydrolyse des GalA-Rückgrates erreicht. Neben der Endo-Polygalakturonaseaktivität bedarf es dafür zunächst einer Exo-Polygalakturonase (Abbildung 9), die, durch die Hydrolyse vom terminalen Ende der PolyGalA, monomere GalA freisetzt. Für die Vervollständigung des pektinolytischen Potentials wurden entsprechende Gene aus heterologen Organismen in *U. maydis* exprimiert. Die Auswahl möglicher Enzyme wurde unter den für *U. maydis* kultivierungsbedingten Voraussetzungen in Bezug auf pH-Wert und Temperaturoptimum durchgeführt. Zudem war eine vorhergegangene *in vitro* Charakterisierung essenziell, um sicherzustellen, dass die Enzyme die gewünschte Aktivität aufweisen. Die Möglichkeit in *U. maydis* auch die unkonventionelle Sekretion (Reindl *et al.*, 2019; Stock *et al.*, 2012; Terfrüchte *et al.*, 2017) nutzen zu können, ermöglichte es bei der Datenbankrecherche neben den eukaryotischen auch prokaryotische, hydrolytische Enzyme mit

in Betracht zu ziehen, was das Spektrum der geeigneten Enzyme erweiterte. Die Expressionsstrategie der heterologen Gene wird in Abbildung 12 dargestellt. Dicodon-optimierte Sequenzen der heterologen Gene aus Pilzen wurden mit den Sequenzen für ihre nativen Signalpeptide unter P_{oma} in den Lokus des *iron-sulfur proteins* (*ip*) integriert (Broomfield und Hargreaves, 1992; Stock *et al.*, 2012). Die heterologen Sequenzen wurden zudem am 3'-Ende mit der Sequenz des SHH-Affinitätstags (Stock *et al.*, 2012) versehen, um eine Detektion des exprimierten Proteins, bzw. die Aufreinigung über eine Affinitätssäule zu ermöglichen (Abbildung 12 A). Die Expression der heterologen Gene bakteriellen Ursprungs wurde über die Fusion mit der Sequenz der Chitinase Cts1 erreicht (Stock *et al.*, 2012) Das Fusionsprotein bestehend aus prokaryotischem CAZyme und Cts1 trug ebenfalls einen SHH-Affinitätstag (Abbildung 12 B).

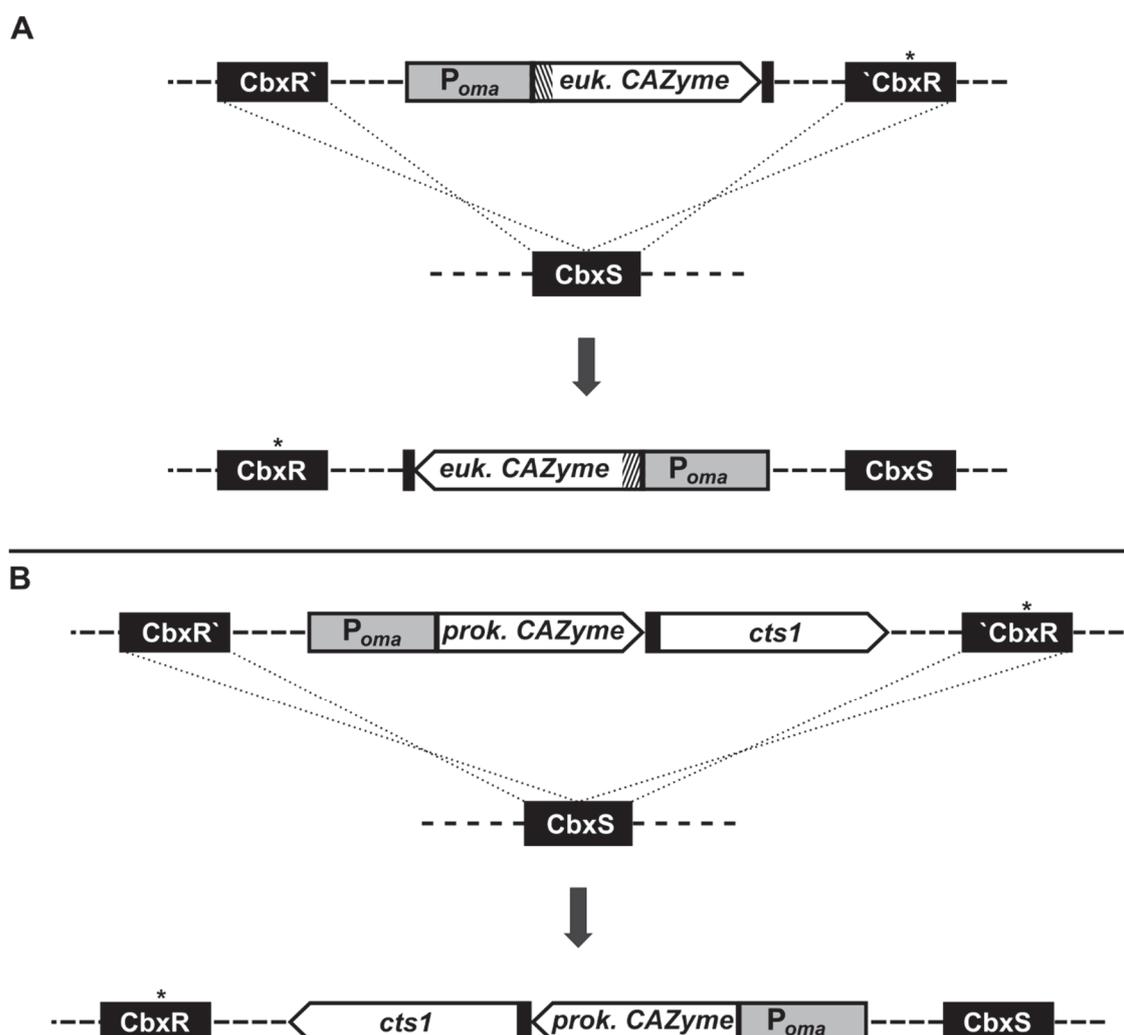


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Überexpressionskonstrukte integriert in den *ip*-Lokus von *U. maydis*. Dargestellt werden nur die für die Überexpression in *U. maydis* relevante Elemente. **A**, unter der Kontrolle des Promotors P_{oma} wurde die dicodonoptimierte Sequenz des heterologen, eukaryotischen Gens mit einer angehängten Sequenz für einen SHH-Affinitätstag eingefügt. Die kodierende Gensequenz trägt an ihrem 5'-Ende die ebenfalls dicodonoptimierte Signalsequenz für konventionelle Sekretion. **B**, die heterologen Gensequenzen prokaryotischen Ursprungs wurden ebenfalls dicodonoptimiert, jedoch ohne Sekretionssignalsequenz integriert. Am 3'-Ende befindet sich ebenfalls eine Sequenz für einen SHH-Affinitätstag, sowie eine Fusion mit der kodierenden Sequenz der Chitinase Cts1 als Vermittler der unkonventionellen Sekretion. Stern: markiert die für die Vermittlung der Carboxinresistenz verantwortliche Mutation.

Um die effektive Hydrolyse von PolyGalA zu fermentierbaren Monomeren zu ermöglichen, wurden zwei Endo-Polygalakturonasen und zwei Exo-Polygalakturonasen ausgewählt und in Bezug auf ihr Potential, reduzierende Gruppen aus PolyGalA freizusetzen, untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Heterologe CAZymes aus eukaryotischen und prokaryotischen Quellen für die Expression in *U. maydis*.

Interne ID/ Acc. Nummer	Donor- Organismus	Quelle	Spezifikation ¹	GH Kategorie ³ Aktivität ¹
PgaX; CAA68128.1	<i>A. tubingensis</i>	Kester <i>et al.</i> , 1996	8 N-Glykosylierungs Sequons ² pH-Bereich 2,8-6,2 Temperaturoptimum 30 °C Substrat PolyGalA	GH 28 Exo- PGase
Pgu1; OJJ96574.1	<i>A. aculeatus</i>	Abdulrachman <i>et al.</i> , 2017	0 N-Glykosylations Sequons ² pH-Bereich 2 - 6 Temperaturbereich 40 °C - 50 °C Substrat PolyGalA, Pektin	GH 28 Endo- PGase
Peh1; M83222.1	<i>P. carotovorum</i>	Ibrahim <i>et al.</i> , 2017	3 N-Glykosylations Sequons ² pH- Bereich 5,4 - 6,2 Temperaturbereich 45 °C - 55 °C Substrat PolyGalA	GH 28 Endo- PGase
PguB; JQ388228.1	<i>K. pneumoniae</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2012b	6 N-Glykosylations Sequons ² pH-Bereich 3 -9 Temperaturbereich 30 °C - 50 °C Substrat PolyGalA	GH 28 Exo- PGase

¹ nach Charakterisierung in angegebener Quelle; Temperatur/ pH Bereiche für Aktivitäten > 50 %, sofern nicht genauer bestimmt

² laut Vorhersage über NetNGlyc 1.0 Server

³ laut CAZy.org Klassifizierung

Aus prokaryotischen Quellen wurden die Endo-Polygalacturonase aus *P. carotovorum* Peh1 (PcPeh1) und die Exo-Polygalacturonase aus *K. pneumoniae* PguB (KpPguB) ausgewählt und die Überexpressionsstämme gemäß der Strategie in Abbildung 12 B erstellt. Um die unkonventionelle Sekretion sicherzustellen, wurden die Sequenzen für die nativen Signalpeptide in den Überexpressionskonstrukten entfernt. Die unkonventionelle Sekretion findet über die Fragmentierungszone während der Biomassebildung statt und umgeht das Endomembransystem (Abbildung 13 A). Durch diese Umgehung werden posttranslationale Modifikationen verhindert. Glykosylierungen können unter anderem Einfluss auf korrekte Faltung oder die Aktivität von Proteinen haben (Iturriaga *et al.*, 1989; Brocca *et al.*, 2000; Helenius und Aebi, 2001). Die vorhandenen N-Glykosylierungs Sequons innerhalb der Aminosäuresequenzen der prokaryotischen Polygalakturonasen (markiert durch *, Abbildung 13 B) sollten durch die hier gewählte unkonventionelle Sekretion nicht N-glykosyliert werden. Western Blot-Analysen bestätigen die Produktion der Enzyme und die fehlende N-Glykosylierung. Dazu wurden aus 24 h kultivierten Kulturen Zellextrakte isoliert und mittels PNGase F teilweise deglykosyliert (Abbildung 13 C). Ein Größenunterschied der deglykosylierten Proben und derer ohne Behandlung war nicht sichtbar. Es war zudem erkennbar, dass in den Überexpressionsstämmen Fusionsprotein exprimiert und auch in das Außenmedium sekretiert wurde (Abbildung 13 D). Neben den Vollängenproteinen wurden ebenfalls Abbauprodukte detektiert. Die detektierten Signale in den

Western Blot-Analysen zeigten insgesamt ein stärkeres Detektionssignal für das Fusionsprotein PcPeh1-Cts1 als für das Exo-Polygalakturonase KpPguB-Cts1 Fusionsprotein. Im Medium wurde zudem für die PcPeh1-Cts1 Fusion mehr Abbauprodukt als Vollängenprotein detektiert. Alle hier nachgewiesenen Proteine laufen verglichen mit dem Größenstandard in der Western-Blot-Analyse etwas höher, als nach den theoretischen Größen erwartet. Dieses Phänomen wurde auch schon in vorhergegangenen Arbeiten beobachtet (Stock *et al.*, 2012, Sarkari *et al.*, 2014). Der DNS-Assay unter Verwendung von Kulturüberstand mit PolyGalA als Substrat zeigte, dass beide bakteriellen Polygalakturonasen in einem aktiven Zustand sekretiert wurden. Während die initiale Menge an freigesetzten reduzierenden Gruppen für den KpPguB-Cts1 enthaltenen Überstand vernachlässigbar war, zeigte der Assay nach 24 h eine Menge von etwa 0,5 mM reduzierende Gruppen. Der PcPeh1-Cts1 sekretierende Stamm zeigte bereits nach 6 h Inkubation des Überstandes auf PolyGalA eine signifikante Menge an reduzierenden Gruppen und setzte bis zum 24 h Messpunkt etwa 1 mM reduzierende Gruppen frei (Abbildung 13 E).

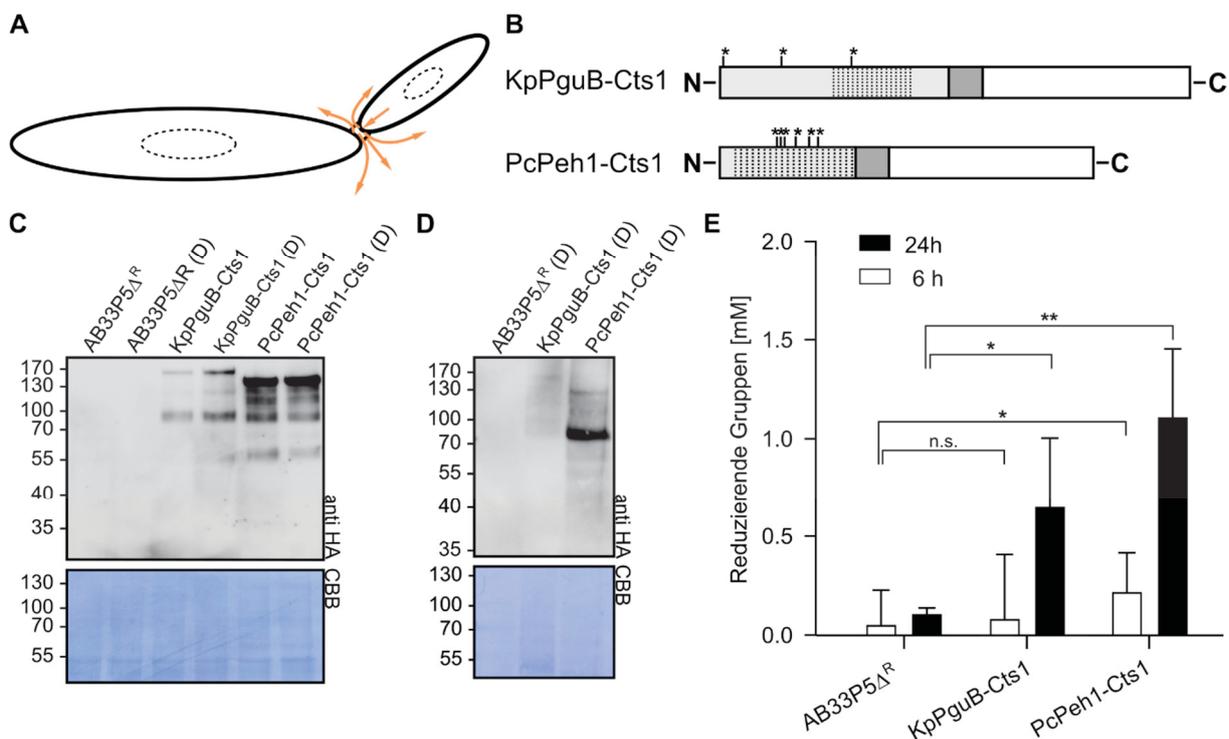


Abbildung 13. Komplementierung durch bakterielle Endo- und Exo-Polyalakturonasen. **A**, Schematische Darstellung der Sekretion heterologer Enzyme über den unkonventionellen Sekretionsmechanismus über die Fragmentierungszone von sich teilenden Zellen. **B**, Darstellung der verwendeten bakteriellen Enzyme in Cts1-Fusion. Vorhergesagte N-Glykosylierungs Sequenzen der Endo-Polygalakturonase aus *P. carotovorum* Peh1 (PcPeh1, 3 Sequenzen) und Exo-Polygalakturonase aus *K. pneumoniae* PguB (KpPguB, 6 Sequenzen) sind mit Sternchen markiert. Vorhergesagte N-terminale Signalpeptide wurden entfernt, um die Cts1-vermittelte unkonventionelle Sekretion zu ermöglichen. Cts1 ist in weiß dargestellt, ein SHH-Affinitäts-Tag (grau) verbindet die beiden Proteine. Vorhergesagte funktionelle GH28 Domänen sind durch gepunktete Linien dargestellt. **C**, Expression der bakteriellen Polygalakturonasen im Stammhintergrund AB33P5 Δ^R . Die Western Blot-Analyse zeigt Zellextrakte (10 ng), die zuvor teilweise deglykosyliert wurden (D). Heterologe Proteine wurden über Antikörper, gerichtet gegen den im internen SHH-Tag befindlichen HA-Affinitäts-Tag, detektiert. CBB, Coomassie Brilliant Blue Färbung der Membranen als Ladekontrolle. Die erwarteten Größen der Fusions-Proteine: KpPguB-Cts1, 134,9 kDa; PcPeh1-Cts1, 105,1 kDa. **D**, Unkonventionelle Sekretion der bakteriellen Polygalakturonase als Cts1-Fusionsproteine in AB33P5 Δ^R . Dargestellt ist der Western Blot von gefällttem und deglykosyliertem Kulturüberstand (entsprechend einer 20 ml Kultur).

Abbildung 13 Fortsetzung: Heterologe Proteine wurden über Antikörper, gerichtet gegen den im internen SHH-Tag befindlichen HA-Affinitäts-Tag, detektiert. CBB, Coomassie Brilliant Blue Färbung der Membranen als Ladekontrolle. **E**, DNS-Assay zur Detektion der Aktivität der bakteriellen Enzyme. Die Überstände beider generierten Stämme sind im Vergleich zum Vorläuferstamm AB33P5 Δ^R in der Lage reduzierende Gruppen aus dem Substrat PolyGalA freizusetzen. Das Diagramm zeigt den Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung: n.s. nicht signifikant, p-Wert >0,05; *, p-Wert <0,05; **, p-Wert <0,01 (Zwei Stichproben T-Test).

Neben den bakteriellen Polygalakturonasen wurden ebenfalls Enzyme aus eukaryotischen Quellen für die Komplementierung des Enzymsets herangezogen. Nach dem in Abbildung 12 A dargestellten Integrationsprinzip wurden die Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und -/AaPgu1 erstellt. PgaX aus *A. tubingensis* (Tabelle 2) wurde als eukaryotische Variante einer Exo-Polygalakturonase getestet, um aus dem PolyGalA-Rückgrat monomere GalA freizusetzen. Der Stamm AB33P5 Δ^R /AaPgu1 wurde als Alternative zur intrinsisch aktivierten Stamm UmPgu1 erstellt und produziert die Endo-Polygalakturonase Pgu1 aus *Aspergillus aculeatus*.

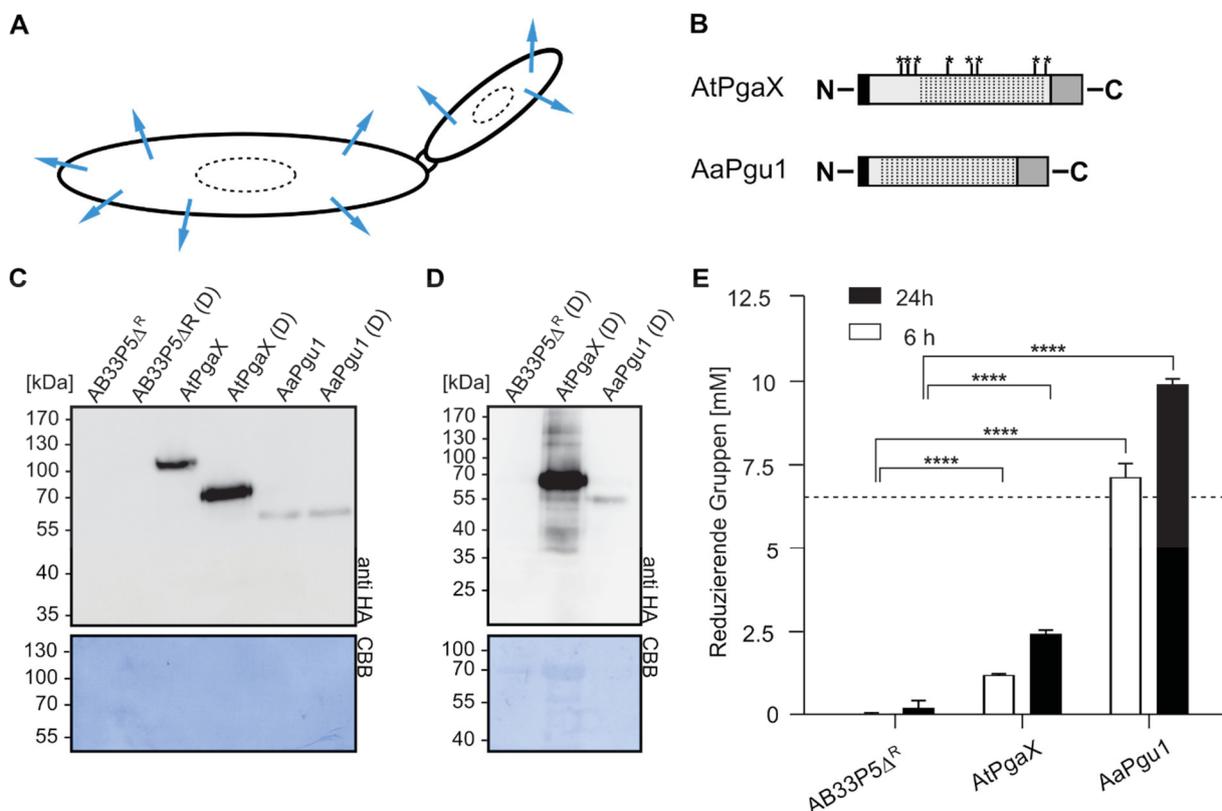


Abbildung 14: Komplementierung mit pilzlichen Endo- und Exo-Polygalakturonasen. **A**, Schematische Darstellung der konventionellen Sekretion über das Endomembransystem der hefeartigen Zellen. **B**, Darstellung der beiden pilzlichen Proteine. Vorhergesagte N-Glykosylierungs Sequons von PgaX aus *A. tubingensis* (AtPgaX, 8 Sequons) und Pgu1 aus *A. aculeatus* (AaPgu1, 0 Sequons) werden durch Sterne dargestellt. N-terminale Signalsequenzen werden gemäß der Vorhersage in schwarz, der C-Terminale SHH-Affinitäts-Tag in grau dargestellt. Funktionelle GH28 Domänen sind durch gepunktete Bereiche markiert. **C**, Expression der pilzlichen Polygalakturonasen im Stammhintergrund AB33P5 Δ^R . Die Western blot-Analyse zeigt Zellextrakte (10 ng), die teilweise deglykosyliert wurden (D). Heterologe Proteine wurden über Antikörper, gerichtet gegen den im C-terminalen SHH-Tag befindlichen HA-Affinitäts-Tag, detektiert. CBB, Coomassie Brilliant Blue Färbung der Membran als Ladekontrolle. Erwartete Größen der produzierten Proteine: AtPgaX, 56.5 kDa; AaPgu1, 47.1 kDa. **D**, Konventionelle Sekretion der pilzlichen Polygalakturonasen im Stamm AB33P5 Δ^R . Die Western Blot-Analyse zeigt die gefällten und deglykosylierten Proteine aus 1 ml Kulturüberstand. Die Proteindetektion geschah über Antikörper, gerichtet gegen den im C-terminalen SHH-Tag befindlichen HA-Affinitäts-Tag. **E**, DNS-Assay der biotechnologisch generierten Stämme im Vergleich zum Vorläuferstamm AB33P5 Δ^R . Beide Stämme zeigen Aktivität auf dem Substrat Polygalakturonsäure, erkennbar durch die erhöhte Freisetzung von reduzierenden Gruppen.

Abbildung 14 Fortsetzung: Die Menge an freigesetzten reduzierenden Gruppen durch die Endo-Polygalakturonase AaPgu1 ist höher im Vergleich zu der intrinsischen UmPgu1 (dargestellt durch die gestrichelte Linie nach 24 h Inkubation, vgl. Abbildung 11 B). Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; ****, p-Wert > 0,0001 (Zwei Stichproben t-Test).

Die Sekretion der beiden pilzlichen CAZymes folgt dem konventionellen Prinzip über das Endomembransystem (Abbildung 14 A), vermittelt durch die nativen N-terminalen Signalpeptide die ebenfalls für die Expression in *U. maydis* dicodonoptimiert wurden (Abbildung 14 B, schwarze Balken). Die exprimierten CAZymes konnten sowohl in den Zellextrakten als auch sekretiert im Überstand detektiert werden. AtPgaX zeigte dabei eine Änderung der molekularen Größe nach teilweiser Deglykosylierung. Dies stimmt mit der Vorhersage überein, dass das Protein bis zu acht N-Glykosylierungsstellen tragen könnte (Abbildung 14 B). AaPgu1 trägt laut Vorhersage des NetNGlyc Vorhersage-tools dagegen keine N-Glykosylierungs Sequons und zeigt entsprechend auch keine Veränderung nach der Behandlung durch PNGase F (Abbildung 14 B,C).

Die Untersuchung der pektinolytischen Aktivität des Kulturüberstands zeigt eine signifikant erhöhte Freisetzung von reduzierenden Gruppen für den AtPgaX produzierenden Stamm mit einer Verdopplung von 6 h zum 24 h Messpunkt auf ca. 2,5 mM reduzierender Gruppen. Der Stamm AB33P5 Δ^R /AaPgu1 zeigt im Vergleich dazu eine über 4-fach höhere Freisetzung von reduzierenden Gruppe nach 24 h von ca. 10 mM, eine höhere Freisetzung als zuvor im Stamm AB33P5 Δ^R /UmPgu1 beobachtet wurde.

Alle getesteten heterologen Polygalakturonasen wurden somit in *U. maydis* sekretiert und waren funktionell. Die bakteriellen Enzyme zeigten dabei jedoch schwächere und die pilzlichen höhere Aktivitäten, weshalb letztere für die effektive Komplementation des intrinsischen Repertoires bevorzugt wurden.

2.1.5 Co-Fermentation von CAZyme produzierenden *Ustilago maydis* Stämmen

Da die intrinsische Aktivierung bzw. die Integration vieler für heterologe CAZymes kodierender Sequenzen in einem Stamm durch die Limitierung der zur Stammherstellung erforderlichen Resistenzkassetten eingeschränkt ist und eine Mehrfachintegration der P_{oma}-Promotorsequenz das Risiko spontaner, unerwünschter Rekombinationsereignisse erhöht, wurde in dieser Arbeit der Einsatz von Mischkulturen verfolgt, um den Abbau von PolyGalA zu etablieren. Um die Stabilität eines solchen Systems zu testen, wurden zunächst zwei vielversprechende, CAZyme sekretierende Stämme sowohl getrennt voneinander, als auch zusammen kultiviert und das pektinolytische Potential der zu gleichen Teilen gemischten, separaten Kulturüberstände mit dem Überstand der zu gleichen Teile inokulierten Co-Fermentation verglichen. Wie auch in den vorherigen Versuchen wurden die Überstände nach 24 h Kultivierung mit dem Substrat PolyGalA

inkubiert und die Konzentration entstandener reduzierender Zucker mittels DNS-Assay ausgewertet. Hierzu wurden die Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 verwendet, da sie die vielversprechendsten Einzelmessungen zeigten (Abbildung 14). Exo- und Endo-Polygalakturonase sollten komplementär auf das PolyGalA-Rückgrat wirken und so eine vollständigere Hydrolyse des Substrates bewirken als die einzelnen Enzyme (Abbildung 15 A). In dem Vergleich der gemischten Überstände mit dem Überstand der co-fermentierten Stämme konnte kein signifikanter Unterschied in der Menge an freigesetzten reduzierenden Gruppen festgestellt werden. Die Menge der reduzierenden Gruppen lag für beide Varianten bei ca. 6 mM nach 6 h, bzw. ungefähr 12 mM nach 24 h Inkubation und somit nochmals höher, als die Freisetzung durch den Kulturüberstand von Stamm AB33P5 Δ^R /AaPgu1 allein (Abbildung 15 B). Ausgehend von einer Substratkonzentration von 21,89 mM PolyGalA entspricht diese einer Hydrolyse von etwa 54 %.

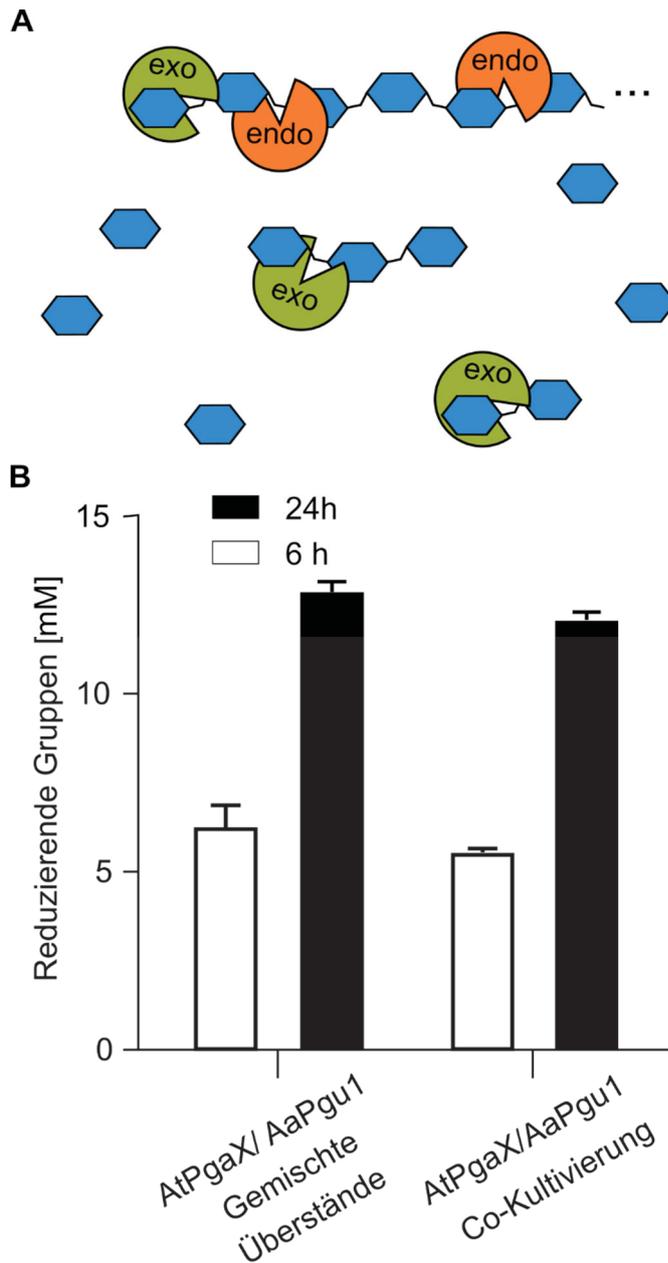


Abbildung 15: Co-Fermentation der Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1. **A,** Schematische Darstellung der komplementären Aktivitäten von Endo- und Exo-Polygalakturonasen auf PolyGalA. **B,** Vergleichender DNS-Assay nach der Inkubation von zu gleichen Teilen gemischten Überstände der separat kultivierten und co-fermentierten Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1. Der Graph repräsentiert die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Beide Versuchsvarianten zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung von reduzierenden Gruppen aus dem Substrat PolyGalA.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Einsatz von co-fermentierten Stämmen ein geeignetes Mittel sein kann, um spezialisierte Produktionsstämme komplementär wirkender CAZymes flexibel für die Hydrolyse komplexer Substrate anzupassen und einzusetzen. Die Evaluation der Kulturüberstände bietet allerdings lediglich eine Momentaufnahme und lässt keine Rückschlüsse auf die Verstoffwechslung der freiwerdenden reduzierenden Zucker in einem Bioprozess zu.

2.1.6 Wachstum von CAZyme produzierenden *Ustilago maydis* Stämmen auf PolyGalA

Nach der erfolgreichen Untersuchung der kombinierten pektinolytischen Aktivität von Kulturüberständen sollte die Verstoffwechslung des Substrats PolyGalA durch die CAZyme produzierenden Stämme in einem laufenden Prozess überwacht werden. Hierbei wurde sich der Methode der Kultivierung in einem *respiration activity monitoring system* (RAMOS) (Anderlei und Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004) bedient. Das RAMOS-System wurde bereits in früheren Versuchen verwendet und über die Kultivierung von AB33P5 Δ^R /PgaX auf GalA und PolyGalA etabliert (Müller *et al.*, 2018). Das System hat den Vorteil, dass die Sauerstofftransferrate sowie die Kohlenstoffdioxidtransferrate in der laufenden Kultivierung überwacht werden können und daraus Schlüsse auf den Stoffwechsel der Kultur gezogen werden können (Anderlei und Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004). Die Versuche im RAMOS-System (Abbildung 16, Abbildung 17) wurden durch den Kooperationspartner Dr. Markus Müller, als Mitglied der Bioverfahrenstechnik (AVT) der RWTH Aachen, durchgeführt. Zunächst wurde der Stamm AB33P5 Δ^R /UmPgu1 in modifiziertem Verduyn C2 Medium kultiviert, welches 4 g/L Glukose und 20 g/L GalA, bzw. PolyGalA enthielt. Diese Verhältnisse der C-Quellen hatten sich als vorteilhaft herausgestellt und dienten der initialen Biomassebildung und der Erhöhung der Menge an sekretierten CAZymes durch das initiale Wachstum auf Glukose (Müller *et al.*, 2018). Für beide Kultivierungen zeigte sich zunächst eine Sauerstofftransferrate von ca. 11 mmol/L/h, was der Kultivierung auf dem bevorzugten Substrat Glukose entsprach (Abbildung 16 A). Nach 7,5 h war die Glukose als C-Quelle verbraucht und die Sauerstofftransferrate fiel auf etwa 2,4 mmol/L/h. Nach einer kurzen Phase niedriger Aktivität zeigte der UmPgu1 sekretierende Stamm einen erneuten Anstieg der Sauerstofftransferrate, der der Verstoffwechslung von GalA entspricht (Abbildung 16 A, blaue Linie), während bei der Kultivierung auf PolyGalA dieser Anstieg ausblieb (Abbildung 16 A, schwarze Linie). Die Verstoffwechslung der Substrate Glukose und GalA konnte auch anhand des Respirationsquotient verfolgt werden (Abbildung 16 B), der für das Wachstum auf Glukose auf ca. 1,1 und für die Verstoffwechslung von GalA auf ca. 1,4 bestimmt wurde (Müller *et al.*, 2018). Für die Kultur auf PolyGalA bleibt ein Anstieg des Respirationsquotienten und folglich eine Verstoffwechslung von GalA aus, da durch die Endo-Polygalakturonase-Aktivität von UmPgu1 keine zu verstoffwechselnden GalA Monomere freigesetzt werden können. Die Menge der insgesamt konsumierten GalA wurde durch Müller *et al.* (2018) für verschiedene GalA Konzentrationen gegen die Menge des insgesamt veratmeten Sauerstoffs kalibriert und diente in diesen Kultivierungen der Ermittlung der verbliebenen (Poly)GalA im Kulturmedium. Für die Kultivierung von AB33P5 Δ^R /UmPgu1 auf GalA zeigt sich beginnend mit der GalA Verstoffwechselungsphase ab 7,5 h Kultivierung eine konstante Abnahme der GalA Konzentration im Kulturmedium auf 2 g/L (Abbildung 16 C, grüne Linie). Parallel wurde die GalA

Konzentration durch *Offline*-Beprobung von unter gleichen Bedingungen kultivierten Kulturen bestimmt, die via HPLC Analyse auf ihren GalA Gehalt überprüft wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Messungen zeigten den Verbrauch der gesamten GalA zum Zeitpunkt des steil abfallenden Respirationsquotienten.

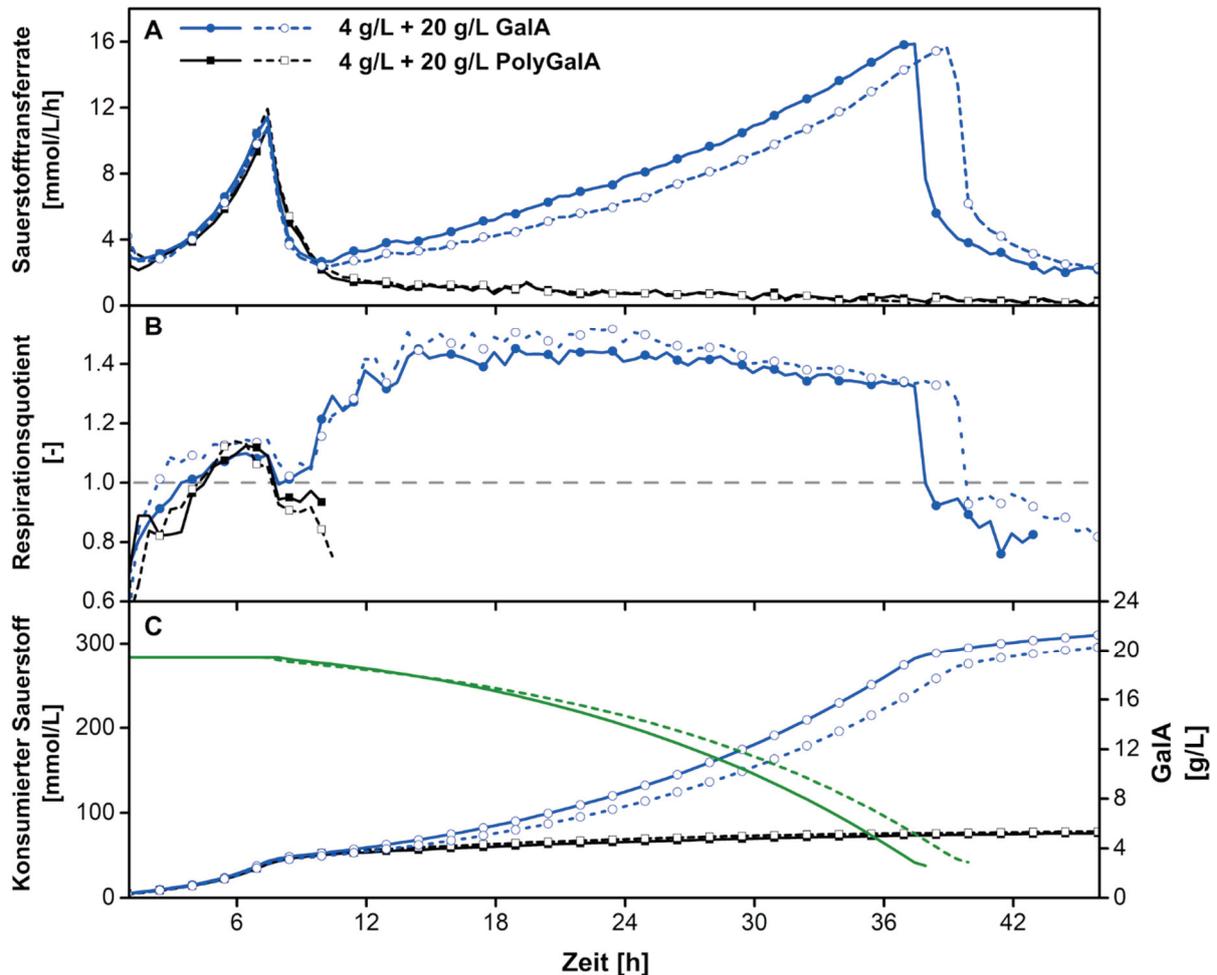


Abbildung 16: RAMOS-Analyse des Stammes AB33P5 Δ^R /UmPgu1 auf Galakturonsäure (GalA) und Polygalakturonsäure (PolyGalA). Die Kultivierung wurde in modifiziertem Verduyn C2 Kulturmedium durchgeführt, welches mit 20 g/L GalA (blaue Linie) oder 20 g/L PolyGalA (Reinheit 85 %, schwarze Linie) als C-Quelle supplementiert war. **A**, Biologische Duplikate der Sauerstofftransferate werden je als Linie und gestrichelte Linie dargestellt. **B**, Biologische Duplikate des Respirationsquotienten, dargestellt als Linie und gestrichelte Linie. **C**, Biologische Duplikate des insgesamt konsumierten Sauerstoffs, dargestellt als Linie und gestrichelte Linie. Für die Kultivierung auf GalA wird die geschätzte restliche Menge an GalA (grüne Linien) dargestellt (Müller *et al.*, 2018). Für eine klarere Darstellung wird lediglich jeder dritte Messpunkt und Respirationsquotienten nur für eine Sauerstofftransferate über 2mmol/L/h dargestellt. Kultivierungsbedingungen: Modifiziertes Verduyn C2 0,2 M MOPS, pH 6,0, 250 mL Rundkolben, Kulturvolumen 20 mL, Schüttelfrequenz 300 upm, Schütteldurchmesser 50 mm, Start OD₆₀₀ 0,6, Temperatur 30 °C. Versuch durchgeführt von Dr. Markus Müller, AVT, RWTH Aachen.

Die erfolgreiche Verstoffwechslung der GalA durch AB33P5 Δ^R /UmPgu1 konnte auch über die Bildung von Biomasse bestätigt werden. So zeigte sich für die Kultivierung auf GalA-haltigem Medium eine OD₆₀₀ von 8,2, während für die Kultur auf dem unzugänglichen Substrat PolyGalA lediglich ein Wert von 1,4 erreicht wurde (Daten nicht gezeigt).

Um die in den *Offline*-Analysen bestätigte komplementäre Wirkung der heterologen CAZymes und die daraus resultierende gesteigerte Zugänglichkeit des Substrates PolyGalA zu bestätigen,

wurden die intrinsische, bakterielle oder pilzliche Endo-Polygalakturonasen exprimierenden Stämme (Abbildung 11 A, Abbildung 13 und Abbildung 14) mit dem AtPgaX exprimierenden Stamm AB33P5 Δ^R /AtPgaX im RAMOS-System co-fermentiert.

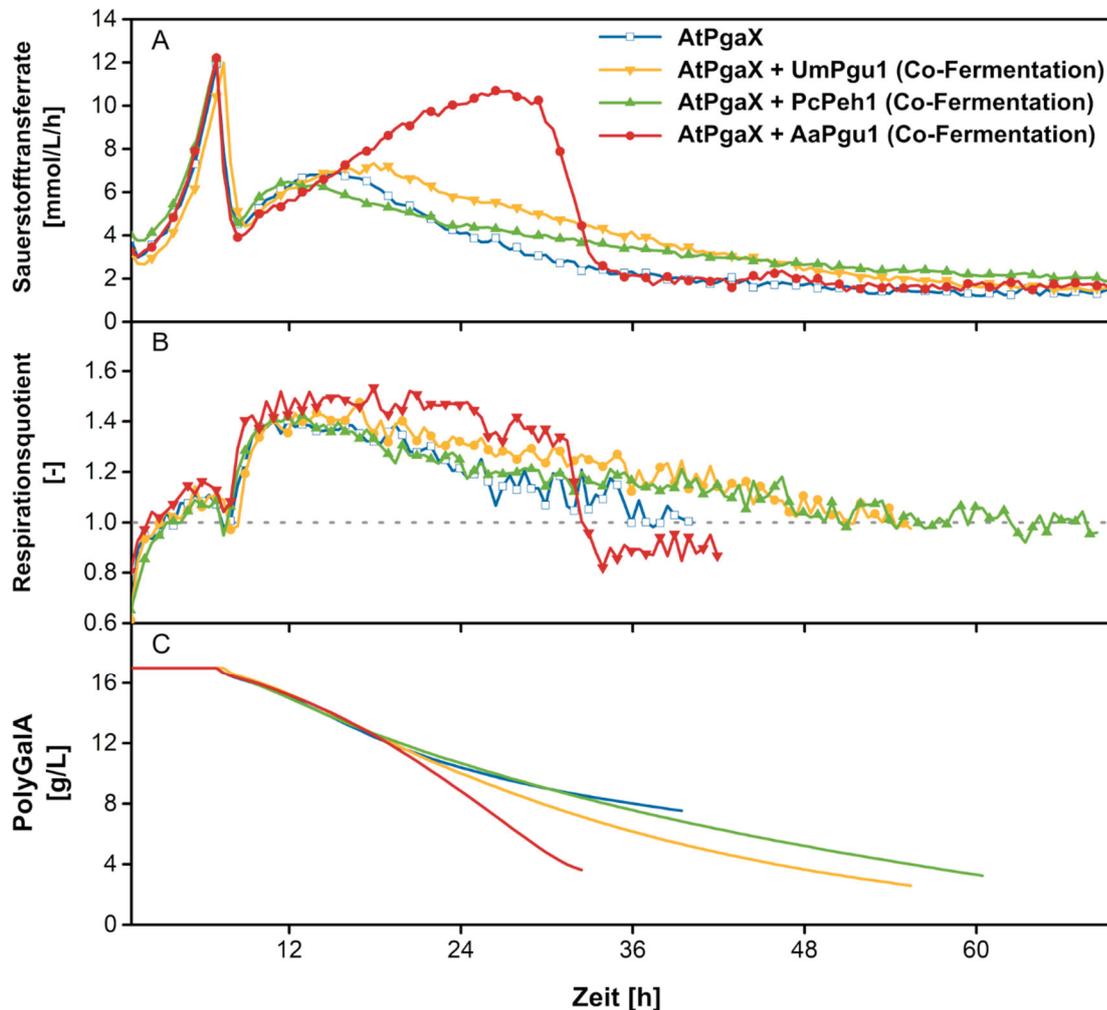


Abbildung 17: RAMOS-Analyse der einzeln und co-fermentierten CAZyme-produzierenden Stämme. Die Stämme welche AtPgaX (pilzliche Exo-Polygalakturonase), UmPgu1 (intrinsische Endo-Polygalakturonase), PcPeh1 (bakterielle Endo-Polygalakturonase) und AaPgu1 (heterologe pilzliche Endo-Polygalakturonase) exprimieren wurden in modifiziertem Verdun C2 mit 4 G/L Glc und 20 g/L PolyGalA (85 % Reinheit) kultiviert. **A**, Sauerstofftransferrate. **B**, Respirationskoeffizient. **C**, Verbliebenes Substrat ermittelt anhand des insgesamt konsumierten Sauerstoffes (Müller *et al.*, 2018). Das Ende der Verstoffwechslung der PolyGalA wurde durch das Unterschreiten eines Respirationsquotienten von 1 definiert. Für eine klarere Darstellung wird lediglich jeder dritte Messpunkt und Respirationsquotienten nur für eine Sauerstofftransferrate über 2mmol/L/h dargestellt. Alle Messungen repräsentieren den Mittelwert biologischer Duplikate. Kultivierungsbedingungen: Modifiziertes Verdun C2 0,2 M MOPS, pH 6,0, 250 mL Rundkolben, Kulturvolumen 20 mL, Schüttelfrequenz 300 upm, Schütteldurchmesser 50 mm, Start OD₆₀₀ 0,6, Temperatur 30 °C. Versuch durchgeführt von Dr. Markus Müller, AVT, RWTH Aachen.

Die Kontroll-Kultivierung von AB33P5 Δ^R /AtPgaX allein zeigte eine nur geringe Aktivität auf dem polymeren Substrat (Abbildung 17 A; blaue Linie) und die über die total verbrauchte Sauerstoffmenge ermittelte Restmenge an PolyGalA zeigte eine Substratverstoffwechslung von unter 56 % nach 93,5 h. Die Kombination mit der intrinsischen Endo-Polygalakturonase UmPgu1 zeigte dagegen einen höheren Verbrauch des Substrates von etwa 85 %. Zwar war eine mit der Kultivierung von AB33P5 Δ^R /AtPgaX vergleichbare Sauerstofftransferrate zu beobachten, jedoch

zeigte sich eine verlängerte Phase der Verstoffwechslung, wie am Respirationsquotient sichtbar (Abbildung 17, gelbe Linie). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Co-Fermentation der PcPeh1 und AtPgaX exprimierenden Stämme beobachtet (Abbildung 17, grüne Linie).

Die Sauerstofftransferrate blieb unter dem Wert, der für die Kombination mit UmPgu1 beobachtet wurde, jedoch war auch hier die Phase der Verstoffwechslung verlängert bis zu einer Substratkonsumierung von 81 % nach einer Kultivierungsdauer von 60,5 h. Die Kombination der AaPgu1 und AtPgaX produzierenden Stämme führte zu der höchsten beobachteten Sauerstofftransferrate und einer rapiden Verstoffwechslung des Substrates (Abbildung 17, rot). Bei einer Kultivierungsdauer von 32,5 h waren bereits 79 % der supplementierten PolyGalA verstoffwechselt. Erstaunlicherweise spiegelte die Sauerstofftransferrate dieser Co-Fermentierung das Wachstum auf dem GalA Monomer wider (Abbildung 16), was für eine annähernd vollständige Hydrolyse in kurzer Zeit spricht. Die konsumierten Substratmengen überstiegen die durch DNS-Assays ermittelten Mengen an freigesetzten reduzierenden Gruppen. Somit zeigen die bereits in den *Offline*-Analysen in Kombination wirkenden Stämme AB33P5 Δ^R / AtPgaX und AB33P5 Δ^R / AaPgu1 das höchste Potential bei der Fermentation von PolyGalA.

Die initiale Verstoffwechslung der Glukose und die geringere Sauerstofftransferrate während der Verstoffwechslung von GalA zeigen, dass letzteres ein weniger favorisiertes Substrat für *U. maydis* darstellt. Die Messung der optische Dichte ist, besonders in dem in Lösung trüben Substrat PolyGalA, sehr fehleranfällig und kann durch morphologische Veränderungen der Zellen beeinflusst werden (Stevenson *et al.*, 2016). Zudem liefert die optische Dichte keine Hinweise auf die Vitalität der Zellen während der Kultivierung. Um sicherzustellen, dass die Kultivierung auf GalA keinen negativen Einfluss auf die Morphologie und Vitalität der Zellen hat, wurden deshalb mikroskopische Kontrollen durchgeführt und tote Zellen identifiziert. Kulturen von AB33P5 Δ^R /UmPgu1, sowie Co-Kulturen von AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 wurden gemäß den Bedingungen der RAMOS-Versuche (Abbildung 16 und Abbildung 17) kultiviert und als Kontrollzeitpunkte die Endphase der Glukoseverstoffwechslung (8 h) und die Phase der GalA Verstoffwechslung (36 h) gewählt. Die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen wurde über eine Färbung mit Propidiumiodit (PI) erreicht, welches in der Cytometrie erfolgreich für die Unterscheidung von toten und lebendigen Zellen eingesetzt wird (Deere *et al.*, 1998). Als Kontrolle wurden Zellen des Stammes AB33P5 Δ^R /UmPgu1 nach 8 h Kultivierung für 10 min bei 95 °C inaktiviert und das PI Signal mit dem von nicht inaktivierten Zellen verglichen. Die starke Färbung des Zellkerns war über den GFP Kanal des Axio Imager Fluoreszenzmikroskops deutlich erkennbar, während vitale Zellen keine Färbung aufwiesen (Abbildung 18 A). Während der Kultivierung auf GalA-haltigem Medium wurden weder zum 8 h Zeitpunkt, noch während der Konsumierung von GalA morphologischen Veränderungen der Zellen der untersuchten Stämme beobachtet und die Anteile der vitalen Zellen sanken nicht unter 98 % (Abbildung 18 B). In

Verduyn C2 supplementiert mit PolyGalA zeigte sich sowohl für die Kultivierung von AB33P5 Δ^R /UmPgu1, als auch für die Co-Fermentation der AtPgaX und AaPgu1 produzierenden Stämme eine leicht verringerte Vitalität von knapp über 90 % nach 8 h (Abbildung 18 C). Während der Verstoffwechslung von GalA war dieser Einbruch, mit Vitalitäten von über 97 %, nicht mehr zu beobachten. Auch AB33P5 Δ^R /UmPgu1 zeigte über 98 % vitale Zellen, obwohl nach den bisherigen Beobachtungen zum 36 h Zeitpunkt keine GalA als C-Quelle vorliegen konnte. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass auch bei der Verstoffwechslung von GalA keine Beeinträchtigung der Vitalität der Kultur zu erwarten sind.

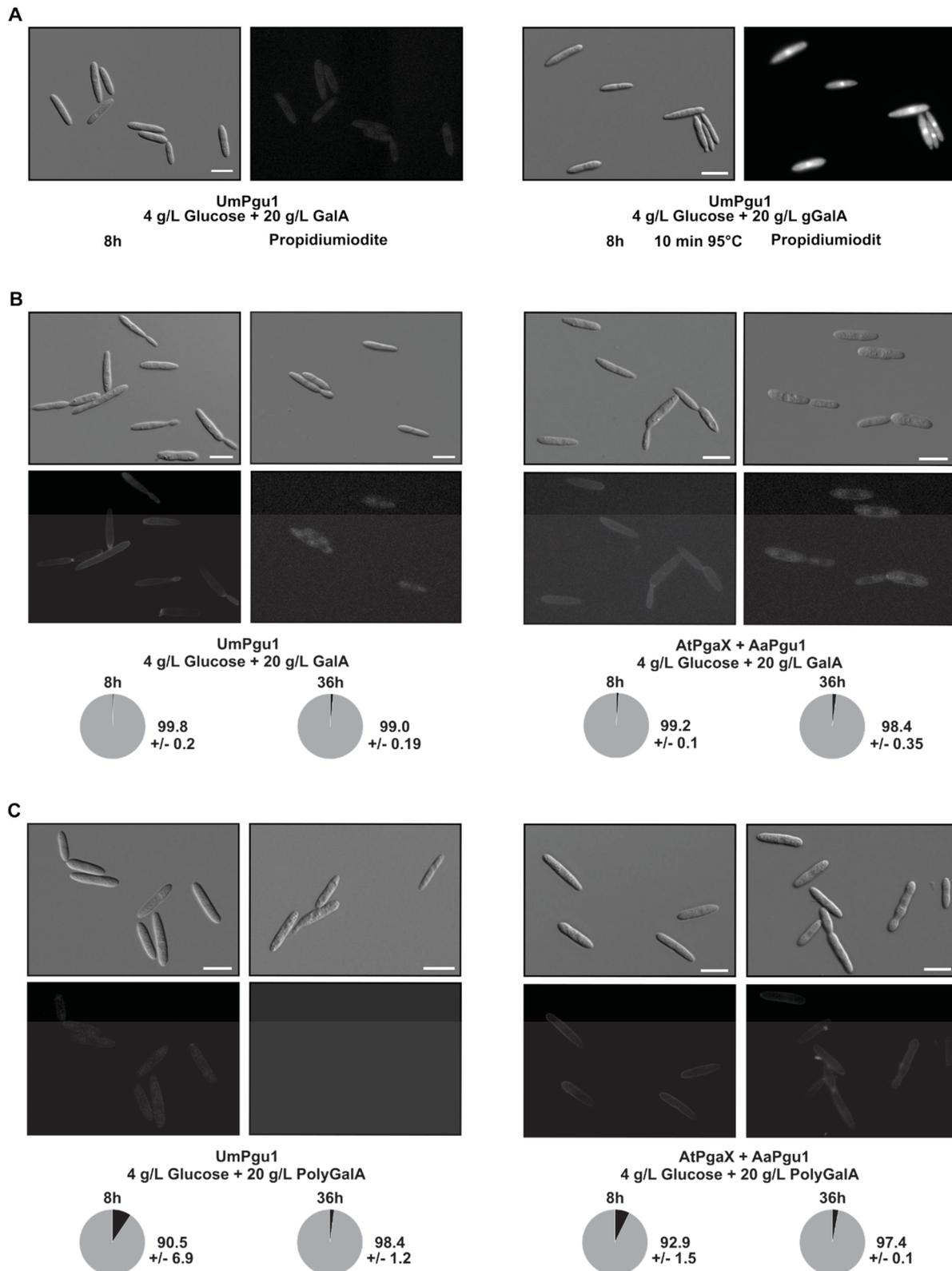


Abbildung 18: Mikroskopische Analyse der CAZyme produzierenden Stämme auf Galakturonsäure (GalA) und Polygalakturonsäure (PolyGalA). **A**, Mikroskopische Aufnahme von vitalen Zellen (links) und tote Zellen (rechts) nach Färbung mit Propidiumiodid (PI). **B**, Mikroskopische Untersuchung von AB33P5 Δ^R /Umpgu1 und einer Co-Kultur der Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 während der Phase der Glukose (8h) und GalA Verstoffwechslung (36 h). **C**, Mikroskopische Untersuchung von AB33P5 Δ^R /Umpgu1 und einer Co-Kultur der Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 während der Phase der Glukose (8h) und (Poly)GalA Verstoffwechslung (36 h). Propidiumiodid färbt die Nukleinsäuren toter Zellen, während vitale Zellen nicht penetriert werden. Die Fluoreszenz ist im GFP Kanal detektierbar. Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wird als Mittelwert von zwei biologischen Duplikaten dargestellt. Größenmarker repräsentiert 10 μ m. Die Kulturbedingungen entsprechen denen der RAMOS-Experimente in Abbildung 16 und Abbildung 17.

2.1.7 Pektinolytisches Potential co-kultivierter Überstände

Die Ergebnisse auf dem polymeren Substrat PolyGalA zeigten, dass durch die Kombination von Exo- und Endo- Polygalakturonasen eine effektive Hydrolyse erreicht werden kann. In einem weiteren Schritt sollte nun getestet werden, inwieweit dieses Potential auch auf das weitaus komplexere Substrat Pektin übertragbar ist. Endo und Exo-Polygalakturonasen sind hier für die Hydrolyse des HG zuständig, welches im Gegensatz zu kommerziell verfügbarem PolyGalA Methylierungen und Acetylierungen tragen kann. Wie hoch der Anteil an modifizierten GalA Resten ist, wird durch den Veresterungsgrad ausgedrückt (Ridley *et al.*, 2001; Ralet *et al.*, 2005). Im Vergleich zu anderen pektinolytischen Enzymen zeigen Polygalakturonasen eine geringe Aktivität auf hoch verestertem HG oder RG (Markovič und Janeček, 2001), was die Verwendung weiterer HG und RG modifizierender CAZymes erfordern könnte, um eine vollständige Hydrolyse zu erreichen. Wie auch in den *Offline*-Assays auf PolyGalA wurden zellfreie Überstände auf ihre pektinolytische Aktivität getestet und via DNA-Assay ausgewertet (Abbildung 19). Hierzu wurden 0,25 % Substratlösungen unterschiedlicher Pektine getestet, die sich in den GalA-Anteilen und dem Veresterungsgrad unterscheiden (Abbildung 7).

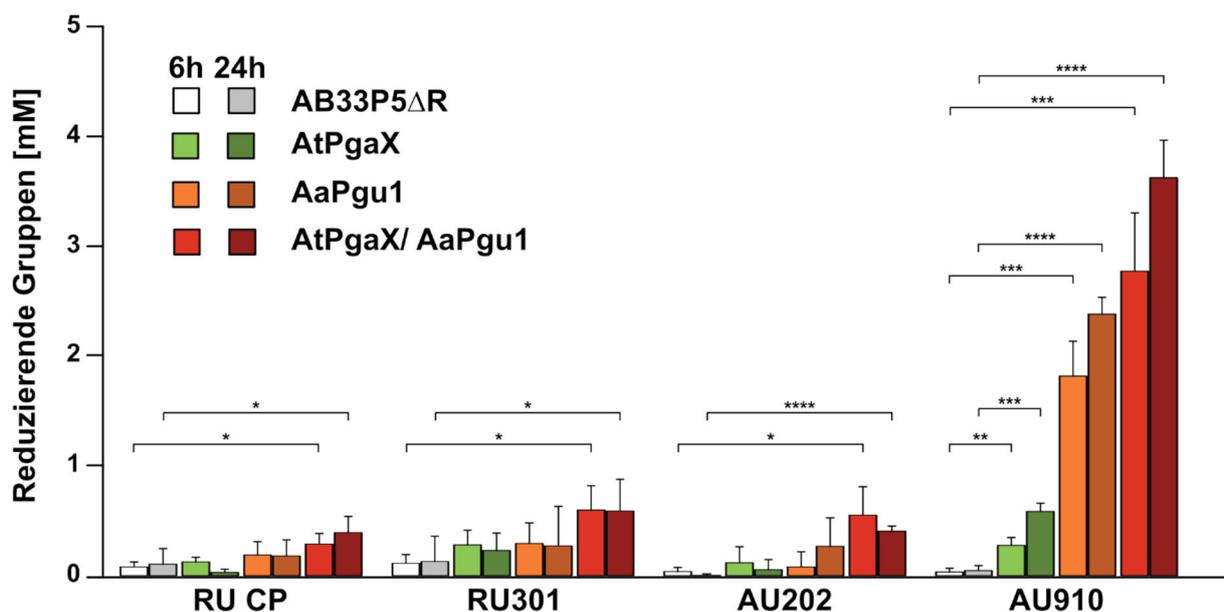


Abbildung 19: DNS-Assay der einzeln oder co-kultivierten CAZyme-produzierenden Stämme AB33P5 Δ ^R/AtPgaX und AB33P5 Δ ^R/AaPgu1. Die Kultivierung der Einzelvarianten wurde zwecks Inokulationsverhältnis in Co-Kultur mit dem Wildtyp AB33P5 Δ ^R durchgeführt. Die verwendeten Pektine unterschieden sich im Grad der Veresterung (VE). RU CP (VE 57%) und RU301 (VE 54%) Rübenpektin, AU202 (VE 68%) und AU910 (VE 4,8%) Apfelpektin (jeweils 0,25% Substratlösungen). Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei biologischen Replikaten. *, p-Wert < 0,05; ***, pWert < 0,001; **** pWert < 0,0001 (Zwei Stichproben t-Test). Nicht signifikante Ergebnisse werden nicht dargestellt.

Die Detektion der reduzierenden Gruppen zeigte eine geringe Freisetzung auf den Pektinen RU CP, RU301 und AU202, die Veresterungsgrade von 57%, 54 % und 68 % aufweisen, wobei zu beobachten war, dass die Überstände der co-kultivierten AtPgaX und AaPgu1 exprimierenden

Stämme auch hier in der Lage waren, höhere Mengen an reduzierenden Gruppen freizusetzen. Auf den Veresterungsgrad zurückzuführende Unterschiede sind zwischen diesen drei Pektinen sichtbar: So sind tendenziell höhere Werte an reduzierenden Gruppen für RU301 messbar, die Unterschiede allerdings statistisch nicht belegbar. Weitaus größere Mengen an reduzierenden Gruppen wurden auf dem lediglich zu 4,8% veresterten Apfelpektin AU910 freigesetzt. Die Einzelüberstände von den AtPgaX und AaPgu1 produzierenden Stämmen setzten hier nach 24 h bereits 0,5 mM und 2,5 mM reduzierender Gruppen frei, was sich für die co-kultivierten Stämme auf 3,5 mM nach 24 h steigerte. Ausgehend von einem Anteil von ca. 37% GalA im vorliegenden Pektin AU910 (Abbildung 7) entspricht das einem Anteil von 72% Hydrolyse des enthaltenen HG. Wie bei den Versuchen auf PolyGalA zeigte sich ein ähnliches Verhältnis der durch die Einzelenzyme freigesetzten reduzierenden Gruppen (Vergleiche AtPgaX und AaPgu1 Abbildung 14). Dieses abschließende Experiment zeigt, dass auch die Hydrolyse von niedrig verestertem HG mit dem integrierten Set an heterologen hydrolytischen Enzymen möglich ist. Eine umfassendere Hydrolyse von auch höher verestertem HG, bzw. den Seitenketten des RG erfordert dagegen den Einsatz weiterer CAZymes (Glass *et al.*, 2013).

2.2 Effektive Produktion von Ustilaginsäure in *Ustilago maydis*

Parallel zur Etablierung der Hydrolyse von Pektinbestandteilen wurde die Produktion des Glykolipids Ustilaginsäure durch *U. maydis* optimiert, um später ggf. einen effizienten zweistufigen Bioprozess daraus zu ermöglichen. Zunächst wurde deshalb ein Produktionsstamm hergestellt. Die Optimierung der Produktion schloss neben der Entkopplung der Produktion von der Stickstoffabhängigkeit auch die Erhöhung der produzierten Menge und die Reduzierung von Nebenprodukten mit ein, um die Isolierung und nachfolgende Aufreinigungsschritte zu erleichtern.

2.2.1 Etablierung einer großvolumigen Produktion von Ustilaginsäure

Zunächst wurde ein Produktionsprozess etabliert, in dem das Ziel war, vom Schüttelkolbenmaßstab hin zur Produktion im Laborfermenter zu gelangen. Um ähnliche Stammvoraussetzungen zu schaffen, wie im geplanten finalen Produktionsstamm, wurde der Stamm MB215/ Δ emt1_ua1 \uparrow (UMa1992) verwendet. Dieser Stamm basiert auf einer *emt1*-Deletionsmutante (Hewald *et al.*, 2006), in der, durch die Integration eines $P_{oma}:ua1_cbxR$ ($pUMa$ 2933) Konstruktes in den *ip*-Lokus, das Gencluster der Ustilaginsäuresynthese konstitutiv aktiviert wurde. Somit werden größere Mengen Ustilaginsäure, jedoch keine MELs produziert. Die Produktion der Ustilaginsäure geschah in Verduyn G Medium mit einer NH_4NO_3

Konzentration von 0,9 g/L und 5 g/L Glukose als C-Quelle. Anders als bei der Produktion im Kolben wurde die Hauptkultur nicht zur Produktion genutzt, sondern als Inokulum für den Fermentationsprozess verwendet.

2.2.1.1 Produktion durch Fermentation im Labormaßstab

Der Fermentationsprozess wurde in einem Infors™ Minifors Laborfermenter durchgeführt und über die firmeneigene Software IRIS überwacht und aufgezeichnet. Über den Kulturverlauf wurden zudem Proben von je 20 ml steril abgenommen, um eine Bestimmung der OD₆₀₀ durchzuführen und den Gehalt an produzierter Ustilaginsäure qualitativ zu bestimmen. Ein Problem in fermentativen Prozessen ist häufig starke Schaumbildung, die durch die Gabe von Schaumhemmern unterbunden wird (Anic *et al.*, 2018). Um die Aufreinigung der Ustilaginsäure aus der Fermentationsbrühe zu erleichtern, sollte zunächst auf den Einsatz von Schaumhemmern verzichtet werden. Dies hatte jedoch im Verlauf der Kultivierung zur Folge, dass der Abluftfilter aufgrund von Feuchtigkeit verstopfte und die Luftzufuhr zum Fermenter automatisch abgestellt wurde. Zum 12 h Punkt der Kultivierung wurde die Schaumbildung daher durch die Zugabe von drei Tropfen eines nicht synthetischen Schaumhemmers (*Antifaom 204*) unterbunden (Abbildung 20 A, gelber Pfeil) und die Begasung wieder aufgenommen, was in einer kurzen Erhöhung des gelösten Sauerstoffs resultierte (Abbildung 20 A, blaue Linie). Anhand der zweiten Beprobung der Kultur wurde über den Zeitraum von 12 h eine Erhöhung der OD₆₀₀ von 0,015 auf 0,13 gemessen. Die optische Dichte stieg im Verlauf der Kultivierung exponentiell auf eine finale OD₆₀₀ von 24,9 an (grüne Kreise). Während der pH-Wert über die gesamte Kultivierung ohne Adjustierung um den Wert von 6,5 konstant blieb (orange Linie), sank die Sauerstoffsättigung des Kulturmediums bei höheren Kulturdichten ab einer Kultivierungsdauer von 30 h stetig und wurde bei 38 h durch eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit von 750 upm auf 850 upm (schwarze gestrichelte Linie) bei einem Wert von ca. 75 % stabilisiert.

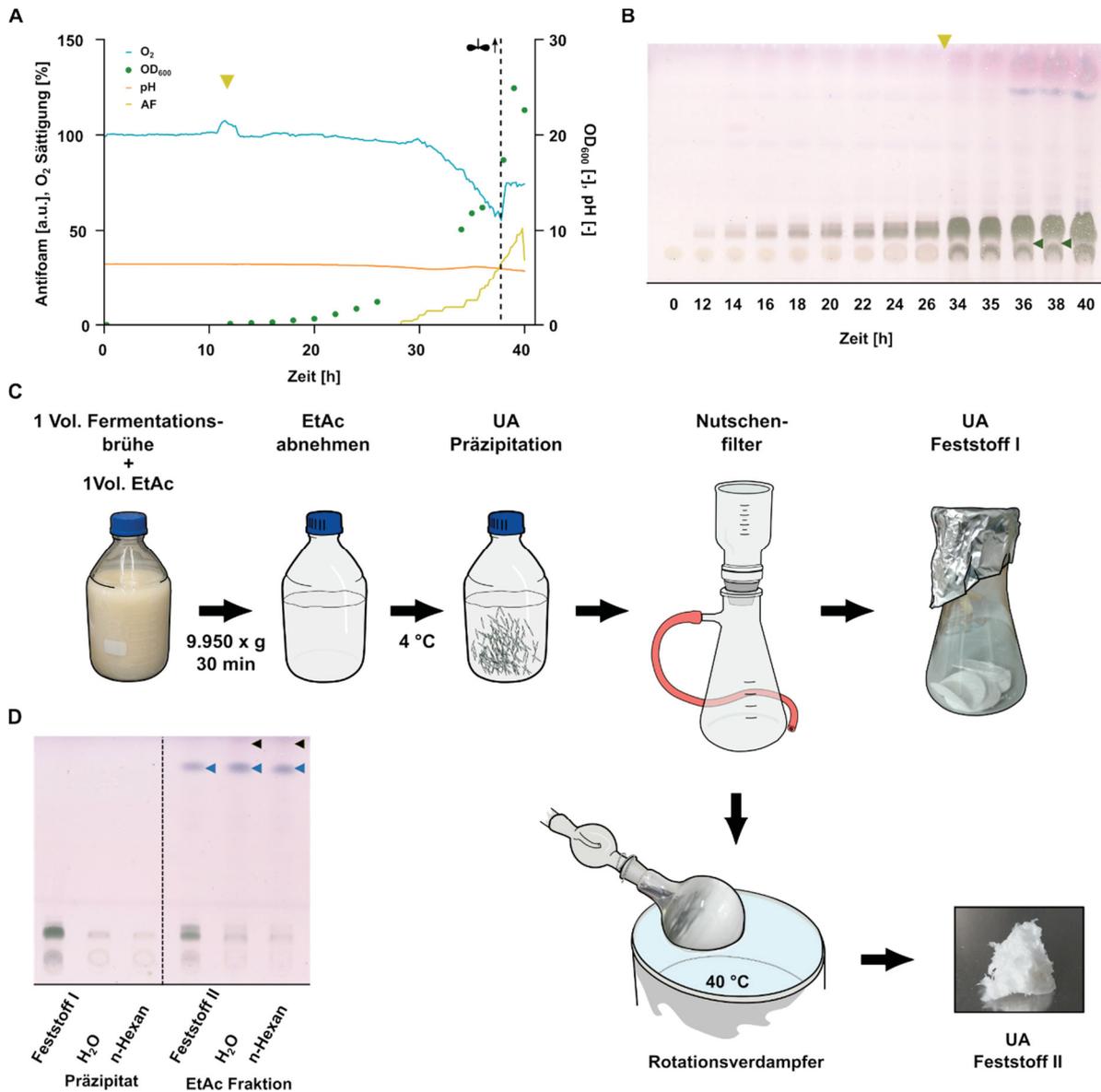


Abbildung 20: Produktion von Ustilaginsäure im Infors™ Minifors Laborfermenter. **A**, Fermentationsprofil des Stammes MB215Δemt1_rua1↑. Aufgrund der besseren Darstellung werden die Werte der Rührgeschwindigkeit und Temperatur nicht abgebildet. Letztere wurde über den gesamten Fermentationsprozess konstant bei 28 °C gehalten. Eine Korrektur des pH-Wertes (orange) wurde nicht vorgenommen. Die Sauerstoffsättigung wurde auf 100 % kalibriert (Blau) und sank ab 30 h auf 65 %. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 750 upm gehalten und ab 38 h auf 850 upm erhöht (Schwarz gestrichelte Markierung) Die OD₆₀₀ wurde über sterile Abnahme von Kulturbrühe ermittelt (Grün). Die Zugabe von Schaumhemmer (*Antifoam* 204) geschah manuell nach 12 h (gelber Pfeil) und automatisiert ab 27 h Kulturdauer (gelbe Linie). **B**, Dünnschichtchromatographie (DC) der Ustilaginsäureextrakte aus über den Fermentationsprozess gewonnenen Proben. Ein Äquivalent von 500 µl Kulturüberstand wurde aufgetragen. Vermehrtes Auftreten von Verunreinigungen (rötliche Wolken) ist nach Einsatz stärkerer Antifoam-Gaben (gelber Pfeil) ab 28 h Kultivierung sichtbar. In den letzten drei Proben sind weitere Verunreinigungen erkennbar (blauer Pfeil). Es wurden große Mengen an Ustilaginsäure gebildet. Die hydroxylierte, kurzkettenige Form war jedoch kaum zu erkennen (grüner Pfeil). **C**, Aufreinigungsstrategie der Ustilaginsäure (UA) aus großen Volumina durch Mischung der Kultur mit einem Volumen Ethylacetat (EtAc). Nach dem Trennen von wässriger und Lösemittelphase durch Zentrifugation wurde letztere auf 4 °C inkubiert. Ustilaginsäure fiel in Form von Kristallen aus, die über einen Nutschenfilter vom Ethylacetat getrennt werden konnten. Die restliche Ustilaginsäure wurde über einen Rotationsverdampfer unter Erhitzen auf 40 °C im Wasserbad vom Ethylacetat getrennt und in einem kleinen Volumen MeOH aufgenommen. **D**, 50 mg Mengen an kristallinem Präzipitat und Feststoff der Ethylacetat-Fraktion wurden zweimal mit 500 µl H₂O und einmal mit 500 µl n-Hexan gewaschen, unter N₂-Begasung getrocknet und in 15 µl MeOH aufgenommen. Die Waschfraktionen wurden abgenommen und gleichbehandelt. Die Waschfraktionen und das gewaschene Präzipitat zeigen keine Nebenprodukte oder detektierbare Verunreinigungen (links). Die Ethylacetat-Fraktion weist auch nach drei Waschschritten die Verunreinigungen durch zellinterne Lipide auf. Die mutmaßliche Verunreinigung durch Schaumhemmer (schwarze Pfeile) konnte reduziert werden. Die DC-Proben wurden in einem zwei Puffer System aufgetrennt (1 x 5 min Puffer I: 65:25:4 Chloroform: MeOH: H₂O; 2 x 17 min Puffer II: 90:10 Chloroform: MeOH). Detektionslösung (50:1:0,5 Eisessig: Schwefelsäure: p-Anisaldehyd).

Zu diesem Zeitpunkt wurde, automatisiert durch die Kreislaufschließung der Schaumsonde, bereits regelmäßig Schaumhemmer zur Kulturbrühe hinzugefügt (Abbildung 20 A, gelbe Linie). Die Analyse via Dünnschichtchromatographie (DC) der gewonnenen Proben zeigte, dass die Menge an Ustilaginsäure stetig zunahm und entsprechend des Stammhintergrunds keine MELs produziert wurden (Abbildung 20 B). Die Unterscheidung der einzelnen Ustilaginsäurevarianten fiel aufgrund der produzierten Mengen schwer, vor allem die Bildung der hydroxylierten C₈-Form, die auf der DC zwischen der hydroxylierten C₆-Form und der nicht hydroxylierten C₆-Form detektiert wird, war kaum erkennbar (grüne Pfeile). Die vermehrte Gabe von Schaumhemmer korrelierte mit der zunehmenden Bildung einer Verunreinigung nahe der Lauffront ab dem 34 h Messpunkt (rötliche Wolken). Ebenfalls erkennbar war die Bildung einer blauen Bande (blauer Pfeil), die in dieser Arbeit in Ustilaginsäureisolaten fortgeschrittener Kulturen häufig beobachtet wurden. Nach einer Dauer von 40 h wurde die Kultivierung beendet und die Fermentationsbrühe zwecks Isolierung der Ustilaginsäure abgepumpt. Das Isolat der letzten Probenahme bei 40 h Kulturdauer wurde auf eine Menge 0,072 g bestimmt, was einer Rohextrakt-Konzentration von 3,6 g/L zur Erntezeit entspricht.

Die Isolierung wurde über die Vermischung der Kulturbrühe mit einem Volumen Ethylacetat (Hewald *et al.*, 2005) und anschließender Fällung der Ustilaginsäure bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt und lieferte ein weißes kristallines Produkt, was über einen Nutschenfilter vom Rest des Lösemittels abgetrennt werden konnte (Abbildung 20 C, UA Feststoff I). Die Fällung bei niedrigen Temperaturen war eine Abwandlung der von Haskins *et al.* (1951) verwendeten Methode, bei der eine Mischung aus Ustilaginsäure und MELs aus einem Wasser, Ether, Methanol-Gemisch (3:2:1) bei 0 °C gefällt wurde. Der Durchfluss wurde, um nicht ausgefallene Ustilaginsäure zu ernten, im Rotationsverdampfer eingetrocknet. Das Isolat, welches nach der Evaporation zurückblieb, zeigte sich unerwarteterweise als weicher, glänzender Feststoff, was ein Zeichen für die Verunreinigung mit Schaumhemmer sein kann (Abbildung 20 C, UA Feststoff II). Diese Verunreinigung hatte zwar keinen Einfluss auf das Laufverhalten der Ustilaginsäure in der DC-Analyse, ist jedoch im finalen Produkt unerwünscht. Mengen von 50 mg der Feststoffe wurden daher mit H₂O und n-Hexan gewaschen, um die Verunreinigung zu entfernen. Es zeigte sich, dass die potentielle *Antifoam* 204 Verunreinigung in den Proben des Feststoffes II reduziert werden konnte (Abbildung 20 D, rechts), während die Waschschriffe zu keinem großen Verlust an Ustilaginsäure in beiden Proben führten. Die DC-Analyse des Feststoff I zeigte keine Rückstände von Verunreinigungen (Abbildung 20 D, links). Insgesamt konnten 2,47 g präzipitierte Ustilaginsäure höherer Reinheit (Feststoff I) und 2,44 g Ustilaginsäure geringerer Reinheit (Feststoff II) aus der Fermentationsbrühe isoliert werden. Die Produktion im labortechnischen Maßstab zeigt somit eine gute Anwendbarkeit, um größere Mengen Ustilaginsäure herzustellen. Die Fällung der Ustilaginsäure stellt eine einfache Methode dar, reines Produkt zu erhalten und kann während des Filterns mit weiteren Reinigungsschritten gekoppelt werden. Die Reinheit der

verbliebenen Ustilaginsäure im Ethylacetatdurchfluss könnte durch weitere Anpassungen des Schaummanagements optimiert werden.

2.2.2 Entwicklung eines Ustilaginsäure Produktionsstammes

Frühere Studien zeigten, dass eine konstitutive Expression des *rua1* Gens, welches das Ustilaginsäure-Biosynthesecuster reguliert, unter der Verwendung des P_{otef} Promotors in einer dauerhaften Aktivierung des Ustilaginsäure-Synthesecusters resultiert (Teichmann *et al.*, 2010). Diese konstitutive Aktivierung konnte auch mit dem sehr starken P_{oma} -Promotor erzielt werden, um eine stickstoffunabhängige, hohe Produktion an Ustilaginsäure zu erreichen (Rodríguez Estévez, 2016). Dieses System, in dem das $P_{oma:rua1}$ -HA Konstrukt im *ip*-Lokus integriert wird, wurde für den Produktionsstamm in dieser Arbeit verwendet.

2.2.2.1 Herstellung eines Produktionsstammes für reine Ustilaginsäure

Die Herstellung eines Ustilaginsäure-Produktionsstammes sollte von einem, sowohl Ustilaginsäure, als auch MELs-defizienten, MB215 Stamm ausgehen, der im Folgeschritt durch die Integration eines $P_{oma:rua1}$ Expressionskonstrukts zu einem konstitutiven Produzenten von Ustilaginsäure komplementiert werden sollte. Da sowohl die Manipulation des Ustilaginsäure-, als auch des MEL-Clusters bereits je eine von fünf möglichen Resistenzkassetten blockieren würde und spätere Restriktionen nach sich ziehen könnte, wurde im ersten Schritt die Inaktivierung des *rua1* Gens durch die Methode von *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*, bzw. RNA-geleiteten Cas9 Nukleasen (CRISPR/Cas9) vorgenommen. Die Methode basiert auf der transienten Transformation eines selbst replizierenden Plasmids, welches eine unter P_{otef} konstitutiv exprimierte, dikodonoptimierte Cas9 Endonuklease und eine unter dem intrinsischen U6 Promotor exprimierte sgRNA beinhaltet (Schuster *et al.*, 2016). Das hier verwendete Plasmid pCas9-*rua1*-cbx (Tabelle 9) wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Michael Bölker zur Verfügung gestellt. Die markerfreie Inaktivierung der *rua1* Sequenz ist in Abbildung 21 dargestellt. Auf die erfolgreiche Integration des Plasmids pCas9-*rua1*-cbx selektierte Klone exprimieren die sgRNA. Die Zielsequenz (Abbildung 21 B) innerhalb der sgRNA ermöglicht den zielgenauen Doppelstrangbruch durch die Cas9 Endonuklease, welcher zwischen dem PAM-Motiv GGN und dem 3'-Ende der Zielsequenz durchgeführt wird.

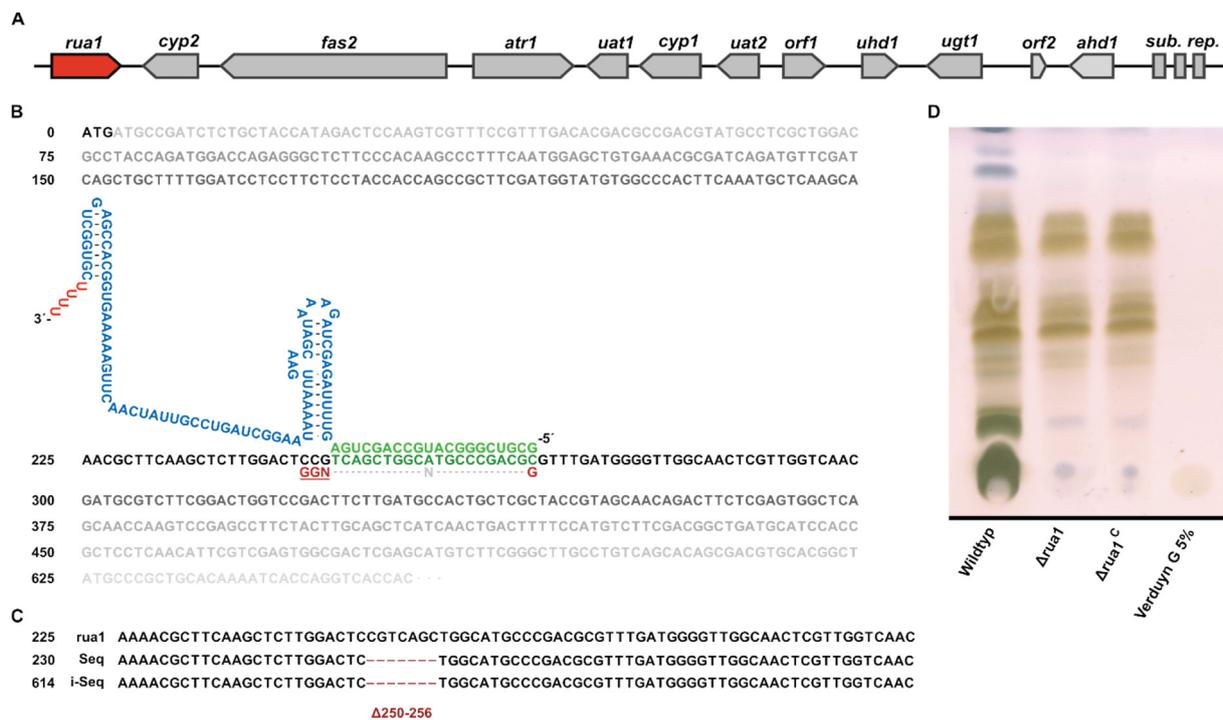


Abbildung 21: Marker-freie Deletion des Transkriptionsfaktors *rua1* durch CRISPR-Cas9. **A**, Schematische Darstellung des für die Produktion von Ustilaginsäure verantwortlichen Genclusters. Das Produkt des ersten offenen Leserahmens des Clusters, Rua1 (Gen in rot) reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression der stromabwärts befindlichen Gene für die Biosynthese. **B**, Darstellung der Deletion des offenen Leserahmens des Transkriptionsfaktors *rua1* auf Sequenzebene. Cas9 führt einen Doppelstrangbruch an der durch die sgDNA definierten Erkennungssequenz des offenen Leserahmens von *rua1* durch. Die Stelle des Doppelstrangbruchs wird durch die Zielsequenz (grün) definiert und zwischen dem PAM Motiv GGN (rot unterstrichen) und den 3'-Ende der Zielsequenz durchgeführt. Mögliche Zielsequenzen sind durch das genomische Sequenzmotiv GN20GG definiert (Mali *et al.*, 2013). **C**, Sequenzierungsergebnis des positiv auf die *rua1* Inaktivierung getesteten Stamms MB215/ Δ *rua1*^C gegenüber der Sequenz des Vorläuferstamms MB215. Die Sequenzierung zeigte eine Deletion von sieben Nukleotiden (rot) und einer daraus resultierenden Verschiebung des Leserasters. **D**, Analyse der isolierten Glykolipide der *rua1* Deletion mittels Cas9 (*rua1*^C) im Vergleich zu einem *rua1* Deletionsstamm hergestellt mittels homologer Rekombination (Δ *rua1*) (AG Bölker) und dem Vorläuferstamm MB215. Beide Mutanten zeigen die im Wildtyp vorhandenen Banden für MELs (gelblich), Ustilaginsäure ist in beiden Stämmen nicht detektierbar. Ein Isolat von Verduyn G Kulturmedium wurde als Negativkontrolle gleichbehandelt und mit aufgetragen. Keine Ustilaginsäure oder MEL Banden waren detektierbar. Die Isolierung der Glykolipide wurde nach 35 h Kultivierung in Verduyn G Kulturmedium in einem Volumen Ethylacetat durchgeführt. Es wurde ein Äquivalent von 500 μ l Kulturmedium aufgetragen und die Proben in einem Zwei-Puffer System aufgetrennt (1 x 5 min Puffer I: 65:25:4 Chloroform: MeOH: H₂O; 2 x 17 min Puffer II: 90:10 Chloroform: MeOH). Detektionslösung (50:1:0,5 Eisessig: Schwefelsäure: p-Anisaldehyd).

Die Bindung von Cas9 und sgRNA wird durch die in blau dargestellte Sekundärstruktur der sgRNA ermöglicht (Mali *et al.*, 2013). Die Evaluation der Ergebnisse geschah nach der Eliminierung des transienten Plasmids pCas9-*rua1*-cbx durch wiederholte Passage der transformierten Klone in CM-Glc Medium ohne Selektionsdruck und anschließender Isolierung der gDNA. Durch PCR wurde der vermeintlich durch Cas9 veränderte Bereich amplifiziert und nachfolgend sequenziert. So wurde an Position 250-256 eine Deletion von 7 Nukleotiden festgestellt (Abbildung 21 C), die durch eine Leserahmenverschiebung ein vorzeitiges Stoppcodon einführt und in einer 107 Aminosäuren langen, trunkeierten Version von Rua1 resultiert. Die DC-Analyse einer Kultur des resultierenden Stammes MB215/ Δ *rua1*^C bestätigte die Inaktivierung und zeigte, ebenso wie der zuvor genutzte herkömmliche *rua1* Deletionsstamm (AG Prof. Dr. Michael Bölker; Teichmann *et al.*, 2010) keine Produktion von Ustilaginsäure (Abbildung

21 D). Die Produktion von MELs unter stickstofflimitierten Bedingungen wurde durch die Deletion nicht beeinträchtigt und ist mit der Produktion im MB215 Stammhintergrund vergleichbar.

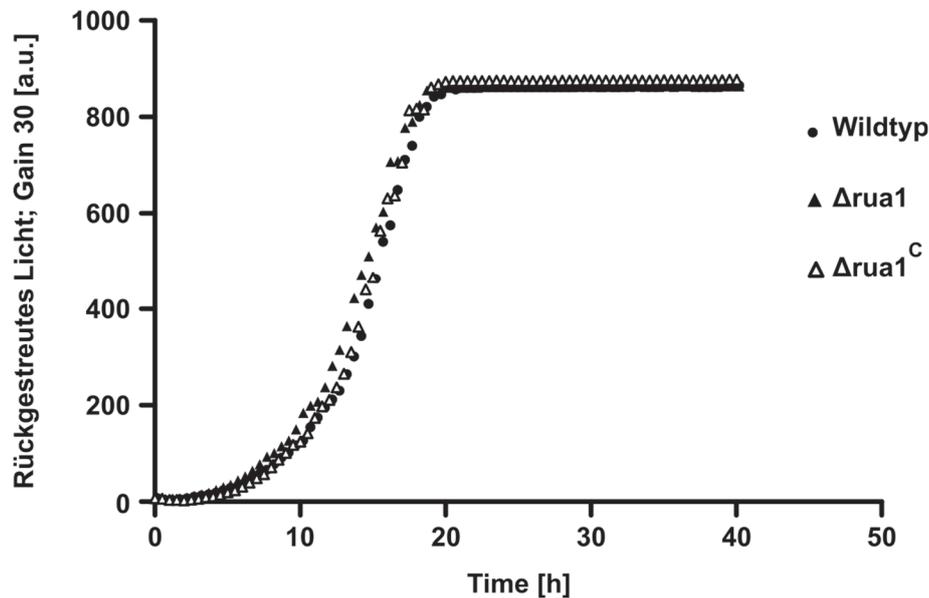


Abbildung 22: Wachstumsvergleich der MB215 *rua1* Deletionsvarianten mit dem Vorläuferstamm. Die Inaktivierung durch die entstandene Trunkierung von *rua1* ($\Delta ru a 1^C$) hat keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum im Vergleich zur klassischen *rua1* Deletion durch das Einfügen einer Selektionskassette ($\Delta ru a 1$) oder dem Wildtyp. Die Graphen zeigen den Mittelwert von zwei technischen Replikaten einer repräsentativen Wachstumsanalyse in Verduyn G Kulturmedium. Die Wachstumskurven wurden im BioLector Kultivierungssystem unter den in 5.2.4 beschriebenen Parametern durchgeführt.

Verglichen mit MB215/ $\Delta ru a 1$, in dem die kodierende Sequenz von *rua1* durch eine Hygromycin Resistenzkassette ausgetauscht wurde, und dem Wildtypstamm MB215 zeigte sich zudem keine Wachstumsbeeinträchtigung durch die trunkierte Version von Rua1 im Stamm MB215/ $\Delta ru a 1^C$ (Abbildung 22).

Ausgehend von der erfolgreichen Inaktivierung der *rua1* Expression im Stamm MB215/ $\Delta ru a 1^C$ wurden die weiteren benötigten Deletionen schrittweise durchgeführt (Abbildung 23 A). Zunächst wurde die Produktion von Itakonsäure eliminiert. Ähnlich dem Biosynthesecoluster von Ustilaginsäure, sind auch die für die Itakonsäuresynthese benötigten Gene in einem Cluster organisiert und reguliert durch den Transkriptionsfaktor Ria1 (*regulator of Itakonic acid production*). Ohne Ria1 bleibt eine Expression der Gene des Clusters sowie die Produktion von Itakonsäure aus (Geiser *et al.*, 2016). Da Itakonsäure durch *U. maydis* in hohen Konzentrationen sekretiert wird (Guevarra und Tabuchi, 1990; Geiser *et al.*, 2018), ist die Deletion des *ria1* Gens ein Versuch, eine unnötige Energiesenke im finalen Bioprozess zu eliminieren. Die Deletion der für Ria1 kodierenden Sequenz wurde durch homologe, flankierende Bereiche stromaufwärts (UF) und stromabwärts (DF) und dadurch vermittelte homologe Rekombination des Integrationskonstrukts erreicht. Die integrierte Gentamycin (G418) Resistenzkassette (Abbildung 23 B $\Delta ria 1$, gepunktet dargestellt) ermöglichte die Selektion der positiven Klone. Die Auswertung

der DC von entsprechenden Kulturen (Abbildung 23 C) zeigte keine Änderung des Glykolipidprofils des Stammes MB215/ Δ rua1^C/ Δ ria1 im Vergleich zum Vorläuferstamm MB21/ Δ rua1^C. HPLC Analysen des Überstandes, die durch die AG von Prof. Nick Wierckx durchgeführt wurden, zeigten jedoch eine fehlende Itakonsäure Produktion im Stamm MB215/ Δ rua1^C/ Δ ria1 verglichen mit dem MB215 Wildtypstamm (Tabelle 16). Von einer erfolgreichen Deletion des *ria1* Gens konnte also ausgegangen werden. Die im nächsten Schritt folgende Deletion der Erythritol-Mannosyl Transferase *emt1* im MELs-Biosyntheseweg resultierte in einem MEL-defizienten Stamm, der nun keine der natürlich durch *U. maydis* sekretierten Glykolipide mehr produzierte (Abbildung 23 C). Wie auch bei der *ria1* Deletion wurde das Zielgen durch die Nutzung von homologen Sequenzflanken durch eine Resistenzkassette ersetzt. Die hier verwendete Hygromycin Resistenzkassette wird durch Erkennungssequenzen für das FLP-FRT System flankiert (Abbildung 23 B, Δ emt1, orange), die ein späteres Recycling der Resistenzkassette durch sequenzspezifische Rekombination ermöglicht (Khrunyk *et al.*, 2010).

Die Produktion von Ustilaginsäure ist unter Wildtypbedingungen an die Limitierung von Stickstoff gebunden (Hewald *et al.*, 2005) und die Entkopplung der Produktion von dieser Limitierung stellt eine große Flexibilität in Hinsicht auf das Kulturmedium und die finale Ausbeute an Ustilaginsäure dar. Der aus der *emt1* Deletion resultierende Stamm (MB215/3x Δ) wurde daher im Folgenden durch die Integration des P_{oma}:rua1-HA Konstruktes in den *ip*-Lokus in seiner Fähigkeit, Ustilaginsäure konstitutiv zu produzieren, komplementiert (Rodríguez Estévez, 2016). Die erfolgreiche Integration ermöglichte den positiven Klonen das Wachsen auf Carboxin-haltigem Selektionsmedium und wurde über Southern Blot Analysen bestätigt. Isolate von Glykolipiden aus Vollkultur zeigten im DC-Profil eine wiederhergestellte Produktion an Ustilaginsäure, die verglichen mit dem auf gleiche Weise kultivierten Wildtypstamm höhere Mengen und eine Verschiebung des Ustilaginsäure-Variantenverhältnisses zeigt (Abbildung 23 B, 3x Δ _rua1 \uparrow , grüne Pfeile). Die anschließend durchgeführte Regeneration des Hygromycin Resistenzmarkers hatte keinen Einfluss auf die produzierte Ustilaginsäure-Menge. Der Stamm MB215/3x Δ _rua1 \uparrow ^R trägt somit eine G418 Resistenzkassette und eine Carboxinresistenz. Durch das Recycling der Hygromycin Resistenzkassette über das FLP-FRT System bleibt eine FRT1 Erkennungssequenz zurück (Abbildung 23 A Δ emt1^R, Orange), während der dazwischen liegende Sequenzbereich durch Rekombination entfernt wurde.

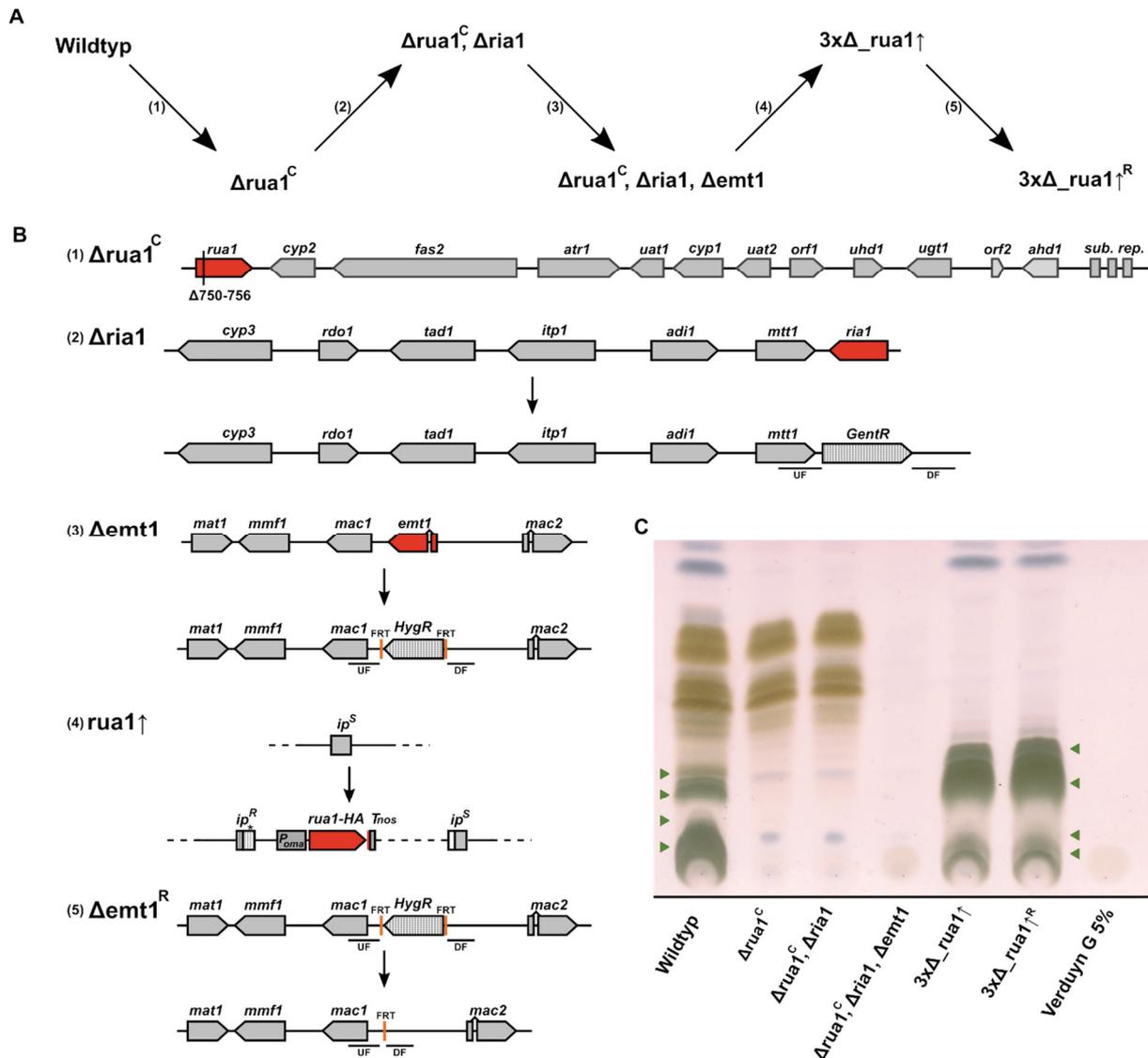


Abbildung 23: Übersicht der Stammerstellungsschritte für die erhöhte, stickstoffunabhängige Produktion von Ustilaginsäure. **A**, Fließschema der Stammerstellung vom MB215 Wildtypstamm zum Produktionsstamm MB215/3xΔ_rua1^{↑R}. Zahlen in Klammern verweisen auf die entsprechenden Detaildarstellungen. **B**, Schematische Darstellung der schrittweise durchgeführten Synthesewegmanipulationen ausgehend von der Cas9 eingefügten Deletion von *rua1* bis hin zur Regeneration der Hygromycin Resistenzkassette im Stamm MB215/3xΔ_rua1^{↑R}. Gezeigt werden die Deletion des Transkriptionsfaktors *ria1* durch Integration eines Gentamycin- und die Deletion von *emt1* durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette. Die homologen Regionen für die Integrierung der Resistenzkassetten sind durch UF und DF gekennzeichnet. Nach erfolgreicher Integration der P_{oma}:*rua1*-HA Konstruktes im *ip*-Lokus wurde die Hygromycin Resistenzkassette durch Verwendung des FLP-FRT Systems regeneriert. Hierzu benötigte FRT-Erkennungssequenzen sind in orange dargestellt. **C**, DC von Glykolipidisolaten der MB215 Derivate bis zum Ustilaginsäure-Produktionsstamm MB215/3xΔ_rua1^{↑R}. Nach der Deletion des Transkriptionsfaktors *rua1* ändert die Deletion des Transkriptionsfaktors *ria1* nichts am Glykolipidprofil. Die zusätzliche Deletion vom *emt1* im Stamm MB215/Δrua1^C, Δria1, Δemt1 führt im nächsten Schritt zum vollständigen Stopp der Glykolipidproduktion. Die Komplementierung dieses 3-fachen Deletionsstamms mit P_{oma}:*rua1* im *ip*-Lokus stellt die Fähigkeit der Ustilaginsäureproduktion wieder her. Im letzten Schritt wurde die Hygromycin Selektionskassette der *emt1* Deletion durch Nutzung des Flippase-Systems recycled. Grüne Pfeile markieren die vier natürlich auftretenden Ustilaginsäurevarianten. Die Isolierung der Glykolipide wurde nach 35 h Kultivierung in Verdunyn G Kulturmedium in einem Volumen Ethylacetat durchgeführt. Es wurde ein Äquivalent von 500 μl Kulturmedium aufgetragen und die Proben in einem Zwei-Puffer System aufgetrennt (1 x 5 min Puffer I: 65:25:4 Chloroform: MeOH: H₂O; 2 x 17 min Puffer II: 90:10 Chloroform: MeOH). Detektionslösung (50:1:0,5 Eisessig: Schwefelsäure: p-Anisaldehyd).

2.2.3 Charakterisierung des Produktionsstammes auf stickstoffunabhängige Ustilaginsäureproduktion

Um die Stickstoffentkopplung des Stammes MB215/3xΔ_rua1↑ zu überprüfen und eine optimale Stickstoffkonzentration im Kulturmedium festzustellen, wurden die Stämme MB215, MB215/Δrua1^c, MB215/Δrua1^c_rua1↑ und der Produktionsstamm MB215/3xΔ_rua1↑ vergleichend in Verduyn G modifiziert durch verschiedene NH₄NO₃ Konzentrationen (0-3,6 g/L) im BioLector-System kultiviert. Für jeden Stamm wurden vier Replikate auf eine Start OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 28°C bei 1000 upm für 48 h inkubiert. Die Glykolipide zum Startzeitpunkt wurden aus der initialen Inokulationsmischung isoliert, alle weiteren Messpunkte wurden durch das Einstechen der Abdeckungsmembran und der Isolierung der Glykolipide aus der entnommenen Probe ermittelt. Die gemessenen Wachstumskurven stellen den Mittelwert von zwei bis zum 48 h Punkt inkubierten Kulturen dar. Die Kultivierung in modifiziertem Verduyn G ohne Stickstoffquelle zeigte in den nicht entkoppelten Stämmen keine maßgebliche Produktion von Glykolipiden (Abbildung 24 A). Die Bildung der Biomasse blieb auf niedrigem Niveau und erst der 48 h Messpunkt zeigte ein leichtes Signal für Ustilaginsäure im Wildtyp. Die von Stickstofflimitierung entkoppelten Stämme MB215/Δrua1^c_rua1↑ und MB215/3xΔ_rua1↑ bildeten Glykolipide ab dem 12 h Messpunkt, doch auch das für diese Stämme überwachte Wachstum blieb gering. Die Kultivierung in Verduyn G supplementiert mit 0,225 g/L NH₄NO₃ (Abbildung 24 B) zeigte für alle kultivierten Stämme ein erwartetes Wachstumsverhalten. Erkennbar ist, dass die entkoppelten Stämme eine längere Verdopplungszeit aufweisen, als die Stämme ohne P_{oma:rua1}-HA Konstrukt. Signale für die Ustilaginsäureproduktion in diesen Stämmen waren bereits nach 12 Stunden messbar, während die auf Stickstofflimitation basierte Produktion von Ustilaginsäure im Wildtyp erst nach 36 h detektiert wurde. Die Produktion von MELs konnte bereits nach 24 h nachgewiesen werden. Kultivierungen mit 0,45 g/L und 0,9 g/L NH₄NO₃ zeigten steigende Mengen an produzierter Ustilaginsäure in den entkoppelten Stämmen mit zunehmender Stickstoffmenge (Abbildung 24 C, D), während die nicht entkoppelten Stämme verringerte Mengen an MELs und der Wildtyp lediglich Spuren von Ustilaginsäure bei den 36 h und 48 h Messpunkten des 0,45 g/L NH₄NO₃ Verduyn G zeigten. Die Wachstumsprofile aller Stämme wiesen zwischen den Varianten keine deutlichen Unterschiede auf, jedoch war für MB215/Δrua1^c_rua1↑ eine langsamere Verdopplungszeit verglichen zu den Messungen 0 g/L und 0,225 g/L NH₄NO₃ erkennbar.

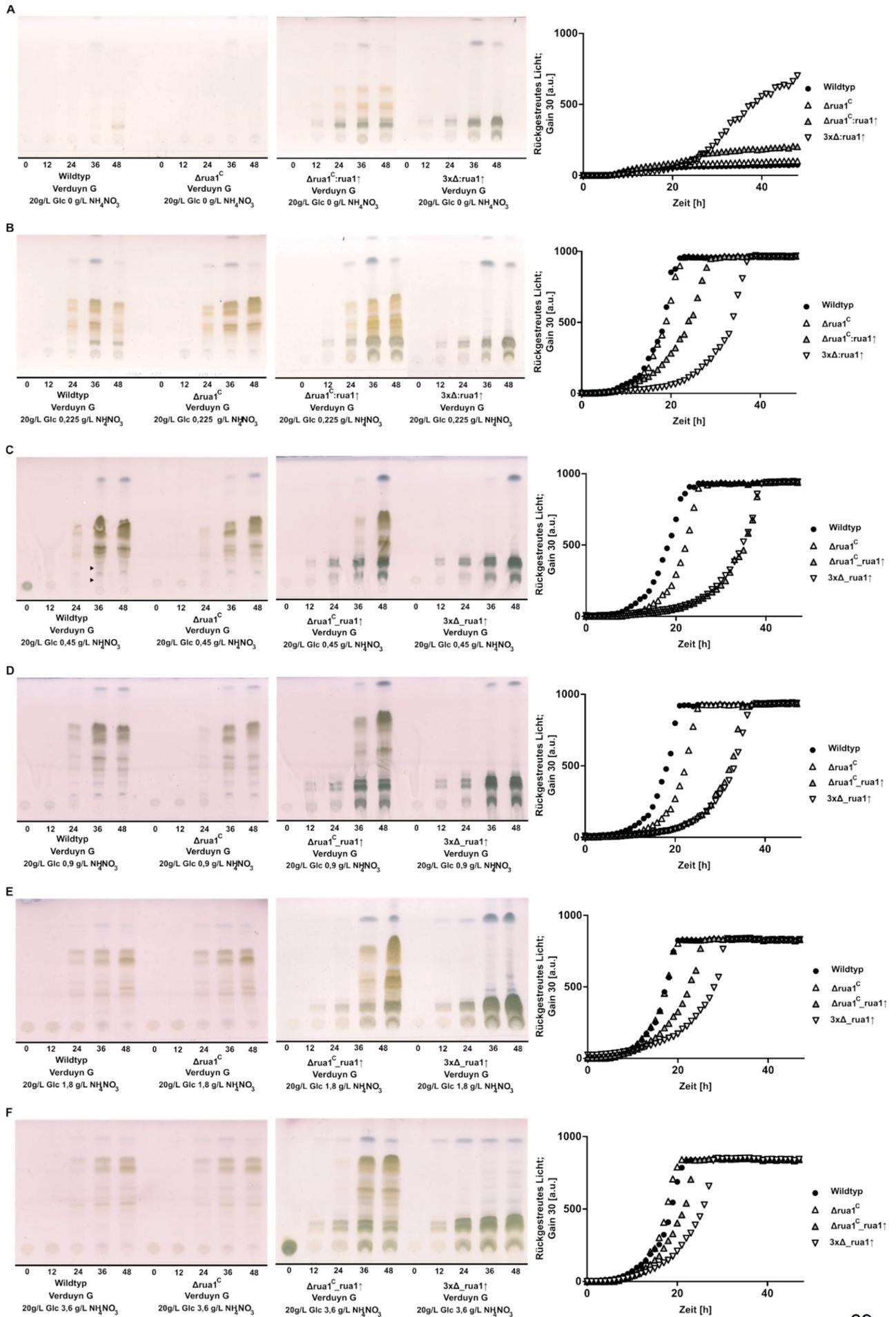


Abbildung 24: Stickstofflimitierungsstudien im BioLector System. In einer 48-Well Kultivierungsplatte wurden je fünf Wells mit einem der vier untersuchten Stämme MB215, MB215/ Δ rua1^C, MB215/rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow , in Verduyn G modifiziert durch verschiedene NH₄NO₃ Konzentrationen (0-3,6 g/L) auf eine OD 600 von 0,1 in einem Volumen von 1,5 ml inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und einer Schüttelfrequenz von 1000 upm. Die gezeigten Kurvenverläufe stellen die Messung des rückgestreuten Lichtes (arbiträre Einheit) bei einem Gain von 30 dar. Gezeigt sind die Mittelwerte zweier Kultivierungen, die bis zum 48 h Erntepunkt inkubiert wurden. Das 500 μ l Isolat der 0 h Probe wurden direkt aus dem Inokulationsansatz entnommen. Die restlichen Proben wurden zu angegebenen Erntezeitpunkten durch Punktierung der Schutzmembran entnommen. Die punktierten Wells (12 h, 24 h, 36 h) wurden für die Auswertung der Wachstumskurve nicht berücksichtigt. Geerntete Proben wurden mit einem Volumen Ethylacetat gemischt und die Glykolipid-haltige Ethylacetat-Phase isoliert, evaporiert und aufgenommen in 15 μ l Methanol auf die DC-Platte aufgetragen. Die Proben in einem Zwei-Puffer System aufgetrennt (1 x 5 min Puffer I: 65:25:4 Chloroform: MeOH: H₂O; 2 x 17 min Puffer II: 90:10 Chloroform: MeOH). Detektionslösung (50:1:0,5 Eisessig: Schwefelsäure: p-Anisaldehyd). **A**, Wachstum auf Verduyn G ohne Stickstoffquelle. Der Wildtypstamm MB215 produzierte bis zu 36 h keine messbare Menge Ustilaginsäure. Erst mit zunehmender Dichte der Kultur wurde bei der 48 h Probe eine kleine Menge Ustilaginsäure detektiert, während im Stamm MB215/ Δ rua1^C über den gesamten Kulturzeitraum keine Glykolipide produziert wurden. Die entkoppelten Stämme MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow zeigten bereits ab dem 12 h Erntepunkt messbare Mengen an Ustilaginsäure und produzieren im Verlauf der Kultivierung weiter. MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow zeigte ebenfalls MEL Produktion ab 24 h Kultivierung. Der Kultivierungsverlauf (rechts) zeigte starke Wachstumslimitierung in allen Stämmen, wobei für MB215/3x Δ _rua1 \uparrow nach 24 h leichtes Wachstum sichtbar war. **B**, Kultivierung in Verduyn G mit 0,225 g/L NH₄NO₃. Die Stämme zeigten ein normales Wachstumsprofil über den Kulturzeitraum. MB215 produzierte nachweisbare Mengen an Glykolipiden nach 24 h, ebenso verhielt sich die MEL Produktion in MB215/ Δ rua1^C. MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow zeigten einen langsameren Anstieg der Kulturdichte, produzierten jedoch Ustilaginsäure nachweislich ab 12 h Kultivierung. In MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow ist die MEL Produktion ist höher als in Verduyn G ohne N-Quelle. **C**, Glykolipidproduktion in Verduyn G mit 0,45 g/L NH₄NO₃ Im Vergleich zum KO-Stamm MB215/ Δ rua1^C wies der Wildtyp leichte Produktion von Ustilaginsäure bei 36 h Kultivierungsdauer auf, die zum 48 h Punkt wieder abnahm (Pfeil). Die Produktion von MELs war für diese Stämme vergleichbar zum 0,225 g/L NH₄NO₃ Ansatz. MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow zeigte geringere Produktion von MELs bei leicht verringerter Produktion von Ustilaginsäure und leicht geringerer Wachstumsgeschwindigkeit. MB215/3x Δ _rua1 \uparrow produzierte etwas mehr Ustilaginsäure bei ähnlicher Wachstumsgeschwindigkeit. **D**, Kultivierung mit 0,9 g/L NH₄NO₃. Keine Produktion von Ustilaginsäure im Wildtypstamm oder MB215/ Δ rua1^C. Die detektierbaren Mengen an MELs nahmen nach einem Maximum bei 36 h zum 48 h Punkt wieder ab. Die Ustilaginsäure Produktion der entkoppelten Stämme startete früher indiziert durch die leicht erhöhten Mengen zum 12 h Messpunkt. **E**, Kultivierung in Verduyn G mit 1,8 g/L NH₄NO₃. Keine Produktion von Ustilaginsäure in MB215 und MB215/ Δ rua1^C bei leichter Produktion von MELs. Erhöhte Produktion von Ustilaginsäure in den Stämmen MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow . Die erhöhten N-Konzentrationen bewirkten eine beschleunigte Erhöhung der Kulturdichte und das frühere Erreichen der Stationären Phase, vor allem sichtbar für die Stämme MB215/ Δ rua1^C, MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow . **F**, Kultivierung in Verduyn G mit 3,6 g/L NH₄NO₃. Keine Produktion von Ustilaginsäure in MB215 und MB215/ Δ rua1^C bei leichter Produktion von MELs. Erhöhte Produktion von Ustilaginsäure in den Stämmen MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow . Die erhöhten N-Konzentrationen bewirkten eine weitere Beschleunigung der Erhöhung der Kulturdichte und dem Erreichen der Stationären Phase.

Wurden die Kulturen in Verduyn G mit 1,8 g/L oder 3,6 g/L Stickstoffquelle kultiviert (Abbildung 24 E, F), produzierten die nicht entkoppelten Stämme keine Ustilaginsäure und auch die Produktion der MELs nahm mit steigender Stickstoffkonzentration weiter ab. Im Kontrast dazu war die Menge der reduzierten Ustilaginsäure in den entkoppelten Stämmen stark erhöht. In diesen Messungen wurde deutlich, dass die Erhöhung der Stickstoffkonzentration in den Kulturen in einer ausbleibenden Induktion der Ustilaginsäureproduktion resultierte, entkoppelte Stämme aber hohe Mengen an Ustilaginsäure produzierten. Daher kann von einer erfolgreichen Entkopplung der Ustilaginsäureproduktion von der Stickstofflimitierung ausgegangen werden. Weiterhin wurde deutlich, dass auch die Bildung von MELs im Stamm MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow im Vergleich zu MB215/ Δ rua1^C erhöht ist, was auf einen bislang nicht bekannten Zusammenhang zwischen der Induktion der Ustilaginsäure- und MEL-Produktion hinweist. Der Vergleich von MB215/ Δ rua1^C_rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow zeigt, dass die Verringerung von produzierten Sekundärmetaboliten, wie MELs, einen positiven Einfluss auf die produzierte Ustilaginsäuremenge hat. Der Stamm MB215/3x Δ _rua1 \uparrow produzierte in Verduyn G

supplementiert mit 3,6 g/L NH_4NO_3 eine Menge von 4,5 g/L Ustilaginsäure. Aufgrund der verkürzten Verdopplungszeit aller Stämme bei Kultivierung in Verduyn G mit 1,8 g/L und 3,6 g/L NH_4NO_3 und der erhöhten Ustilaginsäureausbeute liegt es nahe, diese Medienzusammensetzung für großvolumige Kultivierungen zu übernehmen.

3 Diskussion

Die Verwendung pflanzlicher Biomasse als Substrat für mikrobielle Prozesse ist ein vielversprechender Ansatz für eine nachhaltige und umweltfreundliche Produktion von wertigen Chemikalien und Proteinen. CAZymes spielen in diesem Ansatz eine zentrale Rolle, da sie die Hydrolyse der Zellwandbestandteile katalysieren und so den Zugang zum energetischen Potential der Biomasse ermöglichen. Bei entsprechend effizienten Prozessen können auch Massenprodukte wie Bioethanol wirtschaftlich hergestellt werden (Lennartsson *et al.*, 2014; Lange, 2017; Ruchala *et al.*, 2020). Durch die simultane Produktion von hydrolytischen Enzymen, der Hydrolyse des Substrates und der Fermentation der freigesetzten Zuckermonomere stellen konsolidierte Bioprozesse einen eleganten Weg dar, Kosten im Bioraffinerie-Konzept zu reduzieren (Lennartsson *et al.*, 2014). Zahlreiche Studien zeigen, dass ein konsolidierter Bioprozess nicht zwingend dem klassischen „Biomasse zu Bioethanol“ Konzept folgen muss, sondern dass auch andere wertgesteigerte Produkte aus dem mikrobiologischen Prozess hervorgehen können (Kuivanen *et al.*, 2015; Shahab *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018). Entsprechend dieser vielversprechenden Ansätze wird derzeit die Eignung von *U. maydis* für das konsolidierte Bioprocessing geprüft. Nachdem erste Untersuchungen die erfolgreiche Hydrolyse von Bestandteilen von Hemizellulose unter der Verwendung von *U. maydis* gezeigt haben (Geiser *et al.*, 2016), wurde in dieser Arbeit das komplexere Substrat Pektin, als Bestandteil von pektinreicher Biomasse, gewählt. Nach Evaluierung war es nötig, das vorhandene pektinolytische Enzymset von *U. maydis* (Döhlemann *et al.*, 2008) zu vervollständigen. Zur Etablierung eines zweiten und komplementären Teilbereichs eines zukünftigen Bioprozesses wurde das Potential von *U. maydis*, wertvolle Sekundärmetabolite herzustellen, ausgenutzt (Bölker *et al.*, 2008; Feldbrügge *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2020). Die Produktion des Glykolipids Ustilaginsäure findet unter natürlichen Bedingungen unter Stickstofflimitation statt, ebenso wie die Produktion von Mannosylerythritollipiden und der organischen Säure Itakonsäure (Geiser *et al.*, 2015; Hewald *et al.*, 2005). Um einen effektiven Produzenten von Ustilaginsäure auf variablen Substraten zu erhalten, war es somit nötig, die Ustilaginsäureproduktion von den stickstofflimitierenden Bedingungen zu entkoppeln und mögliche Nebenprodukte gezielt auszuschalten.

3.1 Etablierung von Pektinabbau in *Ustilago maydis*

3.1.1 Potenzielle GalA Versoffwechslung mit *Ustilago maydis*

Pektin und seine Bestandteile stellen in dieser Arbeit das für die Verwertung durch *U. maydis* zu etablierende Substrat dar. Der Aufbau aus Homogalacturonan (HG), Rhamnogalacturonan I (RG-I), Rhamnogalacturonan II (RG-II) und Xylogalacturonan (XG) zeigt die Komplexität dieses Heteropolymers, ist aber auch ein Anzeichen für eine Vielzahl an verwertbaren Zuckern, die potentiell freigesetzt und verstoffwechselt werden können (Glass *et al.*, 2013; Mohnen, 2008). Mit einem Anteil von ca. 65 % ist HG die häufigste strukturelle Einheit des Pektins (Mohnen, 2008). Bei einer vollständigen Hydrolyse ist somit mit einer hohen Menge an fermentierbarer Galakturonsäure (GalA) zu rechnen. Die Analyse von Zuckerrübenpektin zeigt L-Arabinose und D-Galaktose als meist auftretende Monosaccharide nach GalA (Alazi *et al.*, 2016). Diese befinden sich substituiert am RG-I in Form von Arabinan-, Galaktan- und Arabinogalaktan-Seitenketten (Glass *et al.*, 2013). Die Untersuchung der in dieser Arbeit vorliegenden Pektine ergab ähnliche Zusammensetzungen (Abbildung 7). In nahezu allen untersuchten Proben zeigte sich GalA mit ca. 60 bis 65 % der Gesamtzucker Menge als abundantester Zucker, gefolgt von Arabinose und/ oder Galaktose mit relativen Mengen von ca. 3 bis 25 %. Lediglich Pektin A zeigte einen etwas höheren relativen Gehalt an Glukose als an GalA. Auch Pektin C und das Apfelpektin AU910 zeigen einen erhöhten Gehalt an Glukose. Schwankungen des Gehalts neutraler Zucker treten in Pektin je nach Art des Ausgangsmaterials und der Isolierungsmethode auf (Dranca und Oroian, 2018). Die Extraktion von Pektin kann über mehrere Methoden erfolgen, darunter Säureextraktion, die Extraktion mit überkritischem Wasser, sowie mikrowellen- und ultraschall-gestützte Extraktion (Sandarani, 2017). In der klassischen Extraktion mit Säuren wird das Pektin aus der pflanzlichen Biomasse gelöst und von den festen Bestandteilen getrennt. Aufgrund der Viskosität des gelösten Pektins und der Beschaffenheit der restlichen Feststoffe kann ein Kompromiss zwischen effektiver Extraktion und der Abtrennung aller Feststoffe bestehen. Um vorhandene Stärke abzubauen, kann der Extrakt zusätzlich mit α -Amylase behandelt werden (May, 1990). Hohe Anteile an neutralen Zuckern sprechen für Kontaminationen durch Hemizellulose oder Stärke und treten vor allem bei milderer Extraktionsbedingungen auf (Houben *et al.*, 2011; Yapo *et al.*, 2007). Die hohen Gehalte an Glukose könnten Folge solcher Rückstände sein. In kommerziellen Formulierungen wird Glukose aber auch beigemischt, um die Eigenschaften des Pektins einzustellen und so ein einheitliches Produkt zu gewährleisten (CP Kelco, Großenbrode; persönliche Mitteilung). Unterschiede im Gehalt von Arabinose und Galaktose können auf den Anteil an RGI und somit Arabinan- und Arabinogalaktan-Seitenketten zurückzuführen sein. Es wurde berichtet, dass Arabinofuranosylbindungen stärker durch

Säure hydrolysierbar sind (Bemiller, 1967), was zu einem Verlust von Arabinose während der Isolierung führen kann. Sehr niedrige Gehalte von Rhamnose sind auf ähnliche Weise zu erklären. Yapo *et al.* (2007) fanden besonders niedrige Konzentrationen an Rhamnose in einem Pektin, welches in schwefelsäurehaltiger Lösung für 4 h bei pH 1,5 und 90 °C extrahiert wurde. Besonders pH-Werte unter 2 führen zur schnellen Hydrolyse von Seitenketten des RG und im Folgenden bevorzugt zur Hydrolyse der Rha-Rha, sowie Rha-GalA Bindungen (Thibault *et al.*, 1993). Die auf diese Weise freigesetzte Rhamnose kann somit vor der eigentlichen Isolierung des Pektins ausgewaschen werden.

Die beschriebene Anfälligkeit der Pektinbestandteile gegenüber säureinduzierter Hydrolyse provoziert die Frage, warum eine thermochemische Vorbehandlung nicht auch bei der Verwendung von pektinreicher Biomasse in mikrobiologischen Prozessen in Betracht zu ziehen ist. Solche Behandlungen finden Anwendung in der Vorbehandlung von Hemizellulose, um die rekalcitrante Struktur aufzubrechen und den Zugang der Zellulose für zellulolytische Enzyme, wie Cellobiohydrolasen und β -Glukosidasen, zu erleichtern (Glass *et al.*, 2013). Die restlichen Zellwandkomponenten werden dabei gelöst und von der Zellulosefraktion getrennt. Diese pentosereichen Fraktionen können zum Beispiel durch anaeroben Verdau mit Mikroorganismen zu Biogas umgewandelt werden (Galbe und Zacchi, 2012). Für die Verwendung in fermentativen Prozessen ist die Hydrolyse durch den Einsatz von Säure jedoch nicht optimal, da die Freisetzungsraten für die verschiedenen, im Pektin enthaltenen Zucker sehr unterschiedlich sind. Xylose als Bestandteil von Apfelpektin zeigt sich beispielsweise besonders resistent gegenüber der Hydrolyse durch Säure, während die neutralen arabinosehaltigen Seitenketten sehr früh hydrolysiert werden (Garna *et al.*, 2004; Thibault *et al.*, 1993). Zu lange oder zu harsche Behandlungen können zudem zur Degradierung der Zucker führen (Garna *et al.*, 2004), was speziell auf Uronsäuren zutrifft (Pińkowska *et al.*, 2019) und für den folgenden Fermentationsprozess unerwünscht ist.

Die in der Pektinanalyse nachgewiesenen monomeren Zucker, allen voran GalA, müssen für den fermentativen Prozess durch den verwendeten Mikroorganismus verstoffwechslbar sein. Vor allem bei der Verwendung von *S. cerevisiae* ist das ein geläufiges Problem, da die entsprechenden Stoffwechselwege, sowie benötigte Transporter fehlen (van Maris *et al.*, 2006). *U. maydis* hingegen zeigt Wachstum auf Hexosen und Pentosen, wie Arabinose, Xylose und GalA, was ihn zu einem geeigneten Kandidaten für die Veredelung komplexer Zuckergemische machen könnte (Bottin *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1999; Cano-Canchola *et al.*, 2000). Für die Verstoffwechslung von GalA sind verschiedene Stoffwechselwege in Bakterien und filamentösen Pilzen bekannt. Für Letztere wurde in *A. niger*, *T. reesei* und *B. cinerea* eine vierschrittige Reaktion beschrieben, in der zunächst D-GalA durch eine Galakturonat-Dehydrogenase zu L-Galaktonat reduziert wird und in einem weiteren Schritt,

unter Abspaltung von H₂O, durch eine L-Galaktonat-Dehydratase 2-Keto-3-Deoxy-L-Galaktonat gebildet wird. Eine 2-Keto-3-Deoxy-L-Galaktonat-Aldolase spaltet dieses Substrat weiter in Pyruvat und L-Glyzeraldehyd, welches in einem finalen Schritt durch eine Glyzeraldehyd-Reduktase zu Glycerin umgewandelt wird (Martens-Uzunova und Schaap, 2008; Richard und Hilditch, 2009; Zhang *et al.*, 2011). In *A. niger* wurde der beschriebene Stoffwechselweg durch Martens-Uzunova und Schaap (2008) über die Enzyme GAR1, GAAA, GAAB, GAAC und GAAD beschrieben, welche als Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Untersuchungen des GalA Stoffwechselwegs in *U. maydis* dienten (Abbildung 8). Über BLASTP-Vergleiche gegen das vorhergesagte Proteom von *U. maydis* 521 konnten für jedes im Stoffwechselweg vorhandene Enzym entsprechende Homologe in *U. maydis* identifiziert werden. Bis auf das Homolog der -Keto-3-Deoxy-L-Galaktonat-Aldolase (umag_04667), welches 38 % Sequenzidentität zeigt, wurden alle Homologe mit Identitäten von über 50 % identifiziert. Eine Verstoffwechslung von GalA über den für *A. niger* beschriebenen Stoffwechselweg ist somit wahrscheinlich. In einer mit dem hier bearbeiteten Thema verbundenen Studie konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* in der Lage ist, GalA als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Müller *et al.*, 2018). Die Regulation der mit der Verstoffwechslung involvierten Gene geschieht in *A. niger* über den Transkriptionsfaktor GaaR und das Repressorprotein GaaX. Diese sind ebenfalls für die Regulation der Expression von Genen verantwortlich, die mit dem Abbau von PolyGalA und Pektin in Verbindung stehen und interagieren mit stromaufwärts liegenden GARE-Elemente (engl. *galacturonic acid responsive elements*) mit dem Sequenzmotiv CCNCAA (Martens-Uzunova und Schaap, 2008; Niu *et al.*, 2015), die auch in *B. cinerea* gefunden wurden (Zhang *et al.*, 2016). In *U. maydis* sind solche Regulatorproteine hingegen nicht klar konserviert (Niu *et al.*, 2017).

3.1.2 *Ustilago maydis* weist pektinolytisches Potential mit Einschränkungen auf

In der Vergangenheit befassten sich bereits einige Studien mit der Ausstattung von *U. maydis* mit hydrolytischen Enzymen und es konnten zellulolytische und hemizellulolytische Enzyme wie Xylanasen, Endo-Glukanasen, β -Glukosidasen und Oxidoreduktasen, aber auch pektinolytische Enzyme nachgewiesen werden (Cano-Canchola *et al.*, 2000; Couturier *et al.*, 2012; Doehlemann *et al.*, 2008; Geiser *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2008). Diese Nachweise geschahen entweder aktivitätsbasiert, nach der Induktion der Expression durch die Kultivierung auf Zellwandbestandteilen (Couturier *et al.*, 2012; Cano-Canchola *et al.*, 2000; Geiser *et al.*, 2013), oder beruhten auf Sekretomstudien (Mueller *et al.*, 2008). Einen genaueren Einblick lieferte die Studie von Doehlemann *et al.* (2008), bei der das Expressionsprofil verschiedener CAZymes in frühen und späten Phasen der Infektion von

Maispflanzen untersucht wurde. Die RNA-Proben aus infiziertem Gewebe wurden über eine *Microarray*-Analyse gegen die rund 6200 annotierten Gene abgeglichen. Von den 33 bekannten CAZyme-kodierenden Genen wurden 27 von dem *Microarray* abgedeckt und 15 dieser Gene zeigten sich während der Infektionsphase als hochreguliert, darunter β -1,4-Glukanasen, α -L-Arabinofuranosidasen und als einziges hochreguliertes pektinolytisches Enzym eine Endo-Polygalakturonase (Doehlemann *et al.*, 2008). Da die Annotationen dieser Enzyme lediglich auf automatischen Sequenzvergleichen beruhen, wurden in dieser Arbeit weiterführende *in silico* Analysen durchgeführt, um anhand bereits charakterisierter Homologe die potentiellen Funktionen der pektinolytischen Enzyme weiter zu untermauern. In Anbetracht der arabinosehaltigen Seitenketten des RGI wurden die der Hydrolyse von Arabinoxylan zugeschriebenen α -L-Arabinofuranosidasen (Doehlemann *et al.*, 2008) ebenfalls in die bioinformatische Analyse mit aufgenommen. Bis auf zwei identifizierte β -Galaktosidasen konnten alle untersuchten Enzyme einem charakterisierten Homolog zugeordnet werden oder waren bereits in einer anderen Arbeit charakterisiert worden (Tabelle 1). So beispielsweise die α -L-Arabinofuranosidase der GH 62 Familie (Afu3, umag_04309), welche bereits unter dem Namen UmAbf62A charakterisiert und kristallisiert worden ist (Siguier *et al.*, 2014). Interessanterweise kodiert das Genom von *U. maydis* für insgesamt fünf α -L-Arabinofuranosidasen, darunter zwei (Afu 1 und Afu 2), die die höchste Identität mit einem Homolog aus *Pleurotus ostreatus* teilen, der α -L-Arabinofuranosidase PoAbf die der Familie GH51 angehört und zwei weitere (Afu 4 und Afu 5), die als Homologe zu dem GH43 Enzym Arb43A aus *Cellovibrio japonicus* identifiziert wurden (Tabelle 1). Ausgehend von diesen Analysen besitzt *U. maydis* damit Vertreter von drei von fünf in der CAZy Datenbank beschriebenen Klassen von α -L-Arabinofuranosidasen (GH3, GH43, GH51; GH54 und GH62) (Cantarel *et al.*, 2009). Afu3, bzw. UmAbf62A, als bestcharakterisierte α -L-Arabinofuranosidasen konnte als spezifisch aktiv gegenüber α -1,2-, sowie α -1,3-Bindungen gezeigt werden, durch die L-Arabinofuranosyl-Seitenketten am Arabinan-Rückgrat verbunden sind. Die beiden weiteren identifizierten Homologe aus *C. japonicus* und *P. ostreatus* hingegen hydrolysieren spezifisch α -1,5- L-Arabinofuranosylbindungen, wie sie im Rückgrat von Arabinan-Seitenketten auftreten. Speziell das GH43 Enzym Arb43A setzt bei der Hydrolyse exklusiv Arabinotriose Einheiten frei, die wiederum für das GH51 Homolog PoAbf als bevorzugtes Substrat beschrieben wurden (Amore *et al.*, 2015; Nurizzo *et al.*, 2002; Siguier *et al.*, 2014). Die Sequenzübereinstimmungen und Alignments von Afu 1 und Afu 2 mit dem Homolog PoAbf zeigen eine 28 % bzw. 32 % Identität, sowie weitestgehend konservierte funktionelle Gruppen, wie sie für PoAbf beschrieben wurden (Tabelle 1, Abbildung 32). Eine geringere Sequenzidentität zeigt sich für das Homolog Arb43A im Vergleich mit Afu 4 und Afu 5 (Tabelle 1). Im Aminosäure-Sequenzalignment konnte hier lediglich die katalytische Base sicher bestimmt werden (Abbildung 33). Dennoch suggerieren die Übereinstimmungen mit den

charakterisierten Homologen, dass die hier evaluierten α -L-Arabinofuranosidasen ein effektives und zusammenwirkendes Set an Enzymen darstellen, das nicht nur Arabinoxylan oder Arabinogalaktan, sondern ebenfalls Arabinofuranosylketten in RGI von Pektin hydrolysieren könnte (Mohnen, 2008). Neben dem Set an α -L-Arabinofuranosidasen wurden drei weitere pektinolytische Enzyme gefunden, darunter die vermeintliche Pektinlyase Pel1, die putative Pektin Methylesterase Pme1 und die Endo-Polygalakturonase Pgu1 die hydrolytisch auf HG, dem Hauptbestandteil von Pektin, wirken. Für die vermeintliche Pektinlyase Pel1 wurde mit einer Sequenzidentität von 22 % in der Gesamtsequenz als charakterisiertes Homolog die Pektinlyase PNL-ZJ5A aus *A. niger* identifiziert (Xu *et al.*, 2015), allerdings zeigte sich für Pel1 aus *U. maydis* ein ca. 340 AS langer N-terminaler Überhang in dem keine Identität festzustellen war. Dieser Überhang wurde in BLASTP Analysen lediglich in nahen Verwandten wie *Pseudozyma*, *Sporisorium* und *Ustilago* Spezies gefunden und war dort ebenfalls als vermeintliche Pektinlyase annotiert. Vergleicht man den um diese 340 AS trunkierten Sequenzbereich des Enzyms Pel1 mit dem identifizierten Homolog ergibt sich eine Sequenzidentität von ca. 40 % (Abbildung 30). Dieser C-Terminale Bereich kann außerdem der PL6 Enzymfamilie zugeordnet werden. Die genaue Einordnung des *U. maydis* Enzyms ist anhand dieses Sequenzvergleichs nicht möglich, auch aufgrund der widersprüchlichen Angabe der NCBI Datenbank für konservierte Domänen, nach der das gefundene Homolog PNL-ZJ5A strukturbasiert als Pektatlyase, laut Xu *et al.* (2015) jedoch als Pektinlyase eingeordnet wird. Pektin- und Pektatlyasen degradieren das PolyGalA Rückgrat des HG durch eine direkte β -Eliminierung, was zur Bildung von 4,5-ungesättigten Mono- oder Oligogalakturonaten führt, die zwischen dem C₄ und C₅ Atom eine Doppelbindung tragen (Albersheim *et al.*, 1960). Während Pektinlyasen spezifisch methylveresterte Bereiche des HG-Rückgrates schneiden und ungesättigte Methyloligogalakturonate produzieren, sind die Pektatlyasen auf nicht methylierten GalA-Gruppen aktiv (Yadav *et al.*, 2009). Die Entfernung von veresterten O₆-Methylgruppen wird von Pektin-Methylesterasen vorgenommen, die der Familie CE8 (engl. *carbohydrate* esterase) angehören. Bei Pektin-Methylesterasen wird zwischen prozessiven und nicht-prozessiven Enzymen unterschieden. Während prozessive Enzyme mehrere Methylgruppen hydrolysieren, bevor das Enzym sich von seinem Substrat löst, wirken nicht-prozessive Pektin-Methylesterasen willkürlich auf einzelne methylveresterte O₆-Gruppen (Duvetter *et al.*, 2006; Fries *et al.*, 2007). Die bioinformatische Analyse der in *U. maydis* kodierten Pektin-Methylesterase Pme1 ergab das Homolog PME-ZJ5A aus *Aspergillus niger* (Kent *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). Die vorhandene Sequenzidentität zwischen Pme1 und PME-ZJ5A beträgt 24 % und alle sechs von Kent *et al.* (2016) identifizierten funktionellen Reste sind konserviert (Tabelle 1; Abbildung 31). Pme1 könnte somit eine nicht-prozessive Pektin-Methylesterase darstellen (Kent *et al.*, 2016). Eine genauere Charakterisierung dieses Enzymes fand in der vorliegenden Arbeit nicht statt, jedoch

könnte die de-methylierende Aktivität der Pme1 die Aktivität von Pektatlyasen und Polygalakturonasen auf dem HG Rückgrat positiv beeinflussen.

Die identifizierte Endo-Polygalakturonase Pgu1 (UmPgu1) gehört neben Rhamnogalakturonase, Xylogalakturonase und anderen zu der GH28 Familie (Glass *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu pilzlichen Exo-Polygalakturonasen, die Monogalakturonsäuren produzieren, spalten Endo-Galakturonasen das GalA-Rückgrat intern, um Oligogalakturonsäuren zu produzieren (Sakai *et al.*, 1993). Sequenzvergleiche zeigten starke Ähnlichkeit zu den Endo-Polygalakturonasen I und II aus *A. niger* und einer Endo-Polygalakturonase aus *Colleotrichum lupini* (Castruita-Domínguez *et al.*, 2014). Die höchste Identität zur Pgu1 aus *U. maydis* wurde mit 46 % für die Endo-Polygalakturonase Pga aus dem Ascomyceten *Fusarium moniliforme* bestätigt (Federici *et al.*, 2001). Durch Vergleiche mit diesen Endo-Polygalakturonasen konnten alle funktionellen Gruppen identifiziert werden (Abbildung 10). Dabei zeigt sich für Pgu1 die für charakterisierte Homologe nachgewiesene Tertiärstruktur bestehend aus vier β -helikal angeordneten β -Faltblättern und der charakteristischen Pektinase Substratbindefurche (Choi *et al.*, 2004). Die Endo-Polygalakturonaseaktivität von Pgu1 konnte außerdem bereits nach der Expression in *Pichia pastoris* bestätigt werden (Castruita-Domínguez *et al.*, 2014).

Die durch die bioinformatische Evaluation in ihrer Funktion bestätigten intrinsischen Enzyme zeigen, dass das pektinolytische Set an CAZymes in *U. maydis* zwar nicht komplett ist, die vorhandenen Enzyme in ihrer Funktion allerdings aufeinander abgestimmt zu sein scheinen. Nekrotrophe Pilze, deren Lebensstil darauf abzielt, pflanzliche Biomasse zu zersetzen und die freiwerdenden Zucker zu verstoffwechseln, besitzen häufig umfassende CAZyme-Sets. Dies trifft beispielsweise auf den Ascomyceten *A. niger* zu, der als Produzent vieler pektinolytischer Enzyme bekannt ist (Coutinho *et al.*, 2009; van den Brink und de Vries, 2011). In *U. maydis* wird das Zusammenwirken von hydrolytischen Enzymen nicht mit dem gezielten Abbau von pflanzlichen Zellwänden und dem Verstoffwechseln der freiwerdenden Zellwandbestandteile in Verbindung gebracht. Die gezeigten erhöhten Expressionsprofile der Endo-Polygalakturonase, α -L-Arabinofuranosidasen und weiteren CAZymes stehen wahrscheinlich eher mit der Erleichterung der Zellwandpenetration durch das teilweise Aufbrechen der Vernetzung der Zellwandbestandteile in Verbindung (Doehlemann *et al.*, 2008). Obwohl GalA nachweislich als C-Quelle genutzt werden kann (Müller *et al.*, 2018), was hier auf Ebene der bioinformatischen Vorhersage vorhandener Enzyme des Stoffwechselweges unterstrichen wurde, ist die Verstoffwechslung von GalA in der Pflanze unwahrscheinlich. Zum einen kommt es in infizierten Geweben zu einer Umkehr des Assimilatflusses, wodurch der Pilz Zugang zu einfach verwertbarer Stärke und Saccharose hat (Matei *et al.*, 2018; Sosso *et al.*, 2019). Zum anderen fehlen *U. maydis* für die

Hydrolyse von HG zu GalA Monomeren weitere Enzyme, wie eine Exo-Polygalakturonase und ggf. eine Pektin-Acetylerase um das HG von Acetylestern zu befreien (Glass *et al.*, 2013). Trotz der nicht eindeutig geklärten Funktion der zellwandabbauenden Enzyme in der Pathogenizität des Pilzes bietet das vorhandene Enzymset die Grundlage für den Abbau von pflanzlicher Biomasse im Rahmen eines Bioprozesses. Da die filamentöse Wuchsform, in der die nachgewiesenen CAZymes exprimiert werden, nicht die biotechnologisch bevorzugte Form des Pilzes ist (Klement *et al.*, 2012), war eines der Ziele dieser Arbeit, die Expression relevanter Gene, wie die der Endo-Polygalakturonase *umpgu1*, in der Hefeform zu aktivieren.

3.1.3 Abbau von PolyGalA durch Komplementation mit heterologen Enzymen

Die Aktivierung der Expression der intrinsischen CAZymes wurde über den Austausch der nativen Promotorregion durch den starken, konstitutiven Promotor P_{oma} erreicht (Hartmann *et al.*, 1999). Dieser Promotor zeigte bereits in vorherigen Studien eine Eignung für die starke Expression von sowohl sekretierten heterologen *Nanobodies*, als auch intrinsischen CAZymes (Sarkari *et al.*, 2014; Geiser *et al.*, 2016; Terfrüchte *et al.*, 2017). Obwohl eine Vielzahl an vielversprechenden intrinsischen Enzymen identifiziert wurde, lag der Fokus zunächst auf der Erstellung eines Stammes, der HG hydrolysieren und so monomere GalA freisetzen kann. Dazu wurde im proteasereduzierten Stamm AB33P5 Δ^R die Promotorregion des Gens für UmPgu1 durch den Poma Promotor ersetzt (AB33P5 Δ^R /UmPgu1). Die gesteigerte Sekretion der UmPgu1 konnte über Enzymaktivitätstests im Überstand nachgewiesen werden. Diese wurden auf dem Substrat Polygalakturonsäure (PolyGalA) durchgeführt. Als Kette aus α -1,4-glykosidisch verknüpfter GalA stellt dieses Substrat den Pektinbaustein HG ohne veresterte Acetyl- oder Methylgruppen dar. Als Enzym der GH28 Familie spaltet die Endo-Polygalakturonase die α -1,4-glykosidische Bindung durch einen Invertierungsmechanismus, wodurch eine reduzierende Gruppe am C₁ der ehemaligen glykosidischen Bindung entsteht (CAZy.org; Mccarter und Withers, 1994).

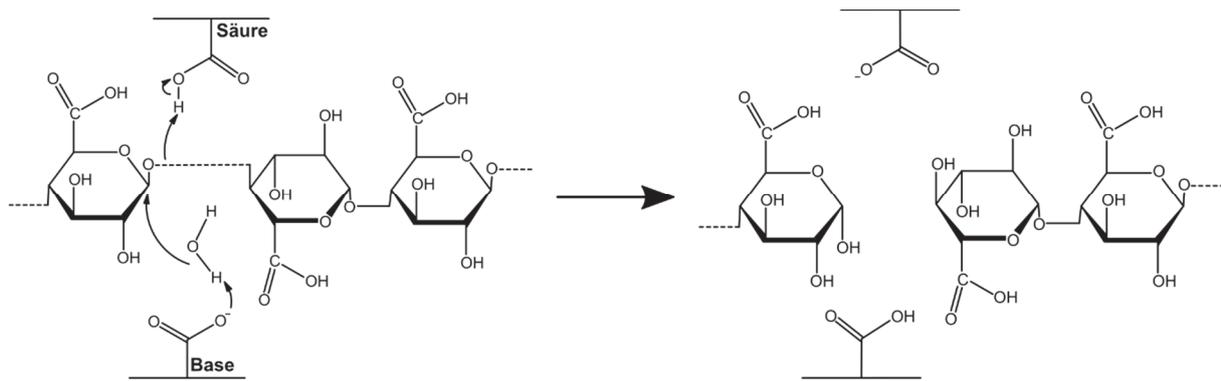


Abbildung 25: Hydrolyse einer α -1,4-glykosidischen Bindung über einen Invertierungsmechanismus. Der glykosidische Sauerstoff wird durch den Einsatz der Säuregruppe protoniert und durch eine nukleophile Attacke eines aktivierten H_2O Moleküls die stereochemische Konfiguration der anomeren Gruppe umgekehrt.

Um die Menge an reduzierenden Zuckern und somit die Menge an hydrolysierten α -1,4-glykosidischen Bindungen quantifizieren zu können, wurde der Dinitrosalicylsäure-Assay (DNS) eingesetzt (Miller, 1959; Geiser *et al.*, 2016). Um Hintergrundsignal im DNS-Assay zu vermeiden, wurde bei der Produktion der Kulturüberstände ein Erntezeitpunkt gewählt, zu dem die C-Quelle in den Kulturen komplett verstoffwechselt war. Der Stamm AB33P5 Δ^R /UmPgu1 zeigte eine signifikant erhöhte Freisetzung von reduzierenden Gruppen verglichen mit dem Vorläuferstamm AB33P5 Δ^R (Abbildung 11 B) und bestätigten die erhöhte Sekretion und Aktivität der Endo-Polygalakturonase im Kulturüberstand. Das Enzym UmPgu1 wurde nach erfolgreicher Expression in *Pichia pastoris* durch Castruita-Domínguez *et al.* (2012) ebenfalls in seiner Funktion bestätigt und eine Aktivität von ca. 1,3 μg reduzierende Gruppen/ min/ mg Protein bestimmt. Eine spezifische Aktivität wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt, da Kulturüberstände direkt in den Assay eingesetzt wurden und nicht exakte Mengen an isoliertem Protein.

Um monomere GalA aus PolyGalA, bzw. HG freizusetzen, wird neben der als Endo-Polygalakturonase identifizierten UmPgu1 ebenfalls eine Exo-Polygalakturonase benötigt. Da *U. maydis* ein solches Enzym fehlt, wurde im nächsten Schritt nach geeigneten heterologen Enzymen gesucht um diese zur Vervollständigung des pektinolytischen Enzymsets einzusetzen. Die Auswahl möglicher Enzyme erfolgte über Datenbankrecherche und wurde unter den für *U. maydis* kultivierungsbedingten Voraussetzungen in Bezug auf pH-Wert und Temperaturoptimum durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden auf einen pH-Wert von 6 eingestellt, was im Rahmen des bevorzugten pH-Bereichs für *U. maydis* liegt (Geiser *et al.*, 2014), und mit 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), bzw. 0,2 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) gepuffert. *U. maydis* säuert im Laufe der Kultivierung das Medium durch die Bildung organischer Säuren an. Im Falle der Kultivierung auf GalA steigt hingegen mit zunehmender Konsumierung der GalA der pH-Wert des Kulturmediums an (Terfrüchte *et al.*, 2018; Müller *et al.*, 2018). Die bevorzugte

Kultivierungstemperatur betrug in den Versuchen im Schüttelinkubator, sowie in RAMOS-Kultivierungen 28 °C, bzw. 30 °C. Des Weiteren wurden nur solche Enzyme in Betracht gezogen, die in ihrer Aktivität bereits in anderen Studien eindeutig bestätigt und charakterisiert wurden. Insgesamt wurden vier heterologe Enzyme ausgewählt, auf die die Bedingungen zutrafen (Tabelle 2). Diese beinhalteten Exo-Polygalakturonasen und Endo-Polygalakturonasen aus je einer pilzlichen und einer bakteriellen Quelle. Neben den Exo-Polygalakturonasen PgaX aus *A. tubingensis* (AtPgaX) und PguB aus *K. pneumoniae* (KpPguB) wurden mit Pgu1 aus *A. aculeatus* (AaPgu1) und Peh1 aus *P. carotovorum* (PcPeh1) zwei weitere Endo-Polygalakturonasen ausgewählt, um diese mit der intrinsischen UmPgu1 vergleichen zu können. Bis auf das Enzym PgaX, welches von Kester *et al.* (1996) aus *A. tubingensis* isoliert und charakterisiert worden war, wurde alle Enzyme zuvor heterolog in *P. pastoris* oder *E. coli* exprimiert und charakterisiert (Abdulrachman *et al.*, 2017; Ibrahim *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2012).

Für die heterologe Expression in *U. maydis* wurden die Sequenzen zur stabilen Translation über ein Sequenzoptimierungswerkzeug dikodon-optimiert (Zhou *et al.*, 2018; Haag *et al.*, 2019). Die Grundlage für dieses Optimierungswerkzeug bildet eine genaue Evaluierung der Dikodon-Nutzung in *U. maydis* (Zarnack *et al.*, 2006). Für die korrekte Expression der bakteriellen Gene wurde der unkonventionelle Sekretionsweg in *U. maydis* genutzt, der den Export der Chitinase Cts1 in einem schleusenähnlichen Mechanismus über die Fragmentierungszone nutzt (Aschenbroich *et al.*, 2019; Koepke *et al.*, 2011; Reindl *et al.*, 2019). Der funktionelle Aufbau der hierfür verwendeten Expressionskonstrukte wurde bereits in vorherigen Arbeiten evaluiert und sieht die translationale Fusion eines zu sekretierenden Proteins, ohne sein N-terminales konventionelles Signalpeptid, an den N-Terminus der Chitinase Cts1 vor (Stock *et al.*, 2012). Diese Möglichkeit der Sekretion erweiterte die Auswahl an möglichen heterologen Genen auf CAZymes bakterieller Spezies, die andernfalls nicht in Betracht gezogen worden wären. N-Glykosylierungen können maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität und korrekte Faltung von Proteinen haben (Brocca *et al.*, 2000; Mitra *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1996), aber auch negative Einflüsse wie verringerte Interaktion mit anderen Proteinen oder stark eingeschränkte Aktivität zur Folge haben (Iturriaga *et al.*, 1989; Skropeta, 2009; Tull *et al.*, 2001). Durch die Sekretion über die unkonventionelle Route wird das Endomembransystem umgangen und negative Auswirkungen von zufällig vorliegenden, eukaryotischen N-Glykosylierungssequenzen könnten verhindert werden (Stock *et al.*, 2012; Koepke *et al.*, 2011). Für die hier verwendeten Enzyme KpPguB und PcPeh1 ist das unter diesem Gesichtspunkt vielversprechend, da drei, bzw. sechs N-Glykosylierungssequenzen identifiziert wurden (Abbildung 13 B). Tatsächlich zeigte sich, dass die bakteriellen Polygalakturonasen als Vollängen-Cts1-Fusionen ins Außenmedium sekretiert wurden und keine durch N-Glykosylierung bedingten Größenunterschiede in den Western Blot-Analysen

aufwiesen (Abbildung 13 C, D), was ein Indiz für eine erfolgreiche Sekretion über die unkonventionelle Route ist. Die Überstände der 24 h kultivierten Stämme AB33P5 Δ R/KpPguB und AB33P5 Δ R/PcPeh1 waren in der Lage, das Substrat PolyGalA zu hydrolysieren, jedoch wurden sehr viel weniger reduzierende Gruppen freigesetzt als zuvor für die intrinsische UmPgu1 (Abbildung 11 B) beobachtet. Ein Grund dafür könnte die im Assay verwendete Temperatur sein, die mit 30 °C unter dem Temperaturoptimum beider Enzyme (ca. 50 °C) lag (Ibrahim *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2012). Zum anderen wurden speziell für die Exo-Polygalakturonase KpPguB nur geringe Proteinkonzentrationen im Überstand nachgewiesen (Abbildung 13 D), was auf eine insgesamt geringe Menge an unkonventionell sekretiertem Protein hinweisen könnte. Neben dem Volllängenprotein wurde außerdem eine Vielzahl von Abbauprodukten detektiert. Diese Abbauprodukte beinhalteten das ca. 63 kDa große Fragment aus SHH-Tag und Cts1 und scheinen zumindest für das KpPguB-SHH-Cts1 Fusionsprotein vermehrt im Überstand aufzutreten. Proteasen stellen bei der Produktion von heterologen Proteinen in pilzlichen Expressionssystemen ein bekanntes Problem dar (Idiris *et al.*, 2006; Ward, 2012). Der Effekt von proteolytischem Abbau von, durch eine N-terminale Cts1-Fusion, unkonventionell sekretierten Proteinen wurde bereits in vorherigen Arbeiten behandelt und die Menge an sekretiertem Protein durch die sukzessive Deletion von vier Aspartat- und einer Serin-Protease erhöht (Sarkari *et al.*, 2014). Der auf diese Weise entstandene Stamm AB33P5 Δ R wurde allerdings bereits für die Sekretion der hier produzierten Fusionsproteine verwendet. Eine Möglichkeit wäre die weiter entwickelte Version dieses Expressionsstamms zu verwenden, in der drei weitere Proteasen der Carboxypeptidasefamilie deletiert wurden. Der so entstandene Stamm AB33P8 Δ zeigte erneut deutlich reduzierte proteolytische Aktivität im Kulturüberstand und könnte die Expression der hier verwendeten bakteriellen Polygalakturonasen weiter stabilisieren (Terfrüchte *et al.*, 2018). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass pH-Einflüsse, vor allem im niedrigen pH-Bereich, zu gesteigerter Proteolyse im Überstand führen können, ein Problem, dem durch den Einsatz von Puffersubstanzen im Medium beizukommen ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Medien beinhalteten bereits 0,1 M Konzentrationen der Puffersubstanzen MES, bzw. 0,2 M MOPS und ein Abfallen des pH-Wertes während der Produktion der CAZymes war nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Über längere Kultivierungen könnten aber höhere Konzentrationen von Puffersubstanzen nötig sein. Die Supplementierung des Kulturmediums mit Konzentrationen von bis zu 0,4 M MOPS wurde im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm AB33P5 Δ / AtPgaX getestet und zeigte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum (Müller, 2019).

Das System der unkonventionellen Sekretion hat sich zuvor bereits als vorteilhaft für die Expression von pharmazeutisch relevanten Proteinen wie *Nanobodies* herausgestellt (Sarkari *et al.*, 2014; Terfrüchte *et al.*, 2017), da nicht menschliche Glykosylierungsmuster

allergische Reaktionen auslösen können (De Groot und Scott, 2007). Die Produktion in Pilzen oder Hefen ist möglich, kann aber die mühsame Humanisierung der N-Glykosylierungs-Maschinerie des Organismus, oder einen zusätzlichen Schritt der Deglykosylierung des Produktes erfordern (Ballew und Gerngross, 2004; Gerngross, 2004). Für den Einsatz zur Produktion von CAZymes liefert die unkonventionelle Sekretion eine Möglichkeit, auch bakterielle Enzyme zu sekretieren und eventuell schädliche N-Glykosylierung zu vermeiden (Tull *et al.*, 2001). Obwohl kaum Beispiele veröffentlicht sind, in denen bakterielle, sekretierte Proteine in Hefen exprimiert wurden (Gellissen, 2000), gibt es dennoch Fälle, in denen keine negativen Einflüsse festgestellt wurden (Effer *et al.*, 2019; Laing und Pretorius, 1993; Zhuge *et al.*, 2008). Die N-Glykosylierung von CAZymes kann sogar einen positiven Einfluss auf die Thermostabilität und Aktivität haben und vergleichende Studien sind somit sinnvoll (Dotsenko *et al.*, 2016; Skropeta, 2009; Xi *et al.*, 2015). Die Wirkung von N-Glykosylierungen auf die bakteriellen Enzyme sollte daher in jedem Fall zuvor evaluiert werden, wozu der hier verwendete unkonventionelle Sekretionsweg gleichzeitig ein wertvolles Werkzeug darstellt.

Nach der Komplementierung des pektinolytischen Repertoires mit bakteriellen Polygalakturonasen wurden die Stämme AB33P5 Δ /AtPgaX und AB33P5 Δ /AaPgu1 mit pilzlichen Enzymvarianten getestet. Diese heterologen Sequenzen wurden ebenfalls in den *ip*-Lokus integriert (Abbildung 12 A) und über den P_{oma}-Promotor exprimiert. Beide Sequenzen wurden zuvor dikodon-optimiert und beinhalteten das native N-terminalen Signalpeptid. Die im Western Blot detektierten Banden entsprachen den erwarteten Größen und auch der Größenunterschied der N-glykosylierten AtPgaX verglichen mit der teilweise deglykosylierten Probe war ersichtlich und entsprach den Angaben von Kester *et al.* (1996). Anders als für die Cts1-Fusionen der bakteriellen Polygalakturonasen beobachtet zeigte sich, dass AtPgaX in großer Menge im Zellextrakt und im Überstand nachweisbar war, während die detektierten Signale für AaPgu1 eher für ein geringeres Expressionslevel sprechen (Abbildung 14 C, D). Im Vergleich zu den bakteriellen Polygalakturonasen und der AtPgaX konnten im Western Blot für AaPgu1 allerdings keine Abbauprodukte nachgewiesen werden. Die detektierten Banden deckten sich, unter Berücksichtigung des in diesen Konstrukten verwendeten SHH-Affinitätstag, mit den Angaben der Literatur (Abdulrachman *et al.*, 2017; Kester *et al.*, 1996). Die Exo-Polygalakturonase AtPgaX setzte über 24 h 2,5 mM reduzierende Gruppen frei. Die Reaktion wurde vermutlich durch die beschriebene Produkthemmung durch GalA limitiert. Diese wurde für GalA und reduziertes Di-Galakturonat mit Inhibitionskonstanten von 0,3 mM und 0,4 mM festgestellt (Kester *et al.*, 1996), womit die hier gemessenen freigesetzten reduzierenden Gruppen das wahre Potential der AtPgaX wohl unterschätzen. Dieses Problem könnte im geplanten Bioprozess vernachlässigbar sein, da, bei erfolgreichem Wachstum von *U. maydis* auf der freigesetzten GalA, das Produkt konstant konsumiert werden würde. Bioprozesse stellen eine Möglichkeit der Nutzung von produktgehemmten Enzymen dar, da

sie diese Limitierung umgehen (Kumar *et al.*, 2008; Andrić *et al.*, 2010; Geiser *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu den Ergebnissen für AtPgaX stehen die großen Mengen an reduzierenden Gruppen, die durch AaPgu1 aus PolyGalA freigesetzt wurden. Mit 10 mM übertrifft diese die Menge an freigesetzten reduzierenden Gruppen durch UmPgu1 um ca. ein Drittel und die der bakteriellen Endo-Polygalakturonase PcPeh1 um das zehnfache. Werte von ca. 7 mM reduzierenden Gruppen zum 6 h Messpunkt lassen zudem auf eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit schließen. Da in den hier durchgeführten Experimenten jedoch keine spezifischen Enzymaktivitäten ermittelt wurden, ist ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten nicht möglich. Aufgrund der im Überstand nachgewiesenen hohen Aktivität des Enzyms wäre ein Vergleich der aufgereinigten AaPgu1 produziert in *U. maydis* mit der durch Abdulrachman *et al.* (2017) in *P. pastoris* produzierten Variante interessant.

3.1.4 Wachstum auf PolyGalA durch Co-Fermentation

Die heterologe Expression der Gene *pgaX* und *pgu1* aus *A. tubingensis* und *A. aculeatus* erwies sich als äußerst vielversprechend, um die Hydrolyse von PolyGalA durch *U. maydis* zu ermöglichen. Darüber hinaus scheinen die sekretierten Enzyme im Überstand relativ stabil und nicht das Ziel stärkerer Proteolyse zu sein. Für AtPgaX konnte das über regelmäßige Substratzugabe in einer laufenden Kultivierung auf PolyGalA bestätigt werden (Müller *et al.*, 2018). Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass die hier evaluierten Enzyme die Hydrolyse von PolyGalA nicht mit maximaler Aktivität katalysiert haben. Zwar wurde der Assay bei der für AtPgaX optimalen Temperatur von 30 °C durchgeführt, jedoch zeigt rekombinantes AaPgu1 bei dieser Temperatur laut Abdulrachman *et al.* (2017) lediglich 50 % der maximal ermittelten Aktivität. Ebenso lag der pH-Wert mit 5,5 noch über den optimalen Werten für AaPgu1 und AtPgaX, die mit pH 5 und pH 4,2 ermittelt wurden (Abdulrachman *et al.*, 2017; Kester *et al.*, 1996). Diese hier bestehenden Einschränkungen zeigen umso mehr, dass die heterologe Expression der pilzlichen Polygalakturonasen ein vielversprechender Schritt auf dem Weg zum hydrolytischen Abbau von HG ist. Sowohl Endo- als auch Exo-Polygalakturonasen werden benötigt, um synergistisch die Hydrolyse von PolyGalA zu verstoffwechselbaren Einheiten zu katalysieren (van den Brink und de Vries, 2011). Im nächsten Schritt wurde daher das Zusammenwirken der erstellten Überexpressionsstämme überprüft (Abbildung 15 A). Es ist wichtig zu erwähnen, dass die konstitutive Expression der intrinsischen oder heterologen Polygalakturonasen durch den P_{oma} -Promotor keine Einflüsse auf die Zellmorphologie hatte (Abbildung 29). Auf die Überexpression von zwei P_{oma} -regulierten Konstrukten in einem Stamm wurde allerdings verzichtet, um zufällige Rekombinationsereignisse zwischen mehreren Promotorsequenzen zu vermeiden. Für die Tests der gemeinschaftlichen Aktivität von Endo- und Exo-Polygalakturonasen wurde deshalb die Methode der Co-Kultivierung gewählt und

exemplarisch für die beiden vielversprechendsten Stämme AB33P5 Δ /AtPgaX und AB33P5 Δ /AaPgu1 durchgeführt (Abbildung 15 B). Der Überstand der co-kultivierten Stämme zeigte sowohl nach 6 h, als auch zum 24 h Messpunkt annähernd gleiche Werte an freigesetzten reduzierenden Gruppen auf dem Substrat PolyGalA verglichen mit den zu gleichen Teilen gemischten Einzelkulturüberständen. Dieses Ergebnis ist ein Anhaltspunkt für ein über die Kultivierung stabil bleibendes Verhältnis zwischen den zwei verwendeten Stämmen während der gemeinsamen Kultivierung.

Verglichen mit den zuvor beobachteten Einzelmessungen zeigt sich in diesem Experiment ein additiver Effekt durch die Exo- und Endo-Aktivitäten der beiden Polygalakturonasen. Wie zuvor beschrieben ist AtPgaX in der Lage, monomere GalA freizusetzen. Die Produktinhibierung des Enzyms durch GalA wird allerdings auch in den gemischten und co-kultivierten Überständen eine genaue Aussage über das Potential der Enzymsynergie limitieren (Kester *et al.*, 1996). Um das Verhalten der Polygalakturonase-sekretierenden Stämme während des Wachstums auf PolyGalA zu beobachten wurden von Kooperationspartnern der RWTH Aachen Messungen im RAMOS-System (engl.: *Respiration Activity MONitoring System*) durchgeführt. Dieses System ermöglicht die Kultivierung von acht parallelen Kulturen in Schüttelkolben und die gleichzeitige Messung der Sauerstofftransferrate (engl.: *oxygen transfer rate*, OTR), der Kohlenstoffdioxidtransferrate (engl.: *carbon dioxide transfer rate*, CTR) und die Ermittlung des Respirationsquotienten (engl.: *respiratory quotient*, RQ), der das Verhältnis zwischen CTR und OTR darstellt. Der RQ ist dabei eine zentrale Größe, um das Wachstum von Mikroorganismen auf Substraten verschiedener Reduktionsgrade zu charakterisieren (Anderlei und Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004). Das RAMOS-System wurde bereits für die Untersuchung der Verstoffwechslung von Zellulose durch den *T. reesei*-Stamm Rut-C30 und die Evaluation alternativer Zellulaseproduzenten verwendet (Antonov *et al.*, 2017; Antonov *et al.*, 2016) und die Methode schließlich für die Korrelation der Stoffwechselaktivität während des Wachstums auf dem polymeren Substrat PolyGalA für den Stamm AB33P5 Δ /AtPgaX etabliert (Müller *et al.*, 2018). Die Kulturen wurden auf abgewandeltem Verduyn-Mineralmedium kultiviert (Geiser *et al.*, 2016), welches auch in dieser Arbeit (Verduyn C2) für die Kultivierung auf GalA und PolyGalA verwendet wurde. Die in diesem Medium hinzugefügte geringe Menge an Glukose diente der schnelleren Bildung von Biomasse und somit einer insgesamt verkürzten Kultivierungsdauer, wie es bereits durch Antonov *et al.* (2016) gezeigt werden konnte. Die Verstoffwechslung von Zuckern ist stöchiometrisch an die Aufnahme von Sauerstoff gekoppelt (Antonov *et al.*, 2016, 2017). Die Menge der insgesamt konsumierter GalA konnte für verschiedene GalA Konzentrationen gegen die Menge des insgesamt veratmeten Sauerstoff kalibriert werden und so verbliebenes Substrat (GalA, bzw. PolyGalA) im Kulturmedium errechnet werden (Müller *et al.*, 2018).

Die Kultivierung des Stammes AB33P5 Δ /UmPgu1 auf den Substraten GalA und PolyGalA kultiviert zeigte die bereits für den Vorläuferstamm beobachteten zwei Phasen der Substratverstoffwechslung getrennt durch eine Phase der Umstellung von Glukose zu GalA als C-Quelle, zu verfolgen durch die Sauerstofftransferrate und den Respirationquotienten (Müller *et al.*, 2018) (Abbildung 16 B). Ein Absinken des Respirationsquotienten unter 1 zeigt die Verstoffwechslung von intern gespeicherten Quellen, wie Lipiden, an (Müller *et al.*, 2018) und zeigt, dass für die Kultur auf PolyGalA nach Verstoffwechslung der Glukose keine verfügbare C-Quelle mehr vorliegt. Das verbildlicht erneut, dass die Endo-Polygalakturonaseaktivität von UmPgu1 keine GalA-Monomere freisetzt. Verglichen mit der Verstoffwechslung von Glukose ist der Anstieg der Sauerstofftransferrate während der GalA-Konsumierung flacher. Dies ist auf eine langsamere Verstoffwechslung von GalA zurückzuführen, die durch den geringeren Reduktionsgrad von GalA verglichen mit Glukose erklärt werden kann und sich auch in einer verringerten Wachstumsgeschwindigkeit von *U. maydis* auf GalA widerspiegelt (Müller *et al.*, 2018; Cano-Canchola *et al.*, 2000). Nichtsdestotrotz konnte über die steigende Menge an total konsumiertem Sauerstoff die konstante Verstoffwechslung von GalA bestätigt werden. Die Schätzung der verbliebenen Menge (Abbildung 16 C, grüne Linie) an GalA wurde anhand der durch Müller *et al.* (2018) erstellten Kalibrierung durchgeführt und über HPLC-Messungen von *offline*-Proben bestätigt. Unterschiede zwischen den errechneten und durch *offline*-Messungen ermittelten Werten sind vermutlich der Berechnungsmethode geschuldet, die sich auf die metabolischen Fluxe, wie den Ertragskoeffizienten zur Biomassebildung ($Y_{X/GalA}$) stützt (Müller *et al.*, 2018). Leichte Änderungen im pH-Wert zu Beginn der Kultivierung, oder der Verwendung anderer als die für die Kalibrierung verwendeten Stämme (AB33P5 Δ^R und AB33P5 Δ^R /AtPgaX) könnten die Vorhersage durch die leichte Veränderung stöchiometrischer Koeffizienten für GalA und O₂ beeinflussen. Diese Größen sollten daher für alle verwendeten Stämme im Vorfeld bestimmt werden, um exakte Vorhersagen treffen zu können.

Die Kontrolle der OD₆₀₀ zum Ende der GalA Verstoffwechslungsphase bestätigte das Wachstum des Stammes AB33P5 Δ R/UmPgu1 auf GalA, im Gegensatz zu PolyGalA haltigem Medium. Es ist wichtig anzumerken, dass die Messung der OD₆₀₀ in Kultivierungen, die PolyGalA enthalten aufgrund der Trübung des Mediums fehleranfällig und auch die Messung des Zelltrockengewichts nicht verlässlich ist, da die Menge der bereits hydrolysierten PolyGalA nicht bekannt ist und das Polymer während der Zentrifugation ebenfalls sedimentiert. Zu diesem Zweck wurden mikroskopische Kontrollen durchgeführt um die Vitalität der Zellen über die Färbung mit Propidiumiodid, ein in der Cytometrie eingesetzter Zellfarbstoff (Deere *et al.*, 1998) zu kontrollieren. Die mikroskopische Kontrolle zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten des Stammes AB33P5 Δ R/UmPgu1, oder das vermehrte Auftreten toter Zellen (Abbildung 18 B) während der Kultivierung auf Glukose (8 h Zeitpunkt), oder der GalA-

Konsumierungsphase (36 h Zeitpunkt). Auffälliger Weise zeigte sich in der frühen Phase der Kultivierung auf PolyGalA-haltigen Medien eine leicht erhöhte Zahl an toten Zellen (Abbildung 18 C), die sowohl für den Stamm AB33P5 Δ R/UmPgu1 als auch für die Co-Kultur von AB33P5 Δ R/AtPgaX und AB33P5 Δ R/AaPgu1 zu beobachten war. Dieses exklusiv in den mit PolyGalA supplementierten Medien auftretende Phänomen ist rätselhaft, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Limitation aufgrund von Nährstoffmangel, oder andere Sekundärlimitationen in den RAMOS-Messungen aufgefallen waren. Ein Übertrag von toten Zellen aus einer evtl. zu dicht gewachsenen Vorkultur hätte sich auch in den Kulturen aus GalA-haltigem Medium zeigen müssen. Obwohl *U. maydis* bereits auf einer Vielzahl von C-Quellen, darunter auch schwer lösliche Substrate wie PolyGalA, oder vorbehandelte Biomasse (Klement *et al.*, 2012; Cano-Canchola *et al.*, 2000) kultiviert wurde, wurde dieser Aspekt noch nicht durch mikroskopische Untersuchungen beleuchtet.

Um auch das Zusammenspiel von Exo- und Endo-Polygalakturonase- produzierenden Stämmen auf dem Substrat PolyGalA zu analysieren, wurde der Stamm AB33P5 Δ^R /AtPgaX zusammen mit den Produzenten der intrinsischen und heterologen Endo-Polygalakturonasen UmPgu1, PcPeh1 und AaPgu1 kultiviert. Wie zuvor konnte die Verstoffwechslung von Glukose und GalA über die zwei charakteristischen Phasen verfolgt und die Konzentration an theoretisch verfügbarer GalA über den total konsumierten Sauerstoff dargestellt werden (Abbildung 17). Insgesamt zeigten alle Kombinationen von Endo- und Exo-Polygalakturonase produzierenden Stämmen eine verlängerte Verstoffwechslung von GalA, verglichen mit der Kultivierung von AB33P5 Δ^R /AtPgaX. Die Exo-Aktivität von AtPgaX produziert zwar monomere GalA (Kester *et al.*, 1996), die Reaktion wird jedoch in ihrer Geschwindigkeit limitiert, da ohne weitere Spaltung durch Endo-Polygalakturonasen nur eine bestimmte Anzahl an angreifbaren PolyGalA Enden zur Verfügung stehen. Ein anderer Punkt ist die Reinheit des Substrates: Polygalakturonase wird durch die Isolierung von Pektin und einer darauffolgende Prozessierung des HG gewonnen (Dranca & Oroian, 2018). AtPgaX zeigt eine spezifische Exo-Polygalakturonaseaktivität vom nicht reduzierenden Ende der PolyGalA (Kester *et al.*, 1996). Eventuell verbliebene Veresterungen machen das PolyGalA-Rückgrat für die Exo-Polyglakturonase unzugänglich und benötigen den zusätzlichen Einsatz von Pektinesterasen (van den Brink und de Vries, 2011). Die hier verbliebene Menge von ca. 56 % PolyGalA im Kulturmedium spricht für eine solche Substratzugänglichkeit und deckt sich mit den Beobachtungen von Müller *et al.* (2018). Die längere GalA-Verstoffwechslung durch die Enzymkombinationen AtPgaX/PcPeh1-Cts1 und AtPgaX/UmPgu1 spricht für eine bessere Zugänglichkeit durch den zusätzlichen Einsatz von Endo-Polygalakturonasen. Beide Kombinationen zeigen eine Konsumierung von PolyGalA bis zu ca. 80%, allerdings deutet die niedrigere maximale Sauerstofftransferrate auf eine geringere Aktivität des Enzyms PcPeh1-Cts1 hin, was auch bereits in den *offline*-Assays zu beobachten war. Messungen über den

Kulturverlauf von Endo- und Exo-Polygalakturonase Produzenten auf PolyGalA zeigten ein Absinken des pH-Werts durch die Akkumulierung von GalA während der Phase der Glukose Verstoffwechslung. Mit zunehmender Verstoffwechslung der GalA steigt der pH-Wert erneut (Müller *et al.*, 2018; Stoffels und Müller *et al.*, 2020). Vergleicht man den Verlauf der Sauerstofftransferrate, bzw. des Respirationsquotienten der Co-Kultur von AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /PcPeh1 mit der Co-Kultur von AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /UmPgu1 zeigt sich eine verlängerte Aktivität im hinteren Verlauf der GalA-Phase (Abbildung 17 A, grüne Linie). Eine Erklärung ist, dass Werte um pH 6 im pH-Optimum der bakteriellen PcPeh1 liegen, während für UmPgu1 lediglich Aktivitäten von 11% ab einem pH-Wert über 6,2 beschrieben wurden (Abdulrachman. *et al.*, 2017, Castruita-Domínguez *et al.*, 2012). Der Fakt, dass die geringe Menge an freigesetzter GalA im Kulturmedium in einen steigenden pH-Wert resultiert, spricht für eine direkte Konsumierung der GalA und indiziert, dass hier die Enzymaktivität der limitierende Faktor ist.

Die Co-Kultivierung von AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 hingegen zeigte die höchste Sauerstofftransferrate und die schnellste Verstoffwechslung der PolyGalA. Bereits ab einer Kultivierungsdauer von 35,2 h waren 79 % des Substrates verstoffwechselt (Abbildung 17 C, rote Linie). Wie bereits beschrieben, unterliegt dieser Wert einer gewissen Unschärfe und eine höhere Konsumierung des Substrates ist möglich. Erstaunlicherweise ermöglicht das Zusammenwirken von AtPgaX und AaPgu1 auf PolyGalA einen annähernd identischen Verlauf der Sauerstofftransferrate, wie es während der Kultivierung auf monomerem GalA zu beobachten war, was für eine schnelle und vollständige Hydrolyse der PolyGalA spricht.

Die Analysen mittels des RAMOS-Systems stellten sich als vielseitiges Werkzeug bei der Überwachung des Biomasseabbaus durch pektinolytische *U. maydis* Stämme heraus. Die in den *offline*-Assays gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des pektinolytischen Potentials konnten über die *online*-Analysen bestätigt werden und die Verstoffwechslung der Substrate Glukose und PolyGalA im Detail untersucht werden. Eine in den Enzym-Assays beobachtete Limitierung war die Produkthemmung der Enzyme durch GalA. Müller *et al.* (2018) beschrieben längere Plateaus in der Sauerstofftransferrate als eine durch die Enzymaktivität limitierte Phase in der jedes freigesetzte GalA-Molekül direkt aufgenommen und verstoffwechselt wird, die Sauerstofftransferrate kann dementsprechend in diesem Bereich zur Messung der Enzymaktivität verwendet werden. Die auf diese Weise ermittelte Enzymaktivitäten für AtPgaX waren bis zu vierfach höher, als die mit dem Überstand der gleichen Kultur ermittelten *offline*-Messungen (Müller *et al.*, 2018) und bestätigen, dass Produktlimitierung in einem Bioprozess nur ein geringes Problem darstellt (Kumar *et al.*, 2008; Andrić *et al.*, 2010; Geiser *et al.*, 2016). Die hier verwendeten Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1, sowie andere getestete Kombinationen, konnten verwendet werden, um

PolyGalA zu hydrolysieren und die freigesetzten GalA-Monomere für die Bildung von Biomasse zu nutzen. Dies stellt den ersten Schritt auf dem Weg der Nutzung von Pektinreicher Biomasse dar.

3.1.5 Komplexere Substrate erfordern ein ausgeweitetes Co-Kultivierungskonzept

Die Nutzung von pflanzlicher Biomasse als Kohlenstoffquelle hat in der Natur viele Mikroorganismen hervorgebracht, die mittels spezialisierter Sets von hydrolytischen Enzymen die in der Lage sind, verschiedene Bestandteile pflanzlicher Zellwände zu zersetzen (de Vries und Visser, 2001; Jayani *et al.*, 2005; Brunecky *et al.*, 2018). Die Nutzung weniger gut ausgestatteter Mikroorganismen für die Hydrolyse von Biomasse erfordert biotechnologische Maßnahmen, um einzelne heterologe CAZymes zu produzieren (Blanco *et al.*, 1999), oder wie in dieser Arbeit behandelt, ein unvollständiges Set zu vervollständigen. Um die Expression mehrerer Gene unter dem starken Promotor P_{oma} zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit Co-Kultivierungen eingesetzt. Co-Kultivierungen sind eine elegante Möglichkeit, komplexe Bioprozesse auf verschiedene Stämme einer Spezies oder Organismen unterschiedlicher Spezies aufzuteilen, so die *metabolic burden* (engl.: Stoffwechselbelastung) zu reduzieren und den Prozess effektiver zu gestalten (Jawed *et al.*, 2019). Bei der Erstellung eines stabilen mikrobiologischen Konsortiums müssen verschiedene Parameter, wie Temperatur, pH-Wert, O_2 -Versorgung und Nährstoffe aufeinander abgestimmt werden (Roell *et al.*, 2019). Da in den hier durchgeführten Versuchen lediglich zwei verschiedene Stämme eines gleichen Stammhintergrunds co-kultiviert wurden, war es nicht nötig, besondere Vorkehrungen bezüglich des Mediums oder der Kulturbedingungen zu treffen. Leicht unterschiedliche Verdopplungszeiten verwendeter Stämme könnten allerdings zu einer ungleichen Gewichtung der Stämme in der Kultur und so unterschiedlichen Mengen an sekretierten Proteinen im Überstand führen. Es ist bekannt, dass Exo-Polygalakturonasen eine niedrigere spezifische Aktivität aufweisen als Endo-Polygalakturonasen (Niture, 2008). Starke Schwankungen oder eine Veränderung des Inokulationsverhältnisses könnten die Hydrolyse daher beeinflussen. Dieser Zusammenhang wurde exemplarisch durch unterschiedliche Inokulationsverhältnisse in RAMOS-Experimenten bestätigt (Stoffels und Müller *et al.*, 2020), jedoch wurden keine Maßnahmen zur Stabilisierung dieses Verhältnisses durchgeführt. Eine in mikrobiologischen Konsortien häufig verwendete Methode ist die Kontrolle über Metabolitabhängigkeit, bei der die kultivierten Stämme durch die Synthese einer Aminosäure jeweils die Auxotrophie des anderen Stammes ausgleichen (Shou *et al.*, 2007). Aber auch andere Ansätze werden beschrieben, die auf der gemeinsamen Spaltung eines Substrates zur Freisetzung von verstoffwechselbaren Einheiten beruhen (Gore *et al.*, 2009). Letzteres beschreibt das hier

verwendete Prinzip am ehesten, allerdings wurden für *U. maydis* noch keine Mechanismen zur Regulation von Co-Kulturen entwickelt. Jüngst wurde in *U. maydis* der Gebrauch von 2A-Peptiden etabliert, was die Translation von multi-cistronischen mRNAs erlaubt (Müntjes *et al.*, 2020). Zwei oder mehr Proteine können so, durch die Trennung mittels 2A Sequenzen, von einem offenen Leserahmen (engl: *open reading frame*, ORF) translatiert werden, wobei zwischen den letzten beiden Aminosäuren des 2A-Peptids (Glycin und Prolin) das Polypeptid unterbrochen wird (Sharma *et al.*, 2012). Müntjes *et al.* (2020) waren in der Lage, verschiedene 2A-Peptide durch die Co-Translation von verschiedenen 2A-Peptiden anhand von unterschiedlich lokalisierenden Fluoreszenzreportern auf ihre Effizienz in *U. maydis* zu testen. Durch die Expression eines tri-cistronischen ORFs aus den kodierenden Sequenzen der Mannosyltransferase Emt1 und den Acyltransferasen Mac1 und Mac2 konnte so synthetisch ein Mannosylerythritolipide produzierender Stamm erstellt werden. Neben den 2A Peptiden haben sich bidirektionale Promotoren als vielversprechendes Werkzeug für die Konstruktion von Expressionskonstrukten gezeigt. Bidirektionale Promotoren sind intergenische Regionen, die ein paar flankierender Gener regulieren, welche häufig einer ähnlichen oder komplementären Funktion dienen (Dash *et al.*, 2020). Wie bereits erwähnt wurde in dieser Arbeit der mehrfache Einsatz des konstitutiven Promotors P_{oma} vermieden, um ungewollte Rekombinationsereignisse zu vermeiden, ein Problem, was auch in anderen Zweigen, wie der Pflanzenbiotechnologie bekannt ist (Peremarti *et al.*, 2010). In Pilzen co-regulieren bidirektionale Promotoren häufig Gene eines Stoffwechselweges (Bergh *et al.*, 1996; Martín, 2000), so auch Pxy, ein bidirektionaler Promotor aus *Fusarium oxysporum*, der die Expression einer β -Xylosidase und einer Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase reguliert und durch Xylan, Arabinoxylan und Pektin induzierbar ist (Dash *et al.*, 2020). Der Einsatz von bidirektionalen Promotoren kann im besten Fall die Menge der benötigten Promotoren um die Hälfte reduzieren und vor allem Promotoren wie der beschriebene Pxy könnten bei der Erstellung von pektinolytischen *U. maydis* Stämmen hilfreich sein. Erste Schritte bei der Nutzung von bidirektionalen Promotoren in *U. maydis* wurden kürzlich von Heuken und Hüsenmann (2020, in Vorbereitung) unternommen und zeigen vielversprechende Ergebnisse in der Kombination von Sequenzen des Cytomegalovirus *immediate early enhancer* und des *Prf1* Perforin-*enhancers*. Diese Techniken versprechen eine effektive Möglichkeit, die Sekretion von mehreren CAZymes in einzelnen Stämmen zu bündeln und so katalytische Spezialstämmen zu generieren. Die Anzahl an co-kultivierten Stämmen für die Hydrolyse von pektinreicher Biomasse könnte reduziert werden und weitere Stämme für die Produktion von Sekundärmetaboliten den Prozess ergänzen.

Die in dieser Arbeit als wirksamste identifizierte Kombination der Stämme AB33P5 Δ^R /AtPgaX und AB33P5 Δ^R /AaPgu1 wurde analog zu den auf PolyGalA durchgeführten Assays auch in Einzel- und Co-Kultur produziert und gegen verschiedene Pektine unterschiedlichen

Veresterungsgrad getestet. Die verwendeten Pektine RU CP (VE) und RU301 (VE) (Rübenpektin), sowie AU202 (Apfelpektin) wiesen Veresterungsgrade von 57%, 54% und 68% und der Einsatz der Exo- und Endo-Polygalakturonasen lieferte nur geringe Mengen an freigesetzten reduzierenden Gruppen. Anders als Pektinlyasen sind Polygalakturonasen nur auf niedrig verestertem HG oder RG aktiv (Markovič & Janeček, 2001), was sich durch die weitaus höheren Mengen an freigesetzten Gruppen auf dem nur zu 4,8 % veresterten Apfelpektin AU910 zeigte. Ausgehend von den anfänglich durchgeführten Zuckeranalysen der vorliegenden Pektine entspricht die freigesetzte Menge an reduzierenden Gruppen ca. 72 % des im Pektin enthaltenen HG. Um auch durch Veresterungen unzugängliche Bereiche höher veresteter Pektine verfügbar zu machen, benötigt es den Einsatz von Pektin-Methylesterasen und Pektin-Acetylerasen, die in Synergie mit Pektatlyasen und Polygalakturonasen wirken (Shevchik und Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997; Fries *et al.*, 2007; Glass *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Untersuchungen lassen vermuten, dass das Genom von *U. maydis* für eine Pektin-Methylesterase kodiert, die in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden müsste. Alternativ stellen Pektinlyasen eine Möglichkeit dar, die durch O-6 Methylierungen vor der Hydrolyse durch Polygalakturonasen geschützten GalA-Gruppen zu hydrolysieren. Durch direkte β -Eliminierung kommt es zur Bildung von 4,5-ungesättigten Mono- oder Oligogalakturonaten, die zwischen dem C₄ und C₅ Atom eine Doppelbindung tragen (Albertsheim *et al.*, 1960). Pektinlyasen werden vor allem in der Industrie zur Klärung von Fruchtsäften oder Weinen eingesetzt, da durch diese spezielle Art der Hydrolyse anders als beim gekoppelten Einsatz von Pektinmethylesterasen und Polygalakturonasen/ Pektatlyasen kein Methanol durch die Entfernung der Methylgruppen freigesetzt wird (Yadav *et al.*, 2009). Für eine Komplementierung des bestehenden und in dieser Arbeit getesteten Enzymsets müssten die während der β -Eliminierung entstehenden 4,5-ungesättigten Oligogalakturonate allerdings als Substrat für die Polygalakturonasen getestet werden. Eine elegante Möglichkeit auch hoch veresterte Pektine zu hydrolysieren, stellt ein durch (Bergh *et al.*, 1996) beschriebenes bifunktionales Enzym dar. Diese GH28 Pektinase aus *Penicillium oxalicum* trägt neben einer Polygalakturonase-Domäne eine separate Methylesterase-Domäne. Solche Enzyme sind eine Möglichkeit, die Effizienz einzelner Stämme zu erhöhen, ohne mehrere heterologe Sequenzen exprimieren zu müssen. Andere Ansätze zeigen die Möglichkeit der künstlichen Erstellung von bifunktionalen, bzw. multifunktionalen CAZymes, wie für ein hemizellulolytisches Enzymkonstrukt bestehend aus einer Ferulyesterase und einer Endo-Xylanase gezeigt wurde, die in einem weiteren Schritt mit einer Kohlenhydrat Bindedomäne verbunden wurde (Levasseur *et al.*, 2005).

Besonderes Potential für die Hydrolyse der Seitenketten des RGI könnte das Set aus fünf α -L-Arabinofuranosidasen in *U. maydis* bereithalten. Diese Enzyme spalten wie bereits beschrieben α -1,2-, sowie α -1,3-Bindungen in den L-Arabinofuranosyl-Seitenketten, sowie α -

1,5- L-Arabinofuranosylbindungen, wie sie im Arabinan-Rückgrat auftreten (Nurizzo *et al.*, 2002; Amore *et al.*, 2012). Freigesetzte Arabinose könnte ebenfalls durch *Ustilago maydis* aufgenommen und als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Müller, 2019). Erste Tests von in der Hefeform aktivierten Überexpressionsstämmen zeigen Aktivitäten auf kommerziell erhältlichen Substraten wie Arabinoxylan, Arabinogalaktan, sowie verzweigtem und unverzweigtem Arabinan (Daten nicht gezeigt), und sollten in Zukunft weiter charakterisiert werden.

3.2 Produktion von Ustilaginsäure in *Ustilago maydis*

Die Produktion von Ustilaginsäure in *U. maydis* wurde erstmals durch Haskins *et al.* (1951) beschrieben und wurde im Folgenden im Detail bezüglich der Struktur und der Biosynthese weiter aufgeklärt (Lemieux, 1953; Saerens *et al.*, 2011; Teichmann *et al.*, 2011; Teichmann *et al.*, 2007). Ustilaginsäure und strukturell äußerst ähnliche Moleküle wie Flocculosin und weitere Cellobioselipide produziert in *Cr. humicola* und *Pseudozyma* Spezies besitzen eine breitgefächerte antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Bakterien und Pilzen, darunter Pflanzenpathogene, wie *B. cinerea* und humanpathogene Hefen wie *Candida* Spezies und *C. neoformans* (Haskins und Thorn, 1951; Mimee *et al.*, 2005; Teichmann *et al.*, 2007). Für die Cellobioselipidvariante, welche durch *P. fusiformata* produziert wird, konnte die antimikrobielle Wirkung auf eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran und dadurch verursachten Verlust von ATP zurückgeführt werden (Kulakovskaya *et al.*, 2003). Dieser membranschädigende Effekt wurde ebenfalls für Flocculosin beschrieben (Mimee *et al.*, 2009). Allen Cellobiosevarianten ist gemein, dass sich die erhöhte Bioaktivität bei niedrigen pH-Werten zeigt (Mimee *et al.*, 2005; Kulakovskaya *et al.*, 2014), was sie zu einer interessanten Glykolipidklasse mit spezifischem biomedizinischen und phytoprotektiven Potential macht. In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Fokus daher auf die Produktion größerer Mengen von Ustilaginsäure als potentielles Sekundärmetabolit-Zielmolekül in einem zukünftigen Bioprozess gelegt.

Analysen zur Identifikation eines Produktionsstammes für hohe Mengen an organischen Säuren zeigten, dass der Stamm AB33P5 Δ keine Itakonsäure produziert (Geiser *et al.*, 2018). Geringe Mengen an Itakonsäure und Glykolipiden waren in einer früheren Studie bereits für den Vorläuferstamm FB1 aufgefallen (Geiser *et al.*, 2014). Diese Charakteristik, geringe Mengen an Sekundärmetaboliten zu produzieren, wurde für die Sekretion von heterologen Proteinen in AB33P5 Δ als hilfreich angesehen, da der Hauptenergiefluss potentiell in die Proteinproduktion fließt, war aber für die Produktion von Ustilaginsäure nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde für die Produktion von Ustilaginsäure der Stammhintergrund MB215 gewählt. Bei MB215 handelt es sich um ein Wildtypisolat aus Norddeutschland, das als Produzent von Glykolipiden identifiziert und für die Aufdeckung des genetischen MEL- und Ustilaginsäureclusters verwendet wurde (Hewald *et al.*, 2005, 2006; Teichmann *et al.*, 2007). Neben der Untersuchung von Glykolipiden wird MB215 auch für die Produktion großer Mengen Itakonsäure und weiterer organischer Säuren verwendet (Becker *et al.*, 2020; Geiser *et al.*, 2014). Die Produktion reiner Ustilaginsäure in *U. maydis* wurde bislang kaum beschrieben. Gründe dafür sind möglicherweise zu geringe Produktionsmengen und die natürlich auftretende Beimischung von MELs, die in Wildtypstämmen zwar durch die Wahl der C-Quelle zu minimieren, jedoch nicht zu verhindern ist (Spoeckner *et al.*, 1999). Das Ziel war es daher,

die Produktion der Ustilaginsäure zu steigern und gleichzeitig die Produktion von Nebenprodukten durch gezielte Deletionen zu verhindern, um ein möglichst reines Produkt zu erhalten.

3.2.1 Produktion von Ustilaginsäure im Laborfermentermaßstab und deren Isolierung

Um die Menge an produzierter Ustilaginsäure zu steigern, wurde die Kultivierung im Laborfermenter-Maßstab angestrebt. Das hierfür verwendete System des Infors™ Minifors Laborfermenters wurde bereits in vorherigen Arbeiten verwendet und ermöglichte eine Kultivierung in einem Volumen von 3 L unter der Kontrolle prozessrelevanter Parameter (Terfrüchte *et al.*, 2018). Der Stamm MB215/*emt1*Δ/*rua1*↑ wurde verwendet, da sich der Produktionsstamm MB215/3xΔ/*rua1*↑ noch in der Herstellung befand, trug aber mit der Deletion von *emt1* und der Überexpression von *rua1* über den P_{oma}-Promoter die wichtigsten genomischen Veränderungen, um mit dem angestrebten Produktionsstamm vergleichbar zu sein. Anders als in industriellen mikrobiellen Fermentationsprozessen, die häufig im Zulauf-Verfahren (engl.: *fed-batch*) durchgeführt werden (Scheidle *et al.*, 2011), fand die Kultivierung in einer Charge statt, wurde aber ebenfalls in den Parametern pH-Wert und O₂-Sättigung überwacht und über die Gabe von 2,5 M NaOH und 1 N H₂SO₄, sowie der Rotationsgeschwindigkeit des Impellers kontrolliert. Es zeigte sich jedoch, dass über den Kultivierungsprozess keine Justierung des pH-Wertes nötig war und lediglich die O₂-Sättigung korrigiert werden musste. Dies spricht für eine ausreichende Pufferung des Mediums durch die eingesetzte Konzentration von 0,1 M MES-Puffer. Die Produktion von Glykolipiden in *U. maydis* ist anders als in verwandten Spezies abhängig von der verfügbaren C-Quelle. So konnte gezeigt werden, dass unter dem Einsatz von Sonnenblumenöl als einzige C-Quelle bis zu 90 % MELs produziert werden, während der Einsatz von Glukose eine Produktion von 90 % Ustilaginsäure bewirkte (Spoeckner *et al.*, 1999). Daher wurde in der Kultivierung als C-Quelle Glukose gewählt. Aufgrund der Deletion von *emt1* im hier verwendeten Stamm, war auch keine Restbeimischung von MELs erkennbar und es konnte erfolgreich lediglich Ustilaginsäure produziert werden. Die ermittelte Menge an Ustilaginsäure zum 40 h Messpunkt betrug 3,6 g/L.

Die Isolierung der Ustilaginsäure konnte zu Teilen durch Kristallisation aus der Ethylacetatphase bei 4 °C geschehen und lieferte ein relativ reines Produkt. Die Fällung bei niedrigen Temperaturen war eine Abwandlung der von Haskins *et al.* (1951) verwendeten Methode, bei der eine Mischung aus Ustilaginsäure und MELs bei 0 °C mit einem Wasser/Ether/Methanol-Gemisch (3:2:1) gefällt wurde. Andere veröffentlichte Methoden beschreiben die Isolierung von Glykolipiden über Säurefällung, was unter anderem für Flocculosin und Rhamnolipide angewendet wird (Mimee *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2015). Bei der Säurefällung

wird durch die Protonierung der Glykolipide die Löslichkeit in wässriger Lösung reduziert, was zur Präzipitation führt (Ishigami *et al.*, 1987; Schenk *et al.*, 1995). Diese Methoden gehen allerdings meist von einer vorherigen Trennung von Zellen und Kulturüberstand aus, was für Ustilaginsäure aufgrund der Bildung von nadelförmigen Kristallen während der Kultivierung (Haskins, 1950; Hewald *et al.*, 2005) zu Produktverlusten führen kann. Neben dem bei 4 °C aus der Ethylacetatphase gefälltem Produkt wurde nach Evaporation der verbliebenen Lösemittelphase ein durch Schaumhemmer verunreinigtes Produkt gewonnen (Abbildung 20 C). Die Verunreinigung konnte durch Waschschriffe mit H₂O und n-Hexan reduziert werden (Abbildung 20 D); ein gänzlicher Verzicht auf schaumhemmende Substanzen wäre jedoch anzustreben, um in einem einfachen Fällungsschritt größere Mengen an präzipitierter Ustilaginsäure abzuscheiden.

Die starke Schaumbildung bei hohen Zelldichten wurde bereits bei frühen Fermentationen von *U. maydis* Stämmen als Problem beschrieben (Roxburgh *et al.*, 1954) und taucht auch bei der Produktion von MELs im Fermentationsmaßstab auf (Rau *et al.*, 2005). Dieses Verhalten ist im Fall von Glykolipiden dem Produkt geschuldet, da Glykolipide oft exzellente Schaumbildner sind (Jimoh und Lin, 2019). Aber auch extrazelluläre Proteine können ein Grund für starke Schaumbildung sein (Prins und van't Riet, 1987). Schaumbildung kann durch die Gabe von Schaumhemmern unterbunden werden, jedoch erschweren diese die Aufreinigungsschritte und können zudem negative Einflüsse auf den Fermentationsprozess haben (Nielsen *et al.*, 2018). Neben synthetischen und nicht synthetischen Substanzen wurden auch Pflanzenöl, oder andere pflanzenöhlhaltige Quellen erfolgreich als schaumhemmende Substanz eingesetzt (Rau *et al.*, 2005; Radzuan *et al.*, 2017). Bei der Produktion von Ustilaginsäure unter der Verwendung von Wildtypstämmen könnte dies zum beschriebenen Effekt der vermehrten MEL-Bildung führen (Spoeckner *et al.*, 1999). Da in dem hier verwendeten Stamm, und ebenfalls im angestrebten Produktionsstamm, die MEL Produktion durch die Deletion der Erytrithol-Mannosyl Transferase Emt1 unterbunden ist, könnte die Verwendung von Pflanzenöl jedoch zugleich als Schaumhemmung und C-Quelle dienen. Rückstände hydrophober C-Quellen stellen allerdings eine zusätzliche Verunreinigung bei der Aufreinigung des Produktes dar (Günther *et al.*, 2010), und müssen wie hier gezeigt über zusätzliche Waschschriffe entfernt werden, oder wie durch Rau *et al.* (2005) beschrieben, über den Verlauf der Fermentation möglichst vollständig konsumiert werden. Da die Extraktion und weitere Aufreinigung von Glykolipiden einen großen Teil der Produktionskosten ausmachen und die verwendeten Lösemittel und Chemikalien negative Einflüsse auf die Umwelt haben können (Sarachat *et al.*, 2010; Marchant und Banat, 2012), wird für die Produktion von Glykolipiden auch die Schaumfraktionierung genutzt. Anstelle der Unterbindung der Schaumbildung wird ausgenutzt, dass oberflächenaktive Substanzen an Stoffgrenzen akkumulieren und so mit dem sich bildenden Schaum vom Prozess abgetrennt werden können

(Qu *et al.*, 2008). Diese Methode wurde unter anderem für die Extraktion von Rhamnolipiden beschrieben und zeigt eine hohe Konzentration von Produkt in der Schaumfraktion, allerdings stellt die Anreicherung von Zellmaterial und der dadurch verbundene Verlust im Fermenter ein häufiges Problem dar (Sarachat *et al.*, 2010; Beuker *et al.*, 2016; De Rienzo *et al.*, 2016).

Dieses Experiment stellte einen ersten Vorstoß in Richtung großvolumige Produktion von Ustilaginsäure dar und zeigte, dass die Kultur unter den getesteten Bedingungen keiner starken Justierung in Bezug auf den pH-Wert bedarf. Ob Schaumfraktionierung auch für die Produktion von Ustilaginsäure genutzt werden kann, muss untersucht werden. In diesem Fall sollte der Fermentationsprozess ebenfalls auf ein Zulauf-System umgestellt werden, um den Volumenverlust auszugleichen.

3.2.2 Kontinuierliche Produktion mit reduzierten Nebenprodukten - ein Produktionsstamm

Viele pilzliche Gencluster für die Synthese von Sekundärmetaboliten kodieren für einen einzelnen Transkriptionsfaktor als regulatorisches Element (Bergmann *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2010; Geiser *et al.*, 2018). Die Regulation dieser Gencluster geschieht häufig als Reaktion auf äußere Einflüsse wie Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, Temperatur, pH-Wert, freie Aminosäuren und reaktive Sauerstoffspezies (Brakhage, 2013). Eine Möglichkeit, ganze Gencluster künstlich zu aktivieren, bietet die konstitutive Expression des für den Transkriptionsfaktor kodierenden Gens (Bergmann *et al.*, 2007). In *U. maydis* wird das Gencluster für die Produktion der Ustilaginsäure über den Transkriptionsfaktor Rua1 (engl.: *regulator of ustilagic acid production*) reguliert, der über zwei Znf-Motive nahe des C-Terminus an kurze Konsensussequenzen in den 5'-untranslatierten Regionen der im Cluster befindlichen Gene bindet. Eine sehr ähnliche Regulation ist ebenfalls für *Pseudozyma flocculosa* und dem Gencluster für die Flocculosinsynthese beschrieben (Teichmann *et al.*, 2007, 2010, 2011). Die Gene des Ustilaginsäureclusters zeigen bei Stickstoffmangelbedingungen eine erhöhte Expression und Ustilaginsäure wird produziert (Teichmann *et al.*, 2007). Da die Kultivierung unter stickstofflimitierenden Bedingungen oft mit reduzierter Biomassebildung verbunden ist (Klement *et al.*, 2012), wird die durch Stickstofflimitierung induzierte Produktion von Glykolipiden auch in ruhenden Zellen durchgeführt (Günther *et al.*, 2010). Aufgrund einer möglichen Zusammenführung des Biomasseabbaus und der Produktion von Ustilaginsäure, wurde diese Art der Produktion nicht in Betracht gezogen und die kontinuierliche und stickstoffunabhängige Produktion von Ustilaginsäure angestrebt. Durch die konstitutive Expression von *rua1* konnte die erhöhte Expression der Gene des Ustilaginsäureclusters und die Produktion von Ustilaginsäure

induziert werden (Teichmann *et al.*, 2010). Dies wurde durch die Verwendung des sehr starken synthetischen Promotors P_{oma} noch verstärkt, was eine stickstoffunabhängige Produktion in wachsenden Zellen ermöglicht (Rodríguez Estévez, 2016). Dem folgend wurde in dieser Arbeit ein Produktionsstamm erstellt, in dem zunächst die endogene *rua1*-Sequenz inaktiviert und zudem *ria1* (engl.: *regulator of itaconic acid production*) und *emt1* (engl.: *erythrol mannosyl transferase*) gezielt deletiert wurden. Dieser Deletionsstamm wurde bezüglich der ausbleibenden Produktion von Ustilaginsäure, Itakonsäure und MELs bestätigt (Abbildung 21 D, Tabelle 16, Abbildung 23 C) und nachfolgend durch die Integration eines $P_{oma:rua1}$ -HA Konstruktes im *ip*-Lokus (Broomfield und Hargreaves, 1992, Stock *et al.*, 2012; Rodríguez Estévez, 2016) komplementiert, um die Ustilaginsäureproduktion konstitutiv anzuschalten. Die erfolgreiche Entkopplung der Ustilaginsäureproduktion im Produktionsstamm konnte im Folgenden durch die Kultivierung auf verschiedenen Verduyn G-Varianten unterschiedlicher NH_4NO_3 -Konzentrationen bestätigt werden und resultierte in allen Medien in einer durchgehenden Ustilaginsäureproduktion. Bei höheren NH_4NO_3 -Konzentrationen blieb die Induktion der Ustilaginsäuresynthese im Wildtypstamm aus, die Induktion der MELs Synthese hingegen blieb bis zu untersuchten Maximalkonzentration auf minimalem Level bestehen.

Ein interessanter Effekt im Produktionsstamm war der Einfluss der *rua1* Überexpression auf die MEL-Synthese. Gesteigerte Mengen an MELs konnten im Vergleich zu den nicht stickstoffentkoppelten Stämmen MB215 und MB215/*rua1* Δ^C festgestellt werden. Da dieser Effekt in den Verduyn G-Varianten mit geringeren NH_4NO_3 Konzentrationen nicht so deutlich erscheint, ist unklar, ob es sich hierbei um einen bislang nicht bekannten Einfluss von *Rua1* auf die Expression der Gene der MEL-Synthese handelt. In den Promotorregionen der Gene involviert in Ustilaginsäure- und MEL-Synthese finden sich GATA-Elemente und es wurde vermutet, dass die Regulation der Glykolipidsynthese in *U. maydis* mit dem Homolog des generellen Stickstoff Regulators *AreA* aus *A. nidulans* zusammenhängt, der in *A. nidulans* für die Regulation von über 100 Genen des Stickstoffmetabolismus verantwortlich ist (Hewald *et al.*, 2005, 2006; Ravagnani *et al.*, 1997). Für das *AreA*-Homolog, *Nit2*, in *U. maydis* konnte zwar kein Zusammenhang mit der Ustilaginsäureproduktion festgestellt werden, allerdings wurde es als regulierendes Element für die Verwendung nicht favorisierter Stickstoffquellen, darunter Nitrat, identifiziert (Horst *et al.*, 2012). Ein Zusammenhang der hier beobachteten MEL Produktion mit der Verstoffwechslung von Nitrat im späten Verlauf der Kultivierung sollte genauer untersucht werden.

Der Vergleich zwischen den Stämmen MB215/*rua1* Δ^C _rua1 \uparrow und MB215/3x Δ _rua1 \uparrow^R zeigte deutlich den Einfluss der durchgeführten Deletionen im finalen Produktionsstamm in Form einer gesteigerten Produktion von Ustilaginsäure. Eine ähnliche Strategie wurde von

Becker *et al.* (2020) bei der Erstellung eines Itakonsäure-produzierenden MB215 Stammes verfolgt, die mit zunehmender Deletion der Hauptsekundärmetaboliten Ustilaginsäure, MELs, Triazylglyzeride und dem Primärmetabolit Apfelsäure die Produktion von Itakonsäure zunehmend steigern konnten. Die Überexpression des für den Transkriptionsfaktor Ria1 kodierenden Gens ermöglichte eine über 15-fach höhere Produktion. Die Menge von produzierter Ustilaginsäure in dieser Arbeit wurde semiquantitativ über DC-Analysen abgeschätzt, oder durch Wägung nach der Evaporation der Lösemittelphase durchgeführt und steht der Quantifizierung von Itakonsäuregehalten durch HPLC basierte Methoden nach, für die jedoch geeignete Standards fehlen.

Die Produktion von größeren Mengen Ustilaginsäure ist kaum beschrieben oder bezieht sich auf Gemische von Ustilaginsäure und MELs (Haskins, 1950; Rau *et al.*, 2005). Mengen von 23 g/L wurden von Roxburgh *et al.* (1956) hergestellt, allerdings wurde der dafür verwendete Stamm PRL-119 in keiner nachfolgenden Publikation verwendet (Rupp *et al.*, 2010). Ähnliche Mengen von 20 g/L wurden von Günther *et al.* (2010) mit Hilfe einer *emt1*Δ Mutante hergestellt. Diese Mengen wurden jedoch in ruhenden Zellen unter Stickstofflimitierung produziert und nicht in exponentieller Kultur. Die Produktionsmengen für Flocculosin belaufen sich auf bis zu 14 g/L, während andere Cellobioselipide aus *Pseudzyma* und *Cryptococcus* Spezies mit Ausbeuten im unteren g/L Bereich produziert werden (Hammami *et al.*, 2008; Kulakovskaya *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden Mengen von 3,6 g/L im Laborfermenter mit dem Stamm MB215/*emt1*Δ_*rua1*↑ produziert, während der durch die Deletion von *emt1* und *ria1* optimierte Stamm, nach der Erhöhung der Stickstoffquelle, Mengen von 4,5 g/L in 35 h Kulturdauer im Schüttelkolben produzierte. Diese Mengen sind vergleichbar mit denen, die für ein Cellobioselipid produziert in *Cr. humicola* unter der Verwendung eines Komplexmediums mit 10 % Glukose in 4 Tagen erreicht wurden (Morita *et al.*, 2011). Letztendlich sind die Produktmengen aus der vorläufigen Fermentation und den späteren Kolbenexperimenten aufgrund der Unterschiede in Medienzusammensetzung und Kultivierungssystem jedoch nicht vergleichbar und eine Produktion im Fermenter sollte auch für den Stamm MB215/3xΔ-*rua1*↑^R mit genauer Charakterisierung des optimalen Erntezeitpunktes durchgeführt werden. Weitere Optimierung der Medienzusammensetzung und des Fermentationsprozesses (kontinuierliche Fermentation) könnten ebenfalls zu einer zusätzlichen Produktsteigerung beitragen.

Um zukünftig weitere biotechnologische Veränderungen in dem entwickelten Produktionsstamm durchführen zu können, wurde das FLP/FRT-System (Khrunyk *et al.*, 2010) für die Regeneration der Hygromycin Resistenzkassette (Abbildung 23 B) verwendet. Die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Rua1 wurde über das durch (Schuster *et al.*, 2016) für *U. maydis* etablierte CRISPR-Cas9 System vorgenommen, wodurch die genomische

Veränderung ebenfalls ohne den Einsatz einer Selektionskassette erreicht werden konnte. Die Effizienz der Inaktivierung lag hier bei einem von 24 getesteten Klonen, was unter den beschriebenen Effizienzen von 8% bis 100 % liegt. Der hier deletierte Sequenzbereich liegt im N-terminalen Bereich von Rua1 (As 83-85) und führt durch eine Leserahmenverschiebung zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription. Die für die Interaktion von Rua1 mit konservierten Sequenzbereichen verantwortlichen Zink-Finger Motive liegen im C-terminalen Bereich des Proteins (As 663-690 und 718-749) (Teichmann *et al.*, 2010). Eine nicht in einer Leserahmenverschiebung resultierenden Veränderung der Sequenz muss somit nicht zwingend eine Inaktivierung von Rua1 und eine Veränderung des Phänotyps zur Folge haben. Eine Beobachtung bei der Verwendung von CRISPR-Cas9 ist die Veränderung von nicht *target*-spezifischen Sequenzabschnitten, sogenannte *off targets*, welche auftreten, wenn Cas9 trotz Fehlpaarungen zwischen sgRNA und Zielsequenz den Doppelstrang schneidet (Hendel *et al.*, 2015). Die in *U. maydis* identifizierten Sequenzunterschiede zwischen genomeditierten Stämmen und den Vorläuferstämmen konnten jedoch als nicht Cas9 herbeigeführt identifiziert werden (Schuster *et al.*, 2016). Jüngst wurden durch Zuo *et al.* (2020) verbesserte Cas9-Endonuklease in *U. maydis* etabliert, und bezüglich der Effektivität und Tendenz *off targets* zu produzieren, getestet. Von den drei getesteten Varianten zeigte sich die Cas9HF1 (Kleinstiver *et al.*, 2016) als ähnlich effektiv verglichen mit der Wildtyp Cas9. Die gleichzeitige *off target*-Analyse, durch den Verlust eines durch sgRNA-Fehlpaarungssequenzen flankierte GFP-Reporterkassette, zeigten allerdings eine 30 % geringere Tendenz *off targets* zu verursachen (Zuo *et al.*, 2020b). Der erstellte Stamm MB215/*rua1* Δ^C wurde auf mögliche negative Effekte durch die CRISPR-Cas9 vermittelte Deaktivierung der *rua1*-Sequenz überprüft und zeigte keine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit, verglichen mit dem Wildtyp oder einem herkömmlich hergestellten *rua1* Deletionsstamm (Abbildung 22). Eine detaillierte *off target*-Analyse müsste im Zweifelsfall durch eine Kompletengenomsequenzierung erfolgen (Schuster *et al.*, 2016).

4 Ausblick

Die Verwendung von pflanzlicher Biomasse für die Produktion von Bioethanol oder anderen wertvollen Chemikalien erfordert immer effektivere Konzepte, um gegenüber etablierten Öl-basierten Konzepten wirtschaftlich zu sein (Lennartsson *et al.*, 2014). In diesem Bestreben wurden über die letzten Jahre Techniken entwickelt, um nahezu alle Bestandteile von pflanzlicher Biomasse verwerten zu können, und eine Vielzahl dieser Techniken stützen sich auf die Verwendung spezialisierter und teilweise biotechnologisch veränderter Mikroorganismen für die Hydrolyse der Biomasse oder die Fermentation der freiwerdenden Zucker (Ruchala *et al.*, 2020). Speziell die Entwicklung von konsolidierten Bioprozessen ermöglicht es, Arbeitsschritte zusammenzulegen und Kosten im Bioraffineriekonzept einzusparen. Die vorliegende Arbeit sollte zu diesem Konzept einen Beitrag leisten und beschäftigt sich daher sowohl mit der Hydrolyse von pflanzlicher pektinreicher Biomasse und dem Wachstum auf den freiwerdenden GalA Monomeren als auch mit der effektiven Produktion von Ustilaginsäure als Sekundärmetabolit.

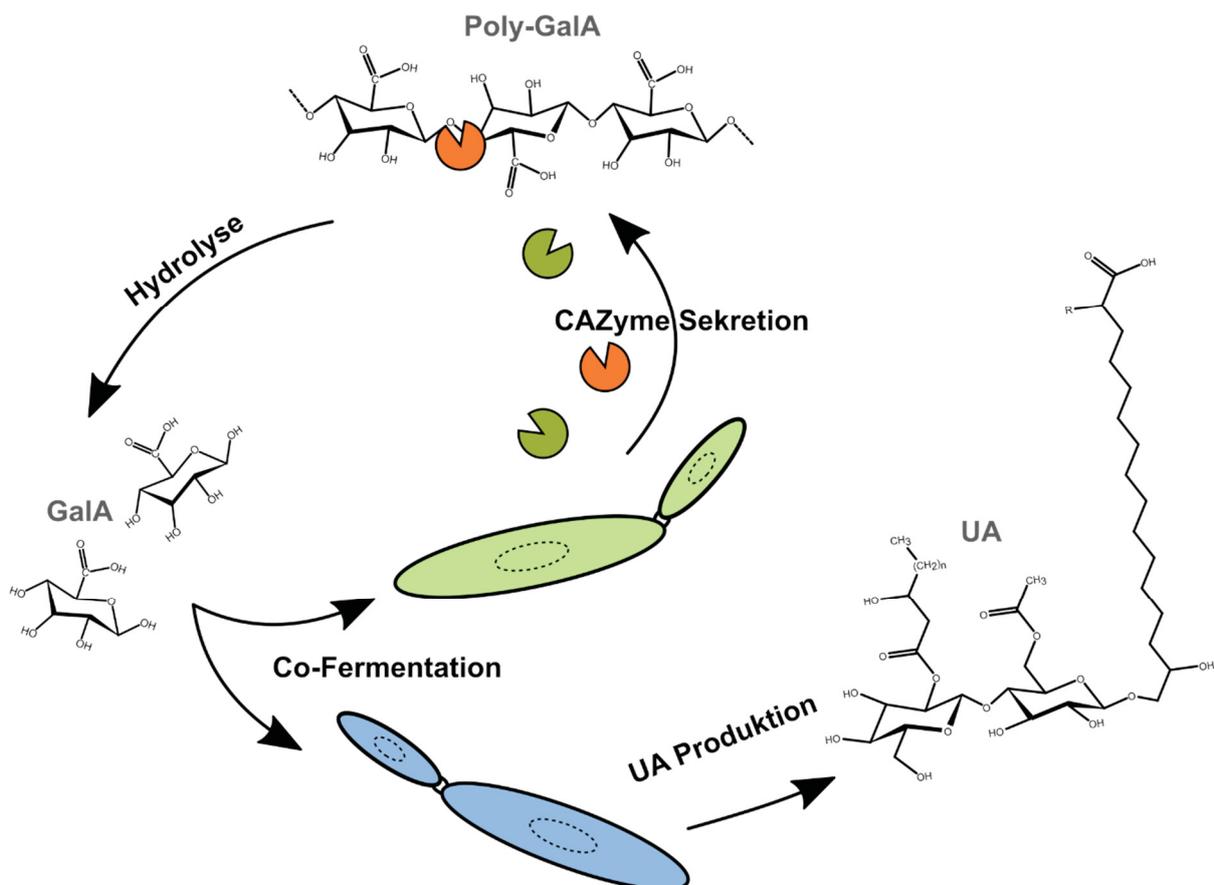


Abbildung 26: Potentielles Co-Fermentationskonzept für die Valorisierung von Polygalakturonsäure (PolyGalA) und der gleichzeitigen Produktion von Ustilaginsäure in einem konsolidierten Bioprozess. Dieses Konzept umfasst den Einsatz spezialisierter Stämme (hell grün), welche ein effektives Set an zusammen wirkenden hydrolytischen Enzymen sekretieren und PolyGalA in monomere Galakturonsäure (GalA) spalten. GalA dient sowohl den CAZyme-produzierenden Stämmen als auch Stämmen spezialisiert auf die effektive, stickstoffunabhängige Produktion von Ustilaginsäure (hell blau) als Kohlenstoffquelle.

Beide Teilaspekte konnten erfolgreich durchgeführt werden und bieten das Potential in der Zukunft in einem konsolidierten Bioprozess zusammengefügt zu werden (Abbildung 26). Ähnliche Verfahren wurden bereits für die Produktion von Itakonsäure aus Lignocellulose durch *N. crassa* oder die Produktion von MELs aus Xylan durch *P. antarctica* beschrieben (Faria *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018).

Die pektinolytische Ausstattung wurde durch die Integration der heterologen Enzyme AtPgaX und AaPgu1 ergänzt und zeigte eine annähernd komplette Hydrolyse des Substrates PolyGalA. Über RAMOS Untersuchungen konnte allerdings festgestellt werden, dass selbst nach Umstellung der *U. maydis* Stämme auf die Verstoffwechslung von GalA diese weiter im Kulturmedium akkumuliert, was für eine langsame Aufnahme von GalA spricht (Stoffels und Müller *et al.*, 2020). In *S. cerevisiae* ist neben GalA auch die Aufnahme und Verstoffwechslung anderer Pentosen ein Problem und ganze Stoffwechselwege müssen heterolog exprimiert (Huisjes *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2019; Kuivanen *et al.*, 2019; Jeong *et al.*, 2020). *U. maydis* ist in der Lage, Pentosen zu verstoffwechseln, zeigt allerdings eine klare Hierarchie in der Präferenz verschiedener Zuckermonomere aus pektinreicher Biomasse mit Arabinose und GalA als geringer favorisierte Kohlenstoffquellen als Glukose, Xylose und Mannose. Dies wurde ebenfalls für *A. niger* beobachtet (Lameiras *et al.*, 2018; Müller, 2019; Schuler *et al.*, 2015). Auch in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von GalA durch die Anwesenheit von Glukose im Medium kompetitiv gehemmt wird; ein Effekt der verringert wird, wenn sich der pH-Wert des Kulturmediums bei 3,5 und somit nahe des isoelektrischen Punktes von GalA befindet (Souffriau *et al.*, 2012). Die Aufnahme von GalA, ist dagegen unabhängig von der Anwesenheit von Glukose und konnte durch die Expression eines GalA spezifischen Transporters (GAT-1) aus *N. crassa* erreicht werden (Benz *et al.*, 2014; Protzko *et al.*, 2018). Erste Versuche diesen GalA Transporter in *U. maydis* zu exprimieren, zeigten keinen Erfolg, da kein Proteinprodukt nachweisbar war. Die Versuche könnten allerdings noch um die Expression von *gatA*, einem GAT-1 Homolog aus *A. niger* erweitert werden, welches in *S. cerevisiae* die Aufnahme von GalA im Vergleich zu der durch GAT-1 steigerte (Protzko *et al.*, 2018).

Die Verringerung des pH-Wertes zu Verbesserung der GalA Aufnahme durch vorhandene Hexosetransporter in *U. maydis* sollte ebenfalls untersucht werden und könnte im Zusammenhang gesteigerter Aktivitäten der sekretierten CAZymes bei niedrigeren pH-Werten für die Hydrolyse von pektinreicher Biomasse vielversprechend sein. Im direkten Gegensatz dazu steht allerdings die erhöhte Aktivität extrazellulärer Proteasen bei niedrigen pH-Werten. AB33P5 Δ^R und der Folgestamm AB33P8 Δ bieten zwar geringere proteolytische Aktivität (Sarkari *et al.*, 2014; Terfrüchte *et al.*, 2018), jedoch nicht der Ustilaginsäure produzierende MB215 Stammhintergrund. Des Weiteren können niedrige pH-Werte filamentöses Wachstum

induzieren (Martínez-Espinoza *et al.*, 2004; Ruiz-Herrera *et al.*, 1995), was aber durch die Deletion von *fuz7*, einer Komponente des Ras/Mitogen-aktivierten MAP Kinase Signalwegs unterbunden werden kann, ohne die Fitness kultivierten Zellen zu beeinflussen (Hosseinpour Tehrani *et al.*, 2019).

Die Verwendung von PolyGalA als Substrat diene der Etablierung des pektinolytischen Enzymsets für die spätere Verwendung auf Pektin und zukünftig gegebenenfalls pektinreicher Biomasse. Zuckerrübenschnitzel sind durch die lokal angesiedelte Zuckerindustrie ein leicht verfügbares Substrat, was keiner besonderen Vorbehandlung bedarf, aber dennoch die meisten charakteristischen Komponenten pflanzlicher Zellwände beinhaltet (Edwards und Doran-Peterson, 2012; Kracher *et al.*, 2014). Dieses weitaus komplexere Substrat benötigt eine Vielzahl an weiteren CAZymes, um vollständig hydrolysiert werden zu können (Glass *et al.*, 2013; Kracher *et al.*, 2014) und kann Grundlage zukünftiger Optimierung der Veredelung pflanzlicher Biomasse durch *U. maydis* sein. Unter den wichtigsten zusätzlichen pektinolytischen Enzymen sollten zunächst Pektin Acetyl- und Methyltransferase hinzugenommen werden, da so eine vollständige Hydrolyse des Homogalakturonans (HG) durch die bereits vorhandenen Polygalakturonasen ermöglicht werden kann.

Studien durch (Couturier *et al.*, 2012) zeigten eine hohe Synergie eines auf Weizenstroh induzierten Sekretoms von *U. maydis* und einem kommerziellen Enzymcocktail von *T. reesei* bei der Hydrolyse von pulverisiertem Weizenstroh. Diese Synergie wurde auf das Set von Arabinofuranosidasen in *U. maydis* zurückgeführt, welches den Mangel an eben diesen CAZymes in *T. reesei* ausgleicht und durch die Depolymerisierung des Arabinoxylans die Zugänglichkeit der Cellulose für sekretierte Cellulasen erhöht. Die logische Erweiterung des Enzymsets schließt daher die fünf vorhandenen Arabinofuranosidasen mit ein. Die Charakterisierung dieser CAZymes hat bereits begonnen und intrinsisch aktivierte Stämme könnten großes Potential in Kombination mit den durch Geiser *et al.* (2016) beschriebenen (hemi-) cellulolytischen Enzymen zeigen.

Die Produktion von Ustilaginsäure konnte über die Erstellung eines mehrfache Deletionen-tragenden Produktionsstammes und der Erhöhung der Stickstoffquelle im Kulturmedium erfolgreich erhöht werden. Durch die konstitutive Expression von *rua1* ist auch die stickstoffunabhängige Produktion in wachsenden Zellen möglich, was für die zeitgleiche Inokulation eines potentiellen Bioprozesses förderlich ist. Weniger Beachtung wurde bislang jedoch der Charakterisierung des Kulturprozesses geschenkt. Es konnte beobachtet werden, dass der Ustilaginsäuregehalt über längere Kultivierungen erneut abnahm, nachdem die primäre Kohlenstoffquelle verstoffwechselt wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Abnahme deutet auf eine Verstoffwechslung der Ustilaginsäure im späten Verlauf der Kultivierung durch *U. maydis* hin, und ist auch schon in *P. flocculosa* durch die Verstoffwechslung des

Cellobioselipids Flocculosin beschrieben (Mimee *et al.*, 2009). Dies verdeutlicht die Bedeutsamkeit der Etablierung des perfekten Erntezeitpunktes oder der Kultivierung unter Zulauf von Nährmedium (Rau *et al.*, 2005). Diese Prozesscharakterisierung wird momentan unter Verwendung des RAMOS Systems für den hier erstellten Produktionsstamm durchgeführt (Carl Brehl, RWTH Aachen).

Housseimpour Tehrani *et al.* (2019) verwendeten das Prinzip der *in situ* Kristallisierung für die erhöhte Produktion von Itakonsäure in einem biotechnologisch optimierten MB215 Stamm. Durch die Bildung von Calcium-Salzen der Itakonsäure wurde die Produkthemmung reduziert und, neben der im Kulturmedium gelösten Itakonsäure, große Mengen an Ca-Itakonat als Präzipitat gewonnen. Produkthemmung ist für Ustilaginsäure nicht beschrieben, allerdings könnte die Reduzierung des pH-Wertes im Prozess auch mit einer geringeren Löslichkeit und Präzipitation von Ustilaginsäure im Kulturmedium einhergehen. Die Isolierung der kristallinen Ustilaginsäure aus dem Zellpellet sollte die Menge an zur Isolierung benötigten Lösemitteln wie Ethylacetat oder Methanol reduzieren. Wie bereits erwähnt birgt die leichte Reduktion des pH-Wertes ebenfalls Potential für die Aufnahme von GalA und die Aktivität der Polygalakturonasen.

Ein großes Problem bei der Anwendung der Ustilaginsäure als bioaktives Agens oder als Biotensid ist die geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Durch die Inkubation von Cellbioselipiden aus *Cr. humicola* in 1 M NaOH konnten Imura *et al.* (2014) die Löslichkeit in wässriger Lösung stark erhöhen, indem Na-Salze der Cellobioselipide gebildet wurden. Diese Erhöhung der Löslichkeit konnte auch in dieser Arbeit für die produzierte Ustilaginsäure festgestellt werden, allerdings unter Verlust der Dekorationen des Cellobioserests (Ergebnisse nicht gezeigt). Die entstehende Struktur sollte Präparationen von Glykolipiden aus *Cr. humicola* ähneln, die fungizide Wirkung gegen *S. cerevisiae*, *C. terreus* und *F. neoformans* zeigen (Kulakovskaya *et al.*, 2009) und sollten daher auf ähnliche antimikrobielle Aktivitäten getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ruhende Potential der Sekretion hydrolytischer Enzyme in *U. maydis* aktiviert und optimiert. Durch eine Verknüpfung der effektiven Hydrolyse von pektinreicher Biomasse und der ebenfalls hier verbesserten, stickstoffunabhängigen Produktion von Ustilaginsäure könnte zukünftig ein durch nachhaltige Rohstoffe unterhaltener Bioprozess für die Produktion des Biotensids Ustilaginsäure entstehen.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

5.1.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Ambion, Amersham, Applichem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Carl Roth, Difco, Duchefa, Fluka, GE Healthcare, Gerbu, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Riedel-de-Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific und VWR bezogen.

5.1.1.2 Enzyme und Kits

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Kits und Größenstandards tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
Lysozym	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Restriktionsendonukleasen (diverse)	NEB
Ribonuklease A	Boehringer
T4 DNA-Ligase	Roché
T5 Exonuclease	NEB
Taq DNA-Ligase	Roché

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung	Anwendungsbereich	Bezugsquelle
AceGlow™ Chemilumineszenz Substrat	Detektion im Western Blot (chemilumineszentes Substrat für Meerrettichperoxidase, HRP)	VWR
CDP-Star®	Detektion im Southern Blot (chemilumineszentes Substrat für alkalische Phosphatase, AP)	Roche
DNA, RNA, and protein purification	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> Kulturen	Macherey & Nagel
Monarch DNA Gel Extraction Kit	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	NEB
PCR DIG Labeling Mix	Herstellung von PCR-Sonden durch Digoxigenin-Markierung (Southern Blot)	Roche
PNGase F	Deglykosylierung von N-glykosylierten Proteinen	NEB
SureClean	Reinigung von PCR-Produkten	Bioline
Medi-Test Glukose-Teststäbchen	Semiquantitative Überprüfung des Glukosegehaltes in Flüssigkeiten	Macherey & Nagel

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Größenstandards.

Bezeichnung	Anwendungsbereich	Bezugsquelle
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 180 kDa)	SDS-PAGE Größenstandard	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	DNA-Gelelektrophorese Größenstandard	Thermo Fisher Scientific
λ -PstI (Enterophage λ DNA, PstI verdaut)	DNA-Gelelektrophorese Größenstandard	laborinterne Herstellung

5.1.2 Lösungen und Medien

5.1.2.1 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

5.1.3 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1987), welche 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden. Antibiotika wurden gemäß Tabelle 6 eingesetzt.

YT-Festmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

8 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
20 g Bacto Agar
Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt

dYT-Glyzerinmedium (Herstellung Glycerinstock)

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
800 ml 87 % Glycerin (f.c. 69,6 %)
Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt

dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt

In den Medien wurden Antibiotika in den in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

Die Kultivierung von *U. maydis* erfolgte in CM-Medium, YNB-Medium und modifiziertem Verduyn-Medium. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medien bei 121 °C für 5 min autoklaviert. Nicht autoklavierte Medienbestandteile wurden unter Nutzung eines 0.22 µm Filtropur BT50 Flaschenaufsatzfilter (Sarstedt) sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der einzelnen Varianten ist im Folgenden dargestellt. Festmedien wurden zwecks Selektion Antibiotika zugegeben, die in Tabelle 7 angegeben sind.

CM (Vollmedium)

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casein-Hydrolysat
0,5 g Heringssperma DNA
1 g Hefeextrakt
10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)
62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)
20 g Bacto Agar (für Festmedium)

Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 1 % Glukose (v/v) zugefügt.

Für das CM FLP Induktionsmedium wurde die Glukose gegen Arabinose ausgetauscht und zusätzlich Antibiotikum zugesetzt (Khrunyk *et al.*, (2010))

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

8 g KH₂PO₄
2 g Na₂SO₄
1 g MgSO₄ * 7 H₂O

Mit H₂O_{bid.} auf 0,5 L aufgefüllt und steril filtriert.

Spurenelemente-Lösung (Holliday, 1974)

60 mg H₃BO₃
191 mg MnCl₂
400 mg ZnCl₂
47 mg NaMoO₄ * 2 H₂O

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin
20 mg Calciumpanthothenat

YNB-Medium (Yeast Nitrogen Base)

1,7 g yeast nitrogen base (w/o amino acids, w/o (NH₄)₂SO₄)

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.
Nach dem Autoklavieren wurde 1 % Glukose-Lösung (v/v) zugefügt.

Verduyn C1 Medium (Verduyn-Medium, modifiziert für CAZyme Produktion)

10 g Glukose (f.c. 1%)
0,5 g KH₂PO₄
4 g NH₄Cl
0,2 g MgSO₄ * 7 H₂O
0,1 g FeSO₄ * 7 H₂O
1,0 mL Spurenelement Lösung
0,1 M MES Puffer, pH 6,0

Verduyn C2 Medium (Verduyn -Medium mod. für Co-fermentation)

4 g Glukose (f.c. 0,4 %)
0,5 g KH₂PO₄
4 g NH₄Cl
0,2 g MgSO₄ * 7 H₂O
0,1 g FeSO₄ * 7 H₂O
1,0 mL Spurenelement Lösung
0,2 M MOPS Puffer, pH 6,0

Dem Medium wurde zusätzlich 2 % (f.c.) Galakturonsäure, bzw. Polygalakturonsäure zugefügt.

Verduyn G Medium (Verduyn-Medium, modifiziert für Glycolipidproduktion)

50 g Glukose
0,5 g KH₂PO₄
0,9 g NH₄NO₃
0,2 g MgSO₄ * 7 H₂O

50 mg p-Aminobenzoesäure
20 mg Nikotinsäure
20 mg Cholinchlorid
40 mg myo-Inositol

Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt

Regenerationsagar (light) (Schulz *et al.*, 1990)

Top-Agar:
182,2 g Sorbitol
10 g Hefeextrakt
4 g Bacto Pepton
4 g Saccharose
15 g Agar

Mit H₂O_{bid.} auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

Bottom-Agar:
50 mg Folsäure
wie Top-Agar mit Antibiotika (s.u.) Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt und steril filtriert.

NSY-Glyzerin (Für Glyzerinkulturen)

8 g Nutrient Broth
1 g Hefeextrakt
5 g Sukrose
800 ml 87% Glyzerin

Mit H₂O_{bid.} auf 1 L aufgefüllt und steril filtriert

0,01 g FeCl₃ * 6 H₂O
1,0 ml Spurenelement Lösung
0,1 M MES Puffer, pH 6,0

Die Einzelkomponenten der Verduyn Medien wurden in Stammlösungen angesetzt, separat autoklaviert und die Arbeitslösung in einem 1 L Volumen mit H₂O_{bid.} gemischt. Die MES, MOPS, FeCl₃, FeSO₄ und Galakturonsäure Stammlösungen wurden steril filtriert.

Spurenelemente Lösung für Verduyn Medium

15 g/L EDTA
4,5 g/L ZnSO₄ * 7 H₂O
4,5 g/L CaCl₂ * 2 H₂O
3 g/L FeSO₄ * 7 H₂O
1 g/L H₃BO₃
0,84 g/L MnCl₂ * 2 H₂O
0,33 g/L CoCl₂ * 6 H₂O
0,3 g/L CuSO₄ * 5 H₂O,
0,4 g/L Na₂MoO₄ * 2 H₂O
0,1 g/L KI

Tabelle 6: In *E. coli* Kulturmedien verwendete finale Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	dYT-Kulturmedium
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Gentamycin	50 µg/ml

Tabelle 7: In *U. maydis* Kulturmedien verwendete finale Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	CM-Festmedium	Regenerationsagar (Bottom)	CM FLP Induktionsmedium
Hygromycin (B)	200 µg/ml	400 µg/ml	-
Nourseothricin	150 µg/ml	300 µg/ml	150 µg/ml
Carboxin	2 µg/ml	4 µg/ml	-
Geneticin	500 µg/ml	1000 µg/ml	-

5.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion AG und Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')
Oligonukleotide für Klonierungen	
oDD932	ACAGCTCTTCCGTGCAATATTTTGGCTATCCGTTGCCTGC
oDD933	AGAGCTCTTCCGGCCTGTCTGACCGCTAGCTGAGCG
oDD934	GAGGCTCTTCCCCTATGGCCTGCCTTTTGCTGGTTGG
oDD935	GAGGCTCTTCCGACAATATTTGGTACTCCTCAGACCACCGC
oMB425	ACAGCTCTTCCGTGCATTTAAATACCTCGAAGCACAACGTACG
oMB426	ACAGCTCTTCCGGCCCCACCCGAGGCACCGTCTTTATGC
oMB427	ACAGCTCTTCCCCTATGGCCTGCCTTTTGCTGGTTGG
oMB428	CGCGCTCTTCCGACATTTAAATACCCGACAATTTGATGTTGG
oMB554	TCAGGATCCATGCGTCTCACCCACGTGCTCTCGCACACGCTCGGTCTGCTCGCTCTCG GCGCCACCGCCGAGGCGTTCTCGCGATCGCGGAGGCCGCTG
oMB555	AGAGGCCGCGTTGGCCATACTAGTGTCCGAGGTGGCGGTG
oUP813	AGAGGGTCTCGCCTGCATTTAAATTGGCTTGACCTCTGGCAACAGCTCTG
oUP814	AGAGGGTCTCCAGGCCGCTCATGCATTTCTCGACACTCACGACTC
oUP815	AGAGGGTCTCCGGCCGAAACAGGGAGGGGGAGGGAG
oUP816	AGAGGGTCTCGCTGCATTTAAATGCTTATTACGTTCTCGCTCTTCATTAC
Oligonukleotide für Sequenzierungen	
oMB314	ATAGGGCCCTTAGTGGTGATGGTGGTGATGATAGTCG
oMB574	CTGGAAGCCCTGCTTGAACGAGTTGGCCTG
oMF167	AACTCGCTGGTAGTTACCAC

Material und Methoden

oMF502	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
oMF503	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
oMF771	ACCTCGCTCGATGCTGAC
oMF964	GATGCTCTCCGTGGCGGCCGCATCCATGGTGTCTGGAGCTCATC
oRL183	CTTCTCGAACTGCGGGTG
oRL1347	CATCACTGAGACGGTACCG
oRL1823	GCGAAGTCCATCTTCTGC
oSL564	CTAGGCCATCTAGGCCATCACGGCGAGGGTCATG
oSL937	CTGTGCTTCTTGCAATGG
oSL1823	GCGAAGTCCATCTTCTGC
oUP322	AGAGCCATGGATGGGCGGTTGCAACGAC

5.1.5 Plasmide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Klonierungsprozedur/ Informationen				Integrations- Iokus <i>U. maydis</i>	Vermittelte Resistenz <i>E. coli</i>	Vermittelte Resistenz <i>U. maydis</i>	Referenz
Verwendete Plasmide								
pDest1	pUJMa1467	Ein Derivat des kommerziell erwerblichen Plasmids pUC57. Mit einer Ampicillinresistenzkassette können <i>E. coli</i> -Transformanten selektiert werden. Die kodierte Gensequenz von LacZ ermöglicht die blau/weiß-Selektion nach Sequenzintegrationen in die multiple Klonierungsstelle. Durch zwei <i>Bsal</i> -Restriktionsstellen im Gen wird bei <i>Bsal</i> -basierter Insertion LacZ zerstört. Das Plasmid diente bei Golden-Gate-Klonierungen mit <i>Bsal</i> als Vektorrückgrat.	-	AmpR	-	Terfrüchte <i>et al.</i> , 2014		
pStorl_1rh (FRT mut1)	pUJMa1523	Dieses Lagerplasmid trägt eine Hygromycinresistenzkassette unter der Kontrolle des P_{hsp70} -Promotors und terminiert durch die <i>Tros</i> -Terminatorsequenz. Die Hygromycinresistenzkassette wird flankiert durch FRT1-Erkennungssequenzen für die FRT-Rekombinase. Nach einer erfolgreichen Integration der Resistenzkassette kann auf diese Weise durch die transiente Transformation des Plasmids pUJMa1889 und die Induzierung des Gens der FRT-Rekombinase, die Resistenzkassette zwischen den FRT-Erkennungssequenzen entfernt werden, wobei eine FRT1-Erkennungssequenz im Genom zurückbleibt (Khrunyk <i>et al.</i> , 2010). Dieses Modul wird durch Erkennungssequenzen für die <i>Bsal</i> -vermittelte Golden-Gate-Klonierung flankiert. Ebenfalls vorhanden ist ein Gentamycinresistenzgen für die Selektion von <i>E. coli</i> -Transformanten.	-	GentR	-	Sarkari <i>et al.</i> , 2014		
pFLPexpN (natR)	pUJMa1889	Dieses selbst replizierende Plasmid auf Grundlage von pNEBUC (Weinzierl, 2001) trägt die für <i>U. maydis</i> kodonoptimierte FLP-Rekombinase unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors (P_{orig}). Die Termination der Transkription wird über den nos-Terminator erreicht. Die Selektion positiver <i>U. maydis</i> -Transformanten kann über die Nourseothricinresistenzkassette erfolgen.	-	AmpR	NatR	Sarkari <i>et al.</i> , 2014		
pUC57 AmpR SapI	pUJMa2074	Ein Derivat des kommerziell erwerblichen Plasmids pUC57. Mit einer Ampicillinresistenzkassette können <i>E. coli</i> -Transformanten selektiert werden. Die kodierte Gensequenz von LacZ ermöglicht	-	AmpR	-	Aschenbroich <i>et al.</i> , 2018		

Material und Methoden

pRabX1P _{oma} :Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR_CbxR	pUIMa2113	die blau/weiß-Selektion nach Sequenzintegrationen in die multiple Klonierungsstelle. Durch zwei SapI-Restriktionsstellen im Gen wird bei SapI-basierter Insertion LacZ zerstört. Das Plasmid diente bei Golden-Gate-Klonierungen mit BsaI als Vektorrückgrat. Die punktmutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (<i>ip</i>), die zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin führt, ermöglicht die Insertion des Plasmids am <i>ip</i> (<i>cbx</i>)-Lokus von <i>U. maydis</i> . Durch die Linearisierung des Plasmids im Gen mittels Restriktion mit <i>AgeI</i> oder <i>SspI</i> und homologer Rekombination am <i>ip</i> (<i>cbx</i>)-Lokus kann auf positive <i>U. maydis</i> -Transformanten selektiert werden. Das Plasmid trägt die Sequenz des konstitutiven, synthetischen Promotors <i>P_{oma}</i> , der aus acht stromaufwärts liegenden Aktivierungssequenzen (<i>engl.</i> : upstream activating sequences; UAS) des <i>prf1</i> -Promotors und dem minimalen <i>mta1</i> -Promotor Flor-Parra <i>et al.</i> , 2006; Hartmann <i>et al.</i> , 1999) besteht. Weiterhin trägt das Plasmid Sequenzen für ein Fusionsprotein aus N-terminaler, bakteriellem β -Glukuronidase (<i>Gus</i>) und C-terminalem <i>Cts1</i> (<i>umag_10419</i>) mit intermediären 2 x <i>Strep</i> , 3 x HA- und His-Affinitätstag (<i>SHH</i> -Tag). Am 3'-Ende der Sequenz des Fusionsgens sind Abschnitte mit der 3'-UTR von <i>ubi1</i> und eine <i>Tnos</i> -Sequenz lokalisiert. Das Plasmid diente als Grundlage für die Integration bakterieller Polygalakturonasene als Fusionskonstrukte für die <i>Cts1</i> -vermittelte unkonventionelle Sekretion. Zur Selektion auf <i>E. coli</i> -Transformanten enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenzkassette.	<i>ip</i> (<i>cbx</i>)	AmpR	CbxR	Sarkari <i>et al.</i> , 2014
pRabX1P _{oma} :Gus-SHH_CbxR	pUIMa2335	Die punktmutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (<i>ip</i>), die zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin führt, ermöglicht die Insertion des Plasmids am <i>ip</i> (<i>cbx</i>)-Lokus von <i>U. maydis</i> . Durch die Linearisierung des Plasmids im Gen mittels Restriktion mit <i>AgeI</i> oder <i>SspI</i> und homologer Rekombination am <i>ip</i> (<i>cbx</i>)-Lokus kann auf positive <i>U. maydis</i> -Transformanten selektiert werden. Das Plasmid trägt die Sequenz des konstitutiven, synthetischen Promotors <i>P_{oma}</i> und die Gensequenz der bakteriellen β -Glukuronidase (<i>Gus</i>) mit 2 x <i>Strep</i> , 3 x HA- und His-Affinitätstag (<i>SHH</i> -Tag). Am 3'-Ende der Sequenz des Fusionsproteins befinden sich Abschnitte mit der 3'-UTR von <i>ubi1</i> und eine <i>Tnos</i> -Sequenz für die Termination der Transkription. Eine Ampicillinresistenzkassette ermöglicht die Selektion von <i>E. coli</i> -Transformanten. Dieses Lagerplasmid beinhaltet eine Nourseothricinresistenzkassette (<i>NatR</i>) und die Sequenz des konstitutiven <i>P_{oma}</i> Promotors flankiert von zwei <i>SapI</i>	<i>ip</i> (<i>cbx</i>)	AmpR	CbxR	Aschenbroich <i>et al.</i> , 2018
pStor1_P _{oma} (SapI)_NatR	pUIMa2443		-	GenfR	NatR	Aschenbroich <i>et al.</i> , 2018

Material und Methoden

pUCIDT_PgaX	pUJMa3106	Restriktionserkennungssequenzen. Dieser Vektor dient in <i>SapI</i> -vermittelten Golden-Gate-Klonierungen als Lagervektor für das <i>NatR-P_{ona}</i> Promotoromodul.	-	AmpR	-	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020
pUCIDT_Pehl_Amp	pUJMa3405	Optimierter Klonierungsvektor des Unternehmens IDT für die direkte Transformation in <i>E. coli</i> . Dieser Standardvektor beinhaltet die für <i>U. maydis</i> dikodonoptimierte Sequenz des Gens <i>atPgaX</i> (X99795.1) aus <i>Aspergillus tubingensis</i> inklusiver der ebenfalls dikodonoptimierten Signalsequenz für die konventionelle Sekretion.	-	AmpR	-	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020
pUCIDT_PguB_Amp	pUJMa3406	Optimierter Klonierungsvektor des Unternehmens IDT für die direkte Transformation in <i>E. coli</i> . Dieser Standardvektor beinhaltet die für <i>U. maydis</i> dikodonoptimierte Sequenz des Gens <i>kpPguB</i> (JQ388228.1) aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Die native Signalsequenz für die konventionelle Sekretion wurde entfernt.	-	AmpR	-	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020
pUCIDT_umePG_Amp	pUJMa3472	Optimierter Klonierungsvektor des Unternehmens IDT für die direkte Transformation in <i>E. coli</i> . Dieser Standardvektor beinhaltet die für <i>U. maydis</i> dikodonoptimierte Sequenz des Gens <i>aaPgu1</i> (XM_020201835) aus <i>Aspergillus aculeatus</i> inklusiver der ebenfalls dikodonoptimierten Signalsequenz für die konventionelle Sekretion.	-	AmpR	-	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020
pStorl-1G_G418R_SapI	pUJMa3560	Dieses Plasmid beinhaltet eine Neomycinresistenzkassette (G418R) unter der Kontrolle des <i>P_{ori1}</i> Promotors und terminiert durch <i>T_{cyc1}</i> . Die Resistenzkassette wird flankiert von zwei <i>SapI</i> Restriktionserkennungssequenzen. Dieser Vektor dient in <i>SapI</i> -vermittelten Golden-Gate-Klonierungen als Lagervektor für die Neomycinresistenzkassette.	-	GentR	G418R	Rink, 2018

Tabelle 9: Fortsetzung

Plasmide für die CAZyme-Expression						
pDest_Poma:umag_02510_N atR	pUMa2822	Ein integratives Plasmid für den Austausch eines Teils der nativen Promotorsequenz (327 bp) durch das NatR-P _{oma} Promotormodul aus pUMa2443. Die Sequenzflanken für die Integration wurden auf gDNA des Stammes UM521 mit Hilfe der Oligonukleotide oMB425 x oMB426 (900 bp) und oMB427 x oMB428 (827 bp) über eine PCR hergestellt und über SapI- vermittelte Golden-Gate-Klonierung mit dem NatR-P _{oma} Promotormodul aus pUMa2443 und dem Vektorrückgrad von pUMa2074 zusammengefügt. Das zu transformierende Konstrukt wird über die Restriktion von zwei, die homologen Sequenzflanken abschließenden SwaI Erkennungssequenzen gewonnen. Zwecks Selektion in <i>E. coli</i> trägt das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen.	umag_02510	AmpR	NatR	Stoffels et al., 2020
pRabX1_Poma_AtPgaX_Cbx R	pUMa3108	Ein integratives Plasmid basierend auf pUMa2335. Dieses Plasmid beinhaltet die durch oMB554 und oMB555 amplifizierte Sequenz von AtPgaX aus pUMa3106 (1338 bp), die über die Restriktion mit BamHI und SfiI gegen die GUS Sequenz aus pUMa2335 ausgetauscht wurde. Das Gen atPgaX steht somit unter der Kontrolle des P _{oma} Promotors und bildet ein Fusionsprotein mit dem oben beschriebenen SHH-Affinitätstag.	ip (cbx)	AmpR	CbxR	Müller et al., 2018
pRabX1_Poma_KpPguB-cts1_CbxR	pUMa3400	Ein integratives Plasmid basierend auf pUMa2113. Über die Restriktionsendonukleasen NcoI und SpeI wurde die Sequenz der Endopolygalakturonase KpPguB aus pUMa3406 (1911 bp), gegen die GUS-Sequenz aus pUMa2113 ausgetauscht. Das Gen kpPguB steht somit unter der Kontrolle des P _{oma} Promotors und bildet ein Fusionsprotein mit dem oben beschriebenen SHH-Affinitätstag und der Sequenz der Chitinase Cts1.	ip (cbx)	AmpR	CbxR	Stoffels et al., 2020
pRabX1_Poma_PcPeh1-cts1_CbxR	pUMa3401	Ein integratives Plasmid basierend auf pUMa2113. Über die Restriktionsendonukleasen BamHI und SpeI wurde die Sequenz der Exopolygalakturonase PcPeh1 aus pUMa3405 (1131 bp), gegen die GUS-Sequenz aus pUMa2113 ausgetauscht. Das Gen pcPeh1 steht somit unter der Kontrolle des P _{oma} Promotors und bildet ein Fusionsprotein mit dem oben beschriebenen SHH-Affinitätstag und der Sequenz der Chitinase Cts1.	ip (cbx)	AmpR	CbxR	Stoffels et al., 2020
pRabX1_Poma_AaPgu1_Cbx R	pUMa3403	Ein integratives Plasmid basierend auf pUMa2335. Dieses Plasmid beinhaltet die Sequenz von AaPgu1 aus pUMa3472 (1089 bp), die über die Restriktion mit BamHI und SpeI gegen die GUS-Sequenz aus pUMa2335 ausgetauscht wurde. Das Gen aaPgu1 steht somit unter der Kontrolle des P _{oma} Promotors und bildet ein Fusionsprotein mit dem oben beschriebenen SHH-Affinitätstag.	ip (cbx)	AmpR	CbxR	Stoffels et al., 2020
Plasmide für die Glykolipidproduktion						
pDest_Poma-rua1-HA	pUMa2933	Dieses Plasmid basierend auf pUMa2113 trägt die Sequenz des Transkriptionsfaktors Rua1 als Fusionskonstrukt mit einem HA-Affinitätstag. Das Fusionskonstrukt steht unter der Kontrolle des P _{oma} Promotors und wird durch T _{nos} terminiert. Über die vorhandene punkt-mutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (ip) wird die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin vermittelt. Die	ip (cbx)	AmpR	CbxR	Rodriges Estevez, 2016

Material und Methoden

pDest_Demt1_Hyg-FRT1	pUMa3631	Integration in den <i>ip</i> -Lokus erfolgt über die Transformation des mittels <i>SphI</i> -Restriktionsverdau linearisierten Plasmids. Des Weiteren vermittelt dieses Plasmid die Ampicillinresistenz für die Selektion in <i>E. coli</i> . Ein integratives Plasmid für die Deletion des Gens <i>emr1</i> durch das Einfügen der FRT1-flankierten Hygromycinkassette aus pUMa1523. Die Sequenzflanken für die Integration wurden auf gDNA des Stammes UM521 mit Hilfe der Oligonukleotide oJP813 x oJP814 (1044 bp) und oJP815 x oJP816 (1024 bp) über eine PCR hergestellt und über <i>Bsal</i> -vermittelte Golden-Gate-Klonierung mit der Hygromycinkassette (HygR) aus pUMa1523 und dem Vektorrückgrad von pUMa1467 zusammengefügt. Das zu transformierende Konstrukt wird über die Restriktion von zwei, die homologen Sequenzflanken abschließenden <i>SwaI</i> Erkennungssequenzen gewonnen.	umag_03117		HygR	Diese Arbeit
pCas9-rua1-cbx	pUMa3739	Trägt die Cas9-Endonuklease unter dem konstitutiven P _{oer} -Promotor sowie die spezifische Targetsequenz für die Deletion des Gens <i>rua1</i> (umag_06458) unter der Kontrolle des <i>U6</i> -Promotors. Beide Sequenzen besitzen eine NLS am 3'-Ende. Die Selektion kann über die vorhandene Ampicillinresistenz in <i>E. coli</i> und über eine Carboxinresistenz in <i>U. maydis</i> erfolgen.	umag_06458	AmpR	CbxR	Björn Sandrock, AG Prof. Michael Bölker
pDest-ria1D-G418R	pUMa4009	Ein integratives Plasmid für die Deletion der <i>ria1</i> Sequenz durch das Einfügen einer Neomycinresistenzkassette. Die Sequenzflanken für die Integration wurden auf gDNA des Stammes UM521 mit Hilfe der Oligonukleotide oJM480 x oJM481 (1038 bp) und oJM482 x oJM483 (1025 bp) über eine PCR hergestellt und über <i>SapI</i> vermittelte Golden-Gate-Klonierung mit der Neomycinresistenzkassette (G418R) aus pUMa3560 und dem Vektorrückgrad von pUMa2074 zusammengefügt. Das zu transformierende Konstrukt wird über die Restriktion von zwei, die homologen Sequenzflanken abschließenden <i>SwaI</i> Erkennungssequenzen gewonnen.	umag_05080	AmpR	G418R	Marius Terfrüchte, unveröffentlicht

5.1.6 Stämme

Tabelle 10: *E. coli* und *U. maydis* Stämme, die in dieser Arbeit generiert und verwendet wurden.

<i>Escherichia coli</i>						
Stämme	Relevanter Genotyp, Resistenz	UMa ¹	Referenz	Transformiertes Plasmid	Veränderter Lokus ²	Vorläufer- Stamm (UMa) ¹ [Referenz]
Top10	<i>F-mcrA</i> Δ(<i>mrrhsdRMS-mcrBC</i>) <i>φ80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) <i>7697 galE15</i> <i>galK16 rpsL(StrR)</i> <i>endA1</i> Δ- <i>Streptomycin</i>	1027	Invitrogen	-	-	-
<i>Ustilago maydis</i>						
Stämme für die Expression von CAZymes						
AB33P5Δ ^R	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> PhleoR	1391	Sarkari <i>et al.</i> , 2014	Genauere Stammbeschreibung in Sarkari <i>et al.</i> 2014	<i>ip (cbx)</i> , <i>umag_04400</i> , <i>umag_11908</i> , <i>umag_00064</i> , <i>umag_02178</i> , <i>umag_04926</i>	AB33
AB33P5Δ ^R /UmPgu1	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>P02510::umag_02510::Poma:</i> <i>:um02510</i> PhleoR, NatR	2030	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020	<i>pDest_Poma:umag_02510_NatR</i> (pUMa2822)	<i>umag_02510</i>	AB33P5Δ ^R (UMa1391)
AB33P5Δ ^R /AtPgaX	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>ip' [P_{oma}AtPgaX:SHH] ip^s</i> PhleoR, CbxR	2106	Müller <i>et al.</i> , 2018	<i>pRabX1_Poma_ppgaX_SHH_CbxR</i> (pUMa3108)	<i>ip (cbx)</i>	AB33P5Δ ^R (UMa1391)
AB33P5Δ ^R /AaPgu1 ³	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>ip' [P_{oma}AaPgu1:SHH] ip^s</i> PhleoR, CbxR	2416	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020	<i>pRabX1_Poma_AaPgu1_SHH_CbxR</i> (pUMa3403)	<i>ip (cbx)</i>	AB33P5Δ ^R (UMa1391)
AB33P5Δ ^R /PcPeh1 ⁴	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>ip' [P_{oma}PcPeh1:SHH:cts1] ip^s</i> PhleoR, CbxR	2402	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020	<i>pRabX1_Poma_Peh1-SHH-Cts1_CbxR</i> (pUMa3401)	<i>ip (cbx)</i>	AB33P5Δ ^R (UMa1391)
AB33P5Δ ^R /KpPguB ⁴	<i>FRT5[um04400 Δ]</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>ip' [P_{oma}KpPguB:SHH:cts1] ip^s</i> PhleoR, CbxR	2401	Stoffels und Müller <i>et al.</i> , 2020	<i>pRabX1_Poma_PguB-SHH-Cts1_CbxR</i> (pUMa3400)	<i>ip (cbx)</i>	AB33P5Δ ^R (UMa1391)

Material und Methoden

Stämme verändert im Glykolipidsyntheseweg						
Stämme	Relevanter Genotyp, Resistenz	UMa ¹	Referenz	Transformiertes Plasmid	Veränderter Locus ²	Vorläufer-Stamm (UMa) ¹ [Referenz]
MB215		1160	Hewald <i>et al.</i> , 2005	-	-	-
MB215/ Δ rua1	<i>um05080</i> Δ <i>HygR</i>	1855	Teichmann <i>et al.</i> , 2010	-	<i>umag_05080</i>	UMa1160
MB215/ Δ emt1	<i>um03117</i> Δ <i>HygR</i>	1856	Hewald <i>et al.</i> , 2005	-	<i>umag_03117</i>	UMa1160
MB215/ Δ emt1_rua1 \uparrow	<i>um03117</i> Δ <i>ip'</i> [<i>P_{oma}rua1</i>] <i>ip</i> ^s <i>HygR</i> , <i>CbxR</i>	1992	Diese Arbeit	pDest_Poma-rua1-HA (pUMa2933)	<i>ip (cbx)</i>	UMa1856
MB215/ Δ rua1 ^C , Δ ria1, Δ emt1	<i>um06458</i> Δ <i>Crisp um05080</i> Δ FRT1[<i>um03117</i> Δ :: <i>HygR</i>] G418R, <i>HygR</i> , <i>CbxR</i>	2509	Diese Arbeit	pDest_Demt1_Hyg-FRT1 (pUMa3631)	<i>umag_03117</i>	Uma2856
MB215/ Δ rua1 ^C	<i>um06458 c.250-256 del</i>	2598	Diese Arbeit	pCas9-rua1-cbx (pUMa3739)	<i>umag_06458</i>	UMa1160
MB215/ Δ rua1 ^C , Δ ria1	<i>um06458</i> Δ <i>Crisp um05080</i> Δ G418R	2856	Diese Arbeit	pDest-ria1D-G418R (pUMa4009)	<i>umag_05080</i>	UMa2598
MB215/3x Δ :rua1 \uparrow	<i>um06458</i> Δ <i>Crisp um05080</i> Δ FRT1[<i>um03117</i> Δ :: <i>HygR</i>] <i>ip'</i> [<i>P_{oma}rua1</i>] <i>ip</i> ^s G418R, <i>HygR</i> , <i>CbxR</i>	2998	Diese Arbeit	pDest_Poma-rua1-HA (pUMa2933)	<i>ip (cbx)</i>	UMa2509
MB215/3x Δ :rua1 \uparrow ^R	<i>um06458</i> Δ <i>Crisp um05080</i> Δ FRT1[<i>um03117</i> Δ] <i>ip'</i> [<i>P_{oma}rua1</i>] <i>ip</i> ^s G418R, <i>CbxR</i>	2999	Diese Arbeit	pFLPexpN (NatR) (pUMa1889)	<i>umag_03117</i>	UMa2998
MB215/ Δ rua1 ^C :rua1 \uparrow	<i>um06458</i> Δ <i>Crisp ip'</i> [<i>P_{oma}rua1</i>] <i>ip</i> ^s <i>CbxR</i>	3021	Diese Arbeit	pDest_Poma-rua1-HA (pUMa2933)	<i>ip (cbx)</i>	UMa2598

1 Interne Nummerierung der Stammsammlung

2 Sequenzen verfügbar über *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) oder *EnsemblFungi*

3 Die Sequenz des intrinsischen Signalpeptids wurde beibehalten

4 Die Sequenz des intrinsischen Signalpeptids wurde über *SignalP 4.1* ermittelt und entfernt um die unkonventionelle Sekretion zu ermöglichen

5.1.7 Computerprogramme und Bioinformatik

Sequenzanalyse und Klonierung:

BLAST2 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Clone Manager 9 (Sci Ed Central Software)

Clustal-Ω (<http://www.clustal.org/omega/>) (Madeira *et al.*, 2019)

ESPrpt 3.0 (<http://esprpt.ibcp.fr/>) (Robert und Gouet, 2014)

NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta *et al.*, 2004)

SignalP V4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Henrik Nielsen, 2017)

(websites last accessed on 05/08/2020)

Literaturrecherche und Datenbanken:

EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/>)

MycoCosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) (Grigoriev *et al.*, 2014)

NCBI - National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(websites last accessed on 05/08/2020)

Firmware für Messgeräte:

Biolection 2.4.5.0 (M2P Labs GmbH)

Iris V5.3 Bioreactor operation software (Infors AG)

i-control™ Microplate Reader Software (Tecan Trading AG)

ImageQuant LAS4000 Control Software (GE Healthcare)

Datenanalyse, Textverarbeitung und Grafikbearbeitung:

Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation)

Inkscape 1.0 (Software Freedom Conservancy)

Canvas 12 (ACDSee Systems)

Meta Morph (Version 7)

Image J (Version 2.0.0)

5.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

5.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Alle Arbeiten wurden mit dem *E. coli* Stamm Top10 durchgeführt (Tabelle 10).

5.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Antibiotika wurden wie unter 5.1.3 eingesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 200 Upm im Erlenmeyerkolben oder im Reagenzglas auf dem Drehrad inkubiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37 °C.

5.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von *Escherichia coli* Kulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Biophotometer 6131 (Eppendorf) bei 600 nm bestimmt. Die Kulturen wurden vor der Messung mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt, sodass die OD₆₀₀ der Verdünnung einem Wert von 0,2 - 0,5 entspricht und die lineare Abhängigkeit sichergestellt ist. Das zur Verdünnung genutzte Kulturmedium wurde für die Messung des Nullwerts verwendet. Eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

5.2.1.3 RbCl-Transformation von *Escherichia coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.*, (1972). Die Herstellung der transformationskompetenten Bakterienzellen wurde in 100 ml dYT-Medium, versetzt mit 10 mM MgCl₂ und MgSO₄, durchgeführt. Das Medium wurde mit einem Inokulum von 1 ml einer frischen Top10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 unter den oben angegebenen Kulturbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 1.250 g und 4 °C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 60 min. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (15 min, 1.250 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation von 15 min auf Eis wurde die Zellsuspension zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils ein Aliquot mit 1 bis 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 sek bei

42 °C wurde der Transformationsansatz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min schüttelnd und bei 37 °C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Gentamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ * 4 H₂O
30 mM KAc
10 mM CaCl₂ * 2 H₂O.
15% (v/v) Glycerin in H₂Obid.,
Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

RF2-Lösung

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ * 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin in H₂Obid
Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

5.2.2 Arbeiten mit *Ustilago maydis*

5.2.2.1 Kultivierung von *Ustilago maydis*

Die Kultivierung von *U. maydis* Stämmen wurde auf Festmedien oder als Schüttelkultur unter aeroben Bedingungen bei 28 °C durchgeführt. Je nach Methode wurden die Kulturen in Schikanekolben bei 200 Upm oder in Rundkolben bei 300 Upm inkubiert. Kulturen auf Festmedien wurden aus Glycerinkulturen inokuliert, 48 h bei 28 °C inkubiert und dann nicht länger als vier Wochen auf 4 °C gelagert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien angeimpft. Weitere Sonderformen der Kultivierung sind im Folgenden genauer beschrieben, oder bei der Darstellung der Ergebnisse entsprechend vermerkt.

5.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte von *Ustilago maydis* Kulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Biophotometer 6131 (Eppendorf) bei 600 nm bestimmt. Die Kulturen wurden vor der Messung mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt, sodass die OD₆₀₀ der Verdünnung einem Wert von 0,2 - 0,5 entspricht und die lineare Abhängigkeit sichergestellt ist. Das zur Verdünnung genutzte Kulturmedium wurde für die Messung des Nullwerts verwendet. Eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

5.2.2.3 Transformation von *Ustilago maydis*

Dieses Protokoll wurde modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer Kultur auf Festmedium wurde eine 3 ml YEPSL-Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 28°C auf dem Drehrad inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag 1:2000 in 50 ml frischem YEPSL-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 (1-2 x 10⁷ Zellen/ml) (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1.250 g, 5 min, 4°C) geerntet, mit 25 ml SCS gewaschen und in 4 ml SCS mit 12,5 mg/ml Glucanex (Sigma) resuspendiert. Die bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt. Während dieses Prozesses nehmen die sonst zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine rundliche Form ein. Nachdem etwa 1/3 der Zellen sichtbar protoplastiert (5 - 15 min) waren, wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten für 10 min bei 735 g (4°C) pelletiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt, um alle Rückstände des Glucanex zu entfernen. Im Folgenden wurde ein finaler Waschschrift mit 10 ml STC durchgeführt und die pelletierten Zellen in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die Protoplasten wurden aliquotiert, frisch verwendet, oder zur späteren Benutzung bei -80°C gelagert. Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1 bis 10 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1 bis 5 µl zirkulärer Plasmid-DNA (ca. 0,5 – 3 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden 0,5 ml STC/PEG zugegeben und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer frisch hergestellten Regenerationsagarplatte (4.1.2) ausgestrichen. Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten CM-Platten vereinzelt. Im Folgenden wurden einzelne Kolonien auf die korrekte Integration des Konstrukts kontrolliert.

SCS

20 mM Natriumcitrat
1 M Sorbitol in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

STC/PEG

15 ml STC
10 g PEG 4000

Heparinlösung

15 mg/ml Heparin in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

5.2.2.4 *Ustilago maydis* Fermentation

Die Fermentation von *U. maydis* Stämmen wurde in einem Infors™ Minifors Benchtop Bioreaktor durchgeführt. Für die Fermentation wurde modifiziertes Verduyn G Medium

verwendet und die Kultivierung in einem Totalvolumen von 3 L durchgeführt. Alle autoklavierbaren Komponenten (2,37 L) des Mediums wurden im voll assemblierten Fermenter ohne die nicht autoklavierbaren Komponenten vorbereitet. Diese wurden sterilfiltriert und nachträglich (Restvolumen 0,63 L) über eine Peristaltikpumpe zugeführt. Für die Inokulation wurde eine Vorkultur in Verduyn G Medium und eine Hauptkultur in 100 ml Verduyn G Medium vorbereitet. Aus der Hauptkultur wurde der Fermenter über einen sterilen Inokulationszugang mit einer 50 ml Spritze inokuliert. Während der Fermentation wurde der pH-Wert über 2,5 M NaOH und 1 N H₂SO₄-Gabe konstant gehalten. Schaumbildung wurde über die Zugabe von *Antifoam* 204 (Sigma-Aldrich) reguliert. Während der Kultivierungsdauer von 40 h wurden für die *Offline*-Beprobung in regelmäßigen Abständen 20 ml Fermentationsbrühe steril entnommen. Die technischen Daten des Infors™ Minifors Benchtop BioReaktors sind im Folgenden aufgeführt.

Infors™ Minifors Benchtop Bioreaktor Technische Daten und Ausstattung

Gesamtvolumen:	5,0 L
Arbeitsvolumen:	1,4 – 3,5 L
Schikane:	3 Schikanen, rostfreier Stahl
Impeller:	2x Rushton-Impeller (6 Schwerter pro Impeller)
Rotor:	80 W externer Motor (50 – 1250 Upm)
O ₂ -Sonde:	Hamilton™ Oxyferm FDA (10 ppb – 40 ppm)
pH-Sonde:	Mettler Toledo™ 405-DPAS-SC-K8S/325 (pH 2 – pH 12)
Peristaltikpumpen:	3,2 cm Durchmesser, 0.14 – 12.5 mL/min
Temperaturregelung:	PT-100 Sensor (5 °C – 60 °C), aktive Wasserkühlung/ -heizung
Begasung:	Luftbegasung durch internen Gasverteiler (8 x 0.8 mm Bohrung, 16 - 166 ccm/min)
Antischaum:	Sonde durch Kreislaufschleißung

5.2.3 RAMOS-Kultivierung für *Ustilago maydis*

Die Kultivierung von *U. maydis* Kulturen wurde in 250 mL Rundkolben, modifiziert für die Nutzung in der RAMOS (Respiration Activity MONitoring System) Anlage (Anderlei und Büchs, 2001) durchgeführt. Kommerzielle Versionen der RAMOS Anlage sind verfügbar über die Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) oder HiTec Zang GmbH (Herzogenrath, Deutschland). Die Kolben wurden mit 20 mL Medium befüllt und bei einer Schüttelfrequenz von 300 Upm und einem Schütteldurchmesser von 50 mm geschüttelt. Die Vorkulturen wurden mit 500 µl Zellsuspensionen aus Kryokulturen in Verduyn C1 mit 20 g/L Glukose inokuliert und für 16 bis 24 h kultiviert, bis die C-Quelle verbraucht war. Hauptkulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,6 aus der Vorkultur inokuliert. Bei Co-Fermentationen wurden die Stämme in gleichen Verhältnissen inokuliert. Als C-Quelle für Kulturen der *online*-Messungen der pektinolytischen Wirkung von *U. maydis* Überständen wurden dem Verduyn Medium 4 g/L Glukose und 20 g/L (Poly) Galakturonsäure zugegeben. Da die Verstoffwechslung von GalA zu einer Erhöhung

des pH-Wertes führt, wurde das Verduyn Medium mit 0,2 M MOPS gepuffert und auf einen pH-Wert von 6 eingestellt (Verduyn C2).

Die *online*-Messung der Sauerstofftransferrate (OTR), der Kohlenstoffdioxidtransferrate (CTR) und des Respirationsquotienten (RQ) ermöglichten die Überwachung der Stoffwechselaktivität der Kulturen. Basierend auf dem RQ wurden Kultivierungsphasen der C-Quellen Glukose und GalA identifiziert (Müller *et al.*, 2018). Die GalA-Konsumierung der Kultur begann nachdem die OTR und der RQ aufgrund der Erschöpfung der Glukose absanken. Das Ende der GalA-Verstoffwechslung wurde definiert als der Zeitpunkt, ab dem der RQ unter einen Wert von 1,0 fiel. Der total veratmete Sauerstoff wurde genutzt um die verbleibende Konzentration von (Poly)GalA im Kulturmedium zu ermitteln, wie beschrieben in Müller *et al.* (2018).

5.2.4 Wachstumsanalysen von *Ustilago maydis* im BioLector I System

Wachstumsanalysen verschiedener Stämme wurden im BioLector I System von m2p Labs (Baesweiler, Germany) durchgeführt. Dadurch wurden detaillierte Wachstumsbedingungen in vielen, parallelen Kulturansätzen bei gleichzeitiger *online* Erfassung ermöglicht. Die Kultivierung fand in einer herstellereigenen 48-Roundwell-Kultivierungsplatte (ohne Optoden) statt. Aus 24 h kultivierten Vorkulturen wurde ein Kulturvolumen von 1,5 ml auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bei 1000 Upm (Schütteldurchmesser 3 mm), 28°C und inokuliert. Sofern nicht anders angegeben wurden zwei technische Replikate inokuliert und das entsprechende Kulturmedium als Hintergrund in einem technischen Duplikat gemessen. Die Messung erfolgte alle 60 min unter Verwendung des Filtersets für rückgestreutes Licht ($\lambda = 620$ nm, Gain: 30). Wurden Proben während der Kultivierung genommen, wurde der Vorgang kurzfristig pausiert und die Membran der zu bearbeitenden Wells zur Probenahme durchstoßen. Die Wells wurden anschließend erneut versiegelt und für die Auswertung der Daten für rückgestreutes Licht nicht mehr berücksichtigt. Die Verarbeitung und Auswertung der Daten geschah mit Hilfe der Computerapplikation BioLector (Version 2.4.5) von m2p-Labs.

5.3 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken, wie die Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, sowie Klonierungstechniken wurden gemäß Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Wurden Kits benutzt, wurde entsprechend der Herstellerangaben gearbeitet.

5.3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch in einem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies) bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀ = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren wurde über den Quotienten aus den Absorbstionswerten A₂₆₀ zu A₂₈₀ ermittelt. Der angestrebte Wert für reine DNA bzw. RNA liegt bei etwa 1,8. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern hin.

5.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

5.3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*:

Die Isolierung erfolgte über „Lyse durch Kochen“ nach Sambrook *et al.* (1989). 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (6.080 x g, 2 min, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in 200 µl STET resuspendiert und 20 µl Lysozym-Lösung zugegeben. Die Probe wurde gut gemischt und 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 16.200 x g zentrifugiert und das resultierende Pellet mit einem sterilen Zahnstocher aus der klaren Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 500 µl Isopropanol unter Zugabe von 20 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 16.060 x g. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 50 °C für wenige Minuten getrocknet. Nach dem Trocknen wurde 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) mit 20 µg/ml RNase A zugegeben und das DNA-Pellet resuspendiert.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM Na₂-EDTA
8% (w/v) Saccharose in H₂O_{bid}.

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
5% (v/v) Triton X-100 in H₂O_{bid}.

5.3.2.2 Phenolfreie DNA-Isolierung aus *Ustilago maydis*

Diese Methode wurde modifiziert nach Hoffman & Winston (1987) und ist beschrieben in Bösch *et al.* (2016). Dabei wurden 2 ml einer Übernachtskultur in CM-Flüssigmedium in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (16.200 x g, 1 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl Glaskugeln und 500 µl Ustilago-Lysispuffer (50:50 mit 1 x TE-Puffer verdünnt) versetzt. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt und im Anschluss für 15 min auf einem Thermomixer compact (Eppendorf) bei 65 °C inkubiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurde den Proben 100 µl 8M Natriumacetat zugegeben und 10-fach invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 16.200 x g für 15 min wurden 500 µl des Überstands zur Fällung der DNA in 40 µl Isopropanol überführt und mehrfach invertiert. Nach erneuter Zentrifugation (16.200 x g, 30 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl EtOH gewaschen. Das daraus resultierende Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase-A aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Lysepuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8
100 mM NaCl
1% (w/v) SDS
2% (w/v) Triton x-100
5 mM EDTA in H₂O_{bid}.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA in H₂O_{bid}.

5.3.3 PCR-Techniken

5.3.3.1 Standard-PCR-Ansätze:

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 20 ng Matrizen-DNA, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (1 µM) und 125 µM dNTPs (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,3). Es wurde 1 U Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Ein Standard-PCR-Volumen betrug 50 µl. Ein Standard-Programm begann mit einem Denaturierungsschritt bei 98 °C für eine Minute, gefolgt von einem 30-fach wiederholten Zyklus bestehend aus 30 s

Denaturierung bei 98 °C, 30 s Anlagerung bei 65 °C und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 30 s/1 kb erwarteter Amplifikatslänge. Abschließend wurde ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (Labcyler, SensoQuest).

5.3.3.2 Gibson Assembly

Die Methode des Gibson Assembly, modifiziert nach Gibson *et al.* (2009), ermöglicht das schnelle und Restriktionsendonuklease-freie Zusammenfügen größerer DNA-Fragmente in einer einzigen, isothermalen Reaktion. Für die isothermale Verknüpfung der DNA-Fragmente wurden diese in einer PCR mit einer *proofreading*-Polymerase so erstellt, dass sie überlappende Sequenzen in das jeweils nächste, zu verbindende Fragment aufwiesen. Es wurden Oligonukleotide von mindestens 40 bp Länge verwendet, deren 3'-Region in der zu amplifizierenden Region der Matrizen-DNA band und die einen 20 bp langen, zum 3'-Ende des Partnerfragments revers-komplementären Überhang enthielten. Die Fragmente wurden über ein Agarosegel, bzw. durch EtOH-Fällung aufgereinigt und zusammen mit T5 Exonuklease, Phusion™ DNA-Polymerase und DNA-Ligase in die Isothermalreaktion eingesetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 50 °C im Thermocycler wurden die Reaktionsansätze in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

5 x Isothermalpuffer für Gibson Assembly:

3 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5
150 µl 2 M MgCl₂
60 µl 100 mM dGTP
60 µl 100 mM dATP
60 µl 100 mM dTTP
60 µl 100 mM dCTP
300 µl 1 M DTT
1,5 g PEG-8000
300 µl 100 mM NAD
Bis zu einem Volumen von 6 ml mit H₂O_{bid.}
auffüllen und in 320 µl Aliquots auf -20 °C lagern

Gibson Assembly Master Mix:

320 µl 5x Isothermalpuffer
6.4 µl 1 U/µl T5 Exonuclease
20 µl of 2 U/µl Phusion DNA Polymerase
160 µl of 40 U/µl Taq DNA Ligase

Bis zu einem Volumen von 1,2 ml mit H₂O_{bid.}
auffüllen und in 15 µl Aliquots auf -20 °C lagern.

Gesamtvolumen der Reaktion 20 µl.

5.3.3.3 Golden-Gate-Klonierung

Die Golden-Gate-Klonierung, durchgeführt nach Engler *et al.*, 2008 und Terfrüchte *et al.*, 2013, wurde für die Erstellung von Plasmiden in einer *One Pot*-Reaktion verwendet. Die Methode ermöglicht es, über Typ IIS Restriktionsendonukleasen mehrere DNA-Fragmente zu verbinden, ohne für jedes der Fragmente ein separates Klonierungsereignis durch Restriktion, Ligation und Transformation durchzuführen. Die hier verwendeten TypIIS Restriktionsendonukleasen waren *SapI* oder *BsaI*. Durch die Positionierung der Erkennungssequenz am terminalen Ende und der passend entworfenen Restriktionssequenz am proximalen Ender des DNA-Fragments wird die Erkennungssequenz entfernt und eine weitere Restriktion an dieser Stelle verhindert. So zusammengefundene komplementäre Überhänge bleiben bei weiteren Restriktionszyklen verbunden. Die im Golden-Gate-Ansatz enthaltene T4-DNA-Ligase vermittelt die Ligation der vorhandenen Einzelstrangbrüche, sodass im Anschluss der Reaktion der Ansatz in kompetente *E. coli* Zellen transformiert werden kann. Die in den Ansatz gegebenen Flanken wurden zuvor mittels PCR hergestellt und gereinigt, während Donor- und Ziel-Plasmid zirkulär in die *One Pot*-Reaktion gegeben wurden.

Typischer Ansatz für die Golden-Gate-Reaktion:

75 ng Donor-Plasmid (Resistenzkassette)
 75 ng Ziel-Plasmid (Vektorrückgrat)
 40 ng DNA-Fragment (stromaufwärts Flanke)
 40 ng DNA-Fragment (stromabwärts Flanke)
 1,5 µl T4-DNA-Ligase
 0,5 µl Restriktionsenzym (Typ IIS)
 1,5 µl 10 x T4-DNS-Ligase Puffer [1x]
 auf 15 µl mit H₂O bid. auffüllen

Typisches Thermocyclerprogramm:

37 °C 2 min
 16 °C 5 min } 50x
 — — — — —
 37 °C 5 min
 50 °C 5 min
 80 °C 5 min
 — — — — —
 4 °C ∞

5.3.3.4 Genomische Deletion mittels CRISPR–Cas9 System

Die spezifische Disruption von Genen in *U. maydis* wurde nach dem veröffentlichten Protokoll von Schuster *et al.* (2016) durchgeführt. Benutzt wurde ein System in dem die Typ II Endonuklease Cas9 von einer *single guidance RNA* (sgRNA) zu einem spezifischen Sequenzabschnitt geleitet wird und dort einen Doppelstrangbruch erzeugt. Die Reparatur dieses Doppelstrangbruchs wird durch *non-homologous end joining* (NHEJ) vermittelt, was nicht selten zu Deletionen kurzer Abschnitte oder Substitutionen führt. Das hierfür verwendete Plasmid pCas9-*rua1-cbx* (pUMa3739) (Tabelle 9) wurde durch die AG Bölker (Philipps Universität Marburg) zur Verfügung gestellt und trägt sowohl die Cas9 Endonuklease unter der Kontrolle des konstitutiven P_{otef}-Promotors, als auch die spezifische Targetsequenz für das Gen *rua1* (*umag_06458*) unter der Kontrolle des U6-Promotors aus *U. maydis*. Beide kodierenden Sequenzen besitzen für die korrekte Translokation in den Zellkern eine Zellkernlokalisationssequenz (NLS) am 3'-Ende. Die verwendete Targetsequenz wurde über

die Onlineapplikation der Seite www.e-crisp.org ermittelt und sollte das zielgenaue Manipulieren des Gens *umag_06458* ermöglichen. Das Plasmid wurde in Protoplasten des Stamms MB215 (UMa1160) unter der Verwendung von Carboxin als Selektionsmarker transient transformiert.

5.3.3.5 FLP/FRT-Resistenzmarker-Recycling

Das Recycling von Resistenzmarkern wurde für den Einsatz in *U. maydis* durch Khrunyk *et al.* (2010) beschrieben und etabliert. Es nutzt die Aktivität einer Sequenz-spezifischen Rekombinase FLP, die es ermöglicht Sequenzbereiche zwischen FRT-Erkennungssequenzen durch Rekombination aus dem Genom zu entfernen, während eine FRT-Erkennungssequenz im Genom verbleibt. Wurde eine Resistenzkassette flankiert von zwei FRT-Erkennungssequenzen in das Genom integriert, kann der Resistenzmarker so rekombinativ entfernt werden. Werden mehrere so vermittelte Rekombinationen in einem Stamm durchgeführt, muss darauf geachtet werden, in den FRT-Erkennungssequenzen Punktmutationen einzuführen, um ungewollte Rekombinationsereignisse zwischen verbliebenen FRT-Erkennungssequenzen zu vermeiden.

Protoplasten des zu behandelnden Stammes wurden mit dem Plasmid pUMa1889, welches eine Nourseothricin-Resistenz trägt, transformiert (5.2.2.3) und die erhaltenen Klone auf Nourseothricin-haltigem CM-Festmedium vereinzelt. Fünf dieser Klone wurden in 20 ml CM-Flüssigmedium mit 1% Arabinose und 150 µg/ml Nourseothricin inokuliert und die Expression von FLP bei 28 °C und 200 upm induziert. Ab einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden mit sterilem H₂O_{bid.} Verdünnungen von 1:1000 und 1:10000 hergestellt und davon entsprechend 20 µl und 100 µl auf CM-Glc Agar ausplattiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf CM-Glc Festmedium und CM-Glc Festmedium supplementiert mit dem Antibiotikum entsprechend der zu entfernenden Resistenzkassette ausgestrichen und bei 28 °C für zwei Tage inkubiert. Die in der Gegenselektion als negativ identifizierten Klone haben die Resistenzkassette verloren. Die entsprechenden auf dem CM-Glc-Festmedium gewachsenen Klone wurden in 3 ml CM-Glc Flüssigmedium inokuliert und nach ca. 24 h in frisches Medium passagiert. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt und die Kulturen durch Ausstreichen auf CM-Glc-Festmedium mit Nourseothricin auf das Vorhandensein des Plasmides pUMa1889 überprüft.

5.3.3.6 Herstellung genspezifischer DNA-Sonden

Genspezifische Sonden wurden nach einem Standard PCR-Protokoll 5.3.3.1 unter Einsatz von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) markiert. Anstelle von dNTPs wurde 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche) verwendet. Es wurden die gleichen Oligonukleotide und Konditionen verwendet, die auch schon für die Amplifikation der homologen Sequenzabschnitte (Flanken) des transformierten Plasmids genutzt wurden.

5.3.4 Sequenz- und Strukturanalyse

Die DNA-Sequenzierung erfolgte über den Sequenzierungsservice im Institut für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München und wurde nach der Sanger-Methode in einem Abi 3730 96-Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurde das Sequenzier-Kit BigDye-Terminator v 3.1 (Applied Biosystems) verwendet. Ebenfalls wurden Sequenzierungen über den *Overnight Sequencing*-Service der Firma Eurofins (Ebersberg) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß den Angaben durch den Sequenzierservice und die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm CLONEMANAGER (Version 8 und Version 9; Sci Ed Central) ausgewertet.

5.3.5 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

5.3.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind negativ geladen und diese Ladung steigt proportional zu ihrer Größe (Länge in bp). Durch diese Ladung werden sie in der Gelelektrophorese zur Anode hingezogen und gleichzeitig durch die Reibungskräfte im Agarosegel verlangsamt. Um Nukleinsäuren aufzutrennen, wurden diese auf ein 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetragen. Hierfür wurde die Agarose in 1 x TAE Puffer aufgekocht. Nach vollständigem Lösen der Agarose wurde das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt und mit 0,01 % (w/v) einer 5 mg/ml Ethidiumbromidlösung vermischt. Die Gellösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und mit einem geeigneten Kamm versehen. Während des Polymerisierungsvorgangs wurden die Nukleinsäureproben mit Auftragspuffer versehen. Das polymerisierte Gel wurde mit 1 x TAE Puffer in einer Gelelektrophoresekammer gelegt, der Kamm entfernt und die vorbereiteten Proben aufgetragen. Um die Bandengrößen abschätzen zu können wurden, ein im Labor hergestellter λ -PstI Größenstandard (Enterophagen DNA λ mit PstI restringiert) oder kommerziell

erworbene GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher) als Größenstandard verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einem elektrischen Feld von 100 – 120 V durchgeführt und die erhaltene Auftrennung der Nukleinsäuren unter UV-Licht bei 254 nm mit einer Kamera (Stratagene) dokumentiert.

50 x TAE-Puffer:

2 mM Tris-Base
2 mM Essigsäure (>99,7 %)
10 % (v/v) 0,5 M EDTA (pH 8,0)
in H₂O_{bid.}

Auftragspuffer:

30 % (v/v) Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau

5.3.5.2 Transfer von DNA (Southern Blot-Analyse)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). DNA-Fragmente werden zunächst über ein Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel via Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Bei dieser Technik wird eine Transfer-Lösung (20x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Der Pufferstrom durch das Gel eluiert dabei die DNA-Fragmente, welche dann an die Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) binden können. Das Agarosegel wurde nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente in drei je 20 min Inkubationsschritten in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert. Die so vorbereiteten Gele wurden über eine Salzbrücke aus Whatman® Papier (1 mm) mit dem Pufferreservoir verbunden und mit einer Nylonmembran überdeckt. Die Membran wurde mit zwei weiteren Schichten Whatman®Papier und einem Stapel Papierhandtücher abgedeckt. Überstehende Bereiche der Salzbrücke wurden mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) abgedeckt um Kurzschlüsse über die Lage Papierhandtücher zu vermeiden. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht oder unter mehrfachem Wechsel der Papiertücher für mindestens 4 h. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) mit einem UV-Strato-Crosslinker (Stratagene) fixiert.

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat * 2 H₂O
in H₂O_{bid.}
pH-Wert mit HCl auf 7,0 einstellen

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
282 mM Tris-HCl
218 mM Tris-Base
in H₂O_{bid.}

5.3.5.3 Der spezifische Nachweis immobilisierter DNA

Die Hybond-N+-Membranen (Amersham GE Healthcare Life Science) wurden zur Äquilibrierung mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65 °C inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und die Membranen mit der für 5 min bei 95 °C

denaturierten Sonde über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Membranen für je 15 min bei 65 °C mit 2x SSPE + 0,1% SDS, 1x SSPE + 0,1% SDS und 0,1x SSPE + 0,1% SDS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Raumtemperatur durchgeführt. Die Membran wurde für 5 min in DIG-Waschpuffer, für 30 min in DIG2-Lösung und für 30 min in DIG2-Antikörper-Lösung (1:20.000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten für 20 min in DIG-Waschpuffer wurde die Membran in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte in einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Science).

20x SSPE-Puffer:

3 M NaCl
200 mM Na₂HPO₄
20 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid}.
pH auf 7,4 einstellen

Denhardt-Lösung:

2 % (v/v) BSA Fraktion V
2 % (v/v) Ficoll
2 % (v/v) PVP
in H₂O_{bid}.

Hybridisierungspuffer:

26 % (v/v) 20 x SSPE
5 % (v/v) Denhardt-Lösung
5 % (v/v) 10 % SDS
in H₂O_{bid}.

Waschpuffer I:

2 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid}.

Waschpuffer II:

1 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid}.

Waschpuffer III:

0,1 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid}.

DIG-Waschlösung:

0,3 % (v/v) Tween-20
in DIG1-Lösung

DIG1-Lösung:

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
in H₂O_{bid}.
mit NaOH pH auf 7,5 einstellen

DIG2-Blockierungslösung:

2 % (w/v) Magermilchpulver
in DIG1-Lösung

DIG3-Lösung:

1 M Tris/HCl
1 M NaCl
in H₂O_{bid}.
pH auf 9,5 einstellen

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad, 1/5 verdünnt) mit 10 µl Proteinlösung gemischt. Die Proben wurden, wenn notwendig, verdünnt in die Konzentrationsbestimmung eingesetzt, um im Messbereich der Standardkurve (BSA in den Konzentrationen 50, 100, 150 und 200 µg/ml) zu liegen. Die photometrische Bestimmung der Proteinlösungen, sowie die Messung der Standardreihe, wurden in Dreifach-Bestimmung auf einer 96-Well-Platte im Fluoreszenz-Spektrometer (Infinite M200, TECAN; Extinktion 595 nm) durchgeführt. Die Berechnung der Proteinkonzentration fand über die aus den gemessenen BSA-Standards erstellte Eichgerade statt.

5.4.2 Proteinisolierung

5.4.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden jeweils 2 ml einer 50 ml Kultur bei 21.000 x g pelletiert und das Pellet in denaturierendem oder nativen Zellextraktionspuffer resuspendiert. Die Ernte der Zellen wurde nach 24 h Kultivierung durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Mahlbechern pipettiert und der Aufschluss der Zellen bei 4 °C in einer Schwingmühle (Retsch; 10 min; 30 Hz) durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei 21.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford entnommen.

Denaturierender Zellextraktionspuffer:

1 % (v/v) 0,1 M PMSF-Lösung (in EtOH)
 0,5 % (v/v) 0,5 M Benzamidin-Lösung (in H₂O_{bid.})
 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Lösung
 1 % (v/v) 1 M DTT-Lösung (in H₂O_{bid.})
 in Lysispuffer

Lysispuffer:

10 mM Tris/ HCl (pH 8,0)
 8 M Harnstoff
 in 0,1 M NaPi (pH 8,0)

Nativer Zellextraktionspuffer:

1 % (v/v) 0,1 M PMSF-Lösung (in EtOH)
 0,5 % (v/v) 0,5 M Benzamidin-Lösung (in H₂O_{bid.})
 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Lösung
 in 1 x PBS-Puffer

Proteaseinhibitor-Lösung:

1 Tablette Proteaseinhibitor-Mix (Roche)
 in 500 µl H₂O_{bid.}

5.4.2.2 Proteinfällung aus zellfreien Überständen

Aus einer Hauptkultur wurde 1 ml Kultur pelletiert (16.200 x g), der zellfreie Überstand abgenommen und mit 25 % (v/v) einer Trichloressigacetat (TCA)-Lösung vermischt. Die Ansätze wurden auf 4°C über Nacht inkubiert, um die extrazellulären Proteine im Überstand zu fällen. Die gefällten Proteine wurden pelletiert (16.200 x g, 4 °C, 30 min) und das Pellet zweimal mit eiskaltem (-20 °C) Aceton gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und in 17 µl 3x Laemmli-Auftragspuffer mit 0,1 N NaOH resuspendiert. Wurden die Proben vor der Analyse via SDS-PAGE und Western Blot deglykosyliert. wurde auf die Resuspendierung in Laemmli- Auftragspuffer verzichtet.

50 % Trichloressigacetat-Lösung:

50 % (w/v) TCA) in H₂O_{bid.}

3 x Laemmli-Auftragspuffer:

150 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 6 % (w/v) SDS
 30 % (v/v) Glycerin
 15 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,003 % Bromphenolblau
 in H₂O_{bid.}

5.4.2.3 Deglykosylierung von Proteinen

Proteine aus Zellextrakten oder präzipitiert aus zellfreien Überständen wurden nach den Herstellerangaben mit PNGaseF (NEB) durchgeführt. Während dieses Prozesses wurden die Zuckerreste der N-Glykosylierungen von den Proteinen entfernt. 10 µg der Zellextrakte oder Pellets aus der Präzipitation von zellfreien Überständen wurden mit 10 µl des im Kit enthaltenen Reaktionspuffers für 10 min auf 95 °C denaturiert und die Proben nach dem angegebenen Ansatz für 4 h bei 37 °C deglykosyliert. Die Proben wurden über SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter analysiert.

Standard-Ansatz:

10 µg Protein/ oder Pellet
10 µl Reaktionspuffer
2 µL 10 % (w/v) Nonidet P-40 (NP-40)
2 µL 10 × GlycoBuffer II
1 µL PNGaseF
Reaktionsvolumen mit H₂O_{bid.} auf 20 µL anpassen

5.4.3 Elektrophoretische-Auftrennung und Nachweis von Proteinen

5.4.3.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode nach Laemmli (1970) wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht verwendet. 10 µg Zellextrakte wurden mit 1/3 Volumen 3 x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden sie bei 16.200 x g für 5 min zentrifugiert. Nach dem Auftragen auf das SDS-Gel wurden die Proteine zunächst in einem 5 % Sammelgel aufkonzentriert. Die Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte in einem 8 % Trenngel. Als Größenstandard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Protean II Gelapparatur (BioRad) bei 30 mA pro Gel für eine Stunde durchgeführt.

SDS-Laufpuffer:

1,5 M Tris/HCl (pH 8,4)
192 mM Glycerin
0,1 % (w/v) SDS
in H₂O_{bid.}

SDS-Sammelgel (5 %):

125 mM Tris/HCl (pH 6,8)
5 % Acrylamid
0,1 % (w/v) SDS
0,05 % (w/v) APS
0,001 % (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

SDS-Trenngel (8 %):

125m M Tris/HCl (pH 6,8)
10 % Acrylamid
0,1 % (w/v) SDS
1,25 % (w/v) Glycerin
0,05 % (w/v) APS
0,001 % (v/v) TEMED
in H₂O_{bid.}

5.4.3.2 Transfer von Proteinen (Western Blot-Analysen)

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden in einer „SemiDry“-Elektroblot-Kammer (846-015-200, Biometra) mit einem dreistufigen Puffersystem auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-P, RPN303F, GE Healthcare Life Science) transferiert. Die Membran wurde zuvor für 10 Sekunden in Methanol aktiviert und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Aufbau des Blots von Anode zu Kathode bestand aus zwei Schichten Whatman®Papier (3mm) getränkt in Anodenpuffer I und einer Schicht Whatman®Papier getränkt in Anodenpuffer II. Es folgte die aktivierte PVDF-Membran und das SDS-Gel. Zuletzt wurden drei Schichten Whatman®Papier getränkt in Kathodenpuffer aufgelegt und der Proteintransfer bei einer Spannung von 1 mA pro cm² für eine Stunde durchgeführt.

Anodenpuffer I:

300 mM Tris/HCl (pH 10,4)
15 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid}.

Anodenpuffer II:

30 mM Tris/HCl (pH 10,4)
15 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid}.

Kathodenpuffer:

25 mM Tris/HCl (pH 9,4)
15 % (v/v) Methanol
40 mM ε -Aminocapronsäure
in H₂O_{bid}.

5.4.3.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach dem Western Blot trägt die PVDF-Membran die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine. Zum spezifischen, immunologischen Nachweis der Proteine wurde die PVDF-Membran zunächst für mindestens 30 min schüttelnd in Blockierungslösung inkubiert. Die Antikörperlösung wurde gemäß der Tabelle 11 verdünnt. Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran zusammen mit der primären Antikörperlösung in einem Autoklavierbeutel eingeschweißt. Die Inkubation fand auf dem Drehrad für 1 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht auf 4 °C statt. Nach der Inkubation wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und die Membran mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung, inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und einmal 5 min mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Lösung (GE Healthcare Life Sciences), die nach Herstellerangaben angesetzt und auf der Membran verteilt wurde. Die Membranen wurden nach 1 min Einwirkzeit der ECL-Lösung in einem Autoklavierbeutel gelegt, die Restflüssigkeit entfernt und die Chemilumineszenz mit einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die Detektion von HA-Affinitätstag tragenden Proteinen.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Primär		
Anti-HA aus Maus (monoklonal)	1:3000	Roche
Sekundär		
Anti-Maus IgG HRP-Konjugat aus Ziege	1:4000	Promega

TBS:

20 mM Tris/ HCl (pH 7,6)
136 mM NaCl
in H₂O_{bid}.

TBST:

20 mM Tris/ HCl (pH 7,6)
136 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween20
in H₂O_{bid}.

Blockierungslösung:

3 % (w/v) Magermilchpulver
in TBST

5.4.3.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen

Die Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen oder auf bereits detektierten PVDF-Membranen wurden durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung sichtbar gemacht. Dieser Schritt diente der Detektion von Proteinen ohne immunologisch detektierbaren Protein-Tag oder als Ladekontrolle der SDS-PAGE. Polyacrylamid-Gele wurden für 3 Stunden oder über Nacht unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in 100 ml Coomassie-Färbelösung eingelegt und anschließend für einige Stunden oder über Nacht in Entfärbelösung bis zu einem Punkt entfärbt, an dem die Proteinbanden ohne starken Hintergrund erkennbar waren. Die Entfärbelösung musste dabei regelmäßig erneuert werden. PVDF-Membranen wurden für 5 min gefärbt und anschließend 30 min entfärbt. SDS-Gele, sowie PVDF-Membranen wurden in einem Autoklavierbeutel eingeschweißt und mit Hilfe eines Scanners (Ricoh) dokumentiert.

Coomassie-Färbelösung:

0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
9,0 % (v/v) Essigsäure
45,5 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid}.

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid}.

5.4.3.5 Zuckeranalysen mittels HPAEC-PAD

Die Zuckeranalysen der Pektinproben fand nach vollständiger Hydrolyse statt. Dazu wurden 100 µl 0,1 % (w/v) Lösungen der Pektine mit 1 ml 200 µg/ml Riboselösung versehen, welches

für die Messung als interner Standard diente und die Flüssigkeit unter N₂-Begasung evaporiert. Anschließend wurden die Proben mit 150 µl 2 M Trifluoressigsäure (TFA) gemischt und in einem 2 ml Schraubgefäß für 90 min bei 121 °C inkubiert. Die Proben wurden abgekühlt und die TFA bei 40 °C unter N₂-Begasung evaporiert. Vollständig getrocknet wurden die Proben mit 300 µl 2-Propanol versehen, gevortext und erneut unter N₂ getrocknet. In 200 ml H₂O_{bid.} aufgenommen wurden die Proben für 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Eine 9-Zucker Mischung (Glukose, Galaktose, Rhamnose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fukose, Galakturonsäure, Glukuronsäure) diente als Standard für die Messung und wurde in den Konzentrationen 0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320 µg/mL eingesetzt. Je 10 µl der Proben wurden in die HPAEC (*high pressure anion- exchange chromatography*) injiziert und über eine CarboPac PA20 mit Vorsäule über das angegebene Laufmittelprofil (Tabelle 12) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über einen PAD (*pulsed amperometric detector*).

Tabelle 12: Flussschema des Eluentensystems der HPAEC-PAD Analyse am Methrohm HPLC System.

Zeit [min]	Eluent A [%] H ₂ O	Eluent B [%] 10 mM NaOH	Eluent C [%] 700 mM NaOH	Änderung der Eluentenmischung	Flussrate [ml/min]
Start	80	20	0		0,4
24,0	80	20	0	Linear	0,4
25,0	30	0	70	Linear	0,4
32,0	30	0	70	Linear	0,4
33,0	0	0	100	Linear	0,4
36,0	0	0	100	Linear	0,4
37,0	80	20	0	Linear	0,4
61,0	80	20	0	Linear	0,4

5.4.4 Enzymaktivitätstests

5.4.4.1 Vorbereitung von zellfreien Überständen

Die für die Hydrolyse von pektinreicher Biomasse ausgewählten CAZymes werden entweder durch Signalpeptide oder durch eine C-terminale Cts1-Fusion in das Außenmedium sekretiert. Die Aktivität der sekretierten Proteine wurde stets in Gesamtüberständen ohne weitere Aufreinigung gemessen. Hauptkulturen in modifiziertem Verduyn C1 Medium wurden nach 24 h geerntet, die OD₆₀₀ bestimmt und die Überstände durch Zentrifugation (16.200 x g, 3 min, Raumtemperatur) geerntet. An diesem Punkt war die C-Quelle des Mediums komplett von der Kultur konsumiert, was zuvor ebenfalls durch einen DNS-Assay (Tabelle 13), oder Glukose-Teststreifen (Nachweisbereich 0.5 g/L bis 10 g/L; Macherey-Nagel) überprüft wurde. Die für 24 h kultivierten Proben lieferten Werte im Bereich des Verduyn C1 Medium ohne Glukose,

sodass von einer vollständigen Konsumierung der C-Quelle und somit möglichst geringem Hintergrund in den Assays zur Messung der Spaltprodukte der enzymatischen Hydrolyse ausgegangen werden konnte. Die Überstände wurden auf Eis gelagert und umgehend in die Enzym-Assays eingesetzt. Die Präparation erfolgte jedes Mal frisch und unmittelbar vor der Durchführung des Assays.

Tabelle 13: Evaluation des Erntezeitraums. Die Messung der verbliebenen reduzierenden Gruppen im Kulturüberstand nach 24 h Kultivierung wurde über den DNS-Assay vorgenommen und zeigte in allen gemessenen Proben einen Wert vergleichbar mit dem Gehalt an reduzierenden Gruppen im Kulturmedium Verduyn C1 ohne beigefügte C-Quelle. Der Wert des Verduyn C1 mit 10 g/L Glukose wurde durch die Messung einer zehnfachen Verdünnung ermittelt und hochgerechnet.

Probe	Reduzierende Gruppen [mM]	Standardabweichung [mM]
AB33P5Δ ^R	0,59	0,04
AB33P5Δ ^R /UmPgu1	0,56	0,03
AB33P5Δ ^R /AtPgaX	0,59	0,05
Verduyn C1 ohne Glc	0,56	0,02
Verduyn C1 (10 g/L Glc)	68,17	1,01

5.4.4.2 DNS-Assay für die Messung von Galakturonsäure und Arabinose

Um die hydrolytische Aktivität von CAZymes-sekretierenden Stämmen zu überprüfen, bietet es sich an, die Spaltprodukte des zu degradierenden Polymers, speziell Galakturonsäure, nachzuweisen. In den hier durchgeführten Experimenten wurde der Dinitrosalicylsäure-Assay (DNS) verwendet, da die Durchführung schnell und unkompliziert gestaltet werden kann und in einem ähnlichen Versuchsaufbau, der Messung von Zellulose und Xylan-Spaltprodukten, bereits reproduzierbare Ergebnisse erlangt wurden (Geiser *et al.*, 2016). Der DNS-Assay ist eine häufig verwendete Methode, um die Spaltprodukte von Oligosacchariden zu quantifizieren (Miller, 1959). 3,5-Dinitrosalicylsäure reagiert dabei mit der Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers und wird zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Diese Verbindung absorbiert bei einer Wellenlänge von 540 nm und kann so quantifiziert werden (Abbildung 27 A).

Die Eignung dieser Methode für die Quantifizierung nach der Hydrolyse von HG des Pektins wurde durch das Erstellen von Standardreihen der entsprechenden Monomere geprüft. Die Messung von Glukose erfolgte, um eine Aussage über eventuell im Kulturmedium verbliebene Reste der C-Quelle treffen zu können, die im DNS-Assay als Hintergrund gemessen werden würde. In verschiedenen Messungen wurde als reduzierender Zucker Glukose und D-Galakturonsäure in Konzentrationen von 0 mM bis 20 mM in die Nachweisreaktion eingesetzt. Der DNS-Assay zeigte eine lineare Abhängigkeit der eingesetzten Menge an reduzierendem Zucker und der Absorption bei 540 nm und wurde somit als geeignet für die Messung des hydrolytischen Potentials der Überexpressionsstämme angesehen (Abbildung 27).

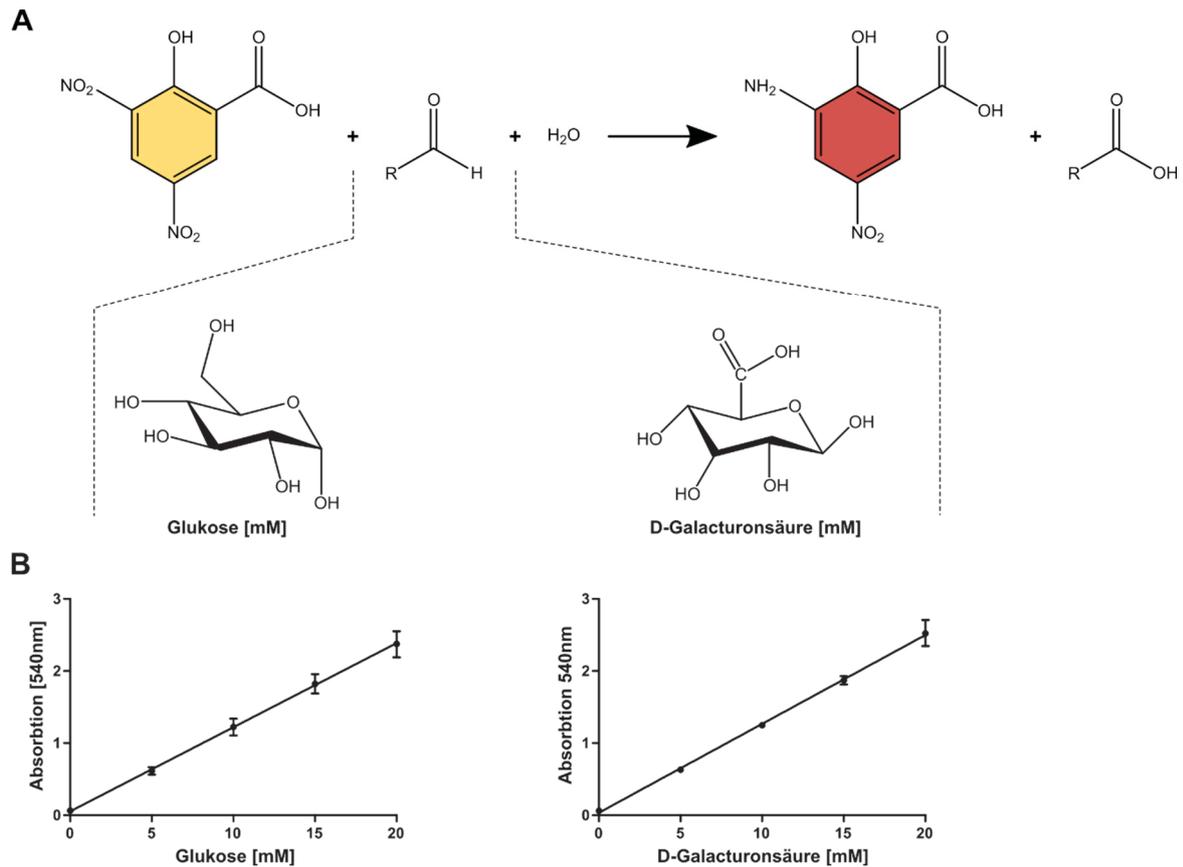


Abbildung 27: Evaluation des DNS-Assays für den Nachweis von Galakturonsäure. **A**, Darstellung der Reaktion des Nachweises für reduzierende Zucker (Miller, 1959). 3,5-Dinitrosalicylsäure wird durch die Reaktion mit der Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure reduziert. Diese Verbindung zeigt einen Farbumschlag von gelb, über orange, zu rot (angedeutet durch farbliche Hinterlegung des Benzolrings) und absorbiert stark bei 540nm. **B**, Standardgeraden mit verschiedenen Verdünnungen der monomeren Zucker wurden in DNS-Assaypuffer gelöst und die reduzierenden Gruppen mittels DNS-Reagenz nachgewiesen. Die resultierenden Werte der Absorption bei 540 nm zeigen eine lineare Beziehung zu der eingesetzten Menge an monomeren Zuckern.

5.4.4.3 Analyse der Polygalakturonase-Aktivität von Kulturüberständen

Die pektinolytische Aktivität von zellfreien Kulturüberständen wurde nach Miller (1959) und angelehnt an Geiser *et al.* (2016) in einem DNS-Assay nachgewiesen. 200 µl des zellfreien Überstandes wurden mit 800 µl 0.5 % (w/v) Polygalakturonsäure (Reinheit 85 %; Carl Roth) in 0,1 M Natrium-Acetat Puffer (pH 5,5) gemischt und auf 30 °C bei 600 upm inkubiert. Alternativ wurde als Substrat 0,25 % Pektinlösung in 0,1 M Natrium-Acetat Puffer (pH 5,5) der unten angegebenen Pektine (Tabelle 14) verwendet. Zu den Probenahmezeitpunkten (0 h, 6 h und 24 h) wurden jeweils 60 µl pro Reaktionsansatz abgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min auf 95 °C inkubiert, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Proben wurden bis zum finalen Probenahmezeitpunkt auf -20 °C gelagert. Die Detektion wurde über die Zugabe von 60 µl DNS-Reagenz und erneutes Inkubieren für 10 min bei 95 °C erreicht. Während dieses Schrittes reagiert 3,5-Dinitrosalicylsäure mit den in dem Reaktionsansatz

vorhandenen reduzierenden Zuckern zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure, was einen Farbumschlag zur Folge hat (Abbildung 27 A). Die Proben wurden auf Raumtemperatur gekühlt und für 10 min bei 16.200 x g zentrifugiert. 100 µl wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) übertragen und die Platte bei 540 nm in einem Tecan 200 *plate reader* (Tecan, Männerdorf, Schweiz) ausgelesen. Die gemessenen Werte wurden über eine Galakturonsäure-Standardkurve (Konzentrationen 0 mM bis 20 mM) quantifiziert (Abbildung 27 B). Für die Messwerte und die Standardkurve wurden die 0 h Werte von allen Werten abgezogen, um den Hintergrund zu entfernen.

DNS-Reagenz:

1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure (Merck)
40,4 g Natrium-Kalium-Tartat Tetrahydrat
In 100 ml 0,4 M NaOH aufnehmen

Tabelle 14: Verfügbare Pektine verschiedener Hersteller inklusive angegebenem Veresterungsgrad.

Pektine:	Hersteller/ Bezugsquelle:	Veresterungsgrad [%]:
Pektin A	Carl Roth	n.a.
Pektin C	Carl Roth	70
RU301	Herbstreith und Fox	54
AU202	Herbstreith und Fox	68
AU910	Herbstreith und Fox	4,8
Zuckerrübenpektin	CP Kelco	57

5.5 Analyse von Glykolipiden

5.5.1 Isolierung von Glykolipiden

5.5.1.1 Isolierung von Glykolipiden aus kleinen und mittleren Volumina

Die Analyse von Glykolipiden wurde in verschiedenen Verfahren im Anschluss an die Isolierung durchgeführt. Die von *U. maydis* produzierten Glykolipide werden sekretiert und konnten somit aus dem Überstand isoliert werden. Da Ustilaginsäure dazu tendiert nadelförmige Kristalle zu bilden, die sich bei der Zentrifugation mit dem Zellpellet am Gefäßboden sammeln, wurden die Isolierung aus Vollkultur durchgeführt. Die Kultivierung der ustilaginsäureproduzierenden Stämme wurde in modifiziertem Verduyn G Medium (5.1.3) durchgeführt. Eine Standard-Hauptkultur wurde aus einer dichten Vorkultur (OD₆₀₀ 2-5) auf eine Start OD₆₀₀ von 0,1 (20 ml in einem 300 ml Rundkolben) inokuliert und bei 28 °C unter 300 Upm für 35 h kultiviert. Ein Volumen (500 µl bzw. 20 ml) Vollkultur wurde mit einem Volumen Ethylacetat versetzt und auf einem Vibrax® VXR Laborschüttler (IKA) für 15 min kräftig gemischt. Anschließend wurden die Gemische für 15 min bei 16.200 x g, bzw. 19.100 x g zentrifugiert und die Ethylacetatphase abgenommen. Abhängig vom Volumen der Ethylacetatphase wurden die Proben auf einem Thermoschüttler bei 70 °C für 1 h getrocknet,

oder das Lösemittel in einem 70 °C warmen Wasserbad unter Stickstoffbegasung durch eine selbst gebaute Abdampfanlage (Abbildung 28) evaporiert. Die zurückbleibenden, trockenen Rückstände enthielten die Glykolipide. Diese wurden auf einer Feinwaage (ABT 100-5M, Kern) ausgewogen und zur weiteren Analyse in Methanol aufgenommen.

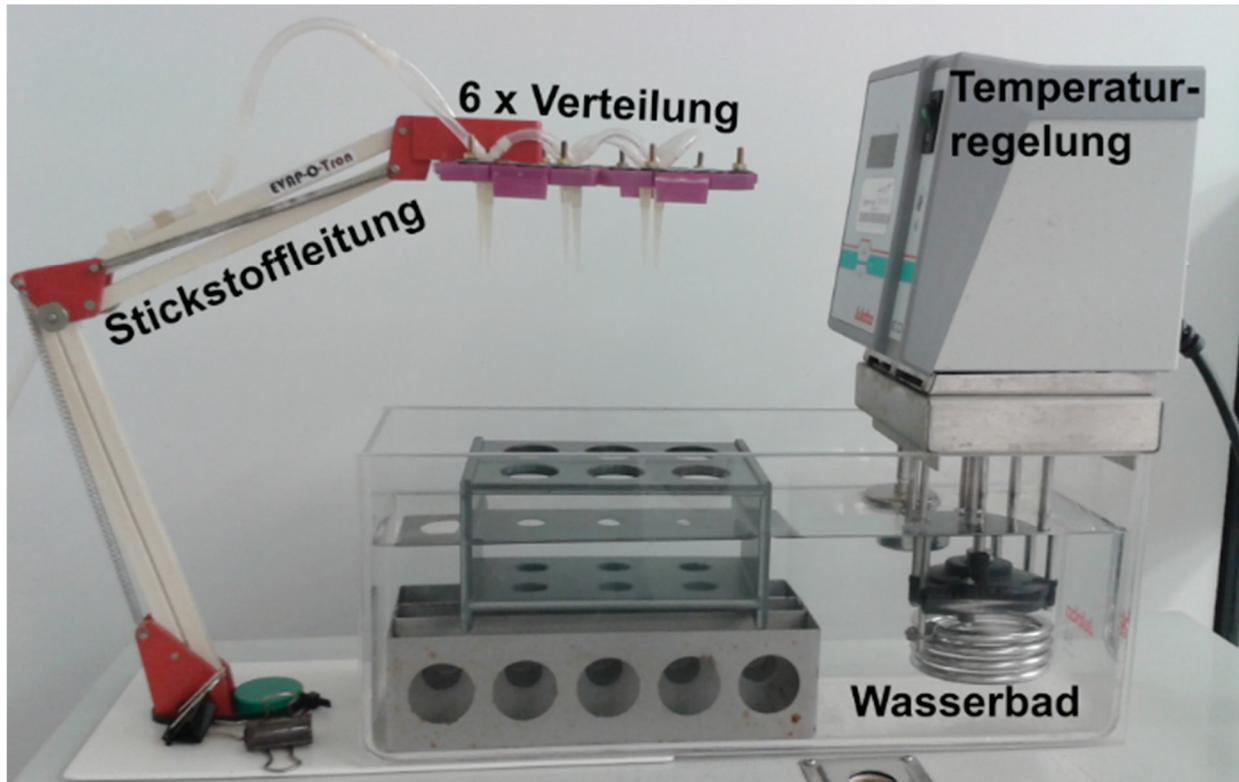


Abbildung 28: Stickstoffbegasungsanlage "Evap-O-Tron". Die Kombination eines Wasserbades und der regulierbaren N₂-Begasung ermöglicht die gleichzeitige Evaporation von Lösemitteln in bis zu sechs 50 ml Reaktionsgefäßen. Bei geringeren Probemengen können einzelne Kanäle der Verteilung abgeklemmt werden.

5.5.1.2 Isolierung von Glykolipiden aus Großvolumina

Die Kulturbrühe einer Fermentation wurde mit dem gleichen Volumen Ethylacetat gemischt. Aufgeteilt auf 2 L Schottflaschen wurde die Mischung unter der Verwendung von einem Magnetrührer (IKA) auf maximaler Einstellung vermengt, in 500 ml Zentrifugationsgefäße portioniert und die Phasen in einer Beckmann J2-21 Kühlzentrifuge bei 9.950 x g (Rotor JA10) für 30 min getrennt. Die Ethylacetatphase wurde abgenommen und über Nacht bei 4 °C gelagert, was zu starker Kristallbildung führte. Die Kristalle wurden über eine Nutsche mit einem Papierfilter (VWR, Porengröße 5-13µm) von der Ethylacetatphase getrennt und auf 4 °C unter Luftabschluss gelagert. Die Restflüssigkeit wurde in einem Rotationsevaporator verdampft. Die trockenen Rückstände wurden in Methanol aufgenommen.

5.5.2 Struktur- und biochemische Analysen von Glykolipiden

5.5.2.1 Dünnschichtchromatographie

Isolierte Glykolipide wurden qualitativ über eine Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Hierzu wurde eine Menge isolierter Glykolipide äquivalent zu 500 µl Kulturvolumen in 15 µl Methanol aufgenommen und in drei 5 µl Schritten auf eine halbierte DC-Platte (Kieselgel 60, Merck) aufgetragen. Über ein Zweipuffersystem wurden die Glykolipide entsprechend ihrer Polarität aufgetrennt, zunächst 5 min in Puffer I und dann zweimal 17 min in Puffer II. Zwischen den DC-Läufen wurde die DC-Platte vollständig unter dem Abzug getrocknet. Die Detektion geschah mit Hilfe des p-Anisaldehyd-Färbereagens, welches über einen Sprühapplikator auf die Silikaschicht aufgetragen und anschließend bei 110 °C im Heizofen entwickelt wurde. Die entwickelte DC wurde in einem Autoklavierbeutel eingeschweißt und das Ergebnis der Auftrennung mit einem Fotoscanner (Aficio MP 301SP; Ricoh, Hannover, Deutschland) dokumentiert. Sollten die aufgetrennten Glykolipide von der DC-Platte für weitere Analysen rückgewonnen werden, wurde ein gewünschtes Volumen über eine längere Front auf die DC-Platte aufgetragen und wie oben beschrieben aufgetrennt. Da die Detektion mit dem Färbereagenz eine irreversible Verbindung mit dem zu detektierenden Molekülen zur Folge hatte, wurde nur die äußersten Bereiche der aufgetrennten Probenfront mit dem Färbereagenz detektiert und ausgehend von den detektierten Banden der nicht entwickelte Bereich der Probenbande mit einem Spatel abgetragen und das Silikat gesammelt. Das erhaltene Pulver wurde mit 500 µl Methanol vermischt, die Probe bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

DC-Laufpuffer I:

65 ml Chloroform (p.a.)
25 ml Methanol (p.a.)
4 ml H₂O_{bid.}

DC-Laufpuffer II:

90 ml Chloroform (p.a.)
10 ml Methanol (p.a.)

Färbereagenz:

50 ml Essigsäure
1 ml Schwefelsäure
0.5 ml 4-Methoxybenzaldehyd

5.5.2.2 HPLC-Analyse des Itakonsäuregehaltes von Kulturüberständen

Die Sekretion von Itakonsäure ins Kulturmedium wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nick Wierckx am Institut für Bio- und Geowissenschaften in der Abteilung für Mikrobielle Katalyse des Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Kulturen wurden in modifiziertem Verduyn G Medium supplementiert mit 2,25 g/L NH₄NO₃ auf eine OD₆₀₀ von 0,2 inokuliert und bei 28 °C und 300 upm für 24 Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden bei 16000 x g pelletiert, der Kulturüberstand durch einen Rotilabo® Spritzenaufsatzfilter (CA, 0,20 µm, Ø 15 mm) filtriert und mit H₂O_{bid.} 1:4 verdünnt. Die Auftrennung erfolgte in einer Agilent Infinity System

HPLC (Agilent, Waldbronn, Deutschland) unter der Benutzung einer ISERA Metab AAC, 300 × 7.8 mm Säule (ISERA, Germany) und 5 mM Schwefelsäure als Flussmittel mit einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer Temperatur von 40 °C. Die Detektion der Itakonsäure erfolgte über einen DAD (*diode array detector*) bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Identifikation der Analyten wurde über den Vergleich der Retentionszeiten mit entsprechenden Standards ermittelt (Itakonsäure 0,1; 0,4; 0,8 und 1,6 g/L). Die Datenanalyse geschah über das Programm Agilent OpenLAB Data Analysis - Version 2.200.0.528 (Agilent, Waldbronn, Germany).

5.6 Mikroskopie

5.6.1 Vorbereitung und Färbung von Präparaten

Die mikroskopische Analyse von *U. maydis*-Zellen wurden zur Vitalitätskontrolle der Stämme anhand von optisch evaluierter Morphologie durchgeführt. Die Zellen sollten innerhalb des durchgeführten Prozesses, bzw. während oder am Ende der Expression von CAZymes und während der Produktion von Glykolipiden überprüft werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dem entsprechend in den dazu verwendeten Medien Verduyn C1/ G Medium (5.1.3). Auf die verwendeten Objektträger wurden mit 500 µl 2 % (w/v) aufgekochte Agarose (in H₂O bid. angesetzt) versehen und zur Polymerisierung einige Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Die Agarosekissen dienen der Immobilisierung der *U. maydis* Zellen während der Mikroskopie. Aus den Kulturen wurde 1 µl auf ein Agarosekissen pipettiert und für eine Minute trocknen gelassen. Ein Deckglas wurde aufgelegt und die Mikroskopie mit Immersionsöl durchgeführt. Um die zelluläre Intaktheit der Zellen zu bestimmen wurde eine Zellfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Aliquots von 150 µl zu untersuchender Zellkultur wurden mit 0,6 µl Propidiumiodid (1 µg/µl) für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Vibrax VXR Basic inkubiert und das Eindringen der Färbelösung augenblicklich über den GFP-Kanal (s.u.) detektiert. Propidiumiodid ist ein häufig in Vitalitätsstudien genutzter, nicht membrangängiger Farbstoff für Nucleinsäuren, der auch bei Arbeiten mit *S. cerevisiae* Anwendung findet (Deere *et al.*, 1998).

Propidiumiodid

Massenkonzentration der Stammlösung:

1 µg/ml

Massenkonzentration im Präparat:

1 µg/ml

Fluoreszenzkanal:

GFP s.u.

5.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) generiert. Die technischen Angaben sind im Folgenden aufgelistet:

Stativ: Axio Imager M.1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Kamera: Spot-Pursuit CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)

Objektive: Plan Neofluar (40x, NA 1,3, Öl); Plan Neofluar (63x, NA 1,25, Öl)

Lampe: HPX Halogen Metaldampflampe (LEJ, Jena, Deutschland)

Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über die Software MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA).

Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen wurden die o.g. HPX Halogen Metall-Dampflampe für die Anregung von eGfp (488 nm/100 mW) verwendet und folgende Filtersätze genutzt:

GFP: ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP (Chroma, Bellow Falls, VT, USA)

5.6.3 Bearbeitung mikroskopischer Daten

Die Bearbeitung von Bildaufnahmen wurde über die Computerprogramme MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA), Image J (2.0.0) und Inkscape (1.0) durchgeführt und beinhaltete die Anpassung von Helligkeit und Kontrast, das Einfügen von Größenstandards und das Zuschneiden auf ein präsentierbares Format.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010).** Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(5), 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Abdulrachman, D., Thongkred, P., Kocharin, K., Nakpathom, M., Somboon, B., Narumol, N., Champreda, V., Eurwilaichitr, L., Suwanto, A., Nimchua, T., & Chantasingsh, D. (2017).** Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endo-polygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scouring. *BMC Biotechnology*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0334-9>
- Adapa, V., Ramya, L. N., Pulicherla, K. K., & Rao, K. R. S. S. (2014).** Cold active pectinases: Advancing the food industry to the next generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(5), 2324–2337. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0685-1>
- Aguilar, L. R., Pardo, J. P., Lomelí, M. M., Bocardo, O. I. L., Juárez Oropeza, M. A., & Guerra Sánchez, G. (2017).** Lipid droplets accumulation and other biochemical changes induced in the fungal pathogen *Ustilago maydis* under nitrogen-starvation. *Archives of Microbiology*, *199*(8), 1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1388-8>
- Alazi, E., Niu, J., Kowalczyk, J. E., Peng, M., Aguilar Pontes, M. V., van Kan, J. A. L. L., Visser, J., de Vries, R. P., & Ram, A. F. J. (2016).** The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of D-galacturonic acid from pectin. *FEBS Letters*, *590*, 1804–1815. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12211>
- Albersheim, P., Neukom, H., & Deuel, H. (1960).** Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *90*(1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(60\)90609-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(60)90609-3)
- Alcantara, V. A., Pajares, I. G., Simbahan, J. F., & Edding, S. N. (2013).** Downstream recovery and purification of a bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. *Philippine Agricultural Scientist*, *96*(4), 349–358.
- Amore, A., Iadonisi, A., Vincent, F., & Faraco, V. (2015).** Identification of the nucleophile catalytic residue of GH51 α -l-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*. *AMB Express*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0164-x>
- Anderlei, T., & Büchs, J. (2001).** Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*, *7*(2), 157–162. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00116-9)
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., & Büchs, J. (2004).** Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, *17*(3), 187–194. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00181-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00181-5)
- Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., & Dam-Johansen, K. (2010).** Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis. II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 407–425. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.005>
- Anic, I., Apolonia, I., Franco, P., & Wichmann, R. (2018).** Production of rhamnolipids by integrated foam adsorption in a bioreactor system. *AMB Express*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0651-y>
- Antonov, E., Schlembach, I., Regestein, L., Rosenbaum, M. A., & Büchs, J. (2017).** Process relevant screening of cellulolytic organisms for consolidated bioprocessing. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0790-4>
- Antonov, E., Wirth, S., Gerlach, T., Schlembach, I., Rosenbaum, M. A., Regestein, L., & Büchs, J. (2016).** Efficient evaluation of cellulose digestibility by *Trichoderma reesei* Rut-

- C30 cultures in online monitored shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0567-7>
- Arino, S., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (1996).** Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1–2), 162–168. <https://doi.org/10.1007/s002530050665>
- Aschenbroich, J., Hussnaetter, K. P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bölker, M., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2019).** The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1867(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.10.007>
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Strukl, K. (1987).** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Inc., USA.
- Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S., & Elst, K. (2016).** Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), 594–606. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.996732>
- Baccile, N., Delbeke, E. I. P., Brennich, M., Seyrig, C., Everaert, J., Roelants, S. L. K. W., Soetaert, W., Van Bogaert, I. N. A., Van Geem, K. M., & Stevens, C. V. (2019).** Asymmetrical, symmetrical, divalent and Y-shaped (bola)amphiphiles: the relationship between molecular structure and self-assembly in amino derivatives of sophorolipid biosurfactants. *The Journal of Physical Chemistry*, 123(17), 3841–3858. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b01013>
- Bacovsky, D., Ludwiczek, N., Ognissanto, M., & Wörgetter, M. (2013).** Status of advanced biofuels demonstration facilities in 2012 A REPORT TO IEA BIOENERGY TASK 39. *IEA Bioenergy, T39-P1b*(March), 1–209.
- Ballew, N., & Gerngross, T. (2004).** Production of therapeutic proteins in fungal hosts. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(5), 623–626. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.5.623>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Banat, Ibrahim M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014).** Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- Banks, G. R., Shelton, P. A., Kanuga, N., Holden, D. W., & Spanos, A. (1993).** The *Ustilago maydis* nar 1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, 131(1), 69–78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90670-X)
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989).** Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(15), 5878–5882. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>
- Banuett, F. (1992).** *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics*, 8(5), 174–180. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90220-X](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90220-X)
- Banuett, F. und Herskowitz, I. (1994).** Identification of Fuz7, a *Ustilago maydis* MEK / MAPKK homolog required steps in the fungal life cycle. *Genes & Development*, 8, 1367–1378.
- Becker, J., Hosseinpour Tehrani, H., Gauert, M., Mampel, J., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2020).** An *Ustilago maydis* chassis for itaconic acid production without by-products. *Microbial Biotechnology*, 13(2), 350–362. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13525>

- Bemiller, J. N. (1967).** Acid-Catalyzed Hydrolysis of Glycosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 22(C), 25–108. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60151-4](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60151-4)
- Benz, J. P., Protzko, R. J., Andrich, J. M. S., Bauer, S., Dueber, J. E., & Somerville, C. R. (2014).** Identification and characterization of a galacturonic acid transporter from *Neurospora crassa* and its application for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation processes. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-20>
- Bergh, K. T., Litzka, O., & Brakhage, A. A. (1996).** Identification of a major cis-acting DNA element controlling the bidirectionally transcribed penicillin biosynthesis genes *acvA* (*pcbAB*) and *ipnA* (*pcbC*) of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3908–3916. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3908-3916.1996>
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2007).** Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature Chemical Biology*, 3(4), 213–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio869>
- Beuker, J., Steier, A., Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M., & Hausmann, R. (2016).** Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *AMB Express*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0183-2>
- Biz, A., Sugai-Guérios, M. H., Kuivanen, J., Maaheimo, H., Krieger, N., Mitchell, D. A., & Richard, P. (2016).** The introduction of the fungal D-galacturonate pathway enables the consumption of D-galacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0544-1>
- Blanco, P., Sieiro, C., & Villa, T. G. (1999).** Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00090-7)
- Bölker, M., Basse, C. W., & Schirawski, J. (2008).** *Ustilago maydis* secondary metabolism- From genomics to biochemistry. *Fungal Genetics and Biology*, 45(SUPPL. 1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.05.007>
- Bottin, A., Kämper, J., & Kahmann, R. (1996).** Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(3), 342–352. <https://doi.org/10.1007/pl00008601>
- Brachmann, A., Koenig, J., Julius, C., & Feldbruegge, M. (2004).** A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1047-z>
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., & Kahmann, R. (2001).** Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 42(4), 1047–1063. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02699.x>
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brakhage, A. A. (2013).** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R. (2009).** *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 423–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081923>
- Brocca, S., Alberghina, L., Lotti, M., Persson, M., Wehtje, E., & Adlercreutz, P. (2000).** Mutants provide evidence of the importance of glycosidic chains in the activation of lipase 1 from *Candida rugosa*. *Protein Science*, 9(5), 985–990.

<https://doi.org/10.1110/ps.9.5.985>

- Broomfield, P. L. E., & Hargreaves, J. A. (1992).** A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, *22*(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00351470>
- Brunecky, R., Chung, D., Sarai, N. S., Hengge, N., Russell, J. F., Young, J., Mittal, A., Pason, P., Vander Wall, T., Michener, W., Shollenberger, T., Westpheling, J., Himmel, M. E., & Bomble, Y. J. (2018).** High activity CAZyme cassette for improving biomass degradation in thermophiles. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1014-2>
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009).** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Cano-Canchola, C., Acevedo, L., Ponce-Noyola, P., Flores-Martínez, A., Flores-Carreón, A., & Leal-Morales, C. A. (2000).** Induction of lytic enzymes by the interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* tissues. *Fungal Genetics and Biology*, *29*(3), 145–151. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1196>
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009).** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(SUPPL. 1), 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., Wilson, R. H., & McCann, M. C. (2001).** Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiology*, *127*(2), 551–565. <https://doi.org/10.1104/pp.010146>
- Carstensen, F., Klement, T., Büchs, J., Melin, T., & Wessling, M. (2013).** Continuous production and recovery of itaconic acid in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, *137*, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.044>
- Castruita-Domínguez, J. P., González-Hernández, S. E., Polaina, J., Flores-Villavicencio, L. L., Alvarez-Vargas, A., Flores-Martínez, A., Ponce-Noyola, P., & Leal-Morales, C. A. (2014).** Analysis of a polygalacturonase gene of *Ustilago maydis* and characterization of the encoded enzyme. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(5), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200606>
- Cherubini, F. (2010).** The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, *51*(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Entwistle, R., Keller, N. P., Wang, C. C. C., & Oakley, B. R. (2010).** Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(7), 2067–2074. <https://doi.org/10.1128/AEM.02187-09>
- Cho, S. W., Lee, S., & Shin, W. (2001).** The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *Journal of Molecular Biology*, *311*(4), 863–878. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4919>
- Choi, J. K., Lee, B. H., Chae, C. H., & Shin, W. (2004).** Computer Modeling of the Rhamnogalacturonase-"Hairy" Pectin Complex. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *55*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1002/prot.10434>
- Christiaens, S., Uwibambe, D., Uyttbroeck, M., Van Droogenbroeck, B., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015).** Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting

- point for waste valorisation in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.054>
- Claus, S., & Van Bogaert, I. N. A. (2017).** Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(21), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8519-7>
- Coutinho, P. M., Andersen, M. R., Kolenova, K., vanKuyk, P. A., Benoit, I., Gruben, B. S., Trejo-Aguilar, B., Visser, H., van Solingen, P., Pakula, T., Seiboth, B., Battaglia, E., Aguilar-Osorio, G., de Jong, J. F., Ohm, R. A., Aguilar, M., Henrissat, B., Nielsen, J., Stålbrand, H., & de Vries, R. P. (2009).** Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology : FG & B*, 46 Suppl 1(1), S161–S169. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.020>
- Couturier, M., Navarro, D., Olivé, C., Chevret, D., Haon, M., Favel, A., Lesage-Meessen, L., Henrissat, B., Coutinho, P. M., & Berrin, J.-G. (2012).** Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *BMC Genomics*, 13(1), 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-57>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romani, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019).** Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>
- da Costa Sousa, L., Chundawat, S. P., Balan, V., & Dale, B. E. (2009).** “Cradle-to-grave” assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.003>
- Dash, A., Gurdaswani, V., D’Souza, J. S., & Ghag, S. B. (2020).** Functional characterization of an inducible bidirectional promoter from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59159-0>
- Davila, A. M., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (1997).** Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 496–501.
- De Graeve, M., De Maeseneire, S. L., Roelants, S. L. K. W., & Soetaert, W. (2018).** *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast. *FEMS Yeast Research*, 18(7), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy072>
- De Groot, A. S., & Scott, D. W. (2007).** Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*, 28(11), 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.011>
- De Oliveira, M. R., Magri, A., Baldo, C., CAmiliou-Neto, D., Minucelli, T., & Celligoi, M. A. P. C. (2015).** Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it’s Applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 6(2), 161–174. <http://www.bipublication.com>
- De Vries, R. P. (2003).** Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(1), 10–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1171-9>
- De Vries, Ronald. P., & Visser, J. (2001).** *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 492–522. <https://doi.org/DOI: 10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu,**

- P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012).** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P., & Veal, D. (1998).** Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast*, *14*(2), 147–160. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<147::AID-YEA207>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<147::AID-YEA207>3.0.CO;2-L)
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *61*(1), 47–64. <https://doi.org/10.1128/61.1.47-64.1997>
- Díaz De Rienzo, M. A., Kamalanathan, I. D., & Martin, P. J. (2016).** Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*, *51*(7), 820–827. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007>
- Djamei, A., & Kahmann, R. (2012).** *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLOS Pathogens*, *8*(11), 11–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002955>
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R. P., Kämper, J., & Kahmann, R. (2008).** Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *Journal of Plant Physiology*, *165*(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.016>
- Döhlemann, G. (2010).** *Etablierung der kompatiblen Interaktion von Ustilago maydis mit seiner Wirtspflanze Mais.*
- Domínguez Rivera, Á., Martínez Urbina, M. Á., & López y López, V. E. (2019).** Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>
- Doran, J. B., Cripe, J., Sutton, M., & Foster, B. (2000).** Fermentations of pectin-rich biomass with recombinant bacteria to produce fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, *84–86*(2), 141–152. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:141>
- Dotsenko, A. S., Gusakov, A. V., Rozhkova, A. M., Sinitsyna, O. A., Nemashkalov, V. A., & Sinitsyn, A. P. (2016).** Effect of N-linked glycosylation on the activity and other properties of recombinant endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum*. *Protein Engineering, Design and Selection*, *29*(11), 495–501. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw030>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2018).** Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. *Food Research International*, *113*(June), 327–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>
- Duvetter, T., Fraeye, I., Sila, D. N., Verlent, I., Smout, C., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2006).** Mode of de-esterification of alkaline and acidic pectin methyl esterases at different pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7825–7831. <https://doi.org/10.1021/jf060013h>
- Edwards, M. C., & Doran-Peterson, J. (2012).** Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(3), 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4173-2>
- Effer, B., Lima, G. M., Cabarca, S., Pessoa, A., Farías, J. G., & Monteiro, G. (2019).** L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *49*(7), 679–

685. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1599396>

- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K., & Antranikian, G. (2014).** Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 29(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.003>
- Eudes, A., Sathitsuksanoh, N., Baidoo, E. E. K., George, A., Liang, Y., Yang, F., Singh, S., Keasling, J. D., Simmons, B. A., & Loqué, D. (2015).** Expression of a bacterial 3-dehydroshikimate dehydratase reduces lignin content and improves biomass saccharification efficiency. *Plant Biotechnology Journal*, 13(9), 1241–1250. <https://doi.org/10.1111/pbi.12310>
- Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 23. April 2009 zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/EG, L 140/16 (2009)** (testimony of Europäische Union).
- Faria, N. T., Santos, M. V., Fernandes, P., Fonseca, L. L., Fonseca, C., & Ferreira, F. C. (2014).** Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. *Process Biochemistry*, 49(11), 1790–1799. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.08.004>
- Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F., & Tsernoglou, D. (2001).** Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13425–13430. <https://doi.org/10.1073/pnas.231473698>
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., & Kahmann, R. (2004).** Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 666–672. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.006>
- Feldbrügge, M., Kellner, R., & Schipper, K. (2013).** The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3253–3265. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4777-1>
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., & Pérez-Martín, J. (2006).** Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell*, 18(9), 2369–2387. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042754>
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J. P., & Banat, I. M. (2010).** Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 617–627. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900162>
- Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E., & Pickersgill, R. W. (2007).** Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *EMBO Journal*, 26(17), 3879–3887. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601816>
- Fukuoka, T., Morita, T., Konishi, M., Imura, T., & Kitamoto, D. (2007).** Characterization of new types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced from soybean oil by a basidiomycetous yeast, *Pseudozyma shanxiensis*. *Journal of Oleo Science*, 56(8), 435–442. <https://doi.org/10.5650/jos.56.435>
- Fukuoka, T., Yanagihara, T., Imura, T., Morita, T., Sakai, H., Abe, M., & Kitamoto, D. (2011).** Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D and its aqueous phase behavior. *Carbohydrate Research*, 346(2), 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.11.025>
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2012).** Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70–78.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>

- García-Muse, T., Steinberg, G., & Pérez-Martín, J. (2003).** Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 494–500. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.494-500.2003>
- Garna, H., Mabon, N., Wathelet, B., & Paquot, M. (2004).** New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4652–4659. <https://doi.org/10.1021/jf049647j>
- Geiser, E., Hosseinpour Tehrani, H., Meyer, S., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2018).** Evolutionary freedom in the regulation of the conserved itaconate cluster by Ria1 in related *Ustilaginaceae*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0058-1>
- Geiser, E., Ludwig, F., Zambanini, T., Wierckx, N., & Blank, L. M. (2016).** Draft genome sequences of itaconate-producing *Ustilaginaceae*. *Genome Announcements*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01291-16>
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Engel, M., Kleineberg, W., Büttner, L., Sarikaya, E., Hartog, T. den, Klankermayer, J., Leitner, W., Bölker, M., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2016).** Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production. *Metabolic Engineering*, 38(August), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.006>
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L. M., & Bölker, M. (2015).** *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate transaconitate. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12329>
- Geiser, E., Reindl, M., Blank, L. M., Feldbrügge, M., Wierckx, N., & Schipper, K. (2016).** Activating intrinsic carbohydrate-active enzymes of the smut fungus *Ustilago maydis* for the degradation of plant cell wall components. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5174–5185. <https://doi.org/10.1128/AEM.00713-16>
- Geiser, E., Wiebach, V., Wierckx, N., & Blank, L. M. (2014).** Prospecting the biodiversity of the fungal family *Ustilaginaceae* for the production of value-added chemicals. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0002-y>
- Geiser, E., Wierckx, N., Zimmermann, M., & Blank, L. M. (2013).** Identification of an endo-1,4-beta-xylanase of *Ustilago maydis*. *BMC Biotechnology*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-59>
- Gellissen, G. (2000).** Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 741–750. <https://doi.org/10.1007/s002530000464>
- Gerngross, T. U. (2004).** Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1409–1414. <https://doi.org/10.1038/nbt1028>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Iii, C. A. H., Smith, H. O., & America, N. (2009).** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 12–16. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1318>
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M., & Kahmann, R. (1992).** A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, 68(4), 647–657. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90141-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90141-X)
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., & Coradetti, S. (2013).** Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Review of Microbiology*, 67(June), 477–498. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150044>

- Göhre, V., Vollmeister, E., Bölker, M., & Feldbrügge, M. (2012).** Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Communicative and Integrative Biology*, 5(5), 485–490. <https://doi.org/10.4161/cib.21219>
- Golubev, W. I., Kulakovskaya, T. V., Shashkov, A. S., Kulakovskaya, E. V., & Golubev, N. V. (2008).** Antifungal cellobiose lipid secreted by the epiphytic yeast *Pseudozyma graminicola*. *Microbiology*, 77(2), 171–175. <https://doi.org/10.1134/S0026261708020082>
- Gore, J., Youk, H., & Van Oudenaarden, A. (2009).** Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. *Nature*, 459(7244), 253–256. <https://doi.org/10.1038/nature07921>
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., & Shabalov, I. (2014).** MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 699–704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Guevarra, E. D., & Tabuchi, T. (1990).** Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartaric, and malic acids by strains of the genus *ustilago*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(9), 2353–2358. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.2353>
- Günter, E. A., & Popeyko, O. V. (2016).** Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 147, 490–499. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.026>
- Günther, M., Grumaz, C., Lorenz, S., Stevens, P., Lindemann, E., Hirth, T., Sohn, K., Zibek, S., & Rupp, S. (2015).** The transcriptomic profile of *Pseudozyma aphidis* during production of mannosylerythritol lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1375–1388. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6359-2>
- Günther, M., Zibek, S., Hirth, T., & Rupp, S. (2010).** Synthese und optimierung von cellobioselipiden und mannosylerythritollipiden. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 82(8), 1215–1221. <https://doi.org/10.1002/cite.201000078>
- Gupta, R., Jung, E., & Brunak, S. (2004).** <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>. Prediction of N-Glycosylation Sites in Human Proteins.
- Haag, C., Klein, T., & Feldbrügge, M. (2019).** ESCRT mutant analysis and imaging of ESCRT components in the model fungus *Ustilago maydis*. In *The ESCRT Complexes Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1998* (pp. 251–271). Humana, New York, NY. <http://www.springer.com/series/7651>
- Hammami, W., Labbé, C., Chain, F., Mimeo, B., & Bélanger, R. R. (2008).** Nutritional regulation and kinetics of flocculosin synthesis by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 307–315. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1541-z>
- Hartmann, A., Krüger, J., Lottspeich, F., & Kahmann, R. (1999).** Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell*, 11(7), 1293–1305. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1293>
- Haskins, R. H. (1950).** Biochemistry of the *Ustilaginales*: I. Preliminary Cultural Studies of *Ustilago zeae*. *Canadian Journal of Research*, 28c(2), 213–223. <https://doi.org/10.1139/cjr50c-012>
- Haskins, R. H., & Thorn, J. A. (1951).** Biochemistry of the *Ustilaginales* VII: Antibiotic Activity of Ustilagic Acid. *Canadian Journal of Botany*, 29(6), 585–592. <https://doi.org/10.1139/b51-046>
- Helenius, A., & Aebi, M. (2001).** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*,

291(5512), 2364–2369. <https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2364>

- Helmy, Q., Kardena, E., Funamizu, N., & Wisjnuprpto. (2011).** Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. *International Journal of Biotechnology*, 12(1–2), 66–86. <https://doi.org/10.1504/IJBT.2011.042682>
- Hendel, A., Fine, E. J., Bao, G., & Porteus, M. H. (2015).** Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends in Biotechnology*, 33(2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.001>
- Henrik Nielsen. (2017).** Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods in Molecular Biology*, 1611(59), 73. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5>
- Hewald, S., Josephs, K., Bölker, M., & Bo, M. (2005).** Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis* Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3033–3040. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3033>
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5469–5477. <https://doi.org/10.1128/AEM.00506-06>
- Holliday, R. (1974).** Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics*, 78(1), 273–287.
- Horst, R. J., Zeh, C., Saur, A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., & Voll, L. M. (2012).** The *ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryotic Cell*, 11(3), 368–380. <https://doi.org/10.1128/EC.05191-11>
- Hosseinpour Tehrani, H., Becker, J., Bator, I., Saur, K., Meyer, S., Rodrigues Lóia, A. C., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2019).** Integrated strain- And process design enable production of 220 g L⁻¹ itaconic acid with *Ustilago maydis*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1605-6>
- Hosseinpour Tehrani, H., Saur, K., Tharmasothirajan, A., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2019).** Process engineering of pH tolerant *Ustilago cynodontis* for efficient itaconic acid production. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1266-y>
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011).** Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.014>
- Huisjes, E. H., Luttik, M. A. H., Almering, M. J. H., Bisschops, M. M. M., Dang, D. H. N., Kleerebezem, M., Siezen, R., van Maris, A. J. A., & Pronk, J. T. (2012).** Toward pectin fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of the first two steps of a bacterial pathway for D-galacturonate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 162(2–3), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.003>
- Hußnätter, K. P. (2015).** Establishing new regulatory elements for protein expression in *Ustilago maydis*. In *Bachelor's thesis*. Heinrich Heine University Düsseldorf.
- Ibrahim, E., Jones, K. D., Hosseney, E. N., & Escudero, J. M. (2013).** Molecular Cloning and Expression of cellulase and polygalacturonase genes in *E. coli* as a promising application for biofuel production. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 04(03), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000147>

- Ibrahim, E., Jones, K. D., Taylor, K. E., Hosseney, E. N., Mills, P. L., & Escudero, J. M. (2017). Molecular and biochemical characterization of recombinant cel12B, cel8C, and peh28 overexpressed in *Escherichia coli* and their potential in biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0732-1>
- Idiris, A., Bi, K., Tohda, H., Kumagai, H., & Giga-Hama, Y. (2006). Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast*, 23(2), 83–99. <https://doi.org/10.1002/yea.1342>
- Imura, T., Yamamoto, S., Yamashita, C., Taira, T., Minamikawa, H., Morita, T., & Kitamoto, D. (2014). Aqueous gel formation from sodium salts of cellobiose lipids. *Journal of Oleo Science*, 63(10), 1005–1010. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14104>
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. (6(9)). San Diego, USA, Acad Press.
- Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H., & Kamata, T. (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. *Chemistry Letters*, 16(5), 763–766. <https://doi.org/10.1246/cl.1987.763>
- Iturriaga, G., Jefferson, R. A., & Bevan, M. W. (1989). Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 1(3), 381–390. <https://doi.org/10.2307/3869017>
- Jankowski, S., Pohlmann, T., Baumann, S., Müntjes, K., Devan, S. K., Zander, S., Feldbrügge, M. (2019). The multi PAM 2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport. *EMBO Reports*, 20(9), 1–15. <https://doi.org/10.15252/embr.201847381>
- Jawed, K., Yazdani, S. S., & Koffas, M. A. (2019). Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering. *Metabolic Engineering Communications*, 9(May), e00095. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00095>
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- Jeong, D., Ye, S., Park, H., & Kim, S. R. (2020). Simultaneous fermentation of galacturonic acid and five-carbon sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 295(October 2019), 122259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122259>
- Jezierska, S., Claus, S., & Van Bogaert, I. (2018). Yeast glycolipid biosurfactants. *FEBS Letters*, 592(8), 1312–1329. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12888>
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184(June). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0962-8>
- Kämper, Jörg, Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saviile, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vraneš, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J.,

- Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Kämper, Jörg, Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., & Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: Nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, 81(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90372-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90372-0)
- Kang, J., He, S., Zhou, W., Shen, Z., Li, Y., Chen, M., Zhang, Q., & Wang, Y. (2020). Single-pass transformation of syngas into ethanol with high selectivity by triple tandem catalysis. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14672-8>
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
- Kent, L. M., Loo, T. S., Melton, L. D., Mercadante, D., Williams, M. A. K., & Jameson, G. B. (2016). Structure and properties of a non-processive, salt-requiring, and acidophilic pectin methylesterase from *Aspergillus niger* provide insights into the key determinants of processivity control. *Journal of Biological Chemistry*, 291(3), 1289–1306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673152>
- Kester, H. C. M., Kusters-Van Someren, M. A., Müller, Y., & Visser, J. (1996). Primary structure and characterization of an exopolysaccharidase from *Aspergillus tubingensis*. *European Journal of Biochemistry*, 240(3), 738–746. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0738h.x>
- Khrunyk, Y., Münch, K., Schipper, K., Lupas, A. N., & Kahmann, R. (2010). The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *The New Phytologist*, 187(4), 957–968. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03413.x>
- Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1999). Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 713–721. <https://doi.org/10.1007/s002530051583>
- Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., & Tabuchi, T. (1990). Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 31–36. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10869918>
- Kitamoto, D., Isoda, H., & Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - From energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(3), 187–201. <https://doi.org/10.1263/jbb.94.187>
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Klement, T., Milker, S., Jager, G., Grande, P. M., Dominguez de Maria, P., & Buchs, J. (2012). Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-43>
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D., & Feldbrügge, M. (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is

- essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(12), 1–15. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011213>
- Konishi, M., & Makino, M. (2018).** Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(1), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.08.003>
- Kracher, D., Oros, D., Yao, W., Preims, M., Rezić, I., Haltrich, D., Rezić, T., & Ludwig, R. (2014).** Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnology Journal*, 9(4), 483–492. <https://doi.org/10.1002/biot.201300214>
- Kuivanen, J., Biz, A., & Richard, P. (2019).** Microbial hexuronate catabolism in biotechnology. *AMB Express*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0737-1>
- Kuivanen, J., Dantas, H., Mojzita, D., Mallmann, E., Biz, A., Krieger, N., Mitchell, D., & Richard, P. (2014).** Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *Aspergillus niger*. *AMB Express*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0033-z>
- Kuivanen, J., Penttilä, M., & Richard, P. (2015).** Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0184-2>
- Kuivanen, J., & Richard, P. (2016).** Engineering a filamentous fungus for l-rhamnose extraction. *AMB Express*, 6(1), 6–11. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0198-8>
- Kulakovskaya, E., Baskunov, B., & Zvonarev, A. (2014).** The antibiotic and membrane-damaging activities of cellobiose lipids and sophorose lipids. *Journal of Oleo Science*, 63(7), 701–707. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14037>
- Kulakovskaya, Tatyana, Shashkov, A., Kulakovskaya, E., Golubev, W., Zinin, A., Tsvetkov, Y., Grachev, A., & Nifantiev, N. (2009).** Extracellular cellobiose lipid from yeast and their analogues: Structures and fungicidal activities. *Journal of Oleo Science*, 58(3), 133–140. <https://doi.org/10.5650/jos.58.133>
- Kulakovskaya, Tatiana V., Kulakovskaya, E. V., & Golubev, W. I. (2003).** ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 401–404. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00202-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00202-7)
- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008).** Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 377–391. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>
- Kundu, D., Hazra, C., Dandi, N., & Chaudhari, A. (2013).** Biodegradation of 4-nitrotoluene with biosurfactant production by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Metabolic pathway, cell surface properties and toxicological characterization. *Biodegradation*, 24(6), 775–793. <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9627-4>
- Kurz, M., Eder, C., Isert, D., Li, Z., Paulus, E. F., Schiell, M., Toti, L., Vértessy, L., Wink, J., & Seibert, G. (2003).** Ustilipids, acylated β -D-mannopyranosyl D-erythritols from *Ustilago maydis* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Antibiotics*, 56(2), 91–101. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.56.91>
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2005).** Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International*, 31(2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.009>
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(15), 680–685.

- Laing, E., & Pretorius, I. S. (1993).** Co-expression of an *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase-encoding gene (peIE) and an *E. carotovora* polygalacturonase-encoding gene (peh1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(2), 181–188. <https://doi.org/10.1007/BF00228603>
- Lameiras, F., Ras, C., ten Pierick, A., Heijnen, J. J., & van Gulik, W. M. (2018).** Stoichiometry and kinetics of single and mixed substrate uptake in *Aspergillus niger*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(2), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1854-3>
- Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., & Yin, X. (2015).** Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>
- Lange, L. (2017).** Fungal enzymes and yeasts for conversion of plant biomass to bioenergy and high-value products. *Microbiology Spectrum*, 5(1), 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0007-2016>
- Langner, T., Öztürk, M., Hartmann, S., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher, B., Walton, J. D., & Göhrea, V. (2015).** Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, 14(9), 846–857. <https://doi.org/10.1128/EC.00022-15>
- Larsen, F. H., Byg, I., Damager, I., Diaz, J., Engelsen, S. B., & Ulvskov, P. (2011).** Residue specific hydration of primary cell wall potato pectin identified by solid-state ¹³C single-pulse MAS and CP/MAS NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 12(5), 1844–1850. <https://doi.org/10.1021/bm2001928>
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015).** Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112–166. <https://doi.org/10.3390/plants4010112>
- Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B. O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., & Kim, J. J. (2018).** Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*, 241, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>
- Lee, Jeewon. (1997).** Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56(1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- Lee, Jungho, Hilgers, F., Loeschke, A., Jaeger, K.-E., & Feldbrügge, M. (2020).** *Ustilago maydis* serves as a novel production host for the synthesis of plant and fungal Sesquiterpenoids. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01655>
- Lemieux, R. ., Thorn, J. A., Brice, C., & Haskins, R. H. (1951).** Biochemistry of the *ustilaginales*. *Canadian Journal of Chemistry*, 29(126), 409–414.
- Lemieux, R. U. (1953).** Biochemistry of the *ustilaginales* VIII. The structures and configurations of the ustilic acids. *Canadian Journal of Microbiology*, 1(148), 749–756. <https://doi.org/10.1139>
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014).** Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, 165(C), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>
- Levasseur, A., Navarro, D., Punt, P. J., Belaïch, J. P., Asther, M., & Record, E. (2005).** Construction of engineered bifunctional enzymes and their overproduction in *Aspergillus niger* for improved enzymatic tools to degrade agricultural by-products. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8132–8140. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8132-8140.2005>

- Limberg, G., Körner, R., Buchholt, H. C., Christensen, T. M. I. E., Roepstorff, P., & Mikkelsen, J. D. (2000).** Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. niger*. *Carbohydrate Research*, 327(3), 293–307. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00067-7)
- Liu, Y., Koh, C. M. J., & Ji, L. (2011).** Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*, 102(4), 3927–3933. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.115>
- Loqué, D., Scheller, H. V., & Pauly, M. (2015).** Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.018>
- Lynd, L. R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E., & Laser, M. (2005).** Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(5), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.08.009>
- Macrelli, S., Galbe, M., & Wallberg, O. (2014).** Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-26>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019).** The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013).** RNA-Guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)*, 339(2), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012).** Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>
- Markovič, O., & Janeček, Š. (2001).** Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: Sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Engineering*, 14(9), 615–631. <https://doi.org/10.1093/protein/14.9.615>
- Marqués, A. M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Ortiz, A., Manresa, A., & Espuny, M. J. (2009).** The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and Physics of Lipids*, 158(2), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.01.001>
- Martens-Uzunova, E. S., & Schaap, P. J. (2008).** An evolutionary conserved D-galacturonic acid metabolic pathway operates across filamentous fungi capable of pectin degradation. *Fungal Genetics and Biology*, 45(11), 1449–1457. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.08.002>
- Martens-Uzunova, E. S., Zandleven, J. S., Benen, J. a E., Awad, H., Kools, H. J., Beldman, G., Voragen, A. G. J., Van den Berg, J. a, & Schaap, P. J. (2006).** A new group of exo-acting family 28 glycoside hydrolases of *Aspergillus niger* that are involved in pectin degradation. *The Biochemical Journal*, 400, 43–52. <https://doi.org/10.1042/BJ20060703>
- Martín, J. F. (2000).** Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: Regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2355–2362. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2355-2362.2000>
- Martínez-Espinoza, A. D., Ruiz-Herrera, J., León-Ramírez, C. G., & Gold, S. E. (2004).** MAP

- kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Current Microbiology*, 49(4), 274–281. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4315-6>
- Matei, A., & Doehlemann, G. (2016).** Cell biology of corn smut disease — *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.020>
- Matei, A., Ernst, C., Günl, M., Thiele, B., Altmüller, J., Walbot, V., Usadel, B., & Doehlemann, G. (2018).** How to make a tumour: cell type specific dissection of *Ustilago maydis*-induced tumour development in maize leaves. *New Phytologist*, 217(4), 1681–1695. <https://doi.org/10.1111/nph.14960>
- Matsumoto, Y., Kuwabara, K., Ichihara, H., & Kuwano, M. (2016).** Therapeutic effects of trehalose liposomes against lymphoblastic leukemia leading to apoptosis in vitro and in vivo. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(2), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.025>
- May, C. D. (1990).** Industrial pectins: Sources, production and applications". *Carbohydrate Polymers. J. Ind. Appl. Pectin*, 12(1), 79–99.
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R., & Jenkins, J. (1997).** Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*, 5, 677–689. <https://doi.org/10.2478/amm-2013-0154>
- McCann, M. C., & Carpita, N. C. (2015).** Biomass recalcitrance: A multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4109–4118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv267>
- Mccarter, J. D., & Withers, S. G. (1994).** Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 885–892. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2)
- Mellinas, C., Ramos, M., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2020).** Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural-based biopolymer for food packaging applications. *Materials*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/ma13030673>
- Miller, G. L. (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mimee, B., Pelletier, R., & Bélanger, R. R. (2009).** In vitro antibacterial activity and antifungal mode of action of flocculosin, a membrane-active cellobiose lipid. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 989–996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04280.x>
- Mimee, Benjamin, Labbé, C., & Bélanger, R. R. (2009).** Catabolism of flocculosin, an antimicrobial metabolite produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Glycobiology*, 19(9), 995–1001. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp078>
- Mimee, Benjamin, Labbé, C., Pelletier, R., & Bélanger, R. R. (2005).** Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1597–1599. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1597-1599.2005>
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T. N. C., & Surolia, A. (2006).** N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.003>
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2016).** Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture*, 96(13), 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>
- Mohnen, D. (2008).** Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Moon, H. J., Jeya, M., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2010).** Biotechnological production of erythritol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1017–1025. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2496-4>
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2013).** Accumulation of cellobiose lipids under nitrogen-limiting conditions by two ustilaginomycetous yeasts, *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma hubeiensis*. *FEMS Yeast Research*, 13(1), 44–49. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12005>
- Morita, T., Ishibashi, Y., Fukoka, T., Imura, T., Sakai, H., Abe, M., & Kitamoto, D. (2011).** Production of glycolipid biosurfactants, cellobiose lipids, by *Cryptococcus humicola* JCM 1461 and their interfacial properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), 1597–1599. <https://doi.org/10.1271/bbb.110036>
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, H. K., & Kitamoto, D. (2007).** Characterization of the genus *Pseudozyma* by the formation of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 286–292. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00154.x>
- Morita, T., Takashima, M., Fukuoka, T., Konishi, M., Imura, T., & Kitamoto, D. (2010).** Isolation of basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis* and production of glycolipid biosurfactant, a diastereomer type of mannosylerythritol lipid-B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 679–688. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2762-5>
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., de Vries, R. P. (2008).** The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(SUPPL. 1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.03.012>
- Müller, M. J. (2019).** *Online Analytics of Pectic Compound Degradation in Small-Scale Using Ustilago Maydis* (Issue November). RWTH Aachen.
- Müller, M. J., Stachurski, S., Stoffels, P., Schipper, K., & Feldbrügge, M. (2018).** Online evaluation of the metabolic activity of *Ustilago maydis* on (poly) galacturonic acid. *Journal of Biological Engineering*, 12(34), 1–17.
- Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012).** Rhamnolipids-Next generation surfactants? *Journal of Biotechnology*, 162(4), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>
- Mulligan, C. N. (2005).** Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012).** Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>
- Müntjes, K., Philipp, M., Hüsemann, L., Heucken, N., Weidtkamp-Peters, S., Schipper, K., Zurbriggen, M. D., & Feldbrügge, M. (2020).** Establishing polycistronic expression in the model microorganism *Ustilago maydis*. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01384>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., & Roberto, I. C. (2008).** Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>

- Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., & Banat, I. M. (2019).** Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(1), 12–28. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>
- Nielsen, J. C., Lino, F. S. de O., Rasmussen, T. G., Thykær, J., Workman, C. T., & Basso, T. O. (2018).** Industrial antifoam agents impair ethanol fermentation and induce stress responses in yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(1), 513. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8643-4>
- Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O., & Contiero, J. (2005).** Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, *21*(6), 1593–1600. <https://doi.org/10.1021/bp050239p>
- Niture, S. K. (2008).** Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, *63*(1), 1–19. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0018-y>
- Niu, J., Alazi, E., Reid, I. D., Arentshorst, M., Punt, P. J., Visser, J., Tsang, A., & Ram, A. F. J. (2017).** An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for D-Galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *Genetics*, *205*(1), 169–183. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194050>
- Niu, J., Homan, T. G., Arentshorst, M., de Vries, R. P., Visser, J., & Ram, A. F. J. (2015).** The interaction of induction and repression mechanisms in the regulation of galacturonic acid-induced genes in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, *82*, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.06.006>
- Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Roberts, S. M., Dodson, E. J., McKie, V. A., Taylor, E. J., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2002).** Cellvibrio japonicus α -l-arabinanase 43a has a novel five-blade β -propeller fold. *Nature Structural Biology*, *9*(9), 665–668. <https://doi.org/10.1038/nsb835>
- Ohm, R. A., De Jong, J. F., Lugones, L. G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J. E., De Vries, R. P., Record, E., Levasseur, A., Baker, S. E., Bartholomew, K. A., Coutinho, P. M., Erdmann, S., Fowler, T. J., Gathman, A. C., Lombard, V., Henrissat, B., Knabe, N., Kües, U., ... Wösten, H. A. B. (2010).** Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, *28*(9), 957–963. <https://doi.org/10.1038/nbt.1643>
- Olgeiser, L., Haag, C., Boerner, S., Ule, J., Busch, A., Koepke, J., König, J., Feldbrügge, M., & Zarnack, K. (2019).** The key protein of endosomal mRNP transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Reports*, *20*(1), 1–17. <https://doi.org/10.15252/embr.201846588>
- Ostergaard, S., Walløe, K. O., Gomes, C. S. G., Olsson, L., & Nielsen, J. (2001).** The impact of GAL6, GAL80, and MIG1 on glucose control of the GAL system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *1*(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(01\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(01)00003-4)
- Parisutham, V., Kim, T. H., & Lee, S. K. (2014).** Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, *161*, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- Paulino, B. N., Pessôa, M. G., Mano, M. C. R., Molina, G., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2016).** Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(24), 10265–10293. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>
- Pauly, M., & Keegstra, K. (2008).** Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, *54*(4), 559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x>

- Pauly, M., & Keegstra, K. (2010).** Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.009>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015).** Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Peremarti, A., Twyman, R. M., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Sabalza, M., Miralpeix, B., Dashevskaya, S., Yuan, D., Ramessar, K., Christou, P., Zhu, C., Bassie, L., & Capell, T. (2010).** Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Molecular Biology*, 73(4), 363–378. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9628-1>
- Pińkowska, H., Krzywonos, M., Wolak, P., & Złocińska, A. (2019).** Production of uronic acids by hydrothermolysis of pectin as a model substance for plant biomass waste. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 683–690. <https://doi.org/10.1515/gps-2019-0039>
- Prins, A., & van't Riet, K. (1987).** Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *Trends in Biotechnology*, 5(11), 296–301. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90080-1](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90080-1)
- Protzko, R. J., Latimer, L. N., Martinho, Z., de Reus, E., Seibert, T., Benz, J. P., & Dueber, J. E. (2018).** Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of D-galacturonic acid and D-glucose from citrus peel waste. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07589-w>
- Qu, Y. H., Zeng, G. M., Huang, J. H., Xu, K., Fang, Y. Y., Li, X., & Liu, H. L. (2008).** Recovery of surfactant SDS and Cd²⁺ from permeate in MEUF using a continuous foam fractionator. *Journal of Hazardous Materials*, 155(1–2), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.024>
- Radzuan, M. N., Banat, I. M., & Winterburn, J. (2017).** Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. *Bioresource Technology*, 225, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003).** Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90(2), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00114-7)
- Ralet, M. C., Cabrera, J. C., Bonnin, E., Quemener, B., Hellin, P., & Thibault, J. F. (2005).** Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66(15), 1832–1843. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.06.003>
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017).** Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(January), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>
- Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H., & Lang, S. (2005).** Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 607–613. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1906-5>
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N., & Scazzocchio, C. (1997).** Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO Journal*, 16(13), 3974–3986. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3974>
- Reindl, M., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S., & Schipper, K. (2019).** A potential lock-type

- mechanism for unconventional secretion in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030460>
- Reindl, M. S. (2013).** Steigerung des Expressionslevels der Endochitinase Cts1 zur Optimierung der unkonventionellen Proteinsekretion in *Ustilago maydis*. *Bachelor's Thesis*, Heinrich Heine University Düsseldorf.
- Remoroza, C., Wagenknecht, M., Gu, F., Buchholt, H. C., Moerschbacher, B. M., Schols, H. A., & Gruppen, H. (2014).** A *Bacillus licheniformis* pectin acetyltransferase is specific for homogalacturonans acetylated at O-3. *Carbohydrate Polymers*, 107(1), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.006>
- REN. (2019).** Renewables 2019 Global Status Report. In *Renewables 2019 Global Status Report* (Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/resources8030139>
- Richard, P., & Hilditch, S. (2009).** D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 597–604. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1870-6>
- Ridley, B. L., Neill, M. A. O., & Mohnen, D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014).** Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rodríguez Estévez, M. (2016).** Establishing novel glycolipid variants in *Ustilago maydis*. In *Master's thesis*. Heinrich Heine University Düsseldorf.
- Rødsrud, G., Lersch, M., & Sjöde, A. (2012).** History and future of world's most advanced biorefinery in operation. *Biomass and Bioenergy*, 46, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.028>
- Roell, G. W., Zha, J., Carr, R. R., Koffas, M. A., Fong, S. S., & Tang, Y. J. (2019).** Engineering microbial consortia by division of labor. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1083-3>
- Roxburgh, J. M., Spencer, J. F. T., & Sallans, H. R. (1954).** Factors Affecting the Production of Ustilagic Acid by *Ustilago zaeae*. *Agricultural and Food Chemistry*, 2(22), 1121–1124.
- Ruchala, J., Kurylenko, O. O., Dmytruk, K. V., & Sibirny, A. A. (2020).** Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(1), 109–132. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>
- Ruiz-Herrera, J., Leon, C. G., Guevara-Oivera, L., & Carabez-Trejo, A. (1995).** diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141, 695–703. www.microbiologyresearch.org
- Ruiz, H. A., Conrad, M., Sun, S. N., Sanchez, A., Rocha, G. J. M., Romani, A., Castro, E., Torres, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Andrade, L. P., Smirnova, I., Sun, R. C., & Meyer, A. S. (2020).** Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 299(December 2019), 122685. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>
- Saerens, K. M. J., Roelants, S. L., Van Bogaert, I. N., & Soetaert, W. (2011).** Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGTA1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214. *FEMS Yeast Research*, 11(1), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00695.x>

- Saika, A., Koike, H., Fukuoka, T., & Morita, T. (2018).** Tailor-made mannosylerythritol lipids: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(16), 6877–6884. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9160-9>
- Saika, A., Koike, H., Fukuoka, T., Yamamoto, S., Kishimoto, T., & Morita, T. (2016).** A gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids consisted of 4-O- β -D-Mannopyranosyl-(2R,3S)-Erythritol as the sugar moiety in a basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis*. *PLoS ONE*, *11*(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157858>
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E. J. (1993).** Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, *39*(C), 213–294. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70597-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70597-5)
- Sambrook, J., Frisch, F. E., & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Sandarani, M. (2017).** A Review: Different Extraction Techniques of Pectin. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products*, *03*(03), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2472-0992.1000143>
- Sarachat, T., Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., & Rujiravanit, R. (2010).** Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresource Technology*, *101*(1), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.012>
- Sarkari, P., Reindl, M., Stock, J., Müller, O., Kahmann, R., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2014).** Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, *191*, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.028>
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010).** Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(2), 127–144. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>
- Scheidle, M., Dittrich, B., Klinger, J., Ikeda, H., Klee, D., & Büchs, J. (2011).** Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics. *BMC Biotechnology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-25>
- Schenk, T., Schuphan, I., & Schmidt, B. (1995).** High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chromatography A*, *693*(1), 7–13. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01127-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01127-Z)
- Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L., & Benz, J. P. (2019).** Spotlight on fungal pectin utilization—from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(6), 2507–2524. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09622-4>
- Schuler, D., Wahl, R., Wippel, K., Vranes, M., Münsterkötter, M., Sauer, N., & Kämper, J. (2015).** Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytologist*, *206*(3), 1086–1100. <https://doi.org/10.1111/nph.13314>
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., & Kahmann. (1990).** The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, *60*(3), 521.
- Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., & Kahmann, R. (2016).** Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genetics and Biology*, *89*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.001>

- Sénéchal, F., Wattier, C., Rustérucci, C., & Pelloux, J. (2014).** Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*(18), 5125–5160. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru272>
- Shahab, R. L., Luterbacher, J. S., Brethauer, S., & Studer, M. H. (2018).** Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a synthetic fungal-bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(5), 1207–1215. <https://doi.org/10.1002/bit.26541>
- Sharma, P., Yan, F., Doronina, V. A., Escuin-Ordinas, H., Ryan, M. D., & Brown, J. D. (2012).** 2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding. *Nucleic Acids Research*, *40*(7), 3143–3151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1176>
- Shevchik, V E, & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997).** Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology*, *24*(6), 1285–1301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4331800.x>
- Shevchik, Vladimir E., Scott, M., Mayans, O., & Jenkins, J. (1998).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of a member of a new family of pectate lyases, PeIL from *Erwinia chrysanthemi*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *54*(3), 419–422. <https://doi.org/10.1107/S0907444497012043>
- Shin, S. K., Hyeon, J. E., Kim, Y. I., Kang, D. H., Kim, S. W., Park, C., & Han, S. O. (2015).** Enhanced hydrolysis of lignocellulosic biomass: Bi-functional enzyme complexes expressed in *Pichia pastoris* improve bioethanol production from *Miscanthus sinensis*. *Biotechnology Journal*, *10*(12), 1912–1919. <https://doi.org/10.1002/biot.201500081>
- Shou, W., Ram, S., & Vilar, J. M. G. (2007).** Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(6), 1877–1882. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610575104>
- Siguier, B., Haon, M., Nahoum, V., Marcellin, M., Burlet-Schiltz, O., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Mourey, L., O'Donohue, M. J., Berrin, J. G., Tranier, S., & Dumon, C. (2014).** First structural insights into α -L-Arabinofuranosidases from the two GH62 glycoside hydrolase subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(8), 5261–5273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528133>
- Silva, I. A., Veras, B. O., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Campos Guerra, J. M., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020).** Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ*, *2020*(4), 1–23. <https://doi.org/10.7717/peerj.9064>
- Skropeta, D. (2009).** The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *17*(7), 2645–2653. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.037>
- Snetselaar, K. M., Mims, C. W., Mycologia, S., & Apr, N. M. (1992).** Sporidial Fusion and Infection of Maize Seedlings by the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, *84*(2), 193–203.
- Sosso, D., Van Der Linde, K., Bezruczyk, M., Schuler, D., Schneider, K., Kämper, J., & Walbot, V. (2019).** Sugar partitioning between *Ustilago maydis* and its host ze mays I during infection. *Plant Physiology*, *179*(4), 1373–1385. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01435>
- Souffriau, B., Den Abt, T., & Thevelein, J. M. (2012).** Evidence for rapid uptake of d-galacturonic acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a channel-type transport system. *FEBS Letters*, *586*(16), 2494–2499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.012>
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., & Kahmann, R. (1994).** Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal*, *13*(7), 1620–1627.

<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06425.x>

- Spoeckner, S., Wray, V., Nitz, M., & Lang, S. (1999).** Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/s002530051359>
- Sprockett, D. D., Piontkivska, H., & Blackwood, C. B. (2011).** Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. *Gene*, 479(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.02.009>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016).** General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(July), 4–10. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2012).** Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.004>
- Stoffels, P., Müller, M. J., Stachurski, S., Terfrüchte, M., Schröder, S., Ihling, N., Wierckx, N., Feldbrügge, M., Schipper, K., & Büchs, J. (2020).** Complementing the intrinsic repertoire of *Ustilago maydis* for degradation of the pectin backbone polygalacturonic acid. *Journal of Biotechnology*, 307(October 2019), 148–163. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.022>
- Suh, S.-J., Invally, K., & Ju, L.-K. (2017).** Rhamnolipids: Pathways, Productivities, and Potential. In *Biobased Surfactants* (pp. 169–204).
- Tanger, P., Field, J. L., Jahn, C. E., DeFoort, M. W., & Leach, J. E. (2013).** Biomass for thermochemical conversion: Targets and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 4(JUL), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00218>
- Teichmann, B., Labbé, C., Lefebvre, F., Bölker, M., Linne, U., & Bélanger, R. R. (2011).** Identification of a biosynthesis gene cluster for flocculosin a cellobiose lipid produced by the biocontrol agent *Pseudozyma flocculosa*. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1483–1495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07533.x>
- Teichmann, B., Lefebvre, F., Labbé, C., Bölker, M., Linne, U., & Bélanger, R. R. (2011).** Beta hydroxylation of glycolipids from *Ustilago maydis* and *Pseudozyma flocculosa* by an NADPH-dependent β -hydroxylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7823–7829. <https://doi.org/10.1128/AEM.05822-11>
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A., & Bölker, M. (2007).** A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 66(2), 525–533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05941.x>
- Teichmann, B., Liu, L., Schink, K. O., & Bölker, M. (2010).** Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *Ustilago maydis* by the C2H2 zinc finger transcription factor rual ∇ . *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2633–2640. <https://doi.org/10.1128/AEM.02211-09>
- Terfrüchte, M. (2016).** *Expression of biopharmaceuticals in Ustilago maydis*. Master Thesis. Heinrich Heine University, Düsseldorf.
- Terfrüchte, M., Joehnk, B., Fajardo-Somera, R., Braus, G. H., Riquelme, M., Schipper, K., & Feldbrügge, M. (2014).** Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 62, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.012>
- Terfrüchte, M., Reindl, M., Jankowski, S., Sarkari, P., Feldbrügge, M., & Schipper, K.**

- (2017). Applying unconventional secretion in *Ustilago maydis* for the export of functional nanobodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050937>
- Terfrüchte, M., Wewetzer, S., Sarkari, P., Stollewerk, D., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Schlepütz, T., Feldbrügge, M., Büchs, J., & Schipper, K. (2018).** Tackling destructive proteolysis of unconventionally secreted heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 284(February), 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.035>
- Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Roger, P., & Crépeau, M. J. (1993).** Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238(C), 271–286. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87019-O](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87019-O)
- Tiso, T., Zauter, R., Tulke, H., Leuchtle, B., Li, W. J., Behrens, B., Wittgens, A., Rosenau, F., Hayen, H., & Blank, L. M. (2017).** Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: Production and characterization. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0838-y>
- Toribio, J., Escalante, A. E., & Soberón-Chávez, G. (2010).** Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(10), 1082–1087. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900256>
- Tull, D., Gottschalk, T. E., Svendsen, I., Kramhøft, B., Phillipson, B. A., Bisgård-Frantzen, H., Olsen, O., & Svensson, B. (2001).** Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus* α -amylase produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 13–23. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1348>
- Uchida, Y., Tsuchiya, R., Chino, M., Hirano, J., & Tabuchi, T. (1989).** Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), 757–763. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869385>
- Valenzuela-Ortega, M., & French, C. E. (2019).** Engineering of industrially important microorganisms for assimilation of cellulosic biomass: Towards consolidated bioprocessing. *Biochemical Society Transactions*, 47(6), 1781–1794. <https://doi.org/10.1042/BST20190293>
- Van Bogaert, I. N. A., Buyst, D., Martins, J. C., Roelants, S. L. K. W., & Soetaert, W. K. (2016).** Synthesis of bolaform biosurfactants by an engineered *Starmerella bombicola* yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(12), 2644–2651. <https://doi.org/10.1002/bit.26032>
- Van den Brink, J., & de Vries, R. P. (2011).** Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1477–1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3473-2>
- Van Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2006).** Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(4), 391–418. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9085-7>
- Van Renterghem, L., Roelants, S. L. K. W., Baccile, N., Uyttersprot, K., Taelman, M. C., Everaert, B., Mincke, S., Ledegen, S., Debrouwer, S., Scholtens, K., Stevens, C., & Soetaert, W. (2018).** From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1195–1206. <https://doi.org/10.1002/bit.26539>

- Vipulanandan, B. C., Ren, X., & Member, S. (2000).** *Enhanced Solubility and Biodegradation of Biosurfactant*. 126(July), 629–634.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009).** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., & Giartosio, A. (1996).** Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. *Biochemistry*, 35(23). <https://doi.org/10.1021/bi9517704>
- Ward, O. P. (2012).** Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
- Wei, Z., Wang, J. J., Gaston, L. A., Li, J., Fultz, L. M., DeLaune, R. D., & Dodla, S. K. (2020).** Remediation of crude oil-contaminated coastal marsh soil: Integrated effect of biochar, rhamnolipid biosurfactant and nitrogen application. *Journal of Hazardous Materials*, 396(April), 122595. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122595>
- Wendisch, V. F., Brito, L. F., Gil Lopez, M., Hennig, G., Pfeifenschneider, J., Sgobba, E., & Veldmann, K. H. (2016).** The flexible feedstock concept in Industrial Biotechnology: Metabolic engineering of *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and yeast strains for access to alternative carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 234, 139–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.022>
- Wilkerson, C. G., Mansfield, S. D., Lu, F., Withers, S., Park, J. Y., Karlen, S. D., Gonzales-Vigil, E., Padmakshan, D., Unda, F., Rencoret, J., & Ralph, J. (2014).** Monoglignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. *Science*, 344(6179), 90–93. <https://doi.org/10.1126/science.1250161>
- Wittgens, A., & Rosenau, F. (2018).** On the road towards tailor-made rhamnolipids: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8175–8185. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9240-x>
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syldatk, C., Rosenau, F., & Blank, L. M. (2011).** Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10(October). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80>
- Xi, H., Tian, Y., Zhou, N., Zhou, Z., & Shen, W. (2015).** Characterization of an N-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(2), 236–246. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400368>
- Xu, S. X., Qin, X., Liu, B., Zhang, D. Q., Zhang, W., Wu, K., & Zhang, Y. H. (2015).** An acidic pectin lyase from *Aspergillus niger* with favourable efficiency in fruit juice clarification. *Letters in Applied Microbiology*, 60(2), 181–187. <https://doi.org/10.1111/lam.12357>
- Xu, Z., & Huang, F. (2014).** Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 43–62. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1015-y>
- Yadav, S., Kumar, P., Yadav, D., Deo, K., & Yadav, S. (2009).** Pectin lyase : A review. *Process Biochemistry*, 44, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007).** Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100(4), 1356–1364. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.012>
- Ye, S., Kim, J. W., & Kim, S. R. (2019).** Metabolic engineering for improved fermentation of l-arabinose. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 339–346.

<https://doi.org/10.4014/JMB.1812.12015>

- Yuan, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., Yang, P., & Yao, B. (2012).** A protease-resistant exo-polygalacturonase from *Klebsiella* sp. Y1 with good activity and stability over a wide pH range in the digestive tract. *Bioresource Technology*, *123*, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.037>
- Zander, S., Baumann, S., Weidtkamp-Peters, S., Feldbrügge, M. (2016).** Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *Journal of Cell Science*, *129*(14), 2778–2792. <https://doi.org/10.1242/jcs.182824>
- Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J., & Feldbrügge, M. (2006).** Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, *43*(11), 727–738. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.05.006>
- Zhang, G., Qi, J., Xu, J., Niu, X., Zhang, Y., Tao, A., Zhang, L., Fang, P., & Lin, L. (2013).** Overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase gene could increase cellulose content in Jute (*Corchorus capsularis* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *442*(3–4), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.053>
- Zhang, L., Lubbers, R. J. M., Simon, A., Stassen, J. H. M., Vargas Ribera, P. R., Viaud, M., & Van Kan, J. A. L. (2016).** A novel Zn₂Cys₆ transcription factor BcGaaR regulates D-galacturonic acid utilization in *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, *100*(2), 247–262. <https://doi.org/10.1111/mmi.13314>
- Zhang, L., Thiewes, H., & van Kan, J. A. L. (2011).** The D-galacturonic acid catabolic pathway in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(10), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.06.002>
- Zhang, Z., Dong, J., Zhang, D., Wang, J., Qin, X., Liu, B., Xu, X., Zhang, W., & Zhang, Y. (2018).** Expression and characterization of a pectin methylesterase from *Aspergillus niger* ZJ5 and its application in fruit processing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *126*(6), 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.022>
- Zhao, C., Chen, S., & Fang, H. (2018).** Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to itaconic acid by metabolically engineering *Neurospora crassa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(22), 9577–9584. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9362-1>
- Zhou, L., Obhof, T., Schneider, K., Feldbrügge, M., Ulrich Nienhaus, G., & Kämper, J. (2018).** Cytoplasmic Transport Machinery of the SPF27 Homologue Num1 in *Ustilago maydis*. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21628-y>
- Zhou, W., Widmer, W., & Grohmann, K. (2007).** Economic Analysis of Ethanol Production from Citrus Peel Waste. *Proc. Fla. State Hort Soc*, *120*, 310–315.
- Zhu, L., Yang, X., Xue, C., Chen, Y., Qu, L., & Lu, W. (2012).** Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. *Bioresource Technology*, *117*, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.091>
- Zhuge, B., Du, G. C., Shen, W., Zhuge, J., & Chen, J. (2008).** Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.018>
- Zuo, W., Depotter, J. R., & Doehlemann, G. (2020).** Cas9HF1 enhanced specificity in *Ustilago maydis*. *Fungal Biology*, *124*(3–4), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.006>

Internetquellen:

<http://www.feedimpex.nl/beet-pulp-pellets#usage-sugar-beet-pellets> (01.08.2020)

7 Appendix

7.1 Stoffanalysen

Tabelle 15: Metrom Einzelzuckeranalyse der untersuchten Pektine. Dargestellt sind die relativen Zuckeranteile von 100 µl der 0,1 % Pektinlösungen nach TFA Hydrolyse. Der Veresterungsgrad entspricht verfügbaren Herstellerangaben.

	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Glukose	Xylose	Galakturosäure	Veresterungsgrad
Pektin C	2,53	2,88	8,75	26,46	/	59,37	70
Pektin A	1,67	25,31	5,78	35,05	1,98	30,20	N/A -
AU202	4,15	6,36	12,94	4,27	3,15	69,12	68
AU910	6,73	3,04	14,63	26,36	5,20	44,04	4,8
RU301	7,97	12,25	17,37	1,73	1,09	59,59	54
RU CP	9,04	14,22	16,62	0,78	1,06	58,27	57

7.2 Stammanalysen

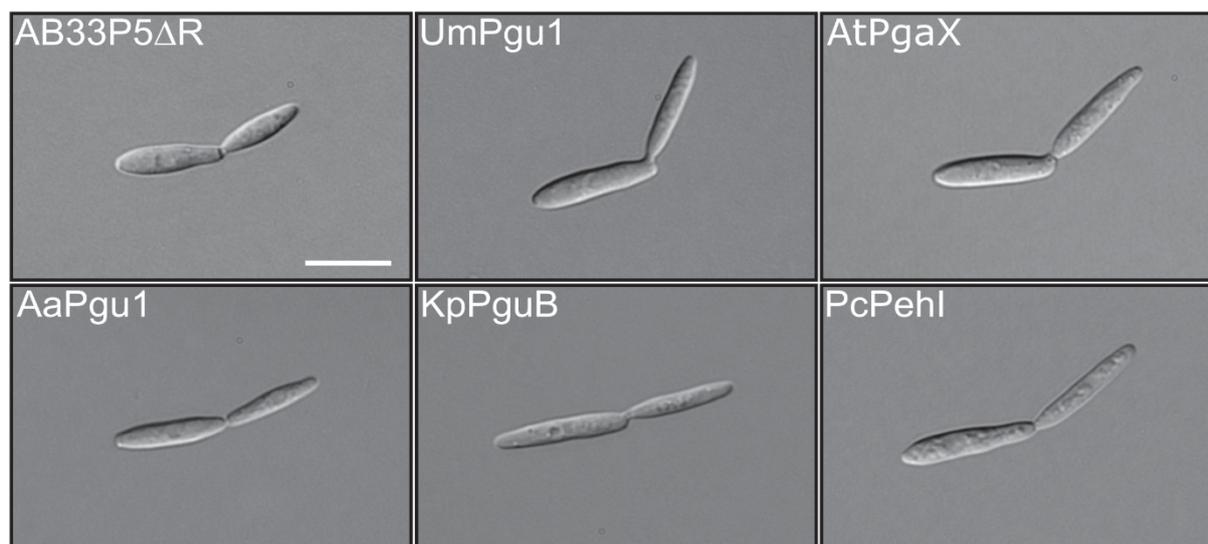


Abbildung 29: Mikroskopische Untersuchung von CAZymes produzierenden AB33P5 Δ^R Derivaten. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen representative Aufnahmen von hefeähnlichen wachsenden Zellen in der finalen Phase der Knospung. Der eingefügte Größenstandard entspricht 20 µm.

Tabelle 16: Itakonsäure Messung mit DAD bei 210 nm. Zellfreie Überstände von 24 h kultivierten Kulturen in modifiziertem Verdun G (2,25 g/L NH_4NO_3) wurden gegen über ein 1260 Infinity System der Firma Agilent mit angeschlossener ISERA Metab AAC 300 × 7.8 mm Säule aufgetrennt und über einen Itakonsäure Standard quantifiziert. Gezeigt sind die Werte für Retentionszeit, Peakfläche und die Konzentrationen an Itakonsäure, die für den Stamm MB215 Δ rua1 Δ ria1 und den MB215 Wildtypstamm ermittelt wurden.

Name	Retention [min]	Peak Fläche [mAU*min]	Konzentration [g/L]
Standardreihe			
ITA Std. 1	14.2972	2685.696	0.1
ITA Std. 2	14.2995	10607.422	0.4
ITA Std. 3	14.301	20910.55	0.8
ITA Std. 4	14.3012	40092.428	1.6
Proben (1:4 Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$)			
MB215 Δ rua1 Δ ria1 I	ND	ND	0
MB215 Δ rua1 Δ ria1 II	ND	ND	0
MB215 WT I	14.2561	1817.746	0.205
MB215 WT II	14.2514	733.741	0.031

7.3 Sequenzalignments

	1	10	20	30	40	50	
UmPelB	MHRWSSWRLGAPL	FALLATLI	VVPLGSA	FTDPYDIL	HHVGTTS	FLPEYYQ	PDTEICIR
AnPNL
	60	70	80	90	100	110	
UmPelB	NGIRNVACSADN	FRLVKLDSV	TRANLHQ	LIAQKQNE	PSMMQLAV	YVMLVDL	ERNMHHGW
AnPNL
	120	130	140	150	160	170	
UmPelB	QVGQSTAAQ	QARATIND	QVQMH	LGLAVS	QSDMDPS	IDGPGAA	KRLGAPPV
AnPNL
	180	190	200	210	220	230	
UmPelB	WLQRNKFAT	ADVDTAL	NELYVR	HVTITQ	DKRWDI	QSTTGCT	ENTLLKRD
AnPNL
	240	250	260	270	280	290	
UmPelB	DDDMNVYHP	VLGTHNQ	DPWAKW	REFDAR	HEFLPS	GEGFGR	KRSIQRR
AnPNL
	300	310	320	330	340	350	
UmPelB	GGRAEQQGA	DAASVPL	ASGV	YAINM	PSAPT	PGGV	GAGVVCD
AnPNL
	360	370	380	390	400	410	
UmPelB	VTGGG	STA	AVVPK	DVNE	LVQL	LSDA	QPRVI
AnPNL
	420	430	440	450	460	470	
UmPelB	PKDKQLA	IDNG	QWCK	DKRATA	VTYD	KAGL	TPITV
AnPNL
	480	490	500	510	520	530	
UmPelB	HQNVI	LHNFR	IDEIN	PNQY	IWGG	GITL	YDTDL
AnPNL
	540	550	560	570	580		
UmPelB	TISN	CLFD	GATK	WSAT	CDGSH	YWT	VLGY
AnPNL
	590	600	610	620	630	640	
UmPelB	QPAV	WHIV	NTIF	DHNT	GHSL	DMG	PGVSA
AnPNL
	650	660	670	680	690		
UmPelB	CNQCK	KGPL	LGRN	CQPN	AYKN	ANPVP	STSN
AnPNL
	700	710	720	730	740	750	
UmPelB	ESVSK	SAGA	AGAA	AVIG	ASSP	ASPG	ASGD
AnPNL
	760	770	780	790	800	810	
UmPelB	IKKQ	QEE	EEQ	NKKQ	QEQE	QNKQ	QEEB
AnPNL
	820	830					
UmPelB	QQKPP	SPPAPP	SPPSPK				
AnPNL				

Abbildung 30: Aminosäure Alignment der charakterisierten Pektin Lyase PNL-ZJ5A (AnPNL, Accession nummer [KM588308.1](#)) aus *A. niger* und UmPelB (UMAG_04708; Accession Nummer [KIS66646.1](#)). identische Aminosäuren sind Schwarz hinterlegt. UmPelB trägt eine N-Terminale Elongation von ca. 350 Aminosäuren, die im vorliegenden Homolog aus *A. niger* nicht vorhanden ist. Die vorhergesagten N-Terminale Signalpeptide sind durch blaue gestrichelte Linien markiert.


```

      1                               10
PoAbf  . . . . . MYRLAAL . . . . . AVIASLGVWOGQ . . . . .
UmAfu1  . . MKLFFAALAAA . . . . . LVASVHGATLPQKMQPDSGPTMDEPNIAAGLKVRKGPQVTDAT
UmAfu2  MKSLSLSWVTMALVLSTYMISSIS . . . . . AAPASSPPAD . . . . .

      20                               30                               40                               50                               60                               70
PoAbf  AQT VSVSATASHPIPTTLWGQMFEDISHSG DGGLYAE LLQNRALQ QVTPNT . . .
UmAfu1  GAQLKGA LTLQLGTKEKAKCIYDMNTFVESNLNYGS DGGLYAE MIRNRAFQ SPADGVFGV
UmAfu2  AAASIPAV T YHVAGNPSRQSNFALAAFIETNINSGT DGGLYAE IIRNRAFQ DNESN . . SR

      80                               90                               100                              110                              120
PoAbf  . . . . . AAS LNAW SAINGGQISVVADSVPV SNS LPNSL RFTVPAGRTGQV GFANS GFFG
UmAfu1  GANDTIGSGS LTAW QPVG . DSKLDDGDKPLS AALPKS AKITCDSKKGDLG GIKNLGFFG
UmAfu2  NKNNTLGGQT L LHW YGTSKSTKLSLSLDNSL S SALLPQ SAIVS . . GDKSHSC GIENAGFFG

      130                              140                              150                              160                              170                              180
PoAbf  MKIVASSTYKGS FVVKFPTASSFTGNLIV GLRRTSGSTIVSQTVPIRGASTS WQQISVSL
UmAfu1  LPVQAGETYNAS F YIRAEKP . . GKMLRY GLYSVDLTETWAQQDSFVEIGTQW TTPVHQVL
UmAfu2  ISVTTEPH . ML S F YARSPTGQTVTPVEV GLYSNDYSITFVRQIMLLELTSE WQQFQRTL

      190                              200                              210                              220                              230                              240
PoAbf  TPRTTTPSTD NQFFVTIDGAAASGQTINFAMF SLFPPT FKNRANGMRDDIATALAEMKPK
UmAfu1  KPIKGAPDINN VFAIQTNC . EIGTF . . HVNLV SLFPPTTFEGTV . . ARKDVAQKMLKFKPK
UmAfu2  TPTQASSNND N VFAIKTSGACQDGF . . QINLV SLMPPTWEGTV . . ARQDLAQAALADIKPV

      250                              260                              270                              280                              290                              300
PoAbf  FFRFPGGNNLE GQTVPTRWQWNATIGSLLDRPGRAGDWG . YINTDGLGLLE YLLFCEDLG
UmAfu1  AVRWPGGNDLV GHTIASRFQWNNTIGPLVDRPGR LGNWA . GWNTDGLGVIEMYNFIQKIG
UmAfu2  FVRLPGGNDLE GNNIPSWFNW TNAIGDNKNRPGRTPTW TTSWNTBGLGLMELMDLTEKWG

      310                              320                              330                              340                              350                              360
PoAbf  MEPIMAVWAG FALGGTSVAQNGLQPYIQQAIDQINFVIGDPATSAPAAARRAALGRAQPFK
UmAfu1  ARLIVGLWAG V DANGNSVPLKDLGPYIQQQVDFVHFLLDTEGK . FADLRVKSGGPKEPYD
UmAfu2  AEA ILGVYAG YSLDSQAVPKGELGPYIQSALNQLHFLLDASGS . WADLRKAQ . GREQPYK

      370                              380                              390                              400                              410
PoAbf  LTYVE IGNE DFFASDT . . YTYRWP AFVNALRGA . . . . . FPNLKF IATSNINSPVL . SP
UmAfu1  VQAFI IGNE GGLNPAVKYQTRF . . DMITNQLKKEFANHKG FDEIDI IASA AVVPTGYKY
UmAfu2  FRHVE IGNE DWLGA AIDTYGAYRWAAFRDAISK . . . . . EFPQLN IASTLKKGVG . . .

      420                              430                              440                              450                              460
PoAbf  NPAQWDHHV YQTP TWF AQNSFFYDDMPR . NGVTFEFG EYAA I STN . . PND IFGSPAN GR
UmAfu1  RVDLLNQPI YGTPAD FVQRYHMYDTASRTNNTIFYNMEFAV INSGMEADDNIWF . . GPGR
UmAfu2  . AKAVDDHM YATP AQMLDFAEGMDA . . TSRETP IWELEFAV INSGLTNDTDIYS . . GPGR

      470                              480                              490                              500                              510                              520
PoAbf  LTFSTMQSASGE AAYMIGMERN S D I VFAAS YAPLLGHV . . AGS QWTPNLIA FDTGNVYR
UmAfu1  LHHSILQGS LAE SIFILGMENNC D I VRG AAYAPELSNESDNRAS QSTPGMLEFD TTKVVG
UmAfu2  LKHPTLIGALAE AAFALAAE ERNG D I YG AAYAP I FQNEGQN . LTQWTP DLLSEFNPGQMIR

      530                              540                              550                              560                              570                              580
PoAbf  SASYFVOKLFST NMGNEYIPS TLPSRTGT . AFWGVT RNTAT GEI I K VSN TVAAQANLTF
UmAfu1  STSWLMQSLISANRISQSLPVTNSKQLQDADIYVSAGADEQQQIVIKIVNYSEKRVPF . .
UmAfu2  STSYWIQYGWGN NPIKIHDA T LSTPTKASQIYHSFGSNGQGD LVAKLININGS PRNVQV

      590                              600                              610                              620                              630
PoAbf  VLPFA . . NVATSGSLQVLTGAATASNSPTTPSALAPA . . . . . TRTITTGKTFTFA
UmAfu1  NINTG . . VQVASPSCWQVAGQGPLDSNTLEKQPIKTQG . . . . . CDANASGSYVSVD
UmAfu2  QVGNGKKVSSFGARSWQVKGNDPQQA NTIDDSEAVTPQTYTSSLPEGSTVGMDSF . TMT

      640
PoAbf  AAGFSVNVITIKAS . . .
UmAfu1  LQKWSLTVIKTPASKVA
UmAfu2  LPAYSATVVTVALS . . .

```

Abbildung 32: Aminosäure Alignment der α -L-Arabinofuranosidase (PoAbf; Accession Nummer [CCC33068.1](#)) aus *Pleurotus ostreatus* und der zwei α -L-Arabinofuranosidasen UmAfu1 (*umag_01829*; Accession Nummer [KIS70669.1](#) und UmAfu2 (*umag_00837*; Accession Nummer [KIS70909.1](#)) aus *U. maydis*. Identische Aminosäuren sind Schwarz hinterlegt. Dreieck, Markiert dien in PoAbf identifizierten Aspartatrest, der als Protonendonor fungiert. Kreis, markiert die katalytische Base, welche als Nukleophil dient (Amore *et al.*, 2015). Die N-Terminalen Signalsequenzen sind durch blau gestrichelte Boxen markiert.

```

1
CjArb43A .....MPTH.....
UmAfu4 MWTQLKKKTLVAGSFAALLSTSGGLASPLRHSSINLTTRADSSYVGYGFYFIGNGAGQEQ
UmAfu5 ..MHLPFSLILSLALWFSLVSL..YVWSPLRK.....HV...RDKVGYLFIFHYDNY.....

      10      20      30      40      50
CjArb43A ..HPITRQHHHSWLSALALLCASLACGAKQVDVHDPVMTRE..EGDTWYLFSTGPGGIT..
UmAfu4 TFAAVSRDNSFNNSWVYVNS..GQEVYLVSTWGTGKGVRDPSIVRSADGSSFYLLATDLNIGSG
UmAfu5 .....SSPGV.....YETYPAGVRDVMYIVSRADESQHFIIIGTDLNQATAA

      60      70      80      90     100
CjArb43A .....IYSKDRVNWRYSDRAFA..TEPTWAKRVSPSFDGHIWAPDIY..QHKGLFYL
UmAfu4 TSWSDAAQRGSRSIIVWKSE..DDLATWSQPK.LVEVIDQRAGSAWAPAEALYNEQTGEYDV
UmAfu5 GGFG..GKFVSRSLVIVWDSKKASLTQWNEPR.LVTVVPPEEYRMAWAPAEAIWLDNDEHFFV

     110     120     130     140     150     160
CjArb43A YYSVSAFGKNTSAIG.VTVNKTLPASPDRYRWEDKGVIVIESVPRDLWNAIDPAIADDH
UmAfu4 YFSSQLFAEEDTHHTGASYRIRMSSTKDF.....ENFSEAQVYVDRH
UmAfu5 YWSSNKFSDA.SHTGDADYDKIYASYTTDF.....VTFTEPHVYLDLG

     170     180     190     200
CjArb43A GQ...VWMSF..GSFWGGLKLFKLN...DLTRP.....AEPQEWHSIAKLE
UmAfu4 NDST.LDLTF...LKTEDSLYRFIKNENPTSDPHPLTVYQEKSSDGTVDGTWTKVTENI
UmAfu5 SHNGVIDLTLGHGPIDGDSQYVRFKDESVMK.....VC.GQVSNNGIHADWQDIESAS

     210     220     230     240     250     260
CjArb43A RSVLMDDSQAGSAQIEAPFILRKGDYYLFFASWGLCCRKGDSTYHLVVGRSKQVTGPYLD
UmAfu4 GAGVI.....GANE...GP...
UmAfu5 E.....

     270     280     290     300     310     320
CjArb43A KTGRDMNQGGGSLLIKGNKRWVGLGHNSAYTWDGKDYLVLHAYEAADNYLQKCLKILNLHW
UmAfu4 .TGFVDNQD.....A.SKTWLYVDE.....YNNRGYVAFNSIDAA.....QGKW
UmAfu5 ...CVDNHH.....RAEAAANLFAG.....

     330     340     350
CjArb43A DGEGWVQV.....DEKELDSYISQRLKKIS
UmAfu4 TLDGNAGEPSNHARHGTTIIPLNQNYDVLRSQV.....
UmAfu5 .....

```

Abbildung 33: Aminosäure Alignment der α -L-Arabinase CjArb43A (Arb43A; Accession Nummer WP_012486466) aus *Cellvibrio japonicas* mit den α -L-Arabinasen UmAfu4 (umag_03416; Accession Nummer KIS68317.1) und UmAfu5 (umag_01427; Accession Nummer KIS71533.1) aus *U. maydis*. Identische Aminosäuren sind Schwarz hinterlegt. Kreis, katalytische Base, die in CjArb43A identifiziert wurde und in den *U. maydis* Enzymen konserviert ist. Viereck, Rest, der vermutlich für die Modifizierung des pK_s und der Orientierung der katalytischen Säure verantwortlich ist. Dreieck, katalytische Säure, die in CjArb43A als Protonendonator fungiert (Nurizzo *et al.*, 2002) und in den *U. maydis* Enzymen nicht konserviert ist. N-Terminale Signalpeptide werden in blauen, gestrichelten Boxen dargestellt.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Michael Feldbrügge bedanken, mir, als Neuzugang des Institutes, die Promotion in seinem Institut zu ermöglichen zu haben. Danke für die stets konstruktiven Gespräche und Arbeit hinter den Kulissen, um die Ordnung und den kollegialen Geist aller auf Pfadfinderqualität zu halten.

Zudem Danke ich Prof. Julia Frunzke für die Übernahme des Zweitgutachtens und dem Bekleiden der Mentorenrolle während meiner Promotion.

Mein herzlicher Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe „RabXpress“, ebenfalls bekannt als RabENDFIT, die meine Zeit am Institut für Mikrobiologie durch eine stets herzliche und kollegiale Atmosphäre bereichert haben. Allen voran gilt mein Dank Kerstin Schipper für die vertrauensvolle Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Hilfsbereitschaft, die fachlichen Gespräche, die Sechskornflocken, sowie die hervorragende Betreuung meiner Promotion. Vielen Dank an meine Laborboiz Magnus Philipp, Kai Hußnätter, sowie Silke Jankowski (kein Boy, klar...) für die vielen niveaувollen und niveaulosen Momente inner- und außerhalb des Institutes. Herzlichen Dank an Michéle Reindl, meiner Promotionsmitstreiterin der ersten Stunde, für fröhliche und auch ernste Momente die wir geteilt und überstanden haben. Danke auch meinen Kollegen Marius Terfrüchte, Jörn Aschenbroich und Bettina Axler für die vielen tollen Laborstunden, Usti-Tipps und Kniffe und das Ertragen meiner karnevalistischen Momente. Darüber hinaus ein Dankeschön allen RabXpress-Studenten, darunter Sabrina Wolf, Philipp Rink, Laura Kuschmierz, Sebastian Schröder und Malte Schanze. Besonders aber Marta Rodriguez Esteves für die enorme Vorarbeit im Ustilaginsäureprojekt.

Weiterhin gilt mein Dank dem restlichen Team-Feldi, besonders Woogie, der herzlichsten Person, die ich kenne. Nemesis der Stadtauben und Erschafferin des Scheißhörnchens. Besonderer Dank auch an Kira Müntjes für Balkonpausen und anti-Stressgespräche auf der Zielgeraden und in Zukunft. Weiterhin herzlichen Dank an Ute Gengenbacher, Simone Krüger, Sachiko Kolar und Jessika Müller und den unabdinglichen Problemlöser und Alleskönner Ulrich Kleinhans.

Im Rahmen meiner Kooperationen im BioSC gilt mein Dank Dr. Markus Müller, Prof. Dr. Nick Wierckx, Dr. Elena Geiser und Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs für die gute Zusammenarbeit und freundliche Korrespondenz. Außerdem möchte ich Dr. Anita Löschke und den anderen CombiComrates für die bereichernden Besprechungen und gemeinsam forschend verbrachten Stunden danken. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Pauly gilt mein Dank für die Hilfestellung bei den Zuckeranalysen, hier sind speziell Dr. Vicente Ramirez Garcia, Dr. Alexandra Matei und Katharina Lufen zu nennen. Vielen Dank auch Prof. Dr. Michael Bölker

und Prof. Dr. Regine Kahmann für ihre Vorarbeiten und der zur Verfügungstellung von Konstrukten.

Zuletzt gilt mein Dank meiner wunderbaren Familie, die nun auch die Familie Gehrke beinhaltet, für ihre Unterstützung während der letzten Jahre. Meinen Eltern, die mich stets ermutigt haben, meine Interessen zu verfolgen und dabei aber froh sind, dass ich das jetzt wieder von Düsseldorf aus machen kann und meiner Schwester, die nicht nur meine Kaffeesucht, sondern auch meine Leidenschaft für eine gute Blödelei teilt.

Mein innigster Dank gilt meiner Frau Raphaela Gehrke, die mich auch nach einem gemeinsamen *lockdown* immer noch erträgt und mir stets motivierend und inspirierend zur Seite steht.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtstag: 20.05.1986
 Geburtsort: Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen

Ausbildung:

Ab 04/2016 **Promotionsarbeit im Fach Mikrobiologie**
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Mikrobiologie
 (Prof. Michael Feldbrügge, AG Dr. Kerstin Schipper)

09/2015 **Master of Science Pflanzenbiotechnologie**

11/2013 - 09/2015 **Masterarbeit** – Institut für Pflanzengenetik, Abt. II Biochemie (Dr. Thomas Reinard)
Beet necrotic yellow vein virus als Vektor für die transiente
 Transformation von *Nicotiana benthamiana*

10/2012 - 09/2015 **Masterstudium: Pflanzenbiotechnologie** an der Gottfried
 Wilhelm Leibniz Universität Hannover

09/2012 **Bachelor of Science Pflanzenbiotechnologie**

10/2011 - 09/2012 **Bachelorarbeit** – Institut für Pflanzengenetik, Abt. II Biochemie
 (Dr. Thomas Reinard)
Nicotiana benthamiana als Expressionssystem für humanes
 Interleukin 2

10/2009 - 09/2012 **Bachelorstudium: Pflanzenbiotechnologie** an der Gottfried
 Wilhelm Leibniz Universität Hannover

08/2007 - 06/2009 **Ausbildung zum Biologisch, technischen Assistenten** am
 Berufskolleg Hilden des Kreises Mettmann

06/2006 **Allgemeine Hochschulreife** am Gymnasium Korschenbroich

Anstellungen:

04/2016 - 09/2020 Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit dem Ziel der Promotion im
 Institut für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität
 Düsseldorf

Praktika:

07/2008 - 09/2008 Betriebspraktikum in der Abteilung IZKF BIOMAT
 Augenklinik des Universitätsklinikums Aachen

Lehrtätigkeit

Persönliche Betreuung von Bachelorstudenten, sowie sechs wöchigen Laborpraktika für
 Masterstudenten im Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Eigenständige Leitung des Seminars und des praktischen Teilversuchs „Hefe zwei Hybrid- und Bakterieller Zwei Hybrid-System“ im Vertiefungsmodul „Allgemeine Mikrobiologie“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betreuung des Mikroskopischen Grundpraktikums im Grundmodul Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Durchführung eines Tutoriums im Bereich der allgemeinen Botanik

Betreuung von Praktika in den Bereichen Botanik, Genetik, Molekularbiologie und Pflanzenbiotechnologie

Wissenschaftliche Beiträge:

Publikationen

Peter Stoffels*, Markus Jan Müller*, Sarah Stachurski, Marius Terfrüchte, Sebastian Schröder, Nina Ihling, Nick Wierckx, Michael Feldbrügge, Kerstin Schipper, Jochen Büchs (2020). Complementing the intrinsic repertoire of *Ustilago maydis* for degradation of the pectin backbone polygalacturonic acid. *Journal of Biotechnology.*, 307 (2020) 148–163

* geteilte Erstautorenschaft

Markus Jan Müller, Sarah Stachurski, Peter Stoffels, Kerstin Schipper, Michael Feldbrügge, Jochen Büchs (2018). Online evaluation of the metabolic activity of *Ustilago maydis* on (poly)galacturonic acid. *Journal of Biological Engineering.*, *Journal of Biological Engineering* (2018) 12:34

Jörn Aschenbroich, Kai Philipp Hussnaetter, Peter Stoffels, Thorsten Langner, Sabrina Zander, Björn Sandrock, Michael Bölker, Michael Feldbrügge und Kerstin Schipper. (2018). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins Proteom.*, S1570–9639(18)30176-6

Konferenzbeiträge:

Vortragsbeiträge

15th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries - *Ustilago maydis* as a production platform for tailor-made glycolipids. (2019) Toulouse, Frankreich

Posterbeiträge

Biosurfactants | Hohenheim 2019 - Establishing the basidiomycete fungus *U. maydis* as a novel chassis for the production of glycolipids. (2019) Stuttgart, Deutschland

BioSC Forum - Establishing the basidiomycete *U. maydis* as a production platform for novel bioactive compounds. (2019) Köln, Deutschland

BioSC Forum - Establishing the basidiomycete fungus *U. maydis* as a novel chassis for the production of glycolipids. (2018) Bonn, Deutschland

2nd International Bioeconomy Congress - *Ustilago maydis* as a whole-cell biocatalyst for biomass degradation and the production of secondary metabolites. (2017) Stuttgart, Deutschland