

***Pseudomonas putida* als Zellfabrik zur  
Produktion von Rhamnolipiden**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von

M. Sc. Biochemie

**Sonja Kubicki**

aus Köln

Düsseldorf, August 2020

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger  
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2020

meiner Familie

# Veröffentlichungen

Sithole, N., Burger, A., Thies, S., **Kubicki, S.** und Trindade, M. Biosurfactant screening and discovery. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Biosurfactants for the biobased economy* Ed. Hausmann, R. und Henkel, M., *In preparation*.

Tiso T., Ihling N., **Kubicki S.**, Biselli A., Schonhoff A., Drepper T., Bator I., Thies S., Karmainski T., Kruth S., Willenbrink A.-L., Loeschcke A., Zapp P., Jupke A., Jaeger K.-E., Büchs J. und Blank L. M. (2020). Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production. *Front. in Bioeng. and Biotech.* 8, 976.

**Kubicki S.**, Bator I., Jankowski S., Schipper K., Tiso T., Feldbrügge M., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2020). A straightforward assay for screening and quantification of biosurfactants in microbial culture supernatants. *Front. in Bioeng. and Biotech.* 8, 958.

**Kubicki S.**, Bollinger A., Katzke N., Jaeger K.-E., Loeschcke A., Thies S. (2019). Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. *Mar Drugs.* 17, 7.

Molitor R., Bollinger A., **Kubicki S.**, Loeschcke A., Jaeger K.-E., Thies S. (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microb. Biotechnol.* 13, 274–284.

**Kubicki S.**, Weihmann R., Bator I., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2018). Konstruktion von *Pseudomonas putida* -Stämmen zur heterologen Produktion von Rhamnolipiden. *Chemie Ing. Tech.* 2018, 90, 1282.

# Präsentationen bei internationalen Konferenzen

## Vorträge

Bator I., **Kubicki S.** (2020). Construction of bacterial cell factories for heterologous rhamnolipid production. 7. *BioSC Spotlight-Modular Biotransformations in a Circular Bioeconomy*. Aachen/DE, 2020-02-07.

**Kubicki S.**, Bator I., Bollinger A., Molitor R., Linden S., Tiso T., Loeschcke A., Jaeger K.-E., Thies S., (2019). Recombinant bacterial cell factories for discovery, tailoring, and production of biosurfactants. 2<sup>nd</sup> *Synthetic Biology for Natural Products Conference*. Puerto Vallarta/MX, 2019-06-03.

**Kubicki S.**, Weihmann R., Thies S., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2018). Recombinant production of secondary metabolites in *Pseudomonas putida* KT2440 – Strategies for construction and identification of biosynthetic pathway expressing strains. 1<sup>st</sup> *Pseudomonas Grassroots Meeting*. Frankfurt a. M./DE, 2018-08-11.

**Kubicki S.**, Weihmann R., Bator I., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Blank L., Jaeger K.-E., Thies S. (2018). Recombinant rhamnolipid-producing *Pseudomonas putida* strains obtained with the yTRES-toolbox. ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen. Aachen/DE, 2018-09-11.

## Poster

**Kubicki S.**, Bator I., Weihmann R., Linden S., Loeschcke A., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2020). Comparative evaluation of expression modules for recombinant biosurfactant production by *Pseudomonas putida*. *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)*. Leipzig/DE, 2020-03-08-11.

**Kubicki S.**, Bator I., Tiso T., Thies S., Blank L. M., Jaeger K.-E. (2019). Construction of recombinant *Pseudomonas putida* cell factories for rhamnolipid production. 2<sup>nd</sup> *Pseudomonas Grassroots Meeting*. Leiden/NL, 2019-11-07-08

**Kubicki S.**, Bator I., Tiso T., Thies, S., Blank L. M., Jaeger K.-E. (2019). Construction of recombinant bacterial cell factories for biosurfactant production. 4<sup>th</sup> *International BioSC Symposium*. Köln/DE, 2019-11-18-19.

**Kubicki S.**, Bator I., Jankowski S., Terfrüchte M., Schipper K., Feldbrügge M., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2019). Colorimetric assay for high throughput quantification of biosurfactants in culture supernatants. 1<sup>st</sup> *Biosurfactants Conference*. Stuttgart-Hohenheim/DE, 2019-09-25-27.

Bator I., **Kubicki S.**, Thies S., Jaeger K.-E., Tiso T., Blank L. M. (2019). Metabolic engineering strategies for enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas putida*. 1<sup>st</sup> *Biosurfactants Conference*. Stuttgart-Hohenheim/DE, 2019-09-25-27.

Weihmann R., Domröse A., **Kubicki S.**, Thies S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019). Engineered natural product synthesis in *Pseudomonas putida* by using the yTRES-system. *German Conference on Synthetic Biology*. Aachen/DE, 2019-09-12-13.

Bator I., Dielentheis-Frenken M. R. E., **Kubicki S.**, Thies S., Jaeger K.-E., Tiso T., Blank L. M. (2019). Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for enhanced rhamnolipid production. *Biochemical and Molecular Engineering XXI*. Mont Tremblant/CA, 2019-07-14-18.

**Kubicki S.**, Bator I., Weihmann R., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Jaeger K.-E., Thies S. (2019). Comparative evaluation of different expression modules for recombinant rhamnolipid production in *Pseudomonas putida* platform strains. *2<sup>nd</sup> Synthetic Biology for Natural Products Conference*. Puerto Vallarta/MX, 2019-06-02-05.

Weihmann R., Domröse A., **Kubicki S.**, Thies S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019). yTREX mediated heterologous pathway activation and reporter-based strain selection in *Pseudomonas putida*. *2<sup>nd</sup> Synthetic Biology for Natural Products Conference*. Puerto Vallarta/MX, 2019-06-02-05.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Thies S., Domröse A., Braß H., Klein A., Pietruszka J., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2019). Natural product and precursor production by effective TREX-mediated gene cluster expression in *Pseudomonas putida*. *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)*. Mainz/DE, 2019-03-17–20.

**Kubicki S.**, Linden S., Bator I., Weihmann R., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2018). Comparative evaluation of different expression systems for *Pseudomonas putida* in recombinant rhamnolipid-producing strains. *3<sup>rd</sup> BioSC International Symposium*. Bonn/DE, 2018-11-12-13.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). Integration and expression of native and adapted gene clusters in the *Pseudomonas putida* chromosome. *3<sup>rd</sup> International BioSC Symposium*. Bonn/DE, 2018-11-12-13.

**Kubicki S.**, Weihmann R., Bator I., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2018). Recombinant rhamnolipid-producing *Pseudomonas putida* strains obtained with the yTREX-toolbox. *1<sup>st</sup> Pseudomonas Grassroots Meeting*. Frankfurt a. M./DE, 2018-11-08-09.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Loeschcke A., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E. (2018). The yTREX toolbox – rapid cloning, transfer and expression of modified pathways. *Aachen Protein Engineering Symposium*. Aachen/DE, 2018-10-07-10.

**Kubicki S.**, Weihmann R., Bator I., Domröse A., Loeschcke A., Drepper T., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E., Thies S. (2018). Recombinant rhamnolipid-producing *Pseudomonas putida* strains obtained with the yTREX-toolbox. *ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*. Aachen/DE, 2018-09-10-13.

Thies S., **Kubicki S.**, Bator I., Loeschcke A., Domröse A., Weihmann R., Drepper T., Tiso T., Blank L. M., Jaeger K.-E. (2018). Construction of recombinant bacterial cell factories for biosurfactant production. *3<sup>rd</sup> European Conference of Natural Products*. Frankfurt a. M./DE, 2018-09-02-05.

Fritsch J., Thies S., Terfrüchte M., Schipper K., Feldbrügge M., Bator I., Tiso T., Blank L. M., **Kubicki S.**, Jaeger K.-E., Schelden M., Büchs J., Bongartz P., Wessling M., Biselli A., Jupke A., Schonhoff A., Zapp P., Schreiber A., Hake J.-F., Wandrey G., Ihling N. (2018). Integration of next generation biosurfactant production into biorefinery processes. *9<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis*. Hamburg/DE, 2018-08-26–30.

Fritsch J., Terfrüchte M., Schipper K., Feldbrügge M., Bator I., Tiso T., Blank L. M., **Kubicki S.**, Thies S., Jaeger K.-E., Schelden M., Büchs J., Bongartz P., Sengpiel R., Wessling M., Biselli A., Maßmann T., Jupke A., Schonhoff A., Zapp P., Schreiber A., Hake J.-F., Wandrey G. (2018). Bio<sup>2</sup>-The biosurfactant biorefinery: Integration of next generation biosurfactant production into biorefinery processes. *ECO-BIO*. Dublin/IE, 2018-03-04–07.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). The yTREX-toolbox for rapid cloning, Transfer and Expression of biosynthetic pathways in bacteria. *Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)*. Wolfsburg/DE, 2018-04-15-18.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). Rapid cloning, transfer and expression of biosynthetic pathways using the yTREX-toolbox. 69. Mosbacher Kolloquium. Mosbach/DE, 2018-03-22-24.

Weihmann R., **Kubicki S.**, Loeschcke A., Thies S., Domröse A., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). Be flexible and effective: yTREX-toolbox for the generation, transfer and expression of synthetic pathways in microorganisms. *2<sup>nd</sup> BioSC International Symposium*. Köln/DE, 2017-11-27-28.

Thies S., Loeschcke A., Domröse A., **Kubicki S.**, Weihmann R., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). Biosurfactant production applying genomic engineering of natural and recombinant producer strains. *ProkaGENOMICS*. Göttingen/DE, 2017-09-19-22.

## Danksagung

Diese Dissertation wäre nicht möglich gewesen, ohne dass mich nicht einige Menschen dabei unterstützt und die Rahmenbedingungen dazu geschaffen hätten.

Ich danke Herrn Prof. Karl-Erich Jaeger für die Konzeption meiner wissenschaftlichen Arbeit und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes mit hervorragenden Bedingungen. Sie haben stets Interesse am Fortgang meiner Arbeit gezeigt und ich bin froh, dass Sie mein Potenzial gesehen und Ihr Vertrauen in mich gesteckt haben. Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka danke ich in diesem Zusammenhang ebenfalls für die Übernahme des Korreferats und die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge, insbesondere auch durch Mitarbeiter Ihres Institutes im Laufe der letzten Jahre.

Besonderen Dank möchte ich zudem Herrn Dr. Stephan Thies aussprechen. Als erster Ansprechpartner hat er stets auf die verrücktesten Ideen geantwortet und war für das Erreichen von wissenschaftlichen Erfolgen, auch im Rahmen von Publikationen, unersetzlich. Seine Kompetenz, seine grenzenlose Geduld, Güte und sein Vertrauen haben in mir die treibenden Kräfte ausgelöst, diese Dissertation zu vollenden. Gleichgestellt dazu geht mein tief empfundener Dank auch an Frau Dr. Anita Loeschcke sowie Herrn Dr. Thomas Drepper, die bei jeder fachlichen oder organisatorischen Frage stets eine ruhige Minute oder auch Stunde(n) geopfert und mich stets mit guten Ratschlägen beraten haben.

Ein vielfaches Dankeschön geht auch an alle (ehemalige) Mitarbeitende des Lehrstuhls, insbesondere Vera Svensson, Holger Gieren, Dr. Achim Heck und Dr. Andreas Domröse sowie an alle weiteren Doktoranden: Jennifer Hage-Huelsmann, Alexander Bollinger, Fabienne Hilgers, Robin Weihmann, Nora Bitzenhofer, Luzie Kruse, Andrea Weiler, Muttalip Caliskan, Patrick Lenz und Rebecka Molitor, die im gleichen Maße zu den hervorragenden Arbeitsbedingungen beigetragen und stets auf alle möglichen Fragen die passenden Antworten bereit hatten.

Auch meinen Studenten Lisa-Marie Kirschen, Xu Li, Fabio Manuel Anzalone Dias und Sabrina Linden gilt mein Dank für ihre hervorragende Mitarbeit im Rahmen der betreuten Projekte anlässlich ihrer Bachelor- und Masterarbeiten.

Zudem danke ich dem BioSC und allen Mitgliedern im Rahmen des FocusLabs Bio<sup>2</sup>, die eine zielführende interdisziplinäre Zusammenarbeit ermöglicht haben. Insbesondere möchte ich Isabel Bator, Dr. Till Tiso, Andreas Schonhoff, Julia Fritsch und Dr. Nina Ihling danken, die eine enge Kooperation ermöglicht und vor allem in der Endphase dieser Arbeit zum wissenschaftlichen Erfolg des Projektes Bio<sup>2</sup> beigetragen haben. Aber auch allen weiteren Kooperationspartnern möchte ich für die Zusammenarbeit danken.

Nicht zuletzt gebührt ein spezieller Dank meinen lieben Freunden und meiner lieben Familie, insbesondere im Zusammenhang mit dieser Arbeit Alena Figge, Karoline Santur, meiner Schwester Natalie Kubicki und meinem Mann Tim Pilgram, für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr offenes Ohr. Ohne sie wäre diese wissenschaftliche Arbeit nicht möglich gewesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1 Potenzial von Biotensiden als Alternative zu Erdöl-basierten Tensiden</b> .....	<b>1</b>
I.1.1 Eigenschaften, Klassifizierung und Struktur von Biotensiden .....	3
I.1.2 Aktuelle Anwendungsgebiete von Biotensiden .....	11
<b>I.2 Biosynthese von Rhamnolipiden in natürlichen Produzenten</b> .....	<b>15</b>
I.2.1 Varietät von Rhamnolipiden .....	17
<b>I.3 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 als ein vielseitiger und robuster Expressionswirt</b> .....	<b>22</b>
I.3.1 Genetische Werkzeuge zur Integration von genetischen Elementen .....	22
I.3.2 Etablierung von <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 als Rhamnolipid-Produzent .....	31
<b>I.4 Zielsetzung</b> .....	<b>37</b>
<b>II Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
<b>II.1 Biologische, chemische und technische Materialien</b> .....	<b>38</b>
II.1.1 Vektoren, Stämme und Oligonukleotide .....	38
II.1.2 Molekularbiologische Kits, Medien, Puffer, Lösungen, Chemikalien und Enzyme .....	42
II.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software und Online-tools .....	45
<b>II.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>47</b>
II.2.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen .....	47
II.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	49
II.2.3 Antibiotika- und Induktorkonzentrationen .....	50
II.2.4 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ und S17-1 Zellen .....	50
II.2.5 <i>In vivo</i> Rekombination von Plasmid-DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VL6-48 Zellen .....	51
II.2.6 Konjugation von Plasmid-DNA zu <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 .....	51
II.2.7 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VL6-48 .....	51
II.2.8 Agarose-Gelelektrophorese .....	52
II.2.9 Enzymatische hydrolytische Spaltung von DNA .....	53
II.2.10 Isolierung von genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien .....	53
II.2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	53
II.2.12 Quantitative <i>real-time</i> PCR .....	54
II.2.13 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen .....	57
II.2.14 Sequenzierung und <i>de novo</i> Synthese von Nukleinsäure .....	57
<b>II.3 Detektion und Analytik</b> .....	<b>58</b>
II.3.1 Zelldichtebestimmung und Aufnahme von Wachstumskurven .....	58
II.3.2 Fluoreszenzintensitätsmessungen und Aufnahme von Fluoreszenzspektren /-veränderungen .....	59
II.3.3 Nachweis hämolytischer Aktivität .....	61
II.3.4 <i>Atomized-oil</i> Test .....	61

II.3.5 <i>Drop-collapsing</i> und <i>grid</i> Test.....	61
II.3.6 Cetylpyridiniumchlorid-Bromthymoblau-Test.....	62
II.3.7 Flüssigchromatographie-Messung von 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoaten und Rhamnolipiden....	62
II.3.8 <i>Victoria Pure Blue BO</i> -Assay.....	63
II.3.9 Orcinol Test.....	64
II.3.10 Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden .....	65
<b>III Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>III.1 Werkzeuge zur Konstruktion und zum Screening von Rhamnolipid-Produzenten .....</b>	<b>66</b>
III.1.1 Konstruktion der <i>attTn7</i> -Integration vermittelnden <i>yTREX-toolbox</i> .....	67
III.1.2 Evaluierung verschiedener Methoden zum Screening von Rhamnolipid-Produzenten .....	78
<b>III.2 Konstruktion von <i>Pseudomonas putida</i> Zellfabriken für die Rhamnolipid- Produktion ..</b>	<b>89</b>
III.2.1 Komparative Analyse rekombinanter Rhamnolipid-Produzenten .....	93
III.2.2 Rhamnolipid-Produktionsstabilität verschiedener Produzenten .....	105
III.2.3 Evaluierung der Induktions- und Biotensidprofile induzierbarer Rhamnolipid-Produzenten .....	109
<b>III.3 Optimierung der Salicylat-induzierten Rhamnolipid-Produktion in <i>Pseudomonas putida</i></b>	
.....	<b>115</b>
III.3.1 Steuerung des metabolischen Flusses zur Optimierung der Produktion und des Wachstums .....	115
III.3.2 Expression von zusätzlichen Genen für die Bereitstellung von Rhamnolipid-Vorstufen .....	123
<b>III.4 Ansatzpunkte zur zukünftigen Weiterentwicklung der <i>Pseudomonas putida</i> Rhamnolipid-Plattform .....</b>	<b>129</b>
III.4.1 Evaluierung der <i>Pseudomonas putida</i> Zellfabrik zur weiteren Optimierung der Rhamnolipid-Produktion .....	129
III.4.2 Maßgeschneiderte Rhamnolipide zur Erhöhung der Produktvielfalt .....	136
<b>IV Zusammenfassung .....</b>	<b>141</b>
<b>V Summary .....</b>	<b>142</b>
<b>VI Literaturverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>VII</b>
<b>Eidesstaatliche Erklärung .....</b>	<b>VIII</b>

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>Abb. I-1</b>	Strukturen von verschiedenen nieder- und hochmolekularen Biotensiden.
<b>Abb. I-2</b>	Screening von neuen Biotensid-Produzenten und Identifikation der Tensidart.
<b>Abb. I-3</b>	Mechanismus und Regulierung der Rhamnolipid-Biosynthese in natürliche Produzenten.
<b>Abb. I-4</b>	Strukturelle Vielfalt von Rhamnolipiden in unterschiedlichen Produzenten.
<b>Abb. I-5</b>	Das Funktionsprinzip des $\gamma$ TREX-Systems zur randomisierten Integration biosynthetischer Gencluster.
<b>Abb. I-6</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 als <i>Chassis</i> für die heterologe Produktion von Rhamnolipiden: Kohlenstoffmetabolismus und konkurrierende Stoffwechselwege.
<b>Abb. II-1</b>	Bestimmung des gelöst-Sauerstoffes im Medium im BioLector® I während der Kultivierung unter ausgewählten Bedingungen.
<b>Abb. II-2</b>	Überblick über die Qualitätskontrolle und Kalibrierung der RT-qPCR-Messungen.
<b>Abb. III-1</b>	Konstruktion, Aufbau und Validierung der $\gamma$ TREX- <i>toolbox</i> zur Tn7-vermittelten Transposition und Expression von genetischen Elementen.
<b>Abb. III-2</b>	Vergleich verschiedener Reportersysteme in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und derer Korrelation zur Biotensid-Produktion in der <i>attTn7</i> -Integration vermittelnden $\gamma$ TREX- <i>toolbox</i> .
<b>Abb. III-3</b>	Evaluierung verschiedener Literatur bekannter Methoden zur Ermittlung der Rhamnolipid-Produktion in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 + pPS05.
<b>Abb. III-4</b>	Methodik und molekulare Basis des <i>Victoria Pure Blue BO</i> -Assays zur Semi-Quantifizierung von Biotensiden in Kulturüberständen von Mikroorganismen.
<b>Abb. III-5</b>	Kalibrierungsreihen der $C_{10}$ - $C_{10}$ -Kongenerere von 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoat, Monorhamnolipid und Dirhamnolipid im <i>Victoria Pure Blue BO</i> -Assays.
<b>Abb. III-6</b>	Quantifizierung von Rhamnolipid-Biotensiden in Kulturüberständen im <i>Victoria Pure Blue BO</i> -Assay.
<b>Abb. III-7</b>	Schematischer Überblick über die Erzeugung und Kollektion von Expressionskassetten zur heterologen Rhamnolipid-Produktion in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.
<b>Abb. III-8</b>	Biomassebildung und Zunahme der Transkriptions-gekoppelten eYFP-Fluoreszenz in rekombinanten Rhamnolipid-produzierenden <i>Pseudomonas putida</i> KT2440-Stämmen.
<b>Abb. III-9</b>	Übersicht über die <i>rhlA</i> -, <i>rhlB</i> -, und <i>eYFP</i> -Transkriptionsprofile, 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoat- und Monorhamnolipid-Produktivität sowie eYFP-Fluoreszenz in Bezug zur Zelldichte verschiedener <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Stämme.
<b>Abb. III-10</b>	Unterschiede im mRNA-Level der Gene <i>rhlA</i> , <i>rhlB</i> und <i>eYFP</i> und Verhältnisse der Transkripte/Tensid-Titer.
<b>Abb. III-11</b>	Produktionsstabilität der rekombinanten <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Produzenten bei andauernder Rhamnolipid-Produktion.
<b>Abb. III-12</b>	Wachstums-, Expressions- und Produktionsprofile der induzierbaren <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Rhamnolipid-Produzenten bei Variation der spezifischen Induktorkonzentration.
<b>Abb. III-13</b>	Vergleich zwischen dem wildtypischen und dem optimierten Stammhintergrund in Bezug zur Salicylat-induzierbaren Produktion von Rhamnolipiden.
<b>Abb. III-14</b>	Potenzieller Abbau von Salicylat: Reduzierung des Wachstums aufgrund der Limitierung von Eisen?
<b>Abb. III-15</b>	Rhamnolipid-Produktion im evolvierten <i>Pseudomonas putida</i> Evo <sub>50</sub> mRL <sup>E</sup> .
<b>Abb. III-16</b>	Plasmid-basierte und Genomintegron-basierte heterologe Koexpression von Genen zur Bildung der Rhamnolipid-Vorstufe dTDP-L-Rhamnose.
<b>Abb. III-17</b>	Produktion alternativer Rhamnolipide durch Salicylat-induzierte heterologe Genexpression in <i>Pseudomonas putida</i> .
<b>Abb. A-1</b>	Vergleich der Kalibrierungen von <i>rpoB</i> / <i>rhlA</i> / <i>rhlB</i> und <i>eYFP</i> zur Berechnung der Transkriptmenge innerhalb der RT-qPCR mit verschiedenen Thresholds.
<b>Abb. A-2</b>	Genesequenz und markierte Elemente der synthetisch hergestellten L- und R-TREX- <i>toolbox</i> Kasette.
<b>Abb. A-3</b>	Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren der hier betrachteten Fluoreszenzproteine/ NADH auf FPBase.org mit in dieser Arbeit gewaschenen Zellen sowie LB-Medium.
<b>Abb. A-4</b>	Einfluss des Protonierungsgrades auf das Absorptionsspektrum von <i>Victoria Pure Blue</i> BO und Rhamnolipid-Makrostrukturen.
<b>Abb. A-5</b>	Induzierte Transkript- und Produktivitätszunahme in rekombinanten <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 Produzenten.
<b>Abb. A-6</b>	Korrelation zwischen der ausgebildeten eYFP-Fluoreszenz und der ermittelten Transkriptmenge.
<b>Abb. A-7</b>	Parameter und Resultate der Transkriptomanalyse zur Identifizierung potenzieller Ziele zur Optimierung der Rhamnolipid-Produktion.

<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>Tab. I-1</b>	Übersicht über die aktuelle wirtschaftliche Bedeutung und kommerzialisierte Produkte verschiedener mikrobieller Biotenside.
<b>Tab. I-2</b>	Bekannte induzierbare Promotorsysteme für die heterologe Genexpression in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.
<b>Tab. I-3</b>	Zusammenfassung ausgewählter Ansätze zur Integration des Rhamnolipid-Operons und Herstellung rekombinanter Monorhamnolipide in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.
<b>Tab. II-1</b>	Überblick über die verwendeten und erzeugten Vektoren.
<b>Tab. II-2</b>	Überblick über die verwendeten und erzeugten Stämme.
<b>Tab. II-3</b>	Überblick der verwendeten Oligonukleotide.
<b>Tab. II-4</b>	Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Kits.
<b>Tab. II-5</b>	Übersicht der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.
<b>Tab. II-6</b>	Übersicht über Enzyme und Chemikalien.
<b>Tab. II-7</b>	Übersicht über Verbrauchsmaterialien und Geräte.
<b>Tab. II-8</b>	Übersicht der verwendeten Softwares und Online- <i>tools</i> .
<b>Tab. II-9</b>	Standardkultivierungs- und Lagerungsbedingungen der verwendeten Mikroorganismen.
<b>Tab. II-10</b>	Übersicht über die Stammlösungen und verwendeten Antibiotika- und Induktorkonzentrationen in den Kultivierungsmedien der eingesetzten Bakterien.
<b>Tab. II-11</b>	Protokoll zum Erstellen eines PCR-Ansatzes und Programm-Vorlage zur Adaptierung eines individuellen PCR-Programms.
<b>Tab. II-12</b>	Protokoll zum Erstellen eines RT-qPCR-Ansatzes und Programm der RT-qPCR.
<b>Tab. II-13</b>	Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzreporter.
<b>Tab. II-14</b>	Parameter der Durchflusszytometrie.
<b>Tab. III-1</b>	Bewertung der Fluoreszenzreporter mBFP, eYFP und mCherry auf die Anwendbarkeit als Transkriptionsreporter für die heterologe Rhamnolipid-Produktion in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 im <i>attTn7</i> -Integration vermittelnden <i>yTREX-toolbox</i> System.
<b>Tab. III-2</b>	Vergleich verschiedener Methoden zur Detektion mikrobieller Biotensid-Produktion.
<b>Tab. III-3</b>	Übersicht über relevante Expressionseigenschaften und resultierenden maximalen Titern der untersuchten induzierbaren Stämme.
<b>Tab. III-4</b>	Übersicht der resultierten Produktionsparameter bei der Verwendung der Salicylat-induzierbaren Rhamnolipid-Kassette und einer Induktorkonzentration von 2 mM.
<b>Tab. III-5</b>	Liste ausgewählter hochregulierter Gene bei Transkriptomanalyse (RNA-Seq) von <i>Pseudomonas putida</i> GR <sub>sal</sub> /mRL als Antwort auf die Exposition mit Salicylat und Rhamnolipiden.
<b>Tab. A-1</b>	Nomenklaturerläuterung zu <i>yTREX-toolbox</i> Vektoren (pYTUVX_WXZ).
<b>Tab. A-2</b>	Heterogenität in der Fluoreszenz nach 24 h-Kultivierung von <i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>k</sub> <sup>B</sup> , KT <sub>k</sub> <sup>E</sup> , KT <sub>k</sub> <sup>C</sup> , KT <sub>sal</sub> mRL <sup>B</sup> , KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> und KT <sub>sal</sub> mRL <sup>C</sup> .
<b>Tab. A-3</b>	Wachstums- und <i>drop-collapsing</i> -Ergebnisse der im <i>Victoria Pure Blue BO</i> -Assay eingesetzten Rhamnolipid-produzierenden Stämme.
<b>Tab. A-4</b>	Kongener-Titer in Kulturüberständen von <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 pSB01, pPS05 und pWJ02 quantifiziert über HPLC-CAD.
<b>Tab. A-5</b>	Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten stationär-Wuchsphase aktiven Promotoren auf Transkriptebene.
<b>Tab. A-6</b>	Übersicht über die erreichten HAA- und mRL-Titer der rekombinanten <i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> nach 6 und 24 h.
<b>Tab. A-7</b>	Übersicht über die Reduktion des Genoms in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 GR18.
<b>Tab. A-8</b>	Retentionszeiten aus der HPLC-CAD Analyse für die in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 heterolog produzierten <i>P. aeruginosa</i> / <i>B. glumae</i> -Typ Rhamnolipide.
<b>Tab. A-9</b>	Vergleich der HAA-, mRL-, und dRL-Titer in <i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>sal</sub> mRL und KT <sub>sal</sub> dRL.
<b>Tab. A-10</b>	Vergleich von vorhergesagten logP-Werten einiger Rhamnolipid-Kongenere.

# Abkürzungen

<b>a. u.</b>	Arbiträre Einheiten ( <i>engl. arbitrary units</i> )
<b>%</b>	Prozent
<b>(M)EOR</b>	<i>engl. (microbial) enhanced oil recovery</i>
<b>°C</b>	Grad Celsius (+ 273,15 K)
<b>3OC<sub>6</sub>-HSL</b>	<i>N</i> -(3-oxo-Dodecanoyl)-L-homoserinlacton
<b>4593</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>4593</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>PP_4593</sub> )
<b>A</b>	Adenin
<b>ACP</b>	Acyl-Carrier-Protein
<b>ALE</b>	<i>engl. adaptive laboratory evolution</i>
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>ara</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>ara</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>BAD</sub> )
<b>ASTM</b>	Standardtestmethode für das Schaumverhalten von oberflächenaktiven Agentien
<b>A<sub>xnm</sub></b>	Absorption bei x nm
<b><i>B. ambifaria</i></b>	<i>Burkholderia ambifaria</i>
<b><i>B. cenocepacia</i></b>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
<b><i>B. glumae</i></b>	<i>Burkholderia glumae</i>
<b><i>B. lata</i></b>	<i>Burkholderia lata</i>
<b>BGR</b>	Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe
<b>BiostoffV</b>	Biostoffverordnung
<b>bolA</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>bolA</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>bolA</sub> )
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BPB</b>	Bromphenolblau
<b>BTB</b>	Bromthymolblau
<b>C</b>	Cytosin
<b><i>C. testosteroni</i></b>	<i>Comamonas testosteroni</i>
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	<i>N</i> -Butanoyl-L-homoserinlacton
<b>CENARS</b>	Replikationseinheit aus <i>S. cerevisiae</i> (Centromergen <i>cen4</i> und autonom replizierende Region ARS1)
<b>CIS</b>	Cluster-Integrationsstelle ( <i>engl. cluster integration site</i> )
<b>Cm</b>	Chloramphenicol
<b>CMC</b>	Kritische Mizellenkonzentration(en) ( <i>engl. critical micellar concentration</i> ; g/L oder mol/L)
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CP</b>	Trübungspunkt ( <i>engl. cloud point</i> ; °C)
<b>CPC</b>	Cetylpyridiniumchlorid
<b>Cq</b>	<i>engl. quantification cycle</i> (dimensionslos)
<b>CTAB</b>	<i>N</i> -Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
<b>DC</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>dmRL</b>	Di-rhamno-mono-lipid(e)
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl. deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>dRL</b>	Dirhamnolipid(e) (Di-rhamno-di-lipid(e))
<b>DSF</b>	<i>cis, cis</i> -11-Methyldodecan-2,5-dienonsäure
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>dTDP</b>	Desoxythymidindiphosphat
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>E24</b>	Emulsifikationsindex (%)
<b>ED</b>	Entner-Doudoroff (-Weg)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>Em</b>	Emission (nm)
<b>EMP</b>	Embden-Meyerhof-Parnas (-Weg)
<b>EPS</b>	Exopolysaccharid(e)
<b>EU</b>	Europäische Union
<b>Ex</b>	Extinktion (nm)
<b>FACS</b>	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung ( <i>engl. fluorescence activated cell sorting</i> )
<b>FASII</b>	Typ-II-Fettsäuresynthese (-Zyklus)
<b>FC [log]</b>	Transkriptänderung auf ein logarithmierten Skala ( <i>engl. fold change</i> ; dimensionslos)
<b>ffg</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>ffg</sub> mRL (P <sub>ffg</sub> )
<b>FMN</b>	Flavin-Mononukleotid
<b>FT-IR</b>	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
<b>F<sub>x/y</sub></b>	Fluoreszenz bei Extinktion x nm/Emission y nm
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>G1P</b>	D-Glucose-1-Phosphat
<b>G6P</b>	D-Glucose-6-Phosphat
<b>GefStoffV</b>	Gefahrstoffverordnung
<b>GenTG</b>	Gentechnikgesetz
<b>GenTSV</b>	Gentechnik-Sicherheitsverordnung
<b>Gm</b>	Gentamicin
<b>GVO</b>	Gentechnisch veränderter Organismus

GVO	Gentechnisch veränderte Organismen
h	Stunde (3600 s)
HAA	3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoat(e)
HLB	Hydrophilie-Lipophilie-Balance ( <i>engl. hydrophilic-lipophilic-balance</i> ; dimensionslos)
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie ( <i>engl. high-performance-liquid-chromatography</i> )
HPLC-CAD	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Ionendetektor ( <i>engl. charged aerosol detector</i> )
HPLC-MS/MS	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
hupA	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>hupA</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>hupA</sub> )
iAMB	Institut für Angewandte Mikrobiologie
iGEM	<i>engl. international genetically engineered machine</i>
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
IQS	2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-carbaldehyd
Irg	Irgasan
K	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>K</sub> <sup>E</sup>
Km	Kanamycin
L	Liter
lac	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>lac</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>lac</sub> )
LB	Komplexes Nährmedium ( <i>engl. lysogeny broth</i> )
LPS	Lipopolysaccharid(e)
LV	Leervektor
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration (mol · m <sup>-3</sup> )
MCS	Multiple-Klonierungsstelle ( <i>engl. multiple-cloning-site</i> )
MDR	<i>engl. multi drug resistance</i>
MEL	Mannosylerythritollipid
MFS	<i>engl. major-facilitator-superfamily</i>
min	Minute (60 s)
mmRL	Mono-rhamno-mono-lipid(e)
mol	Stoffmenge
mRL	Monorhamnolipid(e) (Mono-rhamno-di-lipid(e))
mRNA	<i>engl. messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
mtl	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>mtl</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>mtlE</sub> )
MTP	Mikrotiterplatte(n)
N	Newton (kg · m · s <sup>-2</sup> )
NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (-Hydrid)
NMR	Kernspinresonanz ( <i>engl. nuclear magnetic resonance</i> )
norm.	Normierung auf Biomasse/ OD <sub>xnm</sub>
NRPS	Nicht-ribosomale-Peptidsynthetasen
OD <sub>xnm</sub>	Optische Dichte bei x nm
ORF	Offenes Leseraster ( <i>engl. open-reading-frame</i> )
ori	Replikationsursprung ( <i>engl. origin of replication</i> )
orit	Konjugationsursprung (beinhaltet <i>mob</i> -Gen/ Konjugations-Erkennungssequenz; <i>engl. origin of transfer</i> )
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. protegens</i>	<i>Pseudomonas protegens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>engl. phosphate-buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
PDB	Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
Pgm	Phosphoglucomutase
pH	Wasserstoffionenexponent ( <i>lat. potentia Hydrogenii</i> ; dimensionslos)
PHA	Polyhydroxyalkanoat(e)
P <sub>i</sub>	Phosphat
PP	Pentose-Phosphat (-Weg)
PP_dRL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 + pPS05 (P <sub>syn16</sub> )
PP_HAA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 + pSB01 (P <sub>syn8</sub> )
PP_mRL	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 + pWJ02 (P <sub>syn16</sub> )
PP_wt	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
PQS	2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Chinolon
PVD	Pyoverdin(e)
P <sub>x</sub>	Promotor x
qPCR	quantitative PCR
QS	<i>Quorum sensing</i>
<i>R. erythropolis</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
rha	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>rha</sub> mRL <sup>E</sup> ( <i>rha</i> P <sub>BAD</sub> )
RL	Rhamnolipid(e) (ohne Diskriminierung zwischen Spezies/Kongeneren)
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>engl. revolutions per minute</i> ; min <sup>-1</sup> )

<b>rpoS</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>rpoS</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>rpoS</sub> )
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RT</b>	Reverse-Transkription
<b>RWTH</b>	Rheinisch-Westfälisch Technische Hochschule
<b>s</b>	Sekunden
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>sal</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>naqAa</sub> )
<b>SC</b>	Synthetische Basis für Hefemedien ( <i>engl. synthetic complete</i> )
<b>SD</b>	Selektivnährmedium für Hefen ( <i>engl. synthetic dextrose</i> )
<b>SEVA</b>	<i>engl. Standard European Vector Architecture</i>
<b>SI</b>	Internationales Einheitensystem ( <i>franz. Système international d'unités</i> )
<b>Sm</b>	Streptomycin
<b>SNR</b>	Signal-zu-Rausch Verhältnis ( <i>engl. signal to noise ratio</i> ; dimensionslos)
<b>sp.</b>	Spezies
<b>Spc</b>	Spectinomycin
<b>SS</b>	einzelsträngig ( <i>engl. single-stranded</i> )
<b>syn16</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 + pPS05 (P <sub>syn16</sub> )
<b>TB</b>	Komplexes Nährmedium ( <i>engl. terrific broth</i> )
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
<b>Tc</b>	Tetracyclin
<b>TE</b>	Tris-EDTA (-Puffer)
<b>tet</b>	<i>Pseudomonas putida</i> KT <sub>tet</sub> mRL <sup>E</sup> (P <sub>tetA</sub> )
<b>T<sup>M</sup></b>	Hybridisierungstemperatur (°C)
<b>TREX</b>	<i>engl. transfer and expression (-system)</i>
<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>TS</b>	Schwellenwert ( <i>engl. threshold</i> )
<b>U(ra)</b>	Uracil
<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>V</b>	Volt (kg · m <sup>2</sup> · s <sup>-3</sup> · A <sup>-1</sup> )
<b>v/v</b>	Volumenkonzentration (%)
<b>VE</b>	vollentsalztes (-Wasser)
<b>VIS</b>	Sichtbares Licht ( <i>engl. visible light</i> )
<b>VPBO</b>	<i>Victoria Pure Blue BO</i>
<b>W</b>	Watt (kg · m <sup>2</sup> · s <sup>-3</sup> )
<b>w/v</b>	Massenkonzentration (%)
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>xg</b>	x-fache der Erdbeschleunigung (g = 9,81 m · s <sup>-2</sup> )
<b>YNB</b>	Hefe-Stickstoff-Basis ( <i>engl. yeast nitrogen base</i> )
<b>YPD</b>	Komplexes Nährmedium für Hefen ( <i>engl. yeast peptone dextrose</i> )
<b>λ</b>	Wellenlänge (nm)

# I Einleitung

## I.1 Potenzial von Biotensiden als Alternative zu Erdöl-basierten Tensiden

Tenside sind oberflächenaktive Moleküle und werden in den unterschiedlichsten Bereichen, von der Waschmittel-/Reinigungsmittelindustrie, dem größten Sektor, bis hin zu dem Pharmazie- und Kosmetiksektor, eingesetzt (Falbe, 1987). Das Volumen des globalen Tensidmarktes beträgt zurzeit rund 18 Millionen Tonnen pro Jahr und weiteres Wachstum ist zu erwarten; bis 2022 wird eine jährliche Wachstumsrate von 4,3% prognostiziert (Grand View Research Inc., 2015a; Ahuja und Singh, 2019). Jedoch werden 96% der produzierten Tenside auf Basis fossiler Rohstoffe hergestellt (Roelants et al., 2019), die laut Prognosen zurzeit noch verfügbar sind, aber gewiss doch eine endliche Ressource darstellen (BGR, 2020). Bekannte Beispiele Erdöl-basierter Tenside umfassen Fettalkoholsulfate (bspw. Natriumlaurylsulfat), Alkoholethoxysulfate, lineare Alkylbenzolsulfonate, Alkoholethoxylate und langkettige Alkohole – Inhaltsstoffe, die allen handelsüblichen Waschmitteln und Seifen gemein sind (Cowan-Ellsberry et al., 2014). Diese müssen einer EU-Verordnung zufolge biologisch abbaubar, d. h. nach vier Wochen zu 60% abgebaut sein (EU/648, 2004). Daraus resultiert, dass nach wie vor Erdöl-basierte Tenside bzw. ihre Abbauprodukte über unsere Abwässer in die Umwelt gelangen können und dort über längere Zeit verbleiben. Für Wasserorganismen können einige dieser Substanzen gefährlich sein (Lewis, 1991; Lechuga et al., 2016). Doch auch für die menschliche Gesundheit sind Tenside mitunter bedenklich: Sie können Haut und Schleimhäute austrocknen oder reizen und so anfälliger für Allergien und Ausschläge machen (Bondi et al., 2015). Aus diesem Grund ist in der Bevölkerung, vor allem in der jungen Generation, ein Umdenken zu beobachten, wodurch Unternehmen zunehmend gefordert werden, nachhaltige »grüne« Produkte anzubieten (von Wehrden et al., 2019).

Aufgrund der zunehmenden Verknappung fossiler Rohstoffe, der erhöhten Umweltbelastung und der gesteigerten Nachfrage nach »grünen« Produkten stellen Bio-basierte Tenside somit eine aufstrebende Alternative dar (Olasanmi und Thring, 2018; Elmquist et al., 2019; Marcelino et al., 2020). Als allgemein vorteilhafte Charakteristika von Bio-basierten Tensiden werden die vielversprechenden physikalischen (z. B. starke Oberflächenaktivität und Temperaturstabilität), biologischen (z. B. antimikrobielle und bioaktive Wirksamkeit) und umweltrelevanten (z. B. biologische Abbaubarkeit, geringe Ökotoxizität und Fähigkeit zur Metallionen-Komplexierung) Eigenschaften bewertet (Makkar et al., 2011; Marchant und Banat, 2012a; Kosaric und Vardar-Sukan, 2014; Johann et al., 2016). Zudem zeichnen sich die auf Basis von Bio-basierten Tensiden hervorgehenden Produkte durch ein großes Variantenspektrum aus, welche sie gerade für Spezialanwendungen wie in der Medizin oder der Lebensmittel- und Agrarindustrie besonders wertvoll machen (Rodrigues et al., 2006; Naughton et al., 2019; Ribeiro et al., 2020).

Bio-basierte Tenside können chemisch oder biologisch ausgehend von natürlichen und erneuerbaren Bausteinen hergestellt werden (Roelants et al., 2019). Mit einem Volumen von derzeit

etwa 99% dominieren hier hauptsächlich die oleochemischen Tenside zu denen die Methylstersulfonate, Alkylpolyglucoside und Zuckerester (z. B. Sorbitan-, Saccharose- und Methylglucosid-Ester) gehören, die chemisch oder biokatalytisch auf Basis von Zuckern und Pflanzenölen (z. B. Palmöl) produziert werden (Chang und Shaw, 2009; Grand View Research Inc., 2015b; Ahuja und Singh, 2019). Biotenside, die durch biologische Prozesse in lebenden Zellen produziert werden, können wiederum durch Extraktion aus Pflanzen (z. B. Saponine; Tmáková et al., 2016) oder aus Mikroorganismen (mikrobielle Biotenside wie z. B. Rhamnolipide (RL), Sophorolipide und Surfactin; Henkel et al., 2017) gewonnen werden (Fiechter, 1992; Lang und Trowitzsch-Kienast, 2002; Roelants et al., 2019).

Mikrobielle Biotenside haben den Vorteil, dass sie aus nachwachsen Rohstoffen produziert werden (Satpute et al., 2017). Im Gegensatz zu oleochemischen Tensiden und zu der Extraktion aus Pflanzen benötigt die Produktion der aus Mikroorganismen erhaltenen Biotenside weniger Anbau- bzw. Nutzfläche und als Substrate werden meist nur erneuerbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (z. B. Melasse; Nitrate), Wasser, Sauerstoff und eine Reihe von Vitaminen und Spurenelementen benötigt. Zudem können mit rekombinanten Produktionsstämmen in geeigneten Anlagen Abfall- und Nebenströme anderer Prozesse berücksichtigt werden, die so einfach rezykliert oder zu weiteren hochwertigen Produkten verarbeitet werden können (Satpute et al., 2017; Roelants et al., 2019). Weiterhin lässt sich die chemische Zusammensetzung der Biotenside im Vergleich zu herkömmlichen Tensiden durch umweltschonende und molekularbiologische Techniken verändern, wie bspw. anhand der Bolaform-Sophorolipide gezeigt wurde (Van Bogaert et al., 2016), um sie für spezifische funktionelle Anforderungen anzupassen (Fracchia et al., 2014). Obwohl aus diesen Gründen den mikrobiellen Biotensiden viel Forschungsaktivität gewidmet wird, betrug das Produktionsvolumen bspw. im Jahr 2017 nur wenige tausend Tonnen pro Jahr und damit unter 0,1% des globalen Tensidmarktes (Ahuja und Singh, 2019).

Gründe hierfür bestehen darin, dass deren Produktion im Vergleich zu petro- und oleochemischen Tensiden deutlich teurer ist und zurzeit aufwändigere Herstellungsprozesse mit geringerer Produktivität erfordert (Marchant und Banat, 2012b; Soares da Silva et al., 2019). Chong und Li, 2017 berichten bspw., dass die prozessbedingten Gesamtkosten mikrobieller Biotenside durchschnittlich 20-25 \$/kg betragen, während die von chemisch synthetisierten Tensiden bei 1-3 \$/kg liegen und damit um einen Faktor von 8 – 20 höher liegen; aus ökonomischer Sicht eine große Hürde zur Etablierung mikrobieller Biotenside in Konkurrenz zu petrochemischen Massenchemikalien im Waschmittel- und Reinigungssektor. Mikrobielle Produktion als Ursprung für Biotenside scheint deshalb zurzeit nur wirtschaftlich zu sein, wenn diese bei der Herstellung von hochpreisigen Produkten wie Kosmetika und Medikamenten benötigt werden. Hierzu gehören auch Bereiche, in denen petrochemische Tenside eine schlechtere Wirkung zeigen, z. B. in der Kombination mit antimikrobiellen Substanzen, wodurch Ihre Wirksamkeit potenziert werden kann (Morita et al., 2013; Hage-Hülsmann et al., 2018). Ein Hindernis hierbei: Mikrobielle Biotenside werden meistens als komplexe Tensid- und Kongenergemische produziert (z. B. Sophorolipide, die aus 20 bis 100 unterschiedlichen Verbindungen bestehen), die sich zusätzlich als Naturprodukte

zwischen verschiedenen Produktionschargen durch z. B. variierende Kultivierungsbedingungen, Substrate und Komponenten unterscheiden können (Cavalero und Cooper, 2003; Nitschke et al., 2010). Eine reproduzierbare Produktqualität, die von den Unternehmen, z. B. in der Formulierung von Pharmazeutika, gefordert und somit für die Marktdurchdringung von Nöten ist, kann auf diese Weise nur eingeschränkt gewährleistet werden (Roelants et al., 2019). Zielführend wäre die Herstellung eines definierten Produktsortimentes analog zu den petrochemisch-basierten Tensiden sowie die Verringerung der Produktionskosten durch Optimierung des Produktionsprozesses und der Produktionsstämme, um die Marktdurchdringung zu ermöglichen.

Jedoch haben verbesserte Herstellungs- und Reinigungsverfahren, der steigende Rohölpreis sowie leistungsfähigere Produktionsstämme bereits dazu geführt, dass in den letzten Jahren erste mikrobiell hergestellte Biotenside (z. B. Sophorolipide und RL) an den Markt gebracht werden konnten (Marchant und Banat, 2012a; Henkel et al., 2017; Brandt et al., 2018; Bettenhausen, 2020). Auch wenn Biotenside die klassischen Tenside zurzeit nicht vollständig ersetzen können, besitzen sie aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Vielfalt ein hohes Potenzial dazu (Banat und Thavasi, 2019).

#### I.1.1 Eigenschaften, Klassifizierung und Struktur von Biotensiden

Viele Mikroorganismen produzieren Biotenside. Diese sind ein Beispiel für die Vielzahl von mikrobiellen Naturprodukten, die für ihr Wachstum und Überleben nicht essenziell zu sein scheinen, und somit traditionell als Sekundärmetaboliten bezeichnet werden. Biotenside und ihre Vorstufen spielen jedoch eine entscheidende Rolle für die Vitalität ihrer produzierenden Mikroorganismen; u. a. durch Erleichterung des Nährstofftransports, der bakteriellen Fortbewegung und der Kommunikation mit anderen Organismen (Sullivan, 1998; Gudiña et al., 2013; Kallscheuer et al., 2020). Zum Beispiel kann durch die Produktion von Biotensiden das Wachstum in Biofilmen oder die bakterielle Erschließung hydrophober Substrate gefördert werden (Banat et al., 2010; Kosaric und Vardar-Sukan, 2014).

Dies liegt vor allem am amphiphilen Charakter der Biotenside. Wie jedes Tensid sind auch Biotenside amphiphile Moleküle und bestehen aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, wodurch Sie sowohl mit polaren als auch unpolaren Komponenten interagieren können. Hierbei orientieren sich Tenside an der Phasengrenze, indem hydrophobe Teile der Moleküle, wie z. B. längere Kohlenwasserstoffketten, mit einer unpolaren Phase (z. B. Öl/ Luft) interagieren, während sich die hydrophilen Gruppen zur polaren Phase (z. B. Wasser) hin ausrichten (Lang und Trowitzsch-Kienast, 2002). Dadurch wird die Oberflächenspannung mit steigender Konzentration des Tensids zwischen beiden Phasen verringert bis die Grenzfläche mit Tensidmolekülen abgesättigt ist und diese beginnen zu aggregieren. Diese Aggregate können abhängig von Molekülstruktur, Tensidkonzentration, Temperatur und Ionenstärke Formen wie kugelförmige Mizellen, Stäbchenmizellen und doppelschichtige Strukturen wie Vesikel bzw. Liposomen annehmen (Brandt et al., 2018; Baccile et al., 2019).

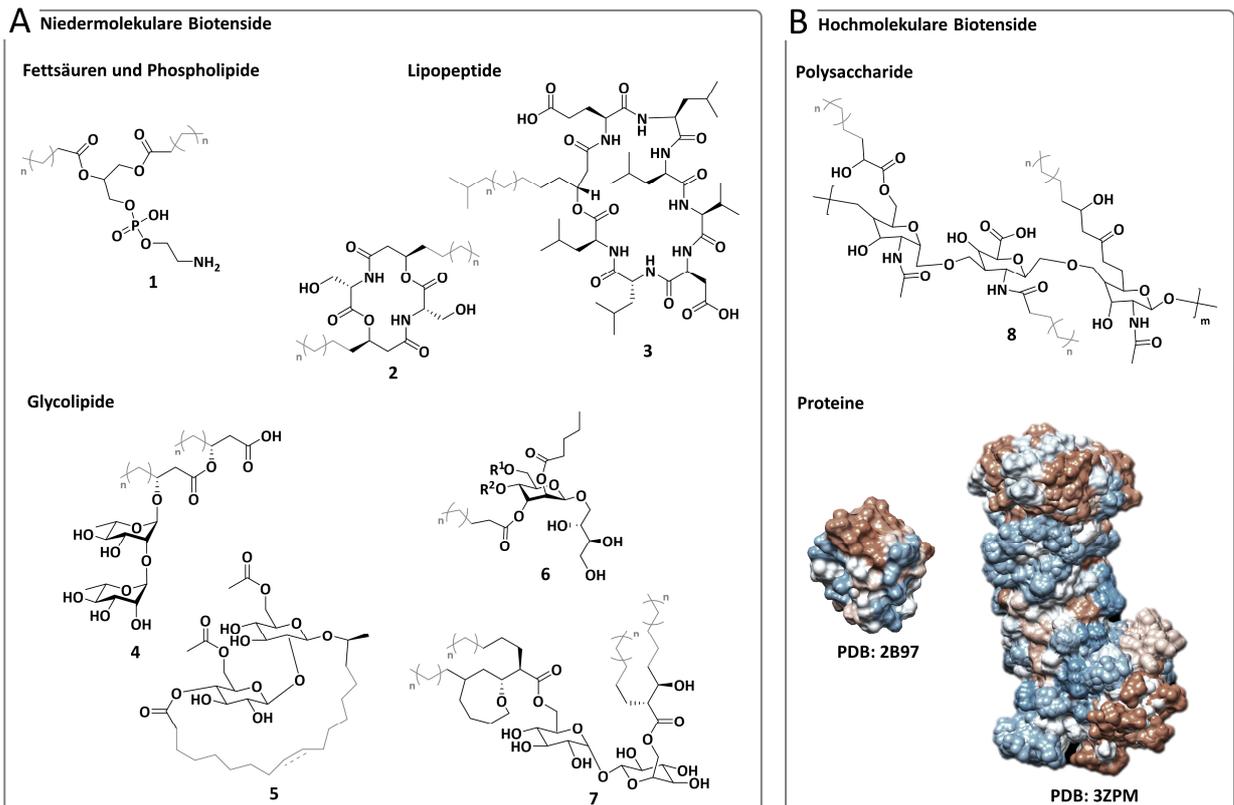
Aus diesem Verhalten lassen sich wichtige Kennzahlen zur Bewertung der physikochemischen Tenseigenschaften ermitteln. Zunächst sind die maximale Reduktion der Oberflächen- bzw. der Grenzspannung bedeutende Richtwerte, die meist mit Hilfe eines Tensiometer ermittelt werden (Varjani et al., 2007; Song et al., 2015). Wirksame Tenside senken die Oberflächenspannung zwischen Wasser und Luft von 72 auf 35 mN/m und die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Hexadekan (Öl) von 40 auf 1 mN/m herab (Soberón-Chávez und Maier, 2011).

Weiterhin wird die Konzentration, bei der Tensidmoleküle beginnen in Mizellen zu aggregieren als kritische Mizellenkonzentration (CMC) bezeichnet. Niedrige CMC-Werte zeigen an, dass die minimale Oberflächenspannung mit geringeren Mengen des Tensids erreicht ist und es als effizient eingestuft werden kann. Hierbei hängt der CMC-Wert von Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und Vorhandensein von organischen Verunreinigungen ab (Dahrazma et al., 2008). Für Tenside mit definierter und bekannter Struktur wird die CMC oft in mol/L angegeben; für Biotenside, die meist in Form von Gemischen aus verschiedenen Kongeneren vorliegen, wird die Dimension g/L verwendet (Tiso et al., 2017a). Biotenside zeichnen sich besonders durch ihre geringe CMC (20-200 g/L) im Vergleich zu konventionellen Tensiden (500-2500 g/L) aus (Christofi und Ivshina, 2002).

Eine weitere Charakteristik ist der Emulsifikationsindex (E24), der die Emulgierungseigenschaften der resultierenden Tensidaggregate beschreibt, indem eine wässrige Biotensidlösung mit einem definierten Volumen einer hydrophoben-Lösung (in der Regel Alkane/Öle) vermengt wird. Je höher dieser Wert ist, umso besser ist die Emulgationsaktivität (Tiso et al., 2017a).

Aber auch Schaumverhalten (Standardtest: ASTM D1173), Benetzungseigenschaften (HLB-Wert) und Trübungspunkt (CP) werden zur Charakterisierung herangezogen (Quina und Hinze, 1999; Jiménez Islas et al., 2010; Tiso et al., 2017a). Biologische Eigenschaften wie z. B. biologische Abbaubarkeit, Ökotoxizität, Hautverträglichkeit und potenzielle antimikrobielle Aktivität sind ebenfalls wichtige Faktoren zur Beurteilung der Tensidwirkung (Soberón-Chávez und Maier, 2011).

Klassische chemisch-synthetisierte Tenside werden meist basierend auf der Art und Ladung des hydrophilen Molekülteils als anionische, kationische sowie zwitterionische/nichtionische (neutrale) Tenside gruppiert, mikrobielle Biotenside zusätzlich anhand der chemischen Zusammensetzung des hydrophilen Molekülteils und ihrem Molekulargewicht (nieder- und hochmolekular). Dies liegt an der erhöhten diskutierten Toxizität kationischer Tenside, wodurch die Mehrzahl der mikrobiellen Biotenside zu der Klasse der anionischen und neutralen Tenside gehören (Smyth et al., 2010; Soberón-Chávez und Maier, 2011; Hausmann und Syldatk, 2014). Generell umfasst der hydrophobe Teil mikrobieller Biotenside gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, Hydroxyfettsäuren oder primäre Fettalkohole mit einer Kettenlänge zwischen 8 und 18 Kohlenstoffatomen. Der hydrophile Teil besteht aus einzelnen polaren Gruppen wie Ester-, Hydroxyl-, Phosphat- oder Carboxylgruppen aber auch hydrophile Moleküle wie Kohlenhydrate (Mono-, Oligo- oder Polysaccharide) oder Peptide/Proteine sind möglich (**Abb. I-1**; Hausmann und Syldatk, 2014).



**Abb. I-1: Strukturen von verschiedenen nieder- und hochmolekularen Biotensiden.**

Biotenside lassen sich in niedermolekulare ((A); LMW; Fettsäuren und Phospholipide, Lipopeptide sowie Glycolipide) und hochmolekulare ((B); HMW; Polysaccharide, Proteine, Lipopolysaccharide und Lipoproteine) Biotenside einteilen. Die hydrophilen Bereiche sind in schwarz, die hydrophoben Anteile in grau eingefärbt. Moleküle mit unterschiedlichen Lipid-Kongeneren werden in ihrer allgemeinen Molekülstruktur gezeigt, wobei (n) die variable Anzahl an Kohlenstoffatomen verdeutlicht.

**A:** Ein Beispiel für ein Phospholipid, welches interessante biotensidische Eigenschaften besitzt, ist das von *Rhodococcus erythropolis* sekretierte Phosphatidylethanolamin **1**. Für die Klasse der Lipopeptide lässt sich das in *Serratia marcescens* produzierte Serrawettin W1 **2** und das von mehreren Arten der Gattung *Bacillus* produzierte Surfactin **3** nennen. Beispiele für biotechnologisch relevante Glycolipide sind RL **4** (hier das Dirhamnolipid (dRL)) aus *Pseudomonas aeruginosa*, das laktonische Sophorolipid **5** aus *Starmerella bombicola*, das u. a. von *Ustilago maydis* produzierte Mannosylerythritollipid **6** (MEL-A: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Acetyl-Gruppe; MEL-B: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Ac; MEL-C: R<sup>1</sup> = Ac, R<sup>2</sup> = H; MEL-D: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H) sowie das von *Rhodococcus erythropolis* produzierte Trehaloselipid **7**.

**B:** Zu den HMW Biotensiden zählen u. a. das von *Acinetobacter* sp. produzierte Glycolipid Emulsan RAG-1 **8** sowie amphiphile Proteine wie Hydrophobin HFBII aus *Trichoderma reesei* (PDB: 2B97) oder das Latherin aus Pferdeschweiß (PDB: 3ZPM). Proteinstrukturen wurden gemäß ihrer Oberflächenhydrophobizität (hydrophil: blau; hydrophob: rot) mit Chimera 1.14 grafisch visualisiert.

Biotenside mit niedrigem Molekulargewicht (**Abb. I-1 (A)**) sind einfache freie Fettsäuren und Phospholipide, Glycolipide oder Lipopeptide.

Freie **Fettsäuren und Phospholipide** werden von allen Mikroorganismen produziert, da sie Bestandteil des Kohlenstoffhaushaltes und der biologischen Membranen sind. Jedoch können diese unter bestimmten Voraussetzungen als Biotenside fungieren (Desai und Banat, 1997). Die stärkste Senkung der Oberflächen- und Grenzflächenspannungen werden z. B. durch freie Fettsäuren mit einer Kettenlängen von C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> erreicht, die sich somit besonders gut zum Aufbau von solubilisierenden Mizellen eignen (Rehm und Reiff, 1981). Anstelle von Fettsäuren sind Phospholipide in der Regel nicht im extrazellulären Raum vorhanden, da sie eine der Hauptkomponenten biologischer Membranen sind. Eine Ausnahme stellen *Acinetobacter* sp. oder *Rhodococcus erythropolis* dar. Diese Mikroorganismen sezernieren extrazelluläre Phospholipidvesikel während des Wachstums auf Alkanen, um diese als Energiequelle zugänglich zu machen (Kosaric und Vardar-Sukan, 2014). Für Phosphatidylethanolamin **1** produziert durch

*R. erythropolis* ist die Reduktion der Grenzflächenspannung niedriger als 0,81 mN/m bei einer CMC von 0,03 g/L (Kretschmer et al., 1982; Petelska et al., 2011).

Eine weitere Gruppe von Biotensiden mit niedrigem Molekulargewicht sind die Aminosäuren (AS)-basierten Lipide und **Lipopeptide** (Mnif und Ghribi, 2015). Beispiele sind u. a. das in *Serratia marcescens* produzierte Serrawettin W1 **2** und das von mehreren Arten der Gattung *Bacillus* produzierte Surfactin **3** (Baltz et al., 2005; Malcolm et al., 2007). Für diese Biotenside ist eine Verringerung der Oberflächenspannung auf 27-34 mN/m verzeichnet worden, was sie als effektive Biotenside klassifiziert (Matsuyama et al., 1986; Christofi und Ivshina, 2002). Viele Vertreter dieser Biotensidklasse zeigen nicht nur eine Verringerung der Oberflächenspannung, sondern auch eine starke antibiotische Wirkung. Zudem handelt es sich meist um zyklische Peptide (Baltz et al., 2005). **Glycolipide** bestehen aus Mono- oder Oligosacchariden sowie aus einem Lipidanteil. Typische Zucker in der hydrophilen Domäne sind D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose, D-Galactosesulfat, D-Glucuronsäure oder L-Rhamnose, während der hydrophobe Teil aus gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren, Hydroxyfettsäuren oder Fettalkoholen besteht. Die vier zurzeit biotechnologisch wichtigsten Gruppen mikrobieller Glycolipide sind RL **4**, Sophorolipide **5**, Mannosylerythritolipide (MEL) **6** und Trehaloselipide **7** (Kosaric und Vardar-Sukan, 2014). RL **4** sind ursprünglich als Sekundärmetaboliten von *Pseudomonas aeruginosa* bekannt und beinhalten ein bzw. zwei L-Rhamnoseeinheiten (Déziel et al., 2000; Abdel-Mawgoud et al., 2010). Anstelle von RL **4** enthalten Sophorolipide **5** das Disaccharid Sophorose (Nuñez et al., 2001). Sophorolipide **5** werden von verschiedenen Ascomyceten, hauptsächlich *Starmerella bombicola* und *Candida apicola* (Asmer et al., 1988; Van Bogaert et al., 2011), sowohl in saurer als auch laktonischer Form sowie mit einer hohen Varietät an Kettenlängen, Hydroxylierungsstellen und Sättigungsgraden produziert (Davila et al., 1993; Price et al., 2012). MEL **6** bestehen aus 4-O-β-D-Mannopyranosyl-D-erythritol als Kohlenhydratanteil, die zusätzlich verschiedene Acylierungsmuster und Kettenlängen an der Acylgruppe aufweisen können. Sie sind hauptsächlich von Spezies wie *Candida* (Kim et al., 1999), *Pseudozyma* (Konishi et al., 2008) und *Ustilago* (Kurz et al., 2003) bekannt. Trehaloselipide **7** enthalten das Disaccharid Trehalose, das mit langkettigen, α-verzweigten 3-Hydroxyl-Fettsäuren (Mykolsäuren) acyliert ist. Diese werden meistens von *Mycobacterium*-, *Arthrobacter*- und *Rhodococcus*-Arten produziert (Christova und Stoineva, 2014). Beispielsweise ist das Glycolipid 6,6'-Dimykolyltrehalose als wichtiger Virulenzfaktor bei Mykobakterieninfektionen (Tuberkulose, Lepra) bekannt (Ryll et al., 2001).

Dadurch dass niedermolekulare Biotenside in komplexen Kongenergemischen mit unterschiedlicher Anzahl an Zuckerresten und verschiedenen Acylierungs- und Methylierungsgraden auftreten, scheint die eindeutige physikochemische Charakterisierung nur bedingt möglich zu sein. So gibt es bspw. für RL **4** zwischen 0,05 und 0,23 g/L verschiedene berichtete CMC (Syldatk et al., 1985; Abalos et al., 2001; Dubeau et al., 2009; Tiso et al., 2017a; Rocha et al., 2020), die sich aufgrund von verschiedenen (heterologen) Produktionsstrategien, Mikroorganismen, Reinheitsgraden und Methoden zur Ermittlung unterscheiden.

**Hochmolekulare** polymere **Biotenside** (**Abb. I-1 (B)**) werden von Mikroorganismen verschiedener Spezies produziert. Es handelt sich dabei um Polysaccharide, Proteine, Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine oder komplexe Mischungen aus diesen, die als Lipoheteropolysaccharide bezeichnet werden (Mujumdar et al., 2019). Die bekanntesten Biotenside mit hohem Molekulargewicht sind Emulsane **8**, die von verschiedenen Archaeen sowie Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gebildet werden. Emulsan ist selbst in niedrigen Konzentrationen von 0,01–0,001% ein hochwirksamer Bioemulgator. Beispielsweise wurden die Emulsane von *Acinetobacter* RAG-1 und BD4 sehr detailliert untersucht (Kaplan und Rosenberg, 1982; Sar und Rosenberg, 1983). Die emulgierende Wirkung ist relativ spezifisch: reine Aliphaten, Aromaten oder zyklische Kohlenwasserstoffe werden nicht, während viele Mischungen aus aliphatischen und aromatischen Verbindungen effektiv emulgiert werden (Rosenberg und Ron, 1999).

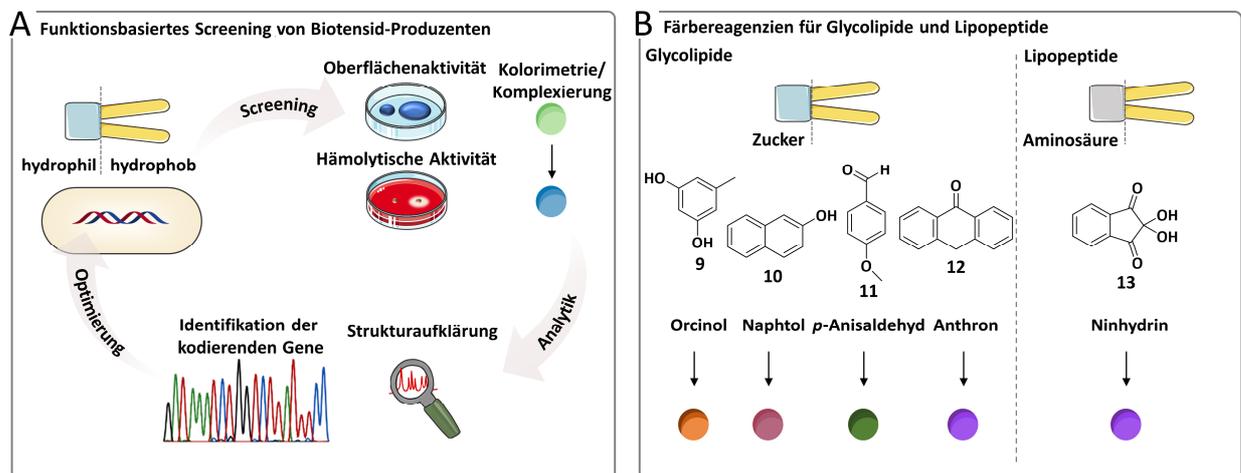
(Lipo-) **Proteine** sind eine interessante Klasse von wenig erforschten und biotechnologisch kaum genutzten Biotensiden. Natürlich vorkommende Schäume enthalten oft Proteinabbauprodukte oder spezielle Schaumproteine (Cheung und Samantray, 2018). Diese Proteine weisen unterschiedliche Strukturen mit schaumstabilisierenden Eigenschaften auf. Ein besonders interessantes Beispiel dafür sind die Ranaspumine tropischer Frösche, die Schaumnester zum Schutz ihrer Eier verwenden. Ein weiteres stark schäumendes Protein ist Latherin, das vor allem aus Pferdeschweiß bekannt ist (Fleming et al., 2009; Vance et al., 2013). Bekanntere Klassen sind die Hydrophobine und Cerato-Platanine, kleine Proteine, die von Pilzen abgesondert werden (Scholtmeijer et al., 2001; de O. Barsottini et al., 2013).

Aufgrund der hohen Vielfalt von Biotensiden ist die Entdeckung und Charakterisierung von (neuen) Biotensid (-produzenten) eine große Herausforderung, da jede Klasse über eigene Charakteristika, Biosynthesewege und -gene (BSG), sowie Methoden zur Identifikation verfügt. Im Gegenteil zu Sekundärmetaboliten, die aufgrund ihrer kolorimetrischen Eigenschaften detektiert und identifiziert werden können, bspw. farbige Alkaloide oder Terpene, ist die initiale Detektion von Biotensiden meist nur über spezifische Test, die bspw. auf die Reduktion der Oberflächenspannung zurückgreifen, möglich.

#### I.1.1.1 Detektion von Biotensid-Produzenten und Analytik

Die Entdeckung von Biotensiden mit einem hohen ökonomischen und biologischen Potenzial und die Erstellung eines breiten *à la carte* -Sortimentes für spezifische Anwendungen ist ein zentraler Bestandteil der künftigen Forschungsentwicklung (Walter et al., 2010; Soberón-Chávez und Maier, 2011). Entsprechend der vielfältigen physiologischen Rollen der produzierten Biotenside konnten Biotensid-produzierende Mikroorganismen in verschiedenen Umgebungen gefunden werden. Viele wurden aus Böden oder Gewässern, die mit hydrophoben organischen Verbindungen kontaminiert sind (z. B. Raffinerieabfällen), isoliert (Mercadé et al., 1996; Huy et al., 1999). Aber auch nicht kontaminierte Böden und marine Lebensräume können als Quelle dienen, da Biotenside nicht nur zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen beitragen, sondern auch in der Pathogenität, der Biofilmbildung, der bakteriellen Fortbewegung und der Kommunikation eine Rolle spielen (Batista

et al., 2006; Kubicki et al., 2019; Tripathi et al., 2019). Zur Gewinnung einer Reinkultur aus einer gemischten Population eines biologischen Isolates können Stämme direkt durch Verdünnung und Plattierung oder indirekt durch Anreicherungskulturen mit hydrophoben Substraten gewonnen werden (Walter et al., 2010). Letztere sind sehr vielversprechend für die Isolierung von Biotensid-produzierenden Mikroorganismen, da lediglich Mikroorganismen, welche hydrophobe Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle verwerten können, anwachsen und somit an dieser Stelle bereits ein indirektes Screening nach Biotensiden erfolgt (Hanson et al., 1993; Walter et al., 2010). Jedoch zeigten bspw. Willumsen und Karlson, 1997 mit einem Isolat aus kontaminierten Böden, welche sie mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffsubstraten anreicherten, dass aus 57 angereicherten Stämmen lediglich vier Biotenside produzierten. Trotzdem grenzt dieses indirekte Screening eine erste Auswahl an Stämmen ein, die anschließend mit direkten Methoden auf ihre Biotensid-Produktion untersucht werden können. Hierbei existieren verschiedene Methoden (qualitativ und/oder quantitativ) zum Screening auf Biotensid-Produktion und zur initialen Identifizierung der Biotenside (vgl. **Abb. I-2**).



**Abb. I-2: Screening von neuen Biotensid-Produzenten und Identifikation der Tensidart.**

**A:** Das Funktions-basierte Screening ist eine einfache Strategie, um ein biologisches Isolat oder bestimmte Mikroorganismen auf Biotensid-Produktion zu überprüfen. Hierbei werden potenzielle Biotensid-produzierende Mikroorganismen über ihre hämolytischen Eigenschaften, ihre Fähigkeit bestimmte Stoffe zu komplexieren bzw. kolorimetrisch umzusetzen oder ihre Oberflächenaktivität identifiziert. Im Anschluss an die initiale Eingrenzung der Tensidart (**B**), erfolgt die Strukturaufklärung (bspw. über FT-IR; HPLC/GC-MS, NMR) und die Sequenzierung des Mikroorganismus bzw. Identifikation der kodierenden Gene. Diese können im Anschluss zur Optimierung der homologen Biotensid-Produktion, insofern die Regulationsmechanismen bekannt sind, oder der rekombinanten Produktion genutzt werden. Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Commons-Lizenz (CC BY 3.0).

**B:** Zur Identifikation der Tensidart lassen sich nach einem geeigneten Isolierungsverfahren (z. B. Chloroform- oder Ethylacetatextraktion) initial erste Tests vornehmen, um bestimmte Tensidklassen anhand ihres hydrophilen Molekülteils zu identifizieren. Hierbei gibt es eine Reihe von Farbstoffen, die als Detektionsreagenzien in der Dünnschichtchromatographie oder in etablierten Quantifizierungstests zur Ermittlung einiger spezieller Tenside verwendet werden. Zur Färbung des Zuckeranteils von Glycolipiden lassen sich Detektionsreagenzien wie Orcinol **9**, Naphthol **10**, *p*-Anisaldehyd **11** oder Anthron **12** verwenden, deren Reaktion eine kolorimetrische Antwort erzeugt. AS-basierte Lipide und Lipopeptide lassen sich u. U. über Ninhydrin **13**-färbung kolorimetrisch nachweisen.

Biotenside sind eine strukturelle sehr vielfältige Gruppe von Biomolekülen mit vielen unterschiedlichen funktionellen Gruppen und Einheiten. Daher sind die meisten der Methoden zur Identifikation von Biotensid produzierenden Stämmen basierend auf den am weitesten verbreiteten bzw. gemeinsamen physikalischen Eigenschaften (vgl. **Abb. I-2 (A)**). Neben der Identifikation von neuen Biotensid-Produzenten, lassen sich diese Methoden auch zur Untersuchung bereits vorhandener Stämme und bei entsprechender Kalibrierung auch zur Quantifizierung nutzen (Walter et al., 2010; Varjani und Upasani, 2017). Hierbei stützen sich die meisten der publizierten Methoden

auf die Detektion von Biotensiden in Kulturüberständen, da diese zumeist sekretiert werden (Soberón-Chávez und Maier, 2011). Formal lassen sich die Methoden in drei Grundprinzipien einteilen: zum einen in die hämolytischen und die kolorimetrischen/ bzw. komplexierenden Verfahren, zum anderen in Prinzipien die die Oberflächenaktivität nachweisen (Walter et al., 2010). Der hämolytische Assay (Mulligan et al., 1984), oder auch Blutagar-Assay, weist die Anwesenheit von Biotensiden durch Hämolyse von Erythrozyten nach. Hierbei wird die betreffende Bakterienkultur punktförmig auf eine Blutagarplatte aufgetragen und inkubiert. Produziert der Stamm Biotenside, werden bei ausreichender Konzentration Klärhöfe sichtbar, da die Zellwand der im Blut befindlichen Erythrozyten aufgelöst wird. Das für die charakteristische rote Farbe des Blutes verantwortliche Hämoglobin wird hierbei abgebaut (Carrillo et al., 1996). Neben diesem qualitativen Ansatz, wurden auch quantitative Methoden beschrieben, die die durch die Hämolyse verursachte Abnahme der Absorption des Hämoglobins bei 540 nm detektieren (Johnson und Boese-Marrazzo, 1980).

Kolorimetrische Komplexierungsreaktionen bspw. mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC) und Bromthymolblau (BTB) oder Methylenblau und N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid (CTAB) sind ebenfalls vielversprechende Ansätze (Pinzon und Ju, 2009; Yang et al., 2015). Hierbei interagieren die funktionellen Gruppen der Biotenside mit den Farbstoffen und erzeugen einen Farbumschlag. Dieser kann anschließend durch Ermittlung der Absorption bestimmt werden und für einen definierten Konzentrationsbereich auch zur Quantifizierung eingesetzt werden.

Jedoch hat sich herausgestellt, dass hämolytische und kolorimetrische Methoden lediglich unterstützend in der Kombination mit weiteren Methoden zuverlässige Ergebnisse liefern können. Diese Tests interferieren oftmals mit verschiedenen Metaboliten oder sind nur für einen geringen Teil von Biotensiden mit speziellen funktionellen Gruppen oder Eigenschaften wirksam (Varjani et al., 2007; Afshar et al., 2008).

Somit empfehlen einige Studien, auf die Oberflächenaktivität als Screening-Methode zurückzugreifen (Varjani und Upasani, 2017). Hierzu gehören bspw. der *drop-collapsing* Test (Jain et al., 1991), der *grid* Test (Vaux und Cottingham, 2007) oder der *atomized-oil* Test (Burch et al., 2010). Im *drop-collapsing* Test wird der Kulturüberstand des betreffenden Stammes auf eine Polystyrol-Platte pipettiert. Wenn im Kulturüberstand keine Biotenside vorhanden sind, entstehen kleine, runde Tropfen. Bei Anwesenheit von Biotensiden verläuft dieser Tropfen, da die Oberflächenspannung reduziert ist (Jain et al., 1991).

Der *grid* Test basiert auf der Änderung der optischen Verzerrung eines Gitters (Vaux und Cottingham, 2007). Wenn ein Biotensid vorhanden ist, verzerrt die konkave Oberfläche des Tropfens das Bild des Gitters unter einer Mikrotiterplatte (MTP). Der Vorteil gegenüber dem *drop-collapsing* Test liegt in dem hohen Durchsatz an Proben, die zur Untersuchung verwendet werden können (Chen et al., 2007).

Der *atomized-oil* Test eignet sich besonders gut zum Screening von Biotensid-Produzenten auf Agarplatten, wodurch die Anzucht einzelner Kolonien in Flüssigmedium nicht erforderlich ist (Burch et al., 2010). Hierbei wird die Produktion von Tensiden durch die veränderte Oberflächeneigenschaft der von der Bakterienkolonie umgebenden Region auf Agarplatten nachgewiesen. Dazu werden

Kolonien mit einem dünnen Paraffinfilm besprüht. Durch Lichtreflexion werden an Stellen, die Biotenside beinhalten, Bereiche gleichförmiger Paraffintröpfchen sichtbar, da die Tenside die Tropfenform über die Oberflächenspannung zwischen Wasser (hier: Agar), Paraffin und Luft beeinflussen (Burch et al., 2010). Die Anwendung eines solchen Hochdurchsatz-Tests, speziell zur Detektion oberflächenaktiver Substanzen, bietet gute Chancen in großen (Metagenom-) Banken auch neue Biotenside zu identifizieren (Kennedy et al., 2011; Williams et al., 2019). Jedoch sind alle Tests, die auf die Oberflächenaktivität der Tenside zurückgreifen, weitestgehend qualitativer Natur und können durch Supplementierung hydrophober Substrate, die zur Anregung der Biotensid-Produktion hinzugegeben werden, verfälscht werden (Varjani und Upasani, 2017).

Sobald jedoch ein Hinweis für eine Biotensid-Produktion besteht, lässt sich über initiale chromatographische Tests und Färbereaktionen die Tensidart bestimmen (vgl. **Abb. I-2 (B)**). Hierzu müssen im ersten Schritt die Biotenside extrahiert werden; bspw. über eine Chloroform- oder Ethylacetatextraktion der ganzen Kultur oder des Kulturüberstandes (Vecino et al., 2014; Shah et al., 2016). Zum Nachweis von Glycolipiden lassen sich bspw. nach einer Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) die Zuckerkomponenten mit Orcinol **9** (Koch et al., 1991), Naphthol **10** (Ginsburg, 1972), *p*-Anisaldehyd **11** (Asmer et al., 1988) oder Anthron **12** (Hodge und Hofreiter, 1962) anfärben. Für AS-basierte Lipide oder Lipopeptide lassen sich die Aminosäuren klassischerweise mit Ninhydrin **13** anfärben (Brückner und Przybylski, 1984; Dimkić et al., 2017). Viele dieser Farbreaktionen werden, neben der Identifikation der Biotensidklasse, auch für quantitative Aussagen benutzt. Zum Beispiel wurde der Orcinol **9** Test dazu entwickelt RL in Extrakten in einem Konzentrationsbereich von 0–50 g/L zu quantifizieren (Hodge und Hofreiter, 1962; Chandrasekaran und Bemiller, 1980; Ochsner et al., 1994).

Im Gegensatz zu LMW sind HMW riesige, strukturell komplexe Polymere. Daher werden diese LPS (bspw. Emulsane) direkt durch komplexere kolorimetrische Assays (Lowry-Methode, Bradford-Assay), Massenspektrometrie (MS) und Sequenzierungstechniken analysiert (Satpute et al., 2010). Im Allgemeinen gilt, dass zur Strukturaufklärung Lipidbestandteile und Zucker bzw. Peptidsequenzen mit Hilfe der automatisierten Edman-Degradations-Sequenzierung und MS oder NMR ermittelt werden (Satpute et al., 2010). Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte haben jedoch Methoden wie die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) den Forschern ermöglicht, das Vorhandensein von Biotensiden zu deutlich geringeren Kosten nachzuweisen und zu verifizieren (Vandenbussche et al., 1992; Smyth et al., 2010; Jeck et al., 2020). Zudem konnten Quantifizierungsmethoden etabliert werden, die es für bestimmte Biotenside, bspw. RL, erlauben, ohne aufwändige Extraktion und in einer hohen Genauigkeit direkt in Kulturüberständen den Titer zu bestimmen (Behrens et al., 2016a). Schließlich ist die Kombination all dieser verschiedenen Methoden zur vollständigen Aufschlüsselung der Struktur von neuartigen Biotensiden wichtig (Satpute et al., 2010).

Sobald die Molekülstruktur aufgeklärt ist, erfolgt die Bestimmung der kodierenden Gene durch die Sequenzierung des Genoms und der Suche nach bekannten Genclustern, die die Produktion der

identifizierten Tensidart vermitteln könnten (Jackson et al., 2015; Chavali und Rhee, 2018). Der Vergleich mit Datenbanken bekannter biosynthetischer Cluster sowie erzeugte Deletionsmutanten geben Aufschluss über die kodierenden Gene, die für die Erzeugung rekombinanter Produktionsstämme eingesetzt werden könnten; eine Strategie, die vor allem bei pathogenen Organismen, schlecht regulierbaren Biosynthesewegen zur Produktion von Biotensiden und Metgenomdatenbanken zum Einsatz kommt (Weber und Kim, 2016).

Diese Methoden haben dazu beigetragen, eine hohe Varietät von mikrobieller Biotenside in Struktur und Eigenschaften mit einem großen Potenzial für industrielle und umwelttechnische Anwendungen im Zusammenhang mit Emulgierung, Schaumbildung, Dispersion und Solubilisierung von hydrophoben Verbindungen zu entdecken. So konnten in den letzten Jahren erste Produkte, die mikrobiell hergestellte Biotenside enthalten, kommerziell zugänglich gemacht werden.

### I.1.2 Aktuelle Anwendungsgebiete von Biotensiden

Chemisch synthetisierte Tenside, die entweder aus petrochemischen oder oleochemischen Quellen stammen, sind wichtige Bestandteile vieler Alltagsprodukte und integraler Bestandteil zahlreicher industrieller und landwirtschaftlicher Produkte sowie ernährungsbezogener Prozesse (Desai und Banat, 1997). Die industrielle Nachfrage nach Tensiden ist hoch, aber im Hinblick auf ihre ökologische Nachhaltigkeit versuchen viele Unternehmen einige oder alle ihrer petro- oder oleochemischen Tensidkomponenten mit ähnlichen Verbindungen natürlichen Ursprungs, wie z. B. mikrobiell produzierten Biotensiden, zu ersetzen (Marchant und Banat, 2012a). Die Entdeckung einer großen Vielfalt von Biotensiden hat dazu geführt, dass viele Unternehmen einen Blick auf Biotenside als Alternative geworfen haben (Sekhon Randhawa und Rahman, 2014; Soares da Silva et al., 2019). Somit haben diese bereits heute eine wirtschaftliche Bedeutung und sind durch verschiedenste Unternehmen bereits in kommerziellen Produkten oder als Reinsubstanzen erhältlich (Jiménez Islas et al., 2010; Sekhon Randhawa und Rahman, 2014; Bettenhausen, 2020; vgl. **Tab. I-1**).

**Tab. I-1: Übersicht über die aktuelle wirtschaftliche Bedeutung und kommerzialisierte Produkte verschiedener mikrobieller Biotenside (modifiziert nach Sekhon Randhawa und Rahman, 2014).**

Produkte und Unternehmen, die RL beinhalten bzw. sich mit der Produktion von RL beschäftigen sind hierbei unterstrichen.

	<b>Biotenside</b>	<b>(diskutierte) wirtschaftliche Bedeutung</b>	<b>Produkte</b>	<b>Unternehmen</b>
<b>GLYCOLIPIDE</b>	<u>Rhamnolipide</u> Trehalolipide Ornithinlipide Sophorolipide Polyollipide Cellobioselipide Mannosylerythritollipide	(M-)EOR (Bioemulgatoren) Landwirtschaft (Biofungizide) Pharmazeutika (Bioaktive Eigenschaften; Antimikrobiell; Antikrebsmittel; Antiproliferativ; Antimykotisch; Spermizid; Formulierungen) Kosmetika (Duschgels; Shampoos; Badezusätze; Seifen) Reinigungsprodukte (Geschirrspülmittel; Waschmittel; Glasreinigungsprodukte) Lebensmittelprodukte	<u>RHEANCE® One</u> <u>MayLü Hand-Spülmittel</u> <u>Biotensidon-Industriereiniger</u> <u>Zonix Biofungizid</u> <u>REWOFERM® SL ONE</u> Ecover Hand-Spülmittel Happy Elephant div.	<u>AGAE Technologies LLC</u> <u>Jeneil Biotech Inc.</u> <u>Rhamnolipid Inc.</u> <u>BioFuture GmbH</u> <u>Suedzucker AG</u> <u>Procter &amp; Gamble GmbH</u> <u>Logos Technologies LLC</u> <u>TensioGreen Corp.</u> <u>EcoChem Organics Company</u> <u>Evonik Industries AG</u> <u>TeeGeneBiotech Ltd.</u> <u>Paradigm Biomedical Inc.</u> <u>Henkel AG &amp; Co. KGaA</u> <u>Ecover GmbH</u> <u>Biotensidon GmbH</u> Unilever N.V. MG Intobio Co., Ltd.
<b>LIPOPEPTIDE</b>	Phospholipide AS-basierte Tenside Surfactin Iturin Fengycin Viscosin Lichenysin Serrawettin Syringomycin Daptomycin	(M-)EOR (Bioemulgatoren) Landwirtschaft (Biofungizide) Pharmazeutika (Antimikrobiell; Antikrebsmittel) Kosmetika	Pharmazeutika (bspw. CUBICIN®)	TeeGeneBiotech Ltd. Showa Denko GmbH Xellia Pharmaceuticals Ltd. Pfizer Inc. (weitere Pharmaunternehmen)
<b>BIOEMULGATOREN</b>	Emulsan Alasan Liposan Lipomanan	(M-)EOR (Bioemulgatoren) Landwirtschaft (Schwermetall- Detoxifizierung)	-	-

Besonders häufig werden Biotenside für Anwendungen in der **erdölverwandten Industrie und des Bioremediationssektors** diskutiert (Shete et al., 2006; Reis et al., 2013). Im Fokus stehen sowohl der Einsatz von Biotensiden, aber auch Biotensid produzierender Mikroorganismen (De Almeida et al., 2016; Geetha et al., 2018). Hierbei gibt es drei Strategien: die Impfung mit Biotensid-produzierenden Bakterien, die Anregung des Wachstums von indigenen Mikroorganismen zur Biotensidsynthese durch geeignete Substrate, oder die Verwendung von gereinigten Biotensiden zur Emulgation des im Boden befindlichen Öls (Al-Sulaimani et al., 2011). Vor allem HMW (Bioemulgatoren), wie z. B. Emulsane, haben ein großes Potenzial, Emulsionen zwischen flüssigen Kohlenwasserstoffen und Wasser zu stabilisieren und so die für den bakteriellen biologischen Abbau verfügbare Oberfläche für die Bioremediation zu vergrößern (Barkay et al., 1999; Franzetti et al., 2009). Für eine 30 g/L Emulsanlösung konnte beispielweise ein E24-Wert von 98% bei einem Wasser zu Rohöl Verhältnis von 1:2 ermittelt werden (Amani und Kariminezhad, 2016). Aber auch Glycolipide, wie bspw. Sophorolipide, wurden für eine verbesserte biologische Abbaubarkeit von z. B. Dieselmotorenstoff in Betracht gezogen (Sadouk et al., 2008; Chandran und Das, 2012).

Biotenside können aber auch zur Solubilisierung und Emulgierung von weiteren Schadstoffen eingesetzt werden, z. B. durch ihre Fähigkeit Schwermetalle zu komplexieren, zu mobilisieren und somit zu entfernen (Marchant und Banat, 2012a). Dies stellt neben dem Einsatz im Bereich des Pflanzenschutzes durch Ihre antimykotischen Eigenschaften einen wichtigen Zweig im

**landwirtschaftlichen Nutzen** dar (Sachdev und Cameotra, 2013). Hierbei haben vor allem Glycolipide, wie Cellobioselipide, RL und zyklische Lipopeptide, wie z. B. Surfactin, Iturin und Fengycin, ein hohes Potenzial; bspw. bei der Abwehr von phytopathogenen Pilzen (Banat et al., 2010).

Diese biologischen Wirkungen von Biotensiden haben dazu geführt, dass Sie auch für den Einsatz in einer breiten Palette potenzieller **pharmazeutischer und biomedizinischer Anwendungen**, insbesondere durch ihre Fähigkeit bakterielle Zellmembranen zu destabilisieren, indem ihre Integrität und Permeabilität gestört wird, diskutiert werden (Sánchez et al., 2010; Jahan et al., 2020). Zudem gibt es mehrere beschriebene interessante Eigenschaften wie die antimikrobielle, antivirale, antitumorale, hypocholesterinämische, antiadhäsive und apoptotische Wirkung, die Biotenside besonders interessant für medizinische Anwendungen und Formulierungen von Arzneistoffen machen (Gudiña et al., 2013; Smith et al., 2020). Lipopeptide bilden die am weitesten verbreitete Klasse von bakteriellen Biotensiden mit antimikrobieller Aktivität, aufgrund ihrer Fähigkeit besonders effektiv Lipidmembranen durch Porenbildung zu zerstören (Hutchinson et al., 2017). Darüber hinaus besitzen Glycolipide, wie Sophorolipide und Derivate, antimikrobielle, entzündungshemmende und immunmodulatorische Aktivitäten gegen septischen Schock und chronisch entzündliche Zustände (Rodrigues et al., 2006; Haque et al., 2016).

Ein weiterer Bereich, in dem der Einsatz von Biotensiden diskutiert wird, ist die **Kosmetikindustrie**. Chemisch synthetisierte Tenside werden in der Kosmetikindustrie aufgrund ihrer Benetzungs-, Emulgier-, Löslichkeits-, Dispergier- und Schäumungseigenschaften häufig in Gesichtereinigungsprodukten verwendet (Fracchia et al., 2014; Vecino et al., 2017). Die Verwendung natürlicher Alternativen ist aktuell von besonderem Interesse wegen der hohen Nachfrage nach umwelt- und tierfreundlichen Naturkosmetika (Lourith und Kanlayavattanakul, 2009). Während der letzten Jahrzehnte wurden biotensidhaltige marktfähige Produkte und Patente zur Anwendung in der Gesundheits- und Kosmetikindustrie gemeldet (Banat et al., 2010; Kanlayavattanakul und Lourith, 2010; Morita et al., 2013). Hier sind besonders Glycolipide wie Sophorolipide, RL und MEL sehr attraktiv. Anwendung finden diese in Produkten wie Lippenstiften, Feuchtigkeitscremes für Haut und Haar, Lidschatten, komprimierten Puderkosmetika, Deodorants, Gesichtereinigern, Duschgelen, Zahnpasta, Make-up-Entfernern und in Produkten für die Behandlung von Akne-anfälliger Haut (Faivre und Rosilio, 2010; Vecino et al., 2017; Resende et al., 2019). Vor allem MEL haben in letzter Zeit aufgrund ihrer günstigen Produktionsbedingungen, ihrer strukturellen Vielfalt und ihren vielseitigen biochemischen Eigenschaften Aufmerksamkeit gewonnen, insbesondere in ihrer potenziellen Verwendung in Kosmetika von Produkten zur Befeuchtung von trockener Haut, Reparatur von geschädigtem Haar und als Antioxidans (Morita et al., 2013, 2015; Coelho et al., 2020).

Schließlich stellt die **Wasch- und Reinigungsindustrie** einen wichtigen Sektor für den Einsatz von Biotensiden dar (Marchant und Banat, 2012b; Perfumo et al., 2013, 2018). Die wichtigsten Anwendungen von Biotensiden bestehen dabei in der Reinigung von Stoffen, Geschirr, Kochutensilien sowie harten Oberflächen wie Glas, verglasten Oberflächen, Kunststoffen und Metallen

(Hall et al., 1996). Hierbei liegt die Herausforderung für die Hersteller in der Fähigkeit, den Gehalt von Biotensiden in Formulierungen ohne Kompromisse gegenüber erhöhten Kosten oder Leistung zu bewältigen. Weiterhin spielen auch die Vielseitigkeit und die zusätzlichen antimikrobiellen Effekte der Biotenside sowie die Verringerung des Lösungsmittelverbrauchs bei der Herstellung eine wichtige Rolle. So diskutierte bereits ein führender Hersteller wie Henkel AG & Co. KGaA, Glycolipide in Glasreinigungsprodukte wie Sidolin, Instanet, Sonasol, Tenn und Bref einzusetzen (Fracchia et al., 2014).

Über alle Wirtschaftszweige gesehen ist es auffallend, dass RL in jedem dieser Sektoren diskutiert und in einigen Fällen bereits kommerziell verwendet werden bzw. patentiert sind (Sekhon Randhawa und Rahman, 2014; Tiso et al., 2017a; Kumar und Das, 2018; Bettenhausen, 2020). Durch Ihre hervorragenden Emulgierungseigenschaften wird ihr Einsatz im Bereich der Bioremediation und EOR erwogen z. B. zur Entfernung von Rohöl aus kontaminierten Böden (Rahman et al., 2003; Câmara et al., 2019). Hierbei wird aufgereinigtes RL in den Boden injiziert und das emulgierte Öl anschließend durch Zugabe von Wasser gewonnen (Van Hamme und Urban, 2009). In der Landwirtschaft werden RL zur Verbesserung der Bodenqualität, zum Pflanzenschutz und zur Unterstützung der Absorption von Düngemitteln und Nährstoffen diskutiert (Sachdev und Cameotra, 2013; Chen et al., 2017). Im Bereich von Pharmazeutika und Therapeutika zeigen RL potenzielle antimikrobielle Eigenschaften gegen Mikroben (Magalhães und Nitschke, 2013), und in der Kosmetikindustrie werden Sie zur Behandlung von Falten diskutiert (Piljac und Piljac, 2007). Schließlich haben RL das Potenzial als natürliche Emulgatoren in verschiedensten Reinigungsprodukten zu fungieren (Perfumo et al., 2013). So begann der Hersteller Evonik Industries AG zuletzt, RL in Form seines Produktes RHEANCE One® für den Einsatz verschiedenster Formulierungen für Produkte im Bereich der Körperpflege wie z. B. Shampoos, Zahnpasta, Sonnenschutzmitteln, zu empfehlen (Evonik Nutrition & Care GmbH, 2018; Bettenhausen, 2020). Umso erstaunlicher ist es, dass die Herstellung von RL in einem marktfähigen Maßstab von vielen Unternehmen bislang nicht final ermöglicht wurde. Dies liegt u. a. an ihrem mikrobiellen Ursprung in opportunistisch pathogenen Krankheitserregern, wie z. B. *P. aeruginosa* (Toribio et al., 2010), mit dem die höchsten RL-Konzentrationen erzielt werden können (Müller et al., 2010), oder in schlecht kultivierbaren Mikroorganismen, wodurch sich die Produktionsbedingungen erheblich erschweren. Auch wenn es Berichte über nicht pathogene *P. aeruginosa* Stämme gibt (Grosso-Becerra et al., 2016), sowie Alternativen wie *Burkholderia glumae* (Costa et al., 2011), ist ein weiterer erheblicher Faktor, dass die Produktion von RL als Sekundärmetaboliten in natürlichen Produzenten einer komplexen genetischen Regulation unterliegt, was die Etablierung großskaliger Prozesse erschwert (Marchant und Banat, 2012b; Perfumo et al., 2013).



Neben vielen äußeren Einflüssen wird das *rhlAB*-Operon transkriptionell und post-transkriptionell durch mehrere Faktoren reguliert (Soberón-Chávez et al., 2005; Reis et al., 2011; Jin et al., 2020). Hierbei spielt das hochkomplexe *Quorum sensing*- (QS) System, welches für *P. aeruginosa* gut beschrieben ist, eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Regulation (Reis et al., 2011; Papenfort und Bassler, 2016; Chen et al., 2019; **Abb. I-3 (B)**). QS ist ein umfassendes Regulationssystem, das in den meisten Bakterienarten zu finden ist und mehrere biologische Funktionen wie Virulenz, Biofilmbildung, Biolumineszenz und bakterielle Konjugation kontrolliert (Venturi, 2006). In natürlichen Produzenten werden RL aufgrund der zell-dichte-abhängigen QS-Regulation erst beim Übergang vom logarithmischen in das stationäre Wachstum gebildet (Medina et al., 2003b). In anderen RL-Produzenten ist die Regulation der RL-Gene u. a. im Zusammenhang mit der Fortbewegung der Zelle durch QS-Systeme bekannt (Nickzad et al., 2015; Victor et al., 2019; Martinez et al., 2020). Die Regulationsmechanismen funktionieren meist nach demselben Grundprinzip. Hierbei synthetisiert eine Synthese ein Signalmolekül, welches frei über Zellmembranen diffundieren kann und an ein Reporterprotein, das dann als Transkriptionsfaktor wirkt, bindet (Seed et al., 1995; Pearson et al., 1999). Dies bewirkt eine positive Rückkopplung, wodurch immer mehr Signalmoleküle synthetisiert werden. Es sind drei QS-Systeme in *P. aeruginosa* bekannt, die direkt die Transkription des Operons *rhlABRI* beeinflussen: das Rhl-, das Las- und das Pqs-QS-System (Dusane et al., 2010).

Die Gene *rhlR* und *rhlI* bilden das **Rhl-QS-System** aus (**Abb. I-3 (B)**; rechts), welche mit den Genen *rhlAB* in einem Gencluster (*rhlABRI*) organisiert sind (Ochsner und Reiser, 1995). Die Synthetase RhlI produziert das Signalmolekül N-Butanoyl-L-homoserinlacton (C<sub>4</sub>-HSL; Pearson et al., 1997). Dieses bindet an das Regulatorprotein RhlR (Ochsner und Reiser, 1995; Reis et al., 2011). Hierbei wurde gezeigt, dass die Expression von *rhlAB* maßgeblich das aktivierte RhlR induziert und ein inaktives RhlR die Expression des Operons reprimiert (Reis et al., 2011).

Beim **Las-QS-System** (**Abb. I-3 (B)**; links oben) reichert sich mit zunehmender Zelldichte das Signalmolekül N-(3-oxo-Dodecanoyl)-L-homoserinlacton (3OC<sub>12</sub>-HSL) an und bindet an das Regulatorprotein LasR (Seed et al., 1995; Dusane et al., 2010). Zudem wird die Expression von *rhlR* und *rhlI* induziert (Latifi et al., 1996; Pearson et al., 1997). In *lasR*-Mutanten wurde gezeigt, dass die RL-Bildung nur geringfügig beeinträchtigt und lediglich eine geringe Expression durch LasR/3OC<sub>12</sub>-HSL Induktion erreicht wird (Pearson et al., 1997; Medina et al., 2003a). *lasR/rhlR*-Doppelmutanten zeigten eine vollständige Aufhebung der Produktion von RL (Medina et al., 2003a). Ein drittes ausgeprägtes QS-System ist das **Pqs-QS-System** (**Abb. I-3 (B)**; mitte links), welches durch den Transkriptionsfaktor PqsR und das *Pseudomonas* Chinolon Signal (PQS; hier 2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon) bestimmt ist (Cao et al., 2001; Groleau et al., 2020), die bekanntermaßen die bakterielle Produktion von QS-abhängigen Faktoren wie Elastase, Pyocyanin und RL beeinflussen (Dekimpe und Déziel, 2009). PQS, dessen Synthese durch den Transkriptionsfaktor PqsR reguliert wird, kann das RhlR-QS-System unabhängig von LasR und 3OC<sub>12</sub>-HSL aktivieren (Diggle et al., 2003; Déziel et al., 2005; Papenfort und Bassler, 2016). PqsR wird wiederum durch das LasR zu RhlR Verhältnis moduliert und fungiert somit als Vermittler zwischen beiden Systemen (Déziel et al., 2005; Wade et al., 2005).

Neben diesen drei bekanntesten QS-Systemen gibt es auch noch weitere nicht komplett aufgeschlüsselte Systeme, bspw. das **Amb-** (**Abb. I-3 (B)**; links unten) und **Rpf-QS-System**, die 2-(2-Hydroxyphenyl)-thiazol-4-carbaldehyd (IQS) und *cis, cis*-11-Methyldodecan-2,5-dienonsäure (DSF: *engl. diffusible signal factor*) als Signalmoleküle besitzen (Ryan et al., 2015; Papenfort und Bassler, 2016). Für das Amb-QS-System ist jedoch bekannt, dass es durch einen niedrigen Phosphatspiegel aktiviert wird und das Las-QS-System stimuliert.

Zudem haben neben dieser transkriptionellen Ebene vor allem Las/Rhl-QS-System vermittelte posttranskriptionelle Regulationsmechanismen sowie der Abfluss von RL-Vorstufen in verschiedene konkurrierende Biosynthesewege bspw. zur Alginate-, LPS- und PHA-Synthese eine Relevanz bei der Produktion von RL (Reis et al., 2011). Diese Biosynthesewege dienen *P. aeruginosa* zur Biofilmbildung, der Modulation der Oberflächenhydrophobizität sowie als Energie- und Kohlenstoffspeicher im Cytoplasma (Reis et al., 2011; Wittgens, 2013). Kleine Veränderungen innerhalb dieser Biosynthesewege können somit zu einer Veränderung der RL-Biosynthese führen (Al-Tahhan et al., 2000; Gutiérrez-Gómez et al., 2019; Price et al., 2019).

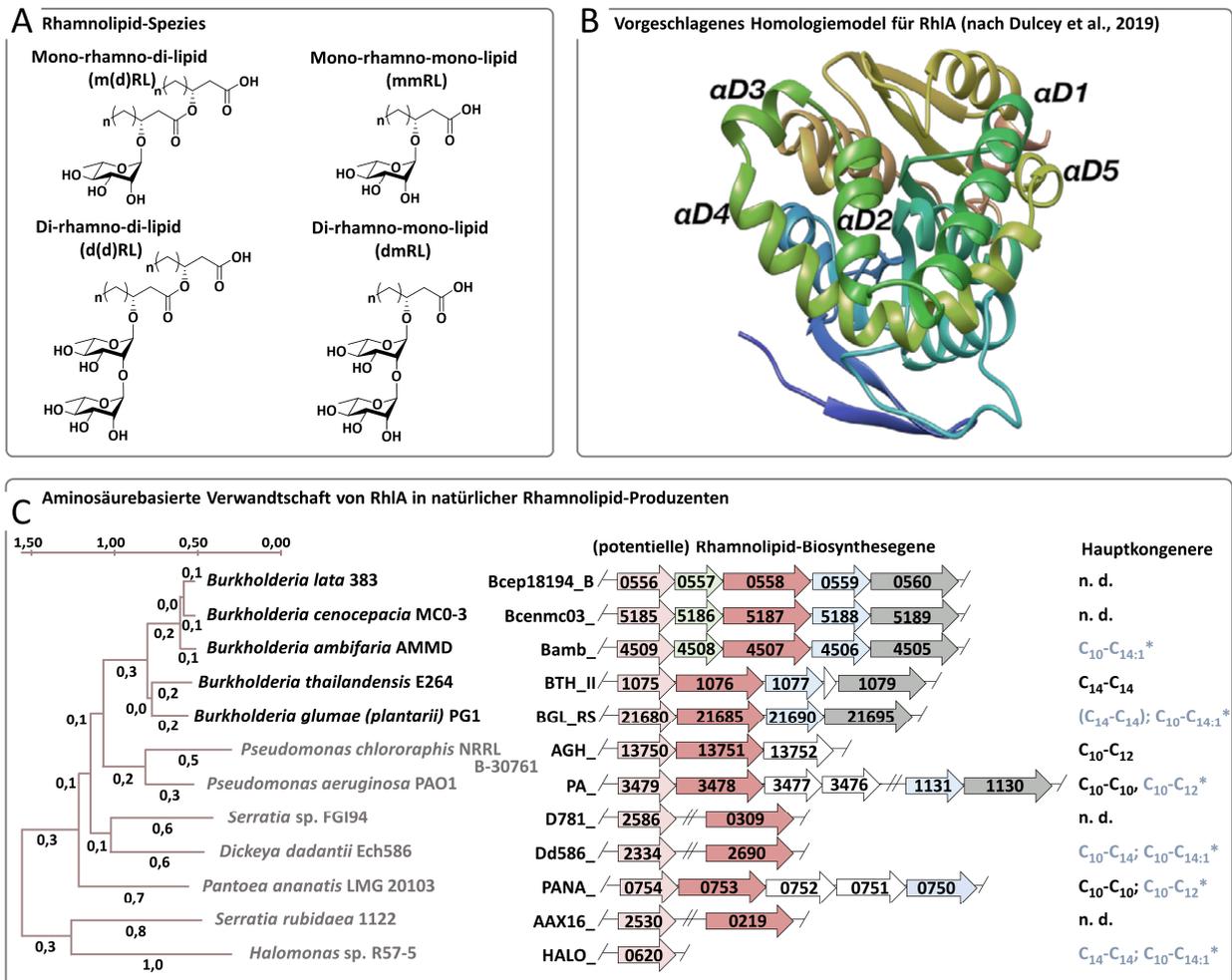
Zusammengefasst zeigt diese hochkomplexe Regulation, dass eine Produktion in natürlichen Produzenten nur unter definierten Bedingungen stattfinden kann, die bei der Etablierung großskaliger Prozesse ein großes Hindernis darstellen können (Nickzad und Déziel, 2016). Weitere Faktoren, die die Skalierung der RL-Produktion in natürlichen Produzenten erschweren, sind der generelle Aufbau und die Zusammensetzung von RL, die sich zwischen verschiedenen natürlichen Produzenten unterscheiden, wodurch ein neuer alternativer RL-Produzent häufig nicht unbedingt eine Alternative, sondern eher eine Quelle für neue RL darstellt.

### I.2.1 Varietät von Rhamnolipiden

Die Kurzform »Rhamnolipide« wird meistens zur Bezeichnung des Gemisches aus HAA, mRL und dRL benutzt, welche in biologischen Systemen in reiner Form nicht produziert werden. Die einzelnen Komponenten aber auch komplexe Gemische, können dabei besondere physiologische Rollen besitzen (Murray und Kazmierczak, 2008; Chrzanowski et al., 2012; Caiazza et al., 2016). Eine Aufgabe von gemischten mRL-/dRL-Mizellen, die zusätzlich aus verschiedenen Kongeneren bestehen, ist bspw. die Emulsion von hydrophoben Substanzen, um diese für die Zelle verfügbar zu machen (Noordman und Janssen, 2002). Eine andere ist die Abwehr verschiedener Mikroorganismen, hauptsächlich Gram-positiver, aber auch Gram-negativer Bakterien sowie Pilze, durch ihre antimikrobielle Wirkung (Cosson et al., 2002; Vatsa et al., 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass HAA und RL einen gegensätzlichen Effekt auf die bakterielle Fortbewegung, das *swarming*, haben. Hierbei stimulieren dRL das *swarming* und die oberflächenassoziierte Migration von Bakterien im Biofilm und damit die anfängliche Mikrokoloniebildung und Differenzierung der Biofilmstruktur, wohingegen HAA diese inhibieren (Pamp und Tolker-Nielsen, 2007; Tremblay et al., 2007; Robitaille et al., 2020).

Trotz der komplexen Zusammensetzung lassen sich die einzelnen Bestandteile von RL durch neueste Erkenntnisse und Methoden sehr gut differenzieren (Behrens et al., 2016a, b, c). So konnten

in der Vergangenheit in unterschiedlichen Produzenten sowohl mRL als auch dRL mit ein oder zwei Hydroxyfettsäuren (nachfolgend: verschiedene Spezies; Wittgens et al., 2017), aber auch Varietäten innerhalb der Lipidkomponente (nachfolgend: verschiedene Kongenere; Germer et al., 2020) gefunden, die u. a. aufgrund einer unterschiedlichen Akzeptanz des Proteins RhIA gegenüber der verwendeten Fettsäuren, gebildet werden (Dulcey et al., 2019; **Abb. I-4**).



**Abb. I-4: Strukturelle Vielfalt von Rhamnolipiden in unterschiedlichen Produzenten (modifiziert nach Dulcey et al., 2019; Germer et al., 2020)**

**A:** RL werden unterteilt in mRL und dRL auf der Grundlage der Anzahl ihrer L-Rhamnose-Einheiten. Neben den typischen RL-Spezies, die zwei (R)-3-Hydroxyfettsäuren (Mono-rhamno-di-lipid und Di-rhamno-di-lipid) besitzen, existieren auch Spezies mit nur einer (R)-3-Hydroxyfettsäure (Mono-rhamno-mono-lipid und Di-rhamno-mono-lipid). Moleküle mit unterschiedlichen Lipid-Kongenere werden in ihrer allgemeinen Molekülstruktur gezeigt, wobei (n) die variable Anzahl an Kohlenstoffatomen verdeutlicht.

**B:** Die modellierte RhIA-Struktur nach Dulcey et al., 2019 unterlässt den postulierten Reaktionsmechanismus und bestätigt, dass die Topologie einer konservierten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase ähnelt, mit dem Hauptunterschied, dass diese einen Satz von fünf  $\alpha$ -Helizes ( $\alpha$ D1- $\alpha$ D5), die eine putative Cap-Domäne bilden, besitzt. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC-BY-NC-ND 4.0) geschützt.

**C:** Phylogenetischer Baum basierend auf den Aminosäuresequenzen repräsentativer und putativer RhIA-Enzyme in Anlehnung an Germer et al., 2020. Die gezeigten Sequenzen wurden mit Hilfe Ihrer Protein-Akzessionsnummer auf NCBI gefunden; das Alignment erfolgte mit Hilfe von MUSCLE (Edgar, 2004). Der Baum wurde konstruiert mit Hilfe der *neighbour-joining* Methode (Saitou und Nei, 1987) in MEGA-X (Kumar et al., 2018) mit Standardeinstellungen. Die evolutionären Abstände wurden mit der Poisson-Korrekturmethode (Zuckerandl und Pauling, 1965) berechnet und geben die Anzahl der Aminosäure-Substitutionen pro Stelle an. Ursprungsorganismen, die zum Genus der *Betaproteobacteria* (schwarz) und *Gammaproteobacteria* (grau) gehören sind farblich gekennzeichnet. Die mit der RL-Bildung assoziierten Operons sind neben den Organismennamen dargestellt und Gene sind mit ihrem Genlocus oder ihrer Protein-Akzessionsnummer gekennzeichnet. Doppelte Schrägstriche stellen unabhängige genomische Loci dar. Das Gen *rhIB* (rot) befindet sich stromabwärts von *rhIA* (rosa). Die Gene *rhIA* und *rhIB* sind zum Teil mit den Regulator- und Induktionsgenen (*rhIRI*, weiß), insofern bekannt, kolokalisiert. Das Gen *rhIC* (grau), dass für die Rhamnosyltransferase II kodiert, befindet sich meistens in einem Cluster mit einem putativen Gen für ein Membranprotein (hellblau), das an der Resistenz oder dem Transport von RL beteiligt sein könnte. Gene, die für eine potenzielle Methyltransferase kodieren, sind in grün dargestellt. Neben den dazugehörigen Operons wurden die identifizierten Hauptkongenere dargestellt. Kongenere, die mit einem (\*) gekennzeichnet sind, wurden durch heterologe Produktion in *E. coli* C43 (DE3) in Germer et al., 2020 bestimmt. Die dargestellten BSG aus *Pseudomonas ananatis* LMG20103 sind als lediglich als Glycolipidoperon zu verstehen, da Studien in verwandten Organismen zeigen, dass es sich bei dem Produkt nicht um RL, sondern um Ananatosid A handeln könnte (Gauthier et al., 2019).

So können RL nicht nur in mRL und dRL anhand der Anzahl ihrer L-Rhamnoseeinheiten unterschieden werden, sondern auch anhand der Anzahl ihrer (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren (**Abb. I-4 (A)**; Syldatk et al., 1985). Typisch sind RL die zwei (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren (Mono-rhamno-di-lipid (mRL) und Di-rhamno-di-lipid (dRL)) besitzen (Déziel et al., 2000; Abdel-Mawgoud et al., 2010), jedoch gibt es eine Reihe von Studien, die auch die Existenz von Spezies mit einer (*R*)-3-Hydroxyfettsäure (Mono-rhamno-mono-lipid (mmRL) und Di-rhamno-mono-lipid (dmRL)) beschreiben (Soberón-Chávez et al., 2005; Wittgens et al., 2017), wobei deren Biosynthese bislang nicht vollständig aufgeschlüsselt ist. Die lange vermutete anabolische Synthese durch einen RhIB-katalysierten Transfer einer einzelnen ACP-aktivierten (*R*)-3-Hydroxyfettsäure auf ein dTDP-L-Rhamnose-Molekül konnte nicht bestätigt werden (Wittgens et al., 2017), was eher für eine katabolische Genese dieser Spezies spricht. Das heißt, dass eine (*R*)-3-Hydroxyfettsäure des veresterten Fettsäure-Dimers der mRL bzw. dRL durch ein noch unbekanntes hydrolytisches Enzym nachträglich abgespalten wird (Soberón-Chávez et al., 2005). *P. aeruginosa*, für das diese RL-Spezies erstmals beschrieben wurden (Syldatk et al., 1985; Déziel et al., 2000), produziert mehrere lipolytische Enzyme, die in Frage kommen würden (Jaeger und Rosenau, 2004; Kovačić et al., 2016; Wittgens et al., 2017). Die vier RL-Spezies zeigen unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften und haben folglich ein unterschiedliches Anwendungspotenzial (Wittgens et al., 2017).

Zusätzlich ist das erste Enzym der Biosynthese, RhIA, nicht spezifiziert auf eine bestimmte Fettsäure, sondern akzeptiert eine gewisse Bandbreite von (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen, wodurch in natürlichen RL-Produzenten unterschiedliche Kongenere vorzufinden sind. Auch RhIB scheint folglich keine spezifische Konditionierung auf ein bestimmtes HAA zu besitzen (Déziel et al., 2000; Wittgens et al., 2017). So wurden 25 RL-Kongenere in *P. aeruginosa* beschrieben, die sich in Kettenlänge und/oder Sättigungsgrad der (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren unterscheiden (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Außerdem zeigen bspw. Stämme von *P. aeruginosa* und *B. glumae* in ihren RL-Kongeneren unterschiedliche Bereiche von Kettenlängen (Déziel et al., 2000; Costa et al., 2011). Die am häufigsten von *B. glumae* produzierten RL sind dRL mit C<sub>14</sub>-Fettsäureketten (Costa et al., 2011), wodurch sie deutlich länger als die von *P. aeruginosa* produzierten RL sind (vorwiegend C<sub>10</sub>-Fettsäureketten; Costa et al., 2010). Dies ist im Wesentlichen auf eine unterschiedliche Substratspezifität von RhIA zurückzuführen (Dulcey et al., 2019). Jedoch scheint diese Selektivität nicht allein vom Enzym RhIA abzuhängen, sondern auch von der Verfügbarkeit der (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren in einem Stammhintergrund oder auch der Zusammensetzung des Mediums (Bukavaz, 2015; Dulcey et al., 2019). Beispielsweise scheint das Enzym RhIA aus *P. aeruginosa* eine hohe Selektivität gegenüber C<sub>8</sub>- bis C<sub>12</sub>-Hydroxyfettsäuren zu besitzen (Dulcey et al., 2019). Im Gegensatz dazu zeigte das RhIA aus *B. glumae* eine breitere Selektivität bei heterologer Produktion in *P. aeruginosa*, wo es ebenfalls zur Produktion von RL mit C<sub>8</sub>- bis C<sub>12</sub>-Kohlenstoffketten kommt (Dulcey et al., 2019). Studien, auf Basis von RhIA-Homologiemodellen (Kiss et al., 2017; Dulcey et al., 2019) unterstützen (vgl. **Abb. I-4 (B)**) den postulierten Reaktionsmechanismus von RhIA und bestätigen, dass die Topologie einer

konservierten  $\alpha/\beta$ -Hydrolase ähneln könnte, mit dem Hauptunterschied, dass die des modellierten RhlA-Enzyms einen Satz von fünf  $\alpha$ -Helizes ( $\alpha$ D1- $\alpha$ D5), die eine putative Cap-Domäne ausbilden, besitzt.  $\alpha$ D1- $\alpha$ D3 und die erste Hälfte von  $\alpha$ D4 spielen vermutlich eine Rolle in der Selektivität von (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren, welches in Kreuzkomplementierungstests mit chimären RhlA Enzymen aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* gezeigt wurde (Dulcey et al., 2019).

Aufgrund der hohen Varietät der RL-Kongenere und der damit einhergehenden physikalisch-chemischen Eigenschaften, wurden weitere RL-Produzenten mit neuen *rhl*-Genen identifiziert (Germer et al., 2020; **Abb. I-4 (C)**). Obwohl es in der Literatur auch Berichte von RL-Produzenten in den Klassen der *Firmicutes*, *Acinetobacter*, *Deinococcus* und *Ascomyceten* gibt (Christova et al., 2004; Lee et al., 2005; Pantazaki et al., 2010; Seghal Kiran et al., 2010; Řezanka et al., 2011; Wang et al., 2014b; Aleksic et al., 2017), wurde die Mehrzahl der Genloci in Produzenten innerhalb der Klassen der *Betaproteobacteria* und *Gammaproteobacteria* beschrieben und die Produktion von RL nachgewiesen (Irorere et al., 2017; Germer et al., 2020).

Auffällig ist, dass die *rhl*-Gene bei den *Betaproteobacteria*, zu denen vor allem die Produzenten der Gattung *Burkholderia* angehören, sich in einem Operon befinden. Zudem liegt der *rhl*-Locus meistens in zwei identischen Kopien im Genom vor, wohingegen die Gene bei den *Gammaproteobacteria* oftmals nur einmal und die einzelnen Gene getrennt voneinander an zwei verschiedenen genomischen Standorten lokalisiert sind. Zudem ist bekannt, dass *Burkholderia* Spezies vor allem dRL produzieren, wohingegen innerhalb der *Gammaproteobacteria* vor allem mRL oder Gemische aus mRL und dRL produziert werden (Toribio et al., 2010; Costa et al., 2011). Sowohl bei den *Gammaproteobacteria* als auch den *Betaproteobacteria* variiert die Kettenlänge der RL innerhalb eines Stammes wie beschrieben, jedoch lässt sich bzgl. des Hauptkongeners ein Trend erkennen. Vertreter der *Betaproteobacteria* scheinen vorwiegend HAA mit Kettenlängen von 14 Kohlenstoffatomen zu produzieren, wohingegen *Gammaproteobacteria* eher RL mit C<sub>10</sub>-Kettenlängen bevorzugen (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Ausnahmen scheinen hier der Stamm *Halomonas* sp. R57-5, der bevorzugt HAA mit der Kongener-Komposition C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> und C<sub>10</sub>-C<sub>14:1</sub> bildet, ähnlich zu denen der Gattung *Burkholderia* (**Abb. I-4 (C)**), oder der Stamm *Pseudomonas gessardii* aus der Antarktis, der bevorzugt Kongenere der Kettenlängen C<sub>12:1</sub>-C<sub>12:1</sub> verwendet, zu sein (Buonocore et al., 2020; Germer et al., 2020).

Auffällig ist zudem die Kolo-kalisation von *rhlC* mit Genen kodierend für putative Membranproteine für die vermutet wurde, dass sie am Transport von RL beteiligt sind (Rahim et al., 2001). Für das Gen PA\_1131 aus *P. aeruginosa* wurde jedoch gezeigt, dass bei heterologer Expression in *P. putida* KT2440 kein Einfluss auf die RL-Sekretion oder -aufnahme zu sehen ist (Wittgens et al., 2017). Zudem scheinen vor allem Bakterien aus dem *Burkholderia cepacia*-Komplex ein Gen in der Mitte des *rhl*-Operons zu besitzen, das potenziell für Methyltransferasen kodieren könnte. Dies würde einen biosynthetischen Hintergrund für einzelne Berichte zu O-methylierten, nichtionischen RL erschließen (Hirayama und Kato, 1982; Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Viele der vorgestellten Organismen sind kaum erforscht und komplexe Regulationsmechanismen haben gezeigt, dass eine homologe Produktion sehr viele Herausforderungen mit sich bringen kann.

Neben der komplexen und Zelldichte-abhängigen QS-Regulation (1.2; Papenfort und Bassler, 2016), erschweren Pathogenität (z. B. im Fall *P. aeruginosa* oder *Burkholderia cenocepacia*) oder aufwendige Aufarbeitung der Endprodukte, durch Einsatz hydrophober Kohlenstoffquellen zur Initiierung der RL-Produktion, die homologe Produktion (Neto et al., 2009; Tan und Li, 2018). Die biologische Sicherheit des Produktes, insbesondere bei Anwendungen mit menschlichem Kontakt bei biomedizinischen, kosmetischen und pharmazeutischen Inhaltsstoffen, scheint zudem ein Kernpunkt in der Kommerzialisierung zu sein (Uzoigwe et al., 2015). Infolgedessen hat die gegenwärtige Forschung ihre Schwerpunkte weitgehend auf die Ermittlung möglicher Wege zur Reduzierung der Kosten für die RL-Produktion einschließlich der Verwendung günstiger Substrate und Identifizierung von Stämmen mit hoher Produktionskapazität gelenkt. Damit liegt die Aufmerksamkeit auf der Suche nach geeigneten Alternativen zu pathogenen und schwer-regulierbaren Mikroorganismen, die in der Lage sind, RL zu produzieren. Ein möglicher Lösungsansatz ist die heterologe Produktion in einem alternativen Expressionswirt.

### I.3 *Pseudomonas putida* KT2440 als ein vielseitiger und robuster Expressionswirt

Für die biotechnologische Herstellung von Naturprodukten bieten rekombinante Produktionsstämme Vorteile gegenüber der Produktion in natürlichen Produzenten. Die heterologe Produktion zeichnet sich hierbei besonders durch ihre einfache Handhabung bezüglich der Laborkultivierung aus, die eine wichtige Voraussetzung für eine biotechnologische Anwendung ist. Darüber hinaus kann die Unabhängigkeit von natürlichen und komplexen Regulationssystemen ein entscheidender Vorteil für rekombinante Produktionsstämme sein (Akondi und Lakshmi, 2013; Huo et al., 2019).

Das Gram-negative und nicht-pathogene Bodenbakterium *Pseudomonas putida* KT2440 konnte in vielen Studien für die Produktion von hochwertigen Naturstoffen und aromatischen Bausteinen eingesetzt werden (Nikel und de Lorenzo, 2018; Loeschcke und Thies, 2020). Das Genom von *P. putida* KT2440 ist hierbei seit über 15 Jahren vollständig sequenziert (Nelson et al., 2002) und kontinuierlich analysiert und aktualisiert worden (*Pseudomonas* Genome DB; Winsor et al., 2011; Belda et al., 2016). Zudem besitzt dieser Stamm, im Gegensatz zu vielen anderen Pseudomonaden, den Status der HV1-Zertifizierung, wodurch er in geeigneten Einrichtungen zur Produktion von industriell relevanten Inhaltsstoffen eingesetzt werden kann (Kampers et al., 2019). Weiterhin zeichnet sich *P. putida* KT2440 durch einen gut aufgeschlüsselten und sehr vielseitigen Metabolismus aus (Blank et al., 2010; Nickel et al., 2014a; Sudarsan et al., 2014). Zusätzlich weisen Pseudomonaden eine natürliche Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie z. B. verschiedenen Antibiotika, Xenobiotika und Ethanol auf (Fernández et al., 2012; Akkaya et al., 2018). Zusammengenommen machen all diese Eigenschaften *P. putida* KT2440 zu einer erfolgreichen Plattform für die Darstellung verschiedenster Naturstoffe wie Polyketide, Terpene, Alkaloide und RL sowie zu einer bakteriellen Fabrik zur potenziellen Skalierung eines Produktionsprozesses (Nikel und de Lorenzo, 2018; Ankenbauer et al., 2020; Loeschcke und Thies, 2020). Deshalb wurde ein *pool* an ausgefeilten molekularbiologischen Werkzeugen erzeugt, die zur genetischen Manipulation von *P. putida* KT2440 bereitstehen, sodass heterologe Gencluster einfach und effizient etabliert werden können (Martínez-García und de Lorenzo, 2017) und eine Programmierung von Edukt- bzw. Produktflüssen durch *metabolic engineering* mehrfach demonstriert werden konnte (Kuepper et al., 2015; Yu et al., 2016; Franden et al., 2018; Martínez-García und de Lorenzo, 2019; Bator et al., 2020).

#### I.3.1 Genetische Werkzeuge zur Integration von genetischen Elementen

Die heterologen Expression von Genclustern erfordert üblicherweise die Neuarrangierung von genetischen Elementen, die zur Adaption an einen neuen Expressionswirt benötigt wird. Hierbei spielt das Promotorsystem eine gesonderte Rolle, da dieses stark reguliert, die Stärke der Expression definiert und im Gegenteil zu in ihrem Sequenzmustern recht universellen Ribosomenbindestellen (RBS) nur eingeschränkt aus dem Ausgangsstamm übertragen werden

können (Salgado et al., 2000; Amit, 2012). Somit wird ein synthetisches Expressionssystem, also die Kombination aus einem Expressionswirt und dem dazugehörigen Promotorsystem, geschaffen, das es erlaubt, die Genexpression des gewünschten Clusters zu initiieren (Amit, 2012).

Promotorsysteme sind hierbei häufig aus natürlichen, bakteriellen Funktionseinheiten, den Operons, abgeleitet (Jacob et al., 1960; Salgado et al., 2000). Diese können entweder nativ im Expressionswirt vorhanden sein und für die Verwendung zur heterologen Expression adaptiert, oder neu für den Expressionswirt etabliert werden. Zu diesem Zweck wurde eine große Anzahl an Promotorsystemen für *P. putida* KT2440 evaluiert, die zumeist aus konstitutiv aktiven oder chemisch induzierbaren Promotorsystemen bestehen (Nikel und de Lorenzo, 2018).

Bei konstitutiv aktiven Systemen wird kein äußeres Signal zur Aktivierung benötigt, wodurch zumeist die Expression des Genclusters permanent erfolgt (Liang et al., 1999). Neben starken nativen konstitutiv aktiven Promotoren, bspw. denen der rRNA-Operons (Domröse et al., 2019), gibt es auch synthetische, die bzgl. der Expressionsstärke optimiert und kalibriert wurden (Nikel und de Lorenzo, 2018). Hierbei ist die stark konservierte Konsensussequenz der –35-Region und –10-Region von  $\sigma^{70}$ -regulierten Promotoren in Prokaryoten bereits bekannt. Die Affinität des Promotors wird durch die flankierenden Nukleotide und die *spacer*-Region bestimmt, welche gezielt mutagenisiert und charakterisiert werden können (Jensen und Hammer, 1998; Singh et al., 2011; Köbbing et al., 2020). Beispielsweise wurden synthetische Promotoren in *P. putida* KT2440 bereits erfolgreich zur heterologen Produktion von *cis*, *cis*-Muconsäure (Derivate von  $P_{gro}$ ,  $P_{tuf}$ ,  $P_{tufs}$ ; Kohlstedt et al., 2018) oder auch RL ( $P_{Syn-BG}$ ; Zobel et al., 2015; Bator et al., 2020) verwendet. Der Nachteil von konstitutiv aktiven Systemen besteht jedoch darin, dass potenziell toxische Proteine oder Metabolite das Wachstum der Bakterien inhibieren können, wodurch eine Entkopplung des Wachstums und der Produktion heterologer Proteine von Vorteil sein kann (Ehrt, 2005; Biedendieck et al., 2007; Santala et al., 2018; Vander mies und Fickers, 2019).

Induzierbare Promotorsysteme (vgl. **Tab. I-2**) basieren hingegen auf dem Prinzip, dass ein Organismus natürlicherweise auf die Exposition mit einer metabolisch agierenden Verbindung reagiert. Die Supplementierung mit Induktor führt im Ursprungsorganismus so oftmals zu dem Abbau des Metaboliten, um diesen als Kohlenstoffquelle zugänglich zu machen oder potenzielle toxische Reaktionen dieser Verbindung zu minimieren (Becker et al., 2010). Induzierbare Systeme besitzen typischerweise einen signalempfindlichen Transkriptionsfaktor, der entweder als Aktivator oder Repressor fungiert. Weiterhin umfasst das System einen entsprechenden Promotor, der bei molekularbiologischer Nutzung den offenen Leserastern (ORF) des gewünschten heterologen Genclusters, die für die Bildung des betreffenden Produkts kodieren, vorangestellt wird (Becker et al., 2010). Ein Vorteil der chemisch induzierbaren Systeme ist, dass sie gezielt durch Supplementierung eines Induktors aktiviert werden können, wodurch sich die Produktion eines gewünschten Proteins gezielt steuern lässt (Corrado und Karali, 2009). Dies kann durch die Regulation der Expressionsstärke zur Vermeidung von *inclusion bodies* (Proteinaggregaten) oder der Reduktion des Einflusses produzierter toxischer Proteine beitragen (Terpe, 2006). Ebenso lassen sich z. B. verschiedene Induktionszeitpunkte testen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit

der Modifikation bestehender Induktoren, durch Schutzgruppen wie bspw. 2-Nitrobenzol- und 7-Nitroindol-Derivate (photolabile Induktoren; Specht et al., 2009), die eine nicht-invasive Steuerung physiologischer Prozesse durch optische Methoden wie Lichtbestrahlung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen (Diensthuber et al., 2013; Binder et al., 2016).

**Tab. 1-2: Bekannte induzierbare Promotorsysteme für die heterologe Genexpression in *Pseudomonas putida* KT2440 (modifiziert nach Nickel und de Lorenzo, 2018).**

Promotorsysteme setzen sich aus dem genetischen Fragment kodierend für den Promotor ( $P_x$ ) und den dazugehörigen Regulatorproteinen zusammen. Positiv-regulierte Promotorsysteme sind mit (+), negativ-reguliert mit einem (-) gekennzeichnet. Hier sind lediglich die gebräuchlichsten Induktoren dargestellt, einige Promotorsysteme akzeptieren daneben weitere ähnliche Moleküle als Induktoren. Die angegebene Arbeitskonzentration ist eine initiale Einschätzung der angegebenen Literatur und variiert je nach verwendetem Expressionssystem.

Promotorsystem	Regulation	Ursprungsorganismus	Induktoren	Arbeitskonzentration	Referenzen
$P_{tetA}$ /TetR	-	<i>E. coli</i>	Anhydrotetracyclin	0,5 mM	Fu et al., 2008; Chai et al., 2012
$P_{lac}$ , $P_{tac}$ /LacIQ	-	<i>E. coli</i>	IPTG	0,1 mM	Graf und Altenbuchner, 2014
$P_{mtIE}$ /MtlR	+	<i>P. fluorescens</i>	D-Mannitol	1 mM	Hoffmann und Altenbuchner, 2015
$P_{BAD}$ /AraC	+	<i>E. coli</i>	L-Arabinose	0,1 mM	Calero et al., 2016
$rhaP_{BAD}$ /RhaRS	+	<i>E. coli</i>	L-Rhamnose	10 mM	Calero et al., 2016
$P_{nagAa}$ /NagR	+	<i>C. testosteroni</i>	Salicylat	1 mM	Hüsken et al., 2001
$P_M$ /XylS	+	<i>P. putida mt-2</i>	m-Toluylsäure	1 mM	Calero et al., 2016

Die zugrundeliegenden Regulons folgen hierbei entweder einem Aktivator- oder Repressor-basierten Modus (Becker et al., 2010).

Die negative (Repressor-basierte) Kontrolle eines Promotorsystems besitzt einen aktiven Repressor, der den Promotor inaktiviert, indem er im nicht gebundenen Zustand mit dem Operator interagiert. Dadurch kann die RNA-Polymerase nicht an die DNA binden und die Expression der nachfolgenden Gene initiieren. Durch Zugabe des passenden Induktors kann die Expression der Gene aktiviert werden, indem der Induktor als Ligand mit dem Repressor interagiert. Die dadurch induzierte Konformationsänderung des Repressors führt dazu, dass dieser nicht mehr an die DNA binden kann (Mooney et al., 1998; Becker et al., 2010). Als erstes beschriebenes induzierbares Expressionssystem wird das *lac*-System seit mehreren Jahrzehnten zur Expression von Genen verwendet und ist heutzutage standardmäßig in vielen Plasmiden enthalten (Jacob et al., 1960; de Lorenzo et al., 1993). Für *P. putida* KT2440 wurde das *lac*-Promotorsystem aus *E. coli* implementiert, da ihm die katabolische Abbauege für Verwertung von D-Lactose und somit das regulierende System fehlen (Dvorak et al., 2015). Induziert wird das System mit Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG), um eine homogene Expression zu ermöglichen. Zudem gibt es auch Abwandlungen des Systems wie z. B. das analog funktionierende *tac*-System, welches eine Fusion aus der -35-Region des *trp*-Promotors und der -10-Region des *lac*-Promotors darstellt (de Boer et al., 1983; de Lorenzo et al., 1993). Eine weitere Abwandlung des Systems besteht in der Verwendung von orthogonalen RNA-Polymerasen (z. B. aus dem Bakteriophagen T7) für die Transkription der Zielgene, die durch ihre hohe Prozessivität oftmals eine starke Überexpression von Genen unabhängig vom spezifischen Wirt erzeugen. Hier werden *lac*-basierte Systeme genutzt, um die Expression des Polymerasegens zu kontrollieren (Studier und Moffatt, 1986). Ein Problem bei der Repressor-basierten Regulierung stellt jedoch häufig die hohe Basalexpression, d. h. die Expression ohne Induktor, dar. Da stets genug aktiver Repressor gebildet werden muss um eine Inaktivierung des Promotors zu gewährleisten, ist die Expression auf Basis des T7-Promotorsystems

oftmals ungeeignet um die Gene, bspw. von in hoher Konzentration toxischer Proteine, zu exprimieren (Terpe, 2006).

Neben der negativen Regulation eines Promotorsystems gibt es auch die positive (Aktivator-basierte) Kontrolle der Expression. Dabei wird der Transkriptionsfaktor erst durch Zugabe des Induktors aktiviert. Erfolgt keine Zugabe, so ist der Promotor inaktiv und es findet keine Expression der nachfolgenden Gene statt. Bei Zugabe des passenden Liganden kann der Aktivator an die Operatorbindestelle binden und die Expression induzieren (Becker et al., 2010). Ein Beispiel ist das D-Mannitol-induzierbare System (Hoffmann und Altenbuchner, 2015), welches aufgrund des kostengünstigen Induktors zur Expression vieler verschiedener Peptide, so z. B. für Untereinheiten von multimeren Proteinen, verwendet wurde (Retallack et al., 2012). In Pseudomonaden kommen häufig auch Systeme zur Anwendung, die durch bestimmte Aromaten induzierbar sind; bspw. das  $P_{nagAa}/NagR$ -System mit dem Induktor Salicylat (Hüsken et al., 2001). Das Funktionsprinzip des aus *Comamonas testosteroni* isolierten *nagAa*-Promotorsystem besteht darin, dass Salicylat als Induktor an das NagR-Aktivatorprotein bindet, wodurch die dahinter liegenden Gene transkribiert werden (Jones et al., 2003; Mitchell und Gu, 2005). Dieses System kontrolliert natürlicherweise die regulatorische Kontrollregion der Naphthalin- und Phenanthrenabbauwege und wurde z. B. zur biokatalytischen Herstellung von 3-Methylcatechol in *P. putida* F1 (Hüsken et al., 2001), Plasmid-basiert auf dem pBNT-Plasmid (Verhoef et al., 2010), zur Produktion von 4-Hydroxybenzoat (36,6 g/L; Lenzen et al., 2019) oder für die Produktion von Phenol (1,1 g/L; Wynands et al., 2018) verwendet. Weitere bekannte Aktivator-basierte Systeme sind das  $P_{M}/XylS$ -, *rhaP<sub>BAD</sub>/RhaRS*- und  $P_{BAD}/AraC$ -System, die bspw. zur Produktion von *p*-Cumarsäure in *P. putida* KT2440 eingesetzt wurden (Calero et al., 2016). Hierbei ist für den Einsatz des L-Arabinose- und L-Rhamnose-induzierbaren Promotorsystems bekannt, dass aus einer zusätzlichen Expression der Gene der membranständigen Zucker-Transporter, im Fall von  $P_{BAD}/AraC$ -System, AraE, und *rhaP<sub>BAD</sub>/RhaRS*-System, RhaT, eine Verringerung der benötigten Induktorkonzentration resultiert, da *P. putida* KT2440 diese spezifischen Zuckertransporter nicht nativ besitzt (Calero et al., 2016).

Neben dieser breiten Palette an Promotorsystemen auf DNA-Ebene konnten auch weitere genetische Elemente auf mRNA Ebene, wie Terminatoren und RBS auf den Wirt und das gewünschte Gencluster adaptiert werden (Kosuri et al., 2013). Jahrzehntelange Forschungen innerhalb der synthetischen Biologie, haben somit die Sammlung um weitere Expressionskomponenten bereichert zu denen bspw. auch optimierte intergenische Regionen für das Design polycistronischer Operons und Sequenzmarkern zur Kontrolle der Stabilität sowohl von Proteinen (z. B. Degrons) als auch von mRNA gehören (Pfleger et al., 2006; Cameron und Collins, 2014; Venturelli et al., 2017; Neves et al., 2020). Der Zusammenbau komplexer genetischer Schaltkreise kann aber auch von sogenannten *riboswitches*, bicistronischen Translationsinitiationsstrukturen und kleinen regulatorischen RNA (Mutalik et al., 2013; Chappell et al., 2015; Kushwaha et al., 2016), sowie dem gezielten Einsatz von Reportergenen zur Verfolgung der Transkription einzelner genetischer Elemente profitieren (Gawin et al., 2019). Eine erste Übersicht geben Sammlungen wie bspw. die *BioBricks*<sup>TM</sup> (iGEM), die eine Zusammenstellung von

genetischen Bausteinen für biologische Systeme darstellt, aus der sich für ein spezifisches Expressionsvorhaben eine Kombination aus genetischen Elementen erstellen lässt (Smolke, 2009; Damalas et al., 2020).

Um solche Funktionseinheiten inklusive der Zielgene für Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten in einen Mikroorganismus einzubringen wird ein passendes Vehikel und eine Klonierungsstrategie benötigt (Loeschcke und Thies, 2020). Hierzu werden zumeist initial Plasmide verwendet.

#### 1.3.1.1 Expression mit Hilfe von standardisierten Plasmidbibliotheken

Der Einsatz von Plasmiden ermöglicht eine schnelle Erzeugung von Expressionswirten und die flexible Verwendung eines Konstrukts in mehreren Stämmen (Calero et al., 2016; Loeschcke und Thies, 2020). Plasmidvektoren bestehen mindestens aus einem Replikationsursprung (*ori*), einer *multiple cloning site* (MCS), einem Selektionsmarker und der gewünschten Expressionskassette (Gopal und Kumar, 2013). Obwohl die Transformation von *Pseudomonas* durch Einführung eines Protokolls zur Elektroporation handlicher geworden ist (Choi et al., 2006), werden für *P. putida* KT2440 Vektoren oft auch mit einer Sequenz des konjugativen Transfers (*oriT*; beinhaltet *mob*-Gen/ Konjugations-Erkennungssequenz) ausgestattet. Dieser ermöglicht die Konjugation des gewünschten Vektors in einen beliebigen Wirt unabhängig von der Größe des Plasmides (Willetts und Skurray, 1980).

Der *ori* spielt hierbei zur Nutzung in *P. putida* eine zentrale Rolle. Da die Replikationsursprünge der bekanntesten Vektoren für *E. coli* bei *Pseudomonas* nicht anwendbar sind, wurden für *Pseudomonas*-Vektoren spezielle *ori* mit einem breitem Wirtsspektrum auf Basis von RSF1010, RK2, pSa, R388 und pBBR1 eingesetzt (Martínez-García und de Lorenzo, 2017). Die Kombination dieser Replikons mit den oben beschriebenen Promotorsystemen resultierte in bekannten *P. putida* Expressionsvektoren wie der Serie pBBR1, pSyn, pBNT und pVLT, die bereits erfolgreich zur Darstellung von heterologen Biosyntheseoperons, u. a. zur Produktion von 3-Methylcatechol und RL in *P. putida* KT2440, genutzt wurden (de Lorenzo et al., 1993; Kovach et al., 1995; Verhoef et al., 2010; Tiso et al., 2016, 2017b).

Jedoch stellt diese Fülle an Vektoren und Auswahlmöglichkeiten für die Herstellung von rekombinanten Pseudomonaden durch die nicht einheitliche Verwendung eine Herausforderung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des biologischen Systems und der Kooperation verschiedener Arbeitsgruppen dar (Endy, 2005; Kelly et al., 2009). Der Adressierung dieses Problems in der synthetischen Biologie und somit der Tendenz hin zu einer Standardisierung der Vektorstrukturen sowie der genetischen Werkzeuge und Verfahren, wurde durch die Schaffung der SEVA (*Standard European Vector Architecture*)-Datenbank nachgekommen (Silva-Rocha et al., 2013; Durante-Rodríguez et al., 2014; Martínez-García et al., 2015, 2020). Die SEVA-Datenbank bietet eine kohärente Vektor-*toolbox*, in der Replikationsursprünge, Antibiotikaresistenzmarker und funktionelle Einheiten standardisiert kombiniert und durch eine genaue Anordnung bestimmt sind. Beispielsweise wurde das pSEVA-System schon erfolgreich zur Herstellung von Isoprenoiden oder

zur Entwicklung eines anaeroben Stoffwechselregimes in *P. putida* KT2440 verwendet (Nikel und de Lorenzo, 2013a; Hernandez-Arranz et al., 2019).

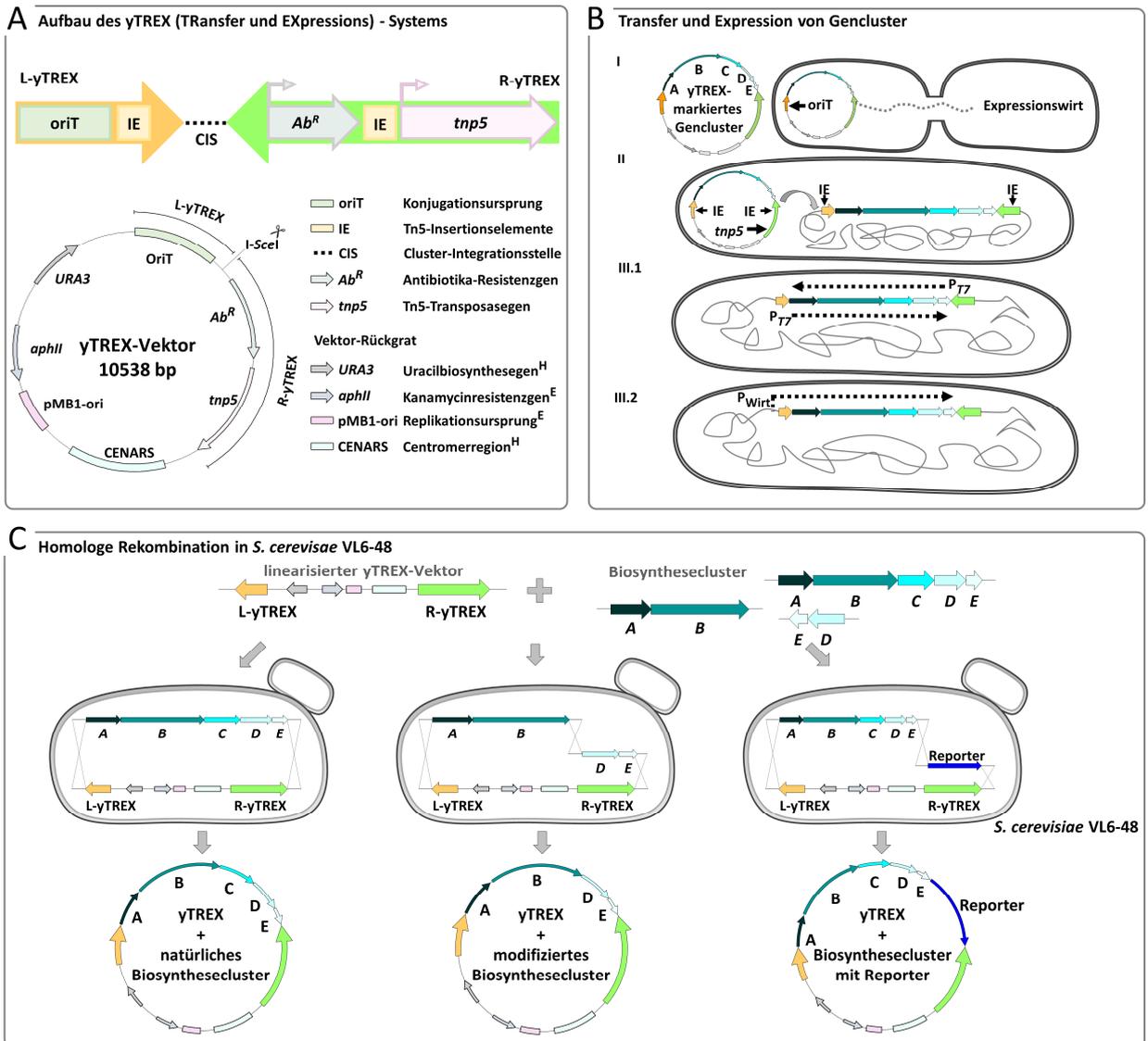
Trotz dieser Bemühungen um eine Standardisierung der Plasmid-basierten Expression von Zielgenen, ist die generelle Verwendung von Plasmiden oftmals mit Problemen behaftet (Del Vecchio, 2015). So ist bekannt, dass die Erhaltung von Plasmiden in Mikroorganismen aufgrund des *metabolic burden* zu einer Verringerung der Wachstumsrate und zu ungewünschten Rückkopplungen führen kann (Bailey et al., 1986; Gyorgy et al., 2015). Ein Mechanismus, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird: Ein durch das Plasmid stark überexprimiertes Protein kann die zellulären Prozesse, z. B. durch eine Enzymaktivität oder seine strukturellen Eigenschaften, stören (Mi et al., 2016). Ein bekanntes Beispiel ist das Tetracyclinresistenzprotein, welches Membranintegritätsänderungen verursacht (Hong et al., 2014). Weitere Nachteile der Plasmid-basierten Expression interessanter Gene liegen in der Plasmidinstabilität, der Heterogenität innerhalb von Zellpopulationen in Bezug auf die Kopienzahlen und in dem daraufhin folgenden Unterschied in der Gendosis (Smith und Bidochka, 1998). So kommt es insbesondere bei Plasmiden mit niedriger Kopienzahl vor, dass während der Zellteilung die Vererbung des Plasmides einer stochastischen Verteilung unterliegt und im Zuge der Kultivierung vererbt (Nora et al., 2019). Dies liegt vor allem bei fehlender Antibiotika-Selektion vor, die bei der Etablierung großskaliger Prozesse nicht wirtschaftlich sind, was schlussendlich zu einem Plasmidverlust und einem Expressionsstopp führt. Eine Möglichkeit, dies zu verhindern besteht in der chromosomalen Integration der BSG (Loeschcke und Thies, 2020).

#### 1.3.1.2 Chromosomale Integration zur Konstruktion stabiler Produktionsstämme

Der Aufbau einer großen Sammlung von Plasmiden zur Expression von Genen und die Vereinheitlichung mit Hilfe der SEVA-Sammlung haben dazu geführt, dass die Etablierung biosynthetischer Prozesse in *P. putida* KT2440 in kurzer Zeit bewerkstelligt werden kann (Martínez-García et al., 2020). Jedoch ist eine Grundvoraussetzung für die Etablierung von Produktionsstämmen für großskalige Prozesse die genetische Stabilität (Yang, 2007; Khalidi et al., 2016; Ademakinwa et al., 2017). Wie beschrieben, sind bislang bestehende Systeme oftmals Plasmid-basiert und müssen somit unter ständigem Selektionsdruck, z. B. durch ein Antibiotikum, gehalten werden, was einen zusätzlichen Kostenfaktor im Produktionsprozess darstellt. Zusätzlich kann die Plasmid-basierte Expression zur Heterogenität der Produktion beitragen sowie zu nicht reproduzierbaren Produktionstitern führen (Mairhofer et al., 2013; Binder et al., 2017; Vogl et al., 2018). Hier stellt die Genomintegration von BSG eine geeignete Alternative dar (Loeschcke und Thies, 2020). Diese sorgt dafür, dass aufgrund von ausgeglichener Verteilung von Genen die Kopienzahl in allen Zellen nahezu identisch ist und sich somit auch zwischen verschiedenen Kultivierungsansätzen nur geringfügig unterscheidet. Zudem sorgt die Integration des biosynthetischen Clusters in das Genom des Wirtes für eine stabile Weitervererbung der genetischen Information (de Lorenzo et al., 1998; Mi et al., 2016). Um ein Fragment stabil in das

Genom eines Wirtes einzubauen gibt es zwei zentrale Methoden, die unterschieden werden – die randomisierte und die zielgerichtete (Loeschcke und Thies, 2020).

Bei der randomisierten Integration werden genetische Elemente an einen zufälligen Locus im Genom des Wirtsorganismus integriert. Diese Zufallsintegration, bspw. durch Einsatz von Transposons (z. B. mariner Transposons oder Tn5-Transposon; Choi und Kim, 2009), erzeugt eine Bibliothek von Klonen, aus der die am besten geeigneten Stämme entweder durch Nachweis des spezifischen Produktes ggf. über eine Kopplungsreaktion oder durch Auslesen eines Transkriptionsreporters (z. B. Fluoreszenz-basiert über Proteine wie GFP) identifiziert werden können (Nikel und de Lorenzo, 2013b; Gemperlein et al., 2017). Solche Strategien konnten genutzt werden um eine geeignete Stelle im Genom zu finden, die zur stabilen Produktion der gewünschten Proteine führt (Domröse et al., 2019). Ein entsprechendes Werkzeug, welches sich besonders für größere biosynthetische Gencluster eignet, ist das *transfer* und *expression*-System, das *yeast recombinational cloning* ermöglicht (yTREX-System; Domröse et al., 2017; **Abb. I-5**) und eine Weiterentwicklung des zuvor publizierten TREX-Systems darstellt (Loeschcke et al., 2013).



**Abb. I-5: Das Funktionsprinzip des yTREC-Systems zur randomisierten Integration biosynthetischer Genclustern (aus Domröse et al., 2017)**

**A:** Aufbau des yTREC-Vektors und Zusammensetzung der yTREC-Kassetten. Das yTREC-System besteht aus zwei Genkassetten, der L-yTREC- (orange) und der R-yTREC- (grün) Kassette. Innerhalb der L-yTREC Kassette befindet sich ein oriT (beinhaltet *mob*-Gen/ Konjugations-Erkennungssequenz), dem Konjugationsursprung zum Transfer in einen beliebigen Wirt, und dem linken Tn5-Insertionselement (IE). Die R-yTREC-Kassette beinhaltet ein Antibiotikaresistenzgen, das rechte Tn5-Insertionselement sowie das Gen kodierend für die Tn5-Transposase (*tnp5*). L- und R-yTREC flankieren die *cluster integration site* (CIS), in der sich eine Erkennungssequenz für die *Homing*-Endonuklease (*I-SceI*) befindet, die zur Linearisierung des Vektors genutzt wird. Mittels homologer Rekombination in Hefe (H), kann an dieser Stelle ein gewünschtes biosynthetisches Cluster in den Vektor integriert werden. Zur Replikation und Selektion in uracildefizienten Hefen, befinden sich auf dem Vektorrückgrat neben dem Replikationsursprung (*pMB1 ori*) und dem Selektionsmarkergen (*aphII-Km<sup>R</sup>*) für *E. coli* (E) die Replikationseinheit (*CENARS*) aus *S. cerevisiae* bestehend aus dem Centromer des Chromosoms IV (*CEN4*) sowie der autonom replizierenden Sequenz (*ARS1*) sowie das zur Selektion benötigte *URA3*-Gen.

**B:** Für die chromosomale Integration wird zunächst der konstruierte yTREC- Vektor in einen Donorstamm transformiert und durch Konjugation in einen Rezipienten überführt (I). Anschließend erfolgt die Integration des biosynthetischen Clusters durch die Tn5-Transposase (II), wobei das Plasmid, aufgrund des nicht kompatiblen Replikationsursprungs, im Expressionswirt nicht repliziert wird. Die Expression der Gene erfolgt nun über zwei Möglichkeiten: Die eine Möglichkeit besteht in der Expression des Genclusters mit Hilfe der integrierten T7-Promotoren in einem Wirt, der das Gen kodierend für die T7-RNA-Polymerase beinhaltet (III.1), die zweite in der Expression des Genclusters durch einen nativen Promotor, der am Ort der Integration vorliegt (III.2).

**C:** Die Hefe-basierte Rekombinations-Klonierung bietet verschiedene Möglichkeiten - Die Klonierung eines Gen-Clusters in seiner nativen Form (links), als manipulierte Variante, z. B. mit Gen-Deletionen (Mitte), oder mit zusätzlich eingeschlossenen Elementen wie Transkriptionsreportergenen (rechts). Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC-BY-NC-ND 4.0) geschützt.

Die Grundlage des yTREC-Systems ist ein Plasmid mit zwei Genkassetten, der L- und R-yTREC Kassette (**Abb. I-5 (A)**). Zur Umsetzung der TREC-Anwendung muss zunächst das betreffende Gencluster von beiden Seiten mit den yTREC-Kassetten markiert werden. Dabei steht das „y“ für

*yeast* (Hefe), wodurch zur Klonierung des Genclusters keine strikte Endonuklease-basierte Klonierung, sondern die homologe Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* genutzt werden kann (Ma et al., 1987). *S. cerevisiae* ist in der Lage, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren und somit bspw. zwei DNA-Fragmente mit überhängenden homologen Bereichen von mind. 30 bp zu verknüpfen (Oldenburg et al., 1997). Durch diese Eigenschaft wird es möglich, die gewünschten, mit überhängenden Bereichen für die R- oder L-yTREX Kasette amplifizierten BSG mittels homologer Rekombination im yTREX-Vektor zu verknüpfen (Domröse et al., 2017). Der Selektionsmarker für *S. cerevisiae* ist das *URA3*-Gen, welches für das Enzym ODC kodiert und ein wichtiges Element zur Bildung von Uracil, u. a. ein Baustein der RNA, darstellt (Harris et al., 2000). Das Fehlen der ODC bewirkt, dass der Uracil-auxotrophe *S. cerevisiae*-Stamm VL6-48 (Kouprina et al., 1998) nur mit erfolgreich transformiertem Vektor auf Uracil-freien Medien wachsen kann. Zudem besitzt der Vektor auch einen *ori*, *oriT* sowie Selektionsmarker für *E. coli*, um eine Amplifikation und Konjugation zu ermöglichen. Nach Übertragung in ein Gram-negatives Wirtsbakterium (**Abb. I-5 (B)**) wie *P. putida* KT2440 wird das betreffende durch Insertionselemente (IE) flankierte Gencluster durch die Tn5-Transposase randomisiert in dessen Genom integriert. Final kann die gezielte Expression aller integrierten Gene entweder durch zwei *T7*-Promotoren oder im Fall eines Genclusters, das aus unidirektional orientierten Genen besteht, durch Expression über einen chromosomalen Promotor realisiert werden. Besonders für große biosynthetische Cluster ist diese Klonierungs- und Expressionsstrategie von Vorteil (vgl. **Abb. I-5 (C)**), da Sie zum einen die Klonierung großer BSG vereinfacht aber auch die Neuarrangierung und das Hinzufügen alternativer Gene bzw. Reporter ermöglicht (Domröse et al., 2017).

Zufalls-basierte Integration ist jedoch nicht für alle Anwendungen von Vorteil und stellt je nach Nachweisbarkeit des produzierten biologischen Produktes einen großen Aufwand im Screening der erzeugten Stammbibliothek dar (Loeschcke und Thies, 2020). Eine Möglichkeit, die Variabilität der Transposon-Insertion zu vermeiden und zusätzlich die Lage des interessierenden DNA-Segments zu fixieren, ist die zielgerichtete Integration an einen bestimmten Locus im Genom. Diese besitzt den Vorteil, dass keine große Bibliothek getestet werden muss. Zudem kann durch den Einsatz eines bekannten Promotors, welcher bereits für die Eignung der Expression des gewünschten Gencluster getestet wurde, ein stabiler Produktionsstamm in kurzer Zeit erzeugt werden (Zobel et al., 2015). Für eine zielgerichtete Integration können verschiedene Strategien eingesetzt werden:

Neben der Integration biosynthetischer Cluster in spezifische Loci innerhalb des Chromosoms, bspw. durch Adressierung von *attB*-Sequenzmotiven mit Hilfe der IntB13-ortspezifischen Rekombinase (Zhang et al., 2020) oder der Verwendung sogenannter *landing patches*, bspw. CRAGE (Wang et al., 2019a), die es ermöglichen, wirtunabhängig eine spezifische Stelle, die vorher mit diesem *patch* bestückt wurde, zu adressieren, gibt es die Möglichkeit der Tn7-Transposition (Choi et al., 2005; Loeschcke und Thies, 2020).

Die bakterielle Tn7-Transposase (Barth et al., 1976) zeichnet sich durch die Fähigkeit aus mit hoher Transfereffizienz in eine bestimmte Stelle, die als *attachment*Tn7- oder kurz *att*Tn7-Stelle bezeichnet wird, zu integrieren. Diese Sequenz kommt im Genom der meisten Bakterien nur einmal, höchstens

zweimal vor (Choi et al., 2005). Sie grenzt im Falle von *P. putida* KT2440 (und vielen anderen Prokaryoten) an das *glmS*-Gen (Glutamin-Fructose-6-phosphat-Aminotransferase) an, das essenziell ist, wodurch ein Verlust dieser Stelle etwa durch Rekombinationsereignisse unwahrscheinlich ist (Choi et al., 2005). Zudem befindet sich die *attTn7*-Stelle oftmals in der Nähe des chromosomalen Replikationsursprungs, auf welche Weise die genetische Information zur meisten Zeit des bakteriellen Wachstums, aufgrund der fortlaufenden Zellteilung und DNA-Replikation, mindestens in zweifacher Kopie vorhanden ist (Slager und Veening, 2016; Chaves et al., 2020) und aus diesem Grund besonders stark transkribiert werden kann (Craig, 1996). Die Transposition erfolgt durch Ausbildung eines Multiprotein-Nukleo-Komplexes, welcher aus den Proteinen TnsABCD, den Transposon-Enden und der Ziel-DNA besteht. Anschließend erfolgt die Integration in die *attTn7*-Stelle mittels einem nicht-replikativen *cut-and-paste*-Mechanismus, bei dem das Transposon zuerst ausgeschnitten und anschließend integriert wird (Craig, 1996). Dieses Prinzip wurde in vielen Studien zur Stammerzeugung genutzt, um bspw. einen Vergleich von Promotorstärken oder Biosensormodulen zu ermöglichen (Lambertsen et al., 2004; Choi und Schweizer, 2006; Damron et al., 2013; Bruckbauer et al., 2015). Das bekannteste Tn7-Integrationssystem ist das mini-Tn7 Transposon, welches zusammen mit einem Transposaseplasmid über ein spezielles Verfahren, der *four-parental-mating* Konjugation mit *E. coli* Helferstämmen und -plasmiden, zur chromosomalen Integration in die *attTn7*-Stelle genutzt werden kann (Choi und Schweizer, 2006).

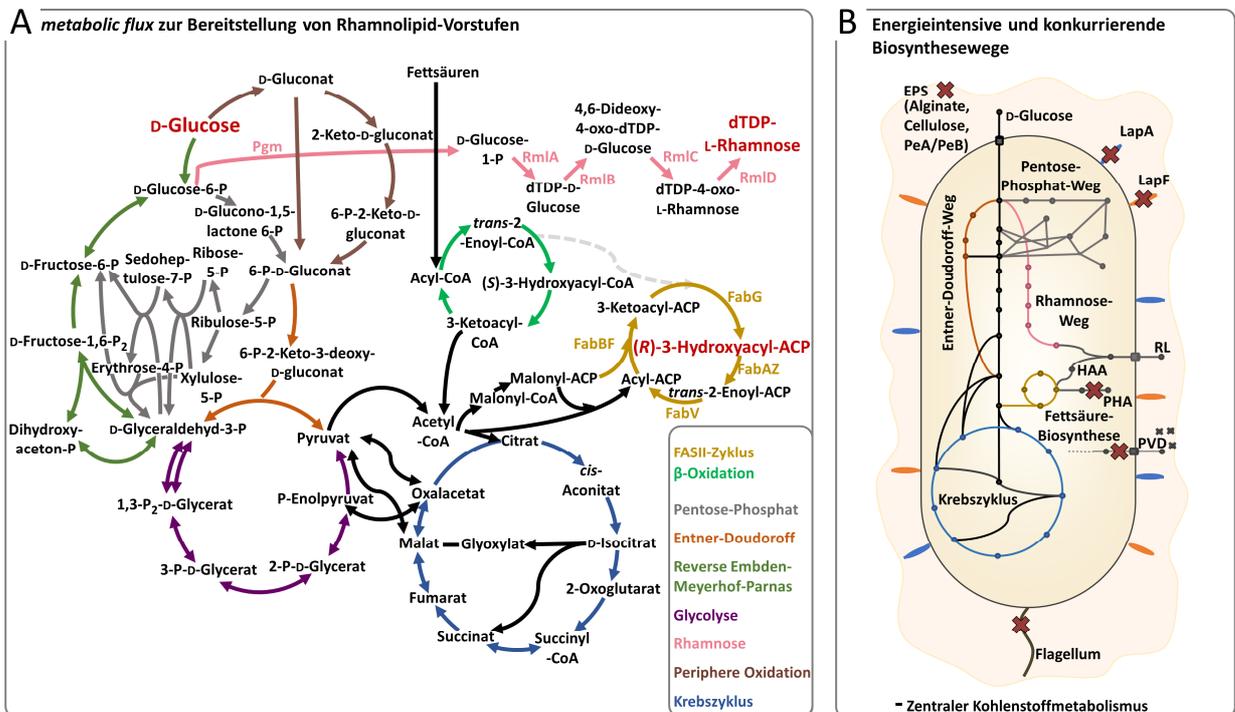
Leider sind, im Gegensatz zu dem SEVA-System der Plasmidvektoren, Bemühungen, die die Standardisierung der chromosomalen Integration von genetischen Elementen in *Pseudomonas* ermöglichen, noch nicht weit fortgeschritten, sodass eine vollständige Kompatibilität und Interoperativität zwischen verschiedenen Forschungsgruppen noch nicht gewährleistet ist (Martínez-García und de Lorenzo, 2017).

Jedoch bietet diese breite Palette an genetischen Werkzeugen viele Möglichkeiten, ein gewünschtes Gencluster zu integrieren, wodurch sich das volle Potenzial von *P. putida* KT2440 zur Produktion von Naturstoffen wie RL nutzen lässt.

### 1.3.2 Etablierung von *Pseudomonas putida* KT2440 als Rhamnolipid-Produzent

*P. putida* KT2440 wurde in den letzten Jahren zu einer Plattform für die heterologe Produktion von RL entwickelt (Nikel und de Lorenzo, 2018; Loeschcke und Thies, 2020). Neben den zahlreichen beschriebenen Werkzeugen zur Integration heterologer Gencluster (1.3.1) und zur Manipulation seiner Erbinformation im Rahmen des *metabolic engineering* (z. B. pEMG-System; Martínez-García und de Lorenzo, 2011), spielt vor allem die hohe Toleranz von *P. putida* KT2440 gegenüber den antimikrobiell wirkenden RL eine große Rolle. Während das Wachstum von *P. aeruginosa* oder *E. coli* schon bei einer RL-Konzentration von 50 g/L stagniert, zeigt *P. putida* auch bei einer extrazellulären Konzentration von 90 g/L unverändertes Wachstum (Wittgens et al., 2011). Ein robustes Wachstum auch unter hohen RL-Konzentrationen scheint eine wichtige Voraussetzung für großskalige Prozesse zu sein, bei denen hohe Zelldichten und Produkt-Titer erreicht werden sollen

(Yang, 2007). Ein weiterer entscheidender Vorteil gegenüber anderen potenziellen Produzenten für RL liegt in seinem gut studierten Metabolismus (Sudarsan et al., 2014), der es erlaubt, diesen gezielt zu steuern. Beispielsweise kann hierdurch die Verwendung geeigneter Kohlenstoffquellen, die Eliminierung konkurrierender Pfade, die Anknüpfung des Primärstoffwechsels zur Bereitstellung ausreichender Mengen an Edukten oder die Verbesserung der Expression des Operons implementiert werden (Wittgens et al., 2011; Martínez-García et al., 2014; Tiso et al., 2016; **Abb. I-6**).



**Abb. I-6: *Pseudomonas putida* KT2440 als Chassis für die heterologe Produktion von Rhamnolipiden: Kohlenstoffmetabolismus und konkurrierende Stoffwechselwege (modifiziert nach Tiso, 2016; Tiso et al., 2016).**

**A:** *P. putida* besitzt einen gut studierten und einzigartigen Kohlenstoffmetabolismus, der es erlaubt, gezielte Optimierungen vorzunehmen (Nikel et al., 2015; Kohlstedt und Wittmann, 2019). Statt des linearen Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weges für die Degradation von Hexosen wie D-Glucose, besitzt das Bakterium einen zyklischen zentralen Kohlenstoffmetabolismus aus Elementen des Entner-Doudoroff (ED)-Weges, des Pentose-Phosphat (PP)-Weges und der Gluconeogenese, ergänzt durch eine Vielzahl zytosolischer und periplasmatischer Oxidations- und Phosphorylierungsreaktionen. Die Edukte dTDP-L-Rhamnose und (R)-3-Hydroxyacyl-ACP, die zur RL-Synthese benötigt werden, können aus D-Glucose in *P. putida* KT2440 dargestellt werden. **B:** Ziele zur Optimierung des metabolischen Flusses der RL-Biosynthese sind zum einen konkurrierende Produktionslinien wie bspw. die Bildung der Polyhydroxyalkanoate (PHA) oder der Alginate, die aus Edukten der RL-Biosynthese gebildet werden. Zudem sind energieintensive Biosynthesewege, wie die Ausbildung der Exopolysaccharidschicht (EPS), des Flagellums, der Adhäsionsproteine LapA und LapF sowie der Pyoverdine (PVD), potenzielle Ziele zur Optimierung der allgemeinen *fitness* und Leistungsfähigkeit der mikrobiellen Fabrik. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) geschützt.

Hierbei besitzen Bodenbakterien wie *P. putida* KT2440 eine enorme Flexibilität bei der Speisung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Neben den klassischen Stoffwechselwegen wie dem Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg, der Glycolyse, dem Pentose-Phosphat (PP)-Weg und dem Krebszyklus, besitzt *Pseudomonas* einen zusätzlichen zentralen Pfad, den Entner-Doudoroff-(ED)-Weg, der den EMP-Weg ersetzen kann. Diese Kombination aus Enzymen des ED-, EMP- und PP-Weges bildet eine einzigartige kreisförmige Architektur und wird auch als EDEMP-Zyklus bezeichnet (Nikel et al., 2015; Kohlstedt und Wittmann, 2019). Zusätzlich besitzt *P. putida* KT2440 eine mannigfaltige Ausstattung zytosolischer und periplasmatischer Oxidations- und Phosphorylierungsreaktionen, die es erlauben, D-Glucose sowohl im Zytoplasma durch eine Glucokinase als auch im Periplasma durch eine Glucosedehydrogenase zu D-Gluconat

zu oxidieren und somit als Substrat zugänglich zu machen (Sudarsan et al., 2014). Im zweiten Fall wird D-Gluconat entweder durch eine Gluconokinase zu 6-Phospho-D-gluconat phosphoryliert und über den ED-Weg in 6-Phospho-D-gluconat, Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-P umgewandelt, oder durch eine Dehydratase weiter zu 2-Keto-D-gluconat oxidiert (Sudarsan et al., 2014; Nickel et al., 2015). 2-Keto-D-gluconat wird anschließend durch eine 2-Ketogluconatkinase zu 2-Keto-D-gluconat-6-P phosphoryliert und durch eine 2-Ketogluconat-6-P-Reduktase zu 6-Phospho-D-gluconat reduziert. Somit führen alle Stoffwechselwege zu 6-Phospho-D-gluconat, die durch den ED- und PP-Weg weiter metabolisiert werden können (Sudarsan et al., 2014; Nickel et al., 2015). Hierbei sind die Stoffwechselwege der Edukte für die RL-Synthese, dTDP-L-Rhamnose und (R)-3-Hydroxyfettsäuren, eng mit diesem zentralen Metabolismus verknüpft (Soberón-Chávez et al., 2005; Müller und Hausmann, 2011; vgl. **Abb. I-6 (A)**).

Die Bildung des Eduktes **dTDP-L-Rhamnose** wird in fünf aufeinanderfolgenden Schritten aus D-Glucose-6-Phosphat (G6P), welches entweder aus extrazellulärer D-Glucose über die Glucokinase Glk, aus dem ED-Weg oder der Gluconeogenese bereitgestellt wird, durch die Enzyme Pgm und RmlABCD (in *P. putida* KT2440 als RfbABCD annotiert) katalysiert (Soberón-Chávez et al., 2005; vgl. **Abb. I-6 (A)**; **Rhamnose**). Zunächst erfolgt die Umsetzung zu D-Glucose-1-Phosphat (G1P) durch die Phosphoglucomutase (Pgm; Zielinski et al., 1991; Ye et al., 1994; Wittgens, 2013), wobei *P. putida* KT2440 insgesamt drei Phosphomanno- bzw. glucomutasen besitzt (XanA, PP\_3578 und PP\_5288), die für diesen ersten Syntheseschritt verantwortlich sein könnten (Wittgens, 2013). Anschließend folgt dessen Veresterung mit Desoxythymidintriphosphat unter Abspaltung eines Diphosphats zu dTDP-D-Glucose durch RmlA (Blankenfeldt et al., 2000). Es folgen die Bildung von TDP-4-oxo-6-desoxy-D-Glucose durch RmlB, eine Epimerisierung zu dTDP-4-oxo-L-Rhamnose und schließlich eine Reduktion zu dTDP-L-Rhamnose durch RmlC und RmlD (Graninger et al., 1999; Rahim et al., 2000; Allard et al., 2001; s. a. Wittgens, 2013). Konkurrierend zur Bereitstellung von dTDP-L-Rhamnose für die Bildung von RL und somit ein direktes Ziel für *metabolic engineering* (vgl. **Abb. I-6 (B)**) sind Biosynthesewege, die zur Ausbildung von Bestandteilen der Exopolysaccharide (EPS) benötigt werden (Wang et al., 2014a). Die Alginat-Synthese erfolgt durch Pgm sowie den Genprodukten des *alg*-Genclusters und verwendet ebenfalls Edukte aus der Glycolyse (Olvera et al., 1999). Die dTDP-L-Rhamnose und das Zwischenprodukt dTDP-D-Glucose werden auch zur Ausbildung der LPS verwendet (Rahim et al., 2000; Poon et al., 2008; s. a. Wittgens, 2013).

Zur Bildung des Edukts **(R)-3-Hydroxyacyl-ACP** innerhalb des Typ-II-Fettsäuresynthese (FASII)-Zyklus (vgl. **Abb. I-6 (A)**; **FASII-Zyklus**), wird zunächst die Bildung von Acetoacetyl-ACP und Malonyl-ACP aus Acetyl-CoA durch FabH und ACCC/FabD katalysiert (Tsay et al., 1992; López-Lara und Geiger, 2010). Anschließend beginnt die zyklische Verlängerung der Fettsäurekette, indem ein Manoyl-ACP durch FabB oder FabF ausgehend von einem initialen Acyl-ACP zu einem 3-Ketoacyl-ACP kondensiert wird. Dieses wird durch FabG zu (R)-3-Hydroxyacyl-ACP (Edukt der RL-Biosynthese) reduziert. Im Anschluss erfolgt eine Dehydratation zu *trans*-2-Enoyl-ACP durch FabA oder FabZ und eine Reduktion zu Acyl-ACP durch FabV (Wittgens, 2013). Dies wird nun erneut mit Manoyl-ACP durch FabB oder FabF kondensiert und der Zyklus beginnt von vorne (López-Lara

und Geiger, 2010; s. a. Wittgens, 2013; Tiso, 2016). Während lange Zeit der Weg über Acetyl-CoA zum FASII-Zyklus als Quelle der Fettsäuren zur RL-Synthese diskutiert wurde, zeigten jedoch kürzlich *in vivo* durchgeführte Untersuchungen zur Isotopenverfolgung auf, dass auch die  $\beta$ -Oxidation (vgl. **Abb. I-6 (A)**; grau-gestrichelte Linie) der Hauptlieferant von Lipidvorläufern für RL sein könnte (Zhang et al., 2012; Dulcey et al., 2019). In direkter Konkurrenz (vgl. **Abb. I-6 (B)**) um die (R)-3-Hydroxyacyl-ACP steht die Synthese der Polyhydroxyalkanoate (PHA), welche als Granula im Cytoplasma akkumulieren und die Bildung über die Transacylase PhaG und die Poly(3-hydroxyalkanoat)-Synthasen PhaC1/2 katalysiert wird (Choi et al., 2011; Wittgens et al., 2011; Tiso et al., 2016). Für die Synthese von PHA werden, ähnlich wie für die Produktion von RL, C<sub>6</sub>- bis C<sub>10</sub>-Fettsäuren verwendet (Choi et al., 2011; Wittgens, 2013). Tiso et al., 2016 zeigte, dass der *knockout* der PHA-Synthese zu einer verbesserten RL-Produktion führte. Weiterhin dienen die (R)-3-Hydroxyfettsäure-Intermediate der Biosynthese von Lipid A der LPS (Raetz und Whitfield, 2002; Wittgens, 2013).

Neben dem *metabolic engineering* als Schlüsselstrategie zur Verbesserung der Produktbildung durch spezifische Flussänderungen, gibt es auch den Ansatz, energieintensive zelluläre Funktionen durch großflächige genomische Deletionen zu modifizieren und ein optimiertes *Chassis* zu kreieren (Liang et al., 2020). Hierbei werden in dem anthropogenen biotechnologischen Produktionsprozess einige Eigenschaften, die in der natürlichen ökologischen Nische zur Vitalität beitragen, nicht benötigt (Nikel et al., 2014b; Nickel und de Lorenzo, 2018). In der Vergangenheit haben gezielte Genomreduktionen u. a. zu einer erhöhten genetischen Stabilität, einer verbesserten *fitness* unter stressauslösenden Bedingungen, erhöhten Wachstumsraten und Biomasseerträgen sowie zu einer gesteigerten heterologen Genexpression in *P. putida* KT2440 geführt (Chang et al., 2007; Umenhoffer et al., 2010; Martínez-García et al., 2014a, 2015; Lieder et al., 2015).

Ein Ziel ist bspw. die Ausbildung der Biofilmmatrix, die größtenteils mit zwei Adhäsinen (LapA und LapF) und vier EPS-Bestandteilen (PeA, PeB, Alginate und Cellulose) assoziiert ist (Gulez et al., 2014; Liu et al., 2019). LapA ist für die anfängliche Biofilmbildung essenziell (Espinosa-Urgel et al., 2000; Hinsä et al., 2003), während LapF an Zell-Zell-Wechselwirkungen und der Reifung des Biofilms beteiligt ist (Martínez-Gil et al., 2010). Alginate und Cellulose haben hingegen bei der Etablierung von Biofilmen unter vollständig hydratisierten Bedingungen eine Relevanz und PeA und PeB bei der Stabilität des Biofilms (Nilsson et al., 2011). Insbesondere die Eliminierung der in der *lap*-Region kodierten großen Adhäsionsproteine LapA und LapF führt nachweislich zu einer verminderten Belastung des Energieflusses, da sie mit 8682 bzw. 6310 Aminosäuren die beiden größten Proteine in *P. putida* KT2440 sind (Martínez-Gil et al., 2010).

Weitere Ziele sind energieintensive bakterielle Fortbewegungsmaschinerien, wie bspw. die Flagelle, die unter biotechnologischer Prozessführung nicht benötigt werden (Westers et al., 2003; Martínez-García et al., 2014c). Bei *P. putida* KT2440 erhöht bspw. die Eliminierung des Flagellar-Clusters die Wachstumsrate in Schüttelkolbenkulturen um 24% (Lieder et al., 2015). Durch Kombination mehrerer Eliminierungen lässt sich so ein Stamm erzeugen, der optimal auf die heterologe Genexpression angepasst ist. Zum Beispiel ergab die simultane Eliminierung von Flagellen,

Prophagen, Transposons und DNA-Restriktionsmodifikationssystemen in *P. putida* KT2440 den Stamm EM383, ein Chassis mit einem um 4,3% reduzierten Genom (Martínez-García et al., 2014b). Dieser Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp höhere Biomasse-Ausbeutekoeffizienten, einen verbesserten Energiefluss sowie eine erhöhte heterologe Genexpression. Darüber hinaus hatte *P. putida* KT2440 EM383 eine erhöhte *fitness* und Toleranz gegenüber oxidativem Stress (Martínez-García et al., 2014b). Aber auch Optimierungen, die die Bildung störender Beiprodukte verhindern, bspw. der Pyoverdine (PVD) in *P. putida* KT2440, die aufgrund ihrer Fluoreszenz in kolorimetrischen Screenings interferieren könnten, sind potenzielle Ziele im Rahmen der heterologen RL-Produktion (Choi et al., 2018). Dennoch sollte beachtet werden, welche Eigenschaften entsprechend den Prozessbedingungen und -zielen erwünscht und entbehrlich sind. Denn die Natur bietet auch oft Lösungen für ökologische Herausforderungen, die auch während biotechnologischer Prozesse auftreten können, wie z. B. Toleranzmechanismen zur Bewältigung von Substrat- oder Produkttoxizität (Gulez et al., 2014).

Die meisten der bislang durchgeführten Studien zur RL-Produktion in *P. putida* KT2440 beschränkten sich auf die Expression der mRL-BSG (Tiso et al., 2017a; **Tab. I-3**). Behrens et al., 2016a haben dabei gezeigt, dass die Einführung der *rhl*-Gene aus *P. aeruginosa* die gleiche RL-Kongenerenverteilung bei *P. putida* KT2440 zeigte (Behrens et al., 2016b, c).

**Tab. I-3: Zusammenfassung ausgewählter Ansätze zur Integration des Rhamnolipid-Operons und Herstellung rekombinanter Monorhamnolipide in *Pseudomonas putida* KT2440 (modifiziert nach Tiso et al., 2017a; Loeschcke und Thies, 2020).**

Zur Beschreibung der Produktionsstrategie wurde zwischen Voll- und Minimalmedium unterschieden, sowie die für die RL-Produktion verwendete Kohlenstoffquelle, die Kultivierungsdauer zur Erreichung des maximalen Titers und die Kultivierungsart aufgelistet.

Expressionswirt	Expressionsstrategie		Produktionsstrategie	Maximaler Titer [g/L]	Referenz
<i>P. putida</i> KT2442	Plasmid	$P_{tac}$ , <i>rhlAB</i>	Vollmedium; 1% Glucose; 24 h Kultivierung; Schüttelkolben	0,6	Ochsner et al., 1995
<i>P. putida</i> KCTC 1067	Plasmid	$P_{native}$ ( <i>RhIRI</i> ), <i>rhlABRI</i>	Minimalmedium; 2% Sojaöl; 72 h Kultivierung; Schüttelkolben	7,3	Cha et al., 2008
<i>P. putida</i> KT2440 $\Delta phaC$	Plasmid	$P_{tac}$ , <i>rhlAB</i>	Vollmedium; 1% Glucose; 48 h Kultivierung; Schüttelkolben	1,5	Wittgens et al., 2011
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{native}$ ( <i>RhIRI</i> ), <i>rhlABRI</i>	Vollmedium; 3% Glycerin; 96 h Kultivierung; Schüttelkolben	1,68	Cao et al., 2012
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{syn}$ ( <i>P<sub>rRNA</sub></i> ), <i>rhlAB</i>	Minimalmedium; 10 mM Natriumcitrat; 24 h Kultivierung; Strömungskammer (Biofilm)	0,08	Wigneswaran et al., 2016
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{syn}$ , <i>rhlAB</i>	Minimalmedium; 3,5% Glucose; Schaumfraktionierung; Bioreaktor	2,15 <sup>a</sup>	Beuker et al., 2016b
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{syn}$ , <i>rhlAB</i>	Vollmedium; 1,2% Glucose; 22 h Kultivierung; Schüttelkolben	3,2	Tiso et al., 2016
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{syn}$ , <i>rhlAB</i>	Minimalmedium; 0,6% Glucose ( <i>feed</i> : 40% (w/v)); 70 h Kultivierung; Bioreaktor	14,9	Beuker et al., 2016a
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid	$P_{syn}$ , <i>rhlAB</i>	Minimalmedium; 0,4% Glucose; 50 h Kultivierung; Schüttelkolben	0,83	Noll et al., 2019
<i>P. putida</i> KT2440 pWeim2_RL <sup>b</sup>	Chromosomal	$P_{syn}$ , <i>rhlAB</i>	Minimalmedium; 1% Xylose; 30 h Kultivierung; Schüttelkolben	0,72	Bator et al., 2020

<sup>a</sup> maximale Konzentration der Schaumfraktion

<sup>b</sup> evolvierter, genetisch manipulierter Stamm mit der Fähigkeit Xylose zu metabolisieren

Hierbei unterscheiden sich die resultierenden Titer stark im Hinblick auf das jeweilige Expressionssystem und die Produktionsstrategie. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Optimierung des metabolischen Flusses durch *knockout* des *phaC*-Gens, welches zur Bildung der PHA benötigt werden, zu einer Steigerung der RL-Produktion führt (Wittgens et al., 2011). Zudem führen unterschiedliche Expressionsstrategien des ca. 2 kbp-großen Operons zu unterschiedlichen

Ergebnissen. Den höchsten Titer erreichte bislang Beuker et al., 2016a mit einem rekombinanten System und einem Titer von 14,9 g/L (Ausbeute: 10 mg/g Glucose) unter Anwendung synthetischer Promotor-kontrollierter Expression von *rhIAB* in *P. putida* KT2440. Der bemerkenswert hohe Titer hier lässt sich vermutlich durch die Hochzelldichtekultivierung und den Einsatz von 15 g/L Antischaum-Materialien erklären. Weiterhin wurde gezeigt, dass alternative Kohlenstoffquellen zur Etablierung neuer Stoffwechselkapazitäten sowie die chromosomale Integration zur Expression als alternative Strategien zur RL-Produktion eingesetzt werden können (Bator et al., 2020).

Auffällig ist, dass bislang vor allem Plasmide zur heterologen RL-Produktion verwendet wurden. Auf dieser Basis wurden bspw. der synthetische Hybrid-Promotor  $P_{tac}$  (Ochsner et al., 1995; Wittgens et al., 2011; Wittgens et al., 2017), völlig unterschiedliche synthetische Promotoren (Beuker et al., 2016a, b; Tiso et al., 2016; Wigneswaran et al., 2016; Noll et al., 2019), oder das native Operon aus *P. aeruginosa* inklusive *rhIRI* (Cha et al., 2008; Cao et al., 2012) eingesetzt. Ein systematischer Vergleich verschiedener Expressionskonstrukte in stabilen und Plasmid-freien Expressionssystemen wurde dabei bislang nicht betrachtet.

## I.4 Zielsetzung

Rhamnolipide sind mikrobiell produzierte Tenside, die als leicht abbaubare und auf Basis nachwachsender Rohstoffe herstellbare Alternative zu Erdöl-basierten Tensiden verwendet werden können. Allerdings ist die industrielle Nutzung von Rhamnolipiden und anderen mikrobiellen Tensiden durch hohe Rohstoffkosten, aufwändige Herstellungsprozesse und eine geringe Produktivität der Organismen bislang stark eingeschränkt. Aus diesem Grund sind Bestrebungen die Rohstoff- und Produktionskosten zu senken, Ausbeuten zu erhöhen und Produkteigenschaften zu optimieren vielversprechende Ansätze, um die Konkurrenzfähigkeit von Biotensiden auf dem Markt zu verbessern. Im Sinne einer nachhaltigen Bioökonomie sollten in dieser Arbeit verschiedene Rhamnolipid-Produzenten des vielversprechenden Produktionswirts *P. putida* KT2440 konstruiert und hinsichtlich ihrer Rhamnolipid-Produktion evaluiert werden.

Hierzu sollten im ersten Schritt als notwendige Grundvoraussetzungen für solche Studien Werkzeuge (i) zur Stammerzeugung, Online-Verfolgung der Zielgenexpression und schnellen Quantifizierung der Rhamnolipid-Produktion etabliert werden. Dies umfasst eine *toolbox* zur effektiven Konstruktion und zum Screening von Rhamnolipid-Produzenten. Die Erzeugung verschiedener Expressionskassetten von Rhamnolipid-Biosynthesegenen sollte hierbei standardisiert werden, indem auf Basis des TREX-Systems eine generalisierte Strategie zur Integration von Expressionskassetten in die *attTn7*-Stelle in bakteriellen Genomen verfolgt wird. Dieses ermöglicht es, verschiedene Promotoren und Gene modular und schnell auszutauschen und sie aufgrund der Standardisierung direkt miteinander zu vergleichen. Hierzu sollen verschiedene Transkriptionsreporter hinsichtlich der Verfolgbarkeit der Expression und der Nutzbarkeit als Online-Sensor während der Kultivierung untersucht werden.

Mithilfe dieser Werkzeuge sollten *P. putida* KT2440-Produktionsstämme mit verschiedenen Expressionsmodulen zur Rhamnolipid-Produktion (ii) konstruiert und anschließend vergleichend evaluiert werden. Hierbei sollen verschiedene bekannte konstitutiv aktive, putativ in der stationären Wachstumsphase aktive sowie induzierbare Promotorsysteme für *P. putida* KT2440 in Kombination mit den *P. aeruginosa* PAO1 Genen *rhIAB* verglichen werden. Betrachtete Zielparameter sind das Wachstum, das Induktionsverhalten, die Transkript- und Monorhamnolipid-Akkumulation sowie die Stabilität der Produktion. Ziel ist es, einen sehr stabilen Produktionsstamm zu generieren, der im Labormaßstab hohe Produktionstiters (> 1 g/L oder höher) liefert.

Abschließend sollten für den vielversprechendsten Kandidaten die Rhamnolipid-Produktion bzgl. der zuvor genannten Parameter optimiert werden (iii), indem u. a. die Auswirkungen zusätzlich exprimierter Gene z. B. zur Vorläufermolekülsynthese untersucht werden.

Zudem sollten weitere mögliche Anwendungen dieses Systems initial getestet werden (iv), z. B. durch Austausch von *rhIAB* durch Glycosyltransferasegene aus anderen Organismen zur Erzeugung alternativer Glykolipide. Abschließend sollen Zukunftsstrategien zur Verbesserung der Rhamnolipid-Produktion ermittelt werden.

## II Material und Methoden

Alle Experimente mit biologischen und chemischen Arbeitsstoffen wurden entsprechend der Definition in der Biostoff- und Gefahrstoffverordnung (BioStoffV; GefStoffV) durchgeführt. Bei der Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) wurden die im Gentechnikgesetz (GenTG) und in der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) angegebenen Sicherheitsmaßnahmen berücksichtigt.

### II.1 Biologische, chemische und technische Materialien

Die Lagerung und Entsorgung der biologischen und chemischen Materialien erfolgte anhand der in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern angegebenen Richtlinien im IMET, HHU. Alle experimentellen Daten wurden auf den jeweiligen Geräten und zusätzlich in dem Forschungszentrum Jülich internen Serversystem gespeichert.

#### II.1.1 Vektoren, Stämme und Oligonukleotide

Die verwendeten Vektoren wurden aus der Sammlung des IMET, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf oder über Kooperation mit dem iAMB, RWTH Aachen bezogen.

Tab. II-1: Überblick über die verwendeten und erzeugten Vektoren.

	Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz	
Vektoren	Vektor-Rückgrat			
	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i>	CENARS, pMB1 ori, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>SC_URA3</i> , <i>P<sub>lac</sub></i>	Domröse et al. 2017	
	YCp50-poly- <i>Amp<sup>R</sup></i>	CENARS, pMB1 ori, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>SC_URA3</i> , <i>P<sub>lac</sub></i>	Weihmann, IMET, nicht veröffentlicht	
	yTRES	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>L- &amp; R-TRES</i> (oriT, Tn5-L, <i>P<sub>T7</sub></i> , CIS, <i>P<sub>T7</sub></i> , <i>Tc<sup>R</sup></i> , Tn5-R, <i>tnp5</i> )	Domröse et al. 2017	
	yTRES- <i>Amp<sup>R</sup></i>	YCp50-poly- <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>L- &amp; R-TRES</i> (oriT, Tn5-L, <i>P<sub>T7</sub></i> , CIS, <i>P<sub>T7</sub></i> , <i>Tc<sup>R</sup></i> , Tn5-R, <i>tnp5</i> )	Weihmann, IMET, nicht veröffentlicht	
	pVLT33	pRSF1010 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>EC_lacI</i> , <i>P<sub>lac</sub></i>	de Lorenzo et al., 1993	
	pUC18-mini-GM	pMB1 ori, <i>Amp<sup>R</sup></i> , FRT-L, Tn7-L, <i>Gm<sup>R</sup></i> , Tn7-R, FRT-L	Choi et al., 2005	
	pMK-RQ-YT_core	ColE1 ori, <i>Km<sup>R</sup></i> , Tn7-L, YT_core, Tn7-R (Gensynthese)	diese Arbeit; Weihmann, IMET, nicht veröffentlicht	
	pTNS1	pR6K λ pir ori, <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>tns7ABCD</i>	Choi et al., 2005	
	Promotoren und Gene			
	pBNTmcs(t)Km	pBBR1 ori, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>nagA</sub></i> , <i>CT_nagR</i>	Verhoef et al., 2010	
	pAra-final	pBR322 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>BAD_GFPmut3</sub></i> , <i>EC_araC</i> , <i>P<sub>lac_EC_araE</sub></i>	Binder, 2016	
	pSK02	pR6K λ pir ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , Tn7-L, <i>P<sub>Jf9</sub>_BCD2_PA_rhlAB</i> , Tn7-R	Bator et al., 2020	
	pBBR1_BG_rhlABC	pBBR1ori, oriT, <i>Tc<sup>R</sup></i> , <i>EC_lacZ</i> , <i>P<sub>T7</sub></i> , <i>P<sub>lac_BG_rhlABC</sub></i>	Wittgens, 2013	
	pASKInt110	f1 ori, ColE1 ori, <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>EC_tetR</i> , <i>P<sub>tetA_EC_eaeA</sub></i>	Adams et al., 2005	
	pVLT33-PA_rhlABC	pRSF1010 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>EC_lacI</i> , <i>P<sub>lac_PA_rhlABC</sub></i>	Wittgens, 2013	
	pRhon5Hi-2-eYFP	pBBR1 ori, oriT, <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>pelB</i> , <i>P<sub>nifH5_eYFP</sub></i>	Troost et al., 2019	
	pRhotHi-2-mTag-BFP2	pBBR1 ori, oriT, <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>pelB</i> , <i>P<sub>T7_mTagBFP2</sub></i>	Endres, IMET, nicht veröffentlicht	
	pAra-mCherry	pBR322 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>BAD_mCherry</sub></i> , <i>EC_araC</i> , <i>P<sub>lac_EC_araE</sub></i>	Hilgers, IMET, nicht veröffentlicht	
	pLO03	pBR322 ori, oriT, <i>Sm<sup>R</sup></i> , <i>Spc<sup>R</sup></i> , <i>PA_algC_full</i>	Op de Hipt, iAMB, nicht veröffentlicht	
pVLT33-PA_algC	pRSF1010 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>EC_lacI</i> , <i>P<sub>lac_PA_algC</sub></i>	Wittgens, 2013		
pVLT33-PA_rmlBADC	pRSF1010 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>EC_lacI</i> , <i>P<sub>lac_PA_rmlBADC</sub></i>	Wittgens, 2013		
pSB01	ColE1 ori, oriT, <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>syn2_PA_rhlA</sub></i>	Tiso et al., 2017b		
pWJ02	pBBR1 ori, oriT, <i>Tc<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>syn16_PA_rhlABC</sub></i>	Tiso et al., 2017b		
pPS05	pBBR1 ori, oriT, <i>Tc<sup>R</sup></i> , <i>Km<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>syn16_PA_rhlAB</sub></i>	Tiso et al., 2016		

Fortsetzung von Tab. II-1. Die *attTn7*-Integration vermittelnden *yTREX-toolbox* Basisvektoren sind kursiv dargestellt.

<i>yTREX-toolbox</i>		
<i>pYTSK00K_0x7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK01K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit; (Genbank Accession Nr. MT522186)
<i>pYTSK02A_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Amp<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK03K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>lac</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK04K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>PP_4593</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK05K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>rpos</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK06K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>hupA</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK07K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>bolA</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK08K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>BAD/araC</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK09K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>rhaP<sub>BAD/rhaRS/P<sub>lac</sub>-rhaT</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK10K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	Tiso et al., 2020
<i>pYTSK12K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>mtIE/mtlR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK13K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>TetA/tetR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK20K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlABC</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK22K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlA</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK31K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK33K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>lac</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK34K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>PP_4593</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK35K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>rpos</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK36K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>hupA</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK37K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>bolA</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK38K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>BAD/araC</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK39K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>rhaP<sub>BAD/rhaRS/P<sub>lac</sub>-rhaT</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK40K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	Tiso et al., 2020
<i>pYTSK42K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>mtIE/mtlR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK43K_1G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>TetA/tetR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>eYFP</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK51K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK54K_7G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>lacZ</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK55K_2G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>mTagBFP2</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK56K_3G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>mCherry</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK57K_3G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>mCherry</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK58K_6G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, B7088_RS11490, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK61K_2G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB</i> , CIS II, <i>mTagBFP2</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK62K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC+PA_algC_full</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK63K_0G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I, <i>P<sub>nagAa/nagR</sub>+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC+PA_algC</i> , CIS II, <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit
<i>pYTSK65K_8G7</i>	YCp50-poly- <i>Km<sup>R</sup></i> , L- & R-TREX (oriT, Tn7-L, CIS I & II, <i>gus</i> , <i>Gm<sup>R</sup></i> , <i>tns7A-D</i> , Tn7-R)	diese Arbeit

*yTREX-toolbox*

Expressionsstudien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen lagen in der Stammsammlung des IMET, HHU-Düsseldorf vor oder wurden durch Kooperation mit dem iAMB, RWTH Aachen bezogen.

Tab. II-2: Überblick über die verwendeten und erzeugten Stämme.

	Organismus	Stamm	Relevante genotypische Merkmale	Referenz	
Wildtypen und Mutanten	<i>S. cerevisiae</i>	VL6-48	<i>MATa, HIS3-Δ200, TRP1-Δ1, URA3-52, IYS2, ADE2-101, MET14</i>	Kouprina et al., 1998	Klonierung
	<i>E. coli</i>	S17-1	<i>recA, thi, pro, hsdR M<sup>+</sup> [RP4 2-Tc<sup>R</sup> Mu Km<sup>R</sup>Tn7] Tp<sup>R</sup> Sm<sup>R</sup></i>	Simon et al., 1983	
	<i>E. coli</i>	DH5α	<i>F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk, mk<sub>+</sub>)</i>	Hanahan, 1983	
	<i>P. protegens</i>	Pf-5	<i>phoA supE44λ<sub>max</sub> thi<sup>1</sup> gyrA96 relA1</i> Wildtyp	Loper et al., 2007	
Wildtypen und Mutanten	<i>P. putida</i>	KT2440	Wildtyp (Plasmid-kuriertes Derivat von <i>P. putida</i> mt-2)	Bagdasarian et al., 1981	Klonierung
	<i>P. putida</i>	GR18	<i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pvd $\Delta$ flag $\Delta$ alg $\Delta$ bc $\Delta$ pea $\Delta$ peb $\Delta$ lapA $\Delta$ lapF	Bator, 2020	
	<i>P. putida</i>	EvoSal	<i>P. putida</i> KT2440 $\Delta$ pvd $\Delta$ flag $\Delta$ alg $\Delta$ bc $\Delta$ pea $\Delta$ peb $\Delta$ lapA $\Delta$ lapF evolviert gegen Salicyllattoleranz	Dias, 2019	
attIn7-Integration	<i>P. putida</i>	KT <sub>ffg</sub> mRL	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>ffg</sub> +BCD2+rhlAB, Gm <sup>R</sup>	Tiso et al., 2020	Expressionsstudien
	<i>P. putida</i>	KT <sub>K</sub>	<i>P. putida</i> KT2440 Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>K<sup>E</sup></sub>	<i>P. putida</i> KT2440 eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>lac</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>lac</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>4593</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>pp_4593</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>rpoS</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>rpoS</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>hupA</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>hupA</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>bolA</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>bolA</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>araC</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>BAD/araC</sub> +BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>rha</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 rhaP <sub>BAD</sub> /rhaRS/P <sub>lac</sub> -rhaT+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	Tiso et al., 2020	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>mtlE</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>mtlE</sub> /mtlR+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>tetR</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>TetA</sub> /tetR+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>K<sup>C</sup></sub>	<i>P. putida</i> KT2440 mCherry, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL <sup>C</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+ PA_rhlAB, mCherry, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>K<sup>B</sup></sub>	<i>P. putida</i> KT2440 mTagBFP2, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL <sup>B</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+ PA_rhlAB, mTagBFP2, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> dRL	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlABC, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit	
	<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL <sup>BG</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+BG-rhlAB, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	Kirschen, 2018	
<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> dRL <sup>BG</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+BG-rhlABC, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	Linden, IMET, nicht veröffentlicht		
<i>P. putida</i>	GR <sub>saI</sub> mRL	<i>P. putida</i> KT2440 GR18 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		
<i>P. putida</i>	GR <sub>saI</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 GR18 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		
<i>P. putida</i>	Evo <sub>saI</sub> mRL <sup>E</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 EvoSal P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB, eYFP, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		
<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL+Rha	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		
<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL+Rha+G1P <sup>F</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC+PA_algC <sub>full</sub> , Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		
<i>P. putida</i>	KT <sub>saI</sub> mRL+Rha+G1P <sup>S</sup>	<i>P. putida</i> KT2440 P <sub>nagAa</sub> /nagR+BCD2+PA_rhlAB+PA_rmlBDAC+PA_algC, Gm <sup>R</sup> , tns7A-D	diese Arbeit		

Verwendete Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software Clone-Manager 9.2 (Sci-Ed; **Tab. II-8**) geplant und in Auftragsarbeit durch die Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bereitgestellt. Oligonukleotide die zur *in vivo* Rekombination eingesetzt wurden, enthielten 30 bp lange homologe Rekombinationsbereiche für die Ermöglichung der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* (II.2.5).

Tab. II-3: Überblick der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	DNA-Matrize
yTREX-toolbox (Tn7-Variante)-Grundgerüst		
fw_HMF_Gm	CAAGATTGGCGGAGAGTCCCATTGACATAAGCCTGTTCCGGTTC	pUC18-mini-GM
rv_Gm_HMR	AGATCCGTCGTTCTGGATACACCCATAATACCCATAATAGCTGTTTGCCAGTCGACTTAGGTGGCG GTAAGTGGGTCG	
fw_HMR_tnsD	CTCTGACCGATCAGTTTAGTCACTCTTCCCATAAACCATTTCGAAGAA	pTNS1
rv_Tn7R_HBy	ATTGATCACCGATATATGGACTTCCACCACTAGTCCCAGGTCGAGATGCCGCATGTG	
Fw_SynSK	CAGGAACCGGGCGCGCACATTTCCCAGATGTGGGCGGACAAAATAG	pMK-RQ-YT_core
Rv_SynSK	AACCGAACAGGCTTATGTCAATGGGACTCTCCGCCAAATC	
Fw_KleSK	GACCCAAAGTACCGCCACCTAAGTCGACTGGCAAACAGCTATTATG	
Rv_KleSK	TTCTTGGAAATGTTTATGGGGAAGAGTGACTAACTGATCGGTCAGAG	
Promotoren		
fw_CIS I_lac_BCD2	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACTTTAACACTTTATGCTCCGGCTCGTATAATGCCCAAGT TCACTTAAAAAGG	pSK02
fw_CIS I_P4593_BCD2	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACCGCCGTACAAGCCTGCGCAAAGACAGCTATCCTCAA TGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAG	
fw_CIS I_PrpoS_BCD2	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACAGGGAGAAAGTGCCGCTCGAGTCTGAGTTCGAACT CAGCAAAGGGCCCAAGTTCACCTAAAAAG	pAra-final
fw_CIS I_PhupA_BCD2	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACCTGCGGTGCCTTGAGCGTCTCCAGAGGCGACAGC GCATAACAACAAGGCCCAAGTTCACCTAAAAAG	
fw_CIS I_PebolA_BCD2	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACATTTGTTGTTAAGCTGCAATGGAACCGTAAAAAGCGG CTAGTATTTAAGCCCAAGTTCACCTAAAAAG	E. coli DH5α
rv_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGAT	
fw_CIS I_AraEC	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACTCAGACGCCGATATTTCTC	pBNTmcs(t)Km
rv_PBADara_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGATGTTTCAGTACGAAAATTGCTTTCATTGTTGATCTCCTTTT AAGTGAACCTTGGGCGAGCCAAAACGGGTAT	
fw_CIS I_PtacRhaT	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTCATCTCGTC GGAGATGTG	pASKInt110
rv_PBADrha_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGATGTTTCAGTACGAAAATTGCTTTCATTGTTGATCTCCTTTT AAGTGAACCTTGGGCGTGAATTTTCATTACGACCACTCT	
fw_CIS I_NagR	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACAGTCAATATGGGTTTGCTGGAAGCTTATG	P. protegens Pf-5
rv_PnagAa_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGATGTTTCAGTACGAAAATTGCTTTCATTGTTGATCTCCTTTT AAGTGAACCTTGGGCGGTACCTCCTGTTTCC	
fw_CIS I_TetR	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACTTAAGACCCACTTTCACAT	pRhon5-eYFP
rv_TetR	CAATAACCTGATAAATGCTTCAA	
fw_TetR_PtetA	ATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCCATCGAATGGCCAGATG	pRhotHi-2 mTag-BFP2
rv_PtetA_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGATGTTTCAGTACGAAAATTGCTTTCATTGTTGATCTCCTTTT AAGTGAACCTTGGGCTTTTTGCCCTCGTTATCTAG	
fw_CIS I_mtlR	CGGCGAACAGTATAAGCAGATTGACTCACTCAGCCGAGGTTCTGTTC	pAra-mCherry
rv_mtlR	GGGCGCAACCTGAGAAC	
fw_mtlR_PmtIE	CCAGAGAAGGCGTTCTCAGGGTTGGCGCCGACCGGAAAAAGCCAGTG	pVLT33-PA_rhlABC
rv_PmtIE_BCD2	TAGAAAACCTCCTTAGCATGATTAAGATGTTTCAGTACGAAAATTGCTTTCATTGTTGATCTCCTTTT AAGTGAACCTTGGGCGGTTCACTCTGCTCGCCGGTGAG	
fw_CIS II_eYFP	CAATTACTCGGACTTCTCAATACGTGCTGCAAAACTTTAGAAAGGAGATATACCATGGTGAGCAAG GGCGAGGAG	pVLT33-PA_rmlBADC pVLT33-algC
rv_eYFP_HB-R-rv	TCTGGGTTAAGCGTGTCTTACACAACAGCACAAAGTAAAGCTTACTGTACAGCTCGTCCATG CAATTACTCGGACTTCTCAATACGTGCTGCAAAACTTTAGAAAGGAGATATACCATGAGCGAGCTGA TTAAG	
fw_CIS II_mtagBFP2	CTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGCGCGCTCACTCGAGATTAAGCTGTGCCCGATTTG TACTCGGACTTCTCAATACGTGCTGCAAAACTTTAGAAAGGAGATATACCATGGTGAGCAAGGGC GAGG	pL003
rv_mtagBFP2_HB-R-rv	CTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGCGCGCTCACTCGAGATTAAGCTGTGCCCGATTTG TACTCGGACTTCTCAATACGTGCTGCAAAACTTTAGAAAGGAGATATACCATGGTGAGCAAGGGC GAGG	
fw_CIS II_mCherry	CTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGCGCGCTTACTGTACAGCTCGTCCA	pVLT33-PA_rmlBADC pVLT33-algC
rv_mCherry_HB-R-rv	ACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTAATGCGGCGGAAAGTCTG	
fw_BCD2_PA-rhlAB	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGACGAGCCTTC	pVLT33-PA_rmlBADC pVLT33-algC
rv_PA-rhlAB_I-SceI_CIS II	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTACTAGGCCTTGGCCTTG AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGCGTAGCCGATG AGGGGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCTGCTGCAACGGACAACCACTGCTTGAAC	
rv_PA-rhlA_I-SceI_CIS II	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGCGTAGCCGATG	pVLT33-PA_rmlBADC pVLT33-algC
fw_rhlB_rmlB	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGCGTAGCCGATG GCAAGGCATTGCGGACGCCGACTGCTTCCCTGAGATTGGAGCAAACCCCATCATGAG	
rv_rmlC_I-SceI_CIS I	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGCGTAGCCGATG	pVLT33-PA_rmlBADC pVLT33-algC
fw_rmlC_algC	AATAGCGGAGATTGAGTCGATACCCAGAGATTACCTGTTATCCCTATCAGGCGTAGCCGATG GAG	
rv_algC_I-SceI_CIS I	GCAAGGCATTGCGGACGCCGACTGCTTCCCTGAAGACCGGAGGAGACGCGGCATGAAGCTTTTC CAGCGCACCGCCAA	pL003
fw_rmlC_algC_full	GCAAGGCATTGCGGACGCCGACTGCTTCCCTGAAGACCGGAGGAGACGCGGCATGAAGCTTTTC CAGCGCACCGCCAA	
Integrationsbestimmung		
PTn7L_rv	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	Tn7-rekombinante P. putida KT2440
PTn7R_fw	CACAGCATAACTGGACTGATTTCC	
Pput-glmS_fw	AGTCAGAGTTACGGAATTGTAGG	
Pput-glmS_rv	TTACGTGGCCGTGCTAAAGGG	

Fortsetzung von Tab. II-3.

Sequenzierungen		
Seq_yTREX_Reporter_fw	CTCAATCTCGCGCTATTGTG	Reporter (R-TREX) Marker (L-TREX) Cluster (CIS) seqTRESrev
Seq_yTREX_Reporter_rv	CCATGGACGCGTAGTCGTAG	
Seq_yTREX_Marker_fw	TACGACTACGCGTCCATGGC	
Seq_yTREX_Marker_rv	GCCAAATTGCGTCAAGATCC	
Seq_yTREX_Cluster_fw	AGTGGCTCGTTACCTCGTTC	
Seq_yTREX_Cluster_rv	GAGGAAGTCGCGAGTAATTG	
AD42	GGCGAATCATGGACATAC	
RT-qPCR		
PA-rhIA_fw-RT	GAGCGCTTCGAGGTCAATCA	cDNA
PA-rhIA_rv-RT	CATGCCTGGTTCAGTCCAG	
PA-rhIB_fw-RT	CGCTGTTTCGACGGCAGTATC	
PA-rhIB_rv-RT	AGGGCCATGGCGTAGAAGTC	
PP-rpoB_fw-RT	ATGCTCACAGTGAAGTCGGA	
PP-rpoB_rv-RT	CGAGCGAACGGATCTCTTTG	
AV-eYFP_fw-RT	AAGGGCATCGACTTCAAGGA	
AV-eYFP_rv-RT	TGTTGTGGCGGATCTTGAAG	

II.1.2 Molekularbiologische Kits, Medien, Puffer, Lösungen, Chemikalien und Enzyme

Zur Nukleinsäureisolation, -elution und -amplifikation (II.2.7; II.2.8; II.2.10; II.2.11; II.2.12) wurden die in Tab. II-4 dargestellten molekularbiologischen Kits verwendet.

Tab. II-4: Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Kits.

	Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
Molekularbiologische Kits	DNeasy Blood & Tissue Kit	DNeasy Spin-Säulen; Proteinase K; Puffer AE/ AL/ ATL/ AW1 & AW2; Sammelbehälter (2 mL); Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
	NucleoBond® Xtra Midi Kit	Resuspensionspuffer; Lysepuffer; Neutralisationspuffer; Waschpuffer; Equilibrierungspuffer; Elutionspuffer; RNase A; Tris-Puffer; NucleoBond® Xtra Midi-Säulen und Filter; NucleoBond® Finalisierer; 1 mL und 30 mL Einwegspritzen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
	innuPREP DOUBLEpure Kit	Gellöser; Bindepuffer; Bindungsoptimierer; Waschlösung LS; Elutionspuffer; Sammelbehälter (2 mL); Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL); DOUBLEpure Spin-Säulen	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
	innuPREP Plasmid Mini Kit	Resuspensionspuffer; Lysepuffer; Neutralisationspuffer; Waschlösung A & B; Elutionspuffer; Sammelbehälter (2 mL); Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL); Plasmid Spin-Säulen	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
	Phusion GC Buffer Pack	5X Phusion GC Puffer; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; DMSO	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	dNTP Mix	10 mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	NucleoSpin® RNA Kit	Puffer MDB/ RA1/ RA3/ RAW2; rDNase; Puffer rDNase; RNase-freies H <sub>2</sub> O; NucleoSpin® Filter; NucleoSpin® RNA Säulen; Sammelbehälter (2 mL); Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
	DNA-free™ DNA Removal Kit	Puffer rDNase I; rDNase I; Dnase Inaktivierungsreagent; Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	RNase-free DNase Set	Puffer RDD; DNase I; RNase-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
	Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit	2X MasterMix (SYBR® Green 1; AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP; dNTPs; Passive Referenz 1; Puffer); 125X RT Enzymmix (ArrayScript™ UP Reverse Transkriptase; RNase Inhibitor)	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA

Die Puffer, Lösungen und Medien wurden, insofern nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert (Spitzenvorsatzfilter; 0,2 µm; PES; **Tab. II-7**).

**Tab. II-5: Übersicht der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.**

	Bezeichnung	Zusammensetzung
Medien	M9	8,5 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 3 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g/L NaCl; 1 g/L NH <sub>4</sub> Cl; 2 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,001% (w/v) Thiamin und 1 mL/L US Spurenelemente (82,81 mL/L 37% rauchende HCl; 4,87 g/L FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 4,12 g/L CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 1,5 g/L MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O; 1,87 g/L ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 0,3 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,25 g/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 0,15 g/L CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O; 0,84 g/L Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O) (zur Produktion von Biotensiden + 30 g/L Glucose)
	LB	10 g/L Trypton; 10 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt (+ ggf. 15 g/L Agar-Agar für LB-Agarplatten) (zur Produktion von Biotensiden: +50 mL/L 20% Glucoselösung)
	TB	12 g/L Trypton; 24 g/L Hefeextrakt; 4 mL/L Glycerin; 2,13 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 12,54 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	Blutagar	Herz-Infus 10 g/L; NaCl 5 g/L; Pepton aus Fleisch 10 g/L; Agar 15 g/L; pH 7,3; + 5% Schafsblut
	YPD	20 g/L Pepton; 10 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Glucose (+ 20 g/L Agar-Agar für LB-Agarplatten)
	SD-Ura	100 mL/L 10X YNB-Mix (67 g/L YNB; 19,26 g/L SC-Ura); 100 mL/L 20% Glucoselösung (+ 20 g/L Agar-Agar für LB-Agarplatten)
Puffer	DNA (5x)	100 mM EDTA; 43% (v/v) Glycerin; 0,01% (w/v) BPB
	Tris-HCl	100 mM Tris; HCl auf pH 8,0
	PBS	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH8
	TBE (0,5x)	89 mM Tris; 89 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 2,5 mM EDTA
	TE	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
Lösungen	CaCl <sub>2</sub>	100 mM CaCl <sub>2</sub> , 15% (v/v) Glycerin
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	LiAc	100 mM LiAc
	Tween 80	100 mM
	HCl	1 M HCl
	NaOH	0,5 M NaOH
	BTB	0,2 mM BTB in PBS-Puffer
	CPC	0,3 mM CPC in PBS-Puffer
	Orcinol	1,6% (w/v) Orcinol
	Lyticase	5 U/µL Lyticase aus <i>Arthrobacter luteus</i> in TE-Puffer
	RNase	100 g/L RNase A aus Rinderpankreas
	PEG 3350	500 g/L Polyethylenglycol 3350
	20% Glucose	200 g/L Glucose
50% Glucose	500 g/L Glucose	

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden, vorausgesetzt in **Tab. II-6** nicht ausdrücklich erwähnt, über die ThermoFisher Scientific GmbH (Waltham, USA) bezogen. Die verwendeten Chemikalien hatten eine für die benötigte Anwendung adäquate Reinheit.

**Tab. II-6: Übersicht über Enzyme und Chemikalien.**

	Bezeichnung	Bezugsquelle
Enzyme	Restriktionsendonukleasen	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	I-SceI ( <i>Homing</i> -Endonuklease)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
	Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	FastAP Alkaline Phosphatase	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	RNase A aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	Lyticase aus <i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Chemikalien	Agar-Agar Kobe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Acetonitril	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Agarose	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
	Amp	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
	Anhydrotetracyclin	Toku-E Biosciences AG, Bellingham, USA
	L-Arabinose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Blutagarbasis	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	BPB	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
	BTB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	CPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	Chloroform	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
	EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Fortsetzung von Tab. II-6.

Chemikalien	<p>Essigsäure          Ethanol          Ethylacetat  <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}</math>          GeneRuler™ 1 kbp/ 150 bp Plus          Glucose          Glycerin          Gm  <math>\text{H}_3\text{BO}_3</math>          HCl          Hefeextrakt          Irg          Isopropanol          IPTG  <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>          Km          Lachssperma SS DNA          LB          LiAc          D-Mannitol          Methanol  <math>\text{MgCl}_2</math>  <math>\text{MgSO}_4</math>          MIDORI<sup>Green</sup> Advance  <math>\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}</math>  <math>\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math>  <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math>  <math>\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math>          NaCl          NaOH  <math>\text{NH}_4\text{Cl}</math>          Nuklease-freies <math>\text{H}_2\text{O}</math>          Orcinol          Paraffinöl          PEG 3350          Pepton          (Mono-) Rhamnolipid <math>\geq 98\%</math>          L-Rhamnose          Salicylat          Schafsblut  <math>\text{H}_3\text{SO}_4</math>  <math>\text{SC-Ura}</math>          Sm          Spc          TB          Tc          Thiamin-HCl          Tris          Tris-HCl          Tween 80          VPBO          YNB  <math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}</math></p>	<p>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Alfa Aesar GmbH &amp; Co. KG, Haverhill, USA          ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland          GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Nippon Genetics Europe GmbH, Dürren, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Geyer Th. GmbH &amp; Co. KG, Lohmar, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Qjagen GmbH, Hilden, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Fiebig-Nährstofftechnik GbR, Idstein, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Formedium Ltd., Norfolk, Großbritannien          GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland          AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland          Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Santa Cruz Biotechnology Inc., California, US          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland          Carl Roth GmbH &amp; Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</p>
-------------	--	---

## II.1.3 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software und Online-tools

Alle nicht ausdrücklich erwähnten Verbrauchsmaterialien und Geräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards und wurden beim marktüblichen Hersteller gekauft.

**Tab. II-7: Übersicht über Verbrauchsmaterialien und Geräte.**

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	Atmungsaktiver Viskosefilm für MTP	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Celluloseacetat-Membran 0,2 µm, Ø 25 mm, Whatman®	GE Healthcare, Maidstone, Großbritannien
	DNA LoBind Tubes, Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	ep Dualfilter T.I.P.S.®, Pipettierspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Halbmikroküvetten, PS, transparent	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
	RT-qPCR Platte 384-well, PP, F-Boden, transparent	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	Mikrotiterplatte 96-well, PS, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
	Deepwell Platte 96-well, PP, R-Boden, weiß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	FlowerPlate® MTP 48-well, OFF, B und BOH	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland
	Kryoröhrchen, CryoTubes™	Nalge Nunc International Corp. Rochester, USA
	Phenex RC Spritzenfilter, 0,2 µm, Ø 4 mm	Phenomenex Inc., Torrance, USA
Spitzenvorsatzfilter (steril), 0,2 µm	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland	
<b>Geräte</b>	7900HT Fast Real-Time, PCR-System	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	Tprofessional Basis Gradient, Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
	Wide Mini-Sub Cell GT, Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	TiMix, MTP-Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
	VKS 75 control, Vielkolben Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
	ThermoMixer® C, MTP-Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	CAMAG TLC® Visualizer 2, Dokumentationssystem	Camag AG & Co. GmbH, Muttenz, Schweiz
	TLC Sprayer, TLC-Applikator	Camag AG & Co. GmbH, Muttenz, Schweiz
	Airbrush Beginner ESB 100, Sprühdose	Revell GmbH, Bünde, Deutschland
	CellStream™, Durchflusszytometer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	m2p-labs BioLector® I, Mikrobioreaktorsystem	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland
	Stella Imaging System, Dokumentationssystem	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Staubenhardt, Deutschland
	Mikroplatten-Replikator mit 96 Pins, Replikator	Boekel Industries Inc., Feasterville, USA
	ThermoStat Plus, Inkubationsschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Mikro 200, Mikroliterzentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
	Rotina 380R, Rotor 1720, Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
	Rotator SB2, Inkubationsrotator	Cole-Parmer GmbH, Vernon Hills, USA
	Blue/Green LED Transilluminator, Dokumentationssystem	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
	Multitron Pro, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweiz
	Multitron Standard, Inkubationsschüttler	Infors AG, Basel, Schweiz
	Speed Vac-Konzentrator 5301, Vakuumzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Calimatic 766, Labor-pH-Meter	Knick GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
	Thriller®, Inkubationsschüttler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	Gel iXImager, Dokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
	Systec VX-55, Autoklav	Systec GmbH, Linden, Deutschland
	Infinite® M1000 Pro, MTP-Fluoreszenzphotometer	TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz
	GENESYS™, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
NanoDrop 2000c, UV-Vis Spektrophotometer	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA	

Zur Verwaltung, Planung, Konstruktion und Analyse von Experimenten, Dokumenten und Grafiken wurden die in **Tab. II-8** gelisteten Softwares und Online-*tools* verwendet.

**Tab. II-8: Übersicht der verwendeten Softwares und Online-*tools*.**

	Bezeichnung	Bezugsquelle/ URL
Lizenzsoftware	Microsoft Windows 10	Microsoft Corp., Redmond, USA
	ChemBioDraw-Ultra-18.0	PerkinElmer, Waltham, USA
	Clone-Manager 9.2	Scientific and Educational Software, Denver, USA
	i-control 1.11	TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz
	Mendeley Desktop	Mendeley Ltd., London, Großbritannien
	MEGA-X	Pennsylvania State University, State College, USA
	Microsoft Office 2019	Microsoft Corp., Redmond, USA
	Vision CATS	Camag AG & Co. GmbH, Muttenz, Schweiz
	SDS 2.3	ThermoFisher Scientific GmbH, Waltham, USA
	PyMOL	Schrödinger GmbH, München, Deutschland
	IntasApp	Intas Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
	CellStream Analysis	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Chimera 1.14	RBVI-UCSF, San Francisco, USA
BioLectio 2	m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland	
Datenbanken	<i>Pseudomonas</i> GenomeDB	<a href="http://www.pseudomonas.com/">http://www.pseudomonas.com/</a>
	<i>Burkholderia</i> GenomeDB	<a href="http://www.burkholderia.com/">http://www.burkholderia.com/</a>
	CAS SciFinder	<a href="http://scifinder.cas.org">http://scifinder.cas.org</a>
	Fpbase	<a href="https://www.fpbases.org/">https://www.fpbases.org/</a>
	DSMZ	<a href="https://www.dsmz.de/">https://www.dsmz.de/</a>
	RCSB Proteindatenbank (PDB)	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
	KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
Powerpoint Templates Servier (SERVIER GmbH)	<a href="https://smart.servier.com/">https://smart.servier.com/</a>	
Online- <i>tools</i>	Laborbuch <i>labfolder</i>	<a href="https://labfolder.hhu.de/">https://labfolder.hhu.de/</a>
	BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
	RNAstructure Webservers	<a href="https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html">https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html</a>
	RBS calculator v2.0	<a href="https://salislab.net/software/">https://salislab.net/software/</a>
	Random DNA sequence generator	<a href="http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm">http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm</a>
	BPROM	<a href="http://www.softberry.com/berry.phtml">http://www.softberry.com/berry.phtml</a>
	ARNold	<a href="http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/">http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/</a>
	Primer3Web	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a>
	SMS2, DNA Molecular Weight	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html">http://www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html</a>
Double Digest Calculator	<a href="https://www.thermoFisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html">https://www.thermoFisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html</a>	

## II.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

Die im Folgenden aufgelisteten Methoden behandeln den Umgang mit nicht kontaminierten Materialien. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden verwendete Materialien vor Gebrauch durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren sterilisiert oder bereits kontaminationsfrei erworben. Ein kontaminationsfreier Umgang mit steril zu haltenden biologischen und chemischen Arbeitsmaterialien wurde mit Hilfe eines Bunsenbrenners gewährleistet. Erlenmeyerkolben (EMK) wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und durch Hitzebehandlung (120 °C, ~ 12 h) sterilisiert. Flowerplates® (m2p-labs GmbH; **Tab. II-7**) wurden zur Erhaltung der Sterilität mit einem atmungsaktiven Viskosefilm (VWR international GmbH; **Tab. II-7**) abgeklebt.

### II.2.1 Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen wurde in Anlehnung an die allgemeinen Empfehlungen der DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) durchgeführt. Zur Lagerung von Mikroorganismen wurden entsprechende Kulturen mit Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen (Nalge Nunc International Corp.; CryoTubes™) gelagert (**Tab. II-9**).

**Tab. II-9: Standardkultivierungs- und Lagerungsbedingungen der verwendeten Mikroorganismen.**

Mikroorganismen	Medien	Inkubationsschüttler [rpm]	Temperatur [°C]	Kultivierungsdauer [h]	Lagerung
<i>E. coli</i> DH5α/ <i>E. coli</i> S17-1	LB	VKS 75 control: 130	37	Festmedium: 24	-20 °C: 20% Glycerin
				Flüssigmedium: 18	-80 °C: 50% Glycerin
<i>P. putida</i> KT2440	LB	Multitron Standard: 130	30	Festmedium: 24	-20 °C: 20% Glycerin
				Flüssigmedium: 18	-80 °C: 50% Glycerin
<i>S. cerevisiae</i> VL6-48	YPD	Multitron Standard: 130	30	Festmedium: 48-72 Flüssigmedium: 24	-80 °C: 50% Glycerin

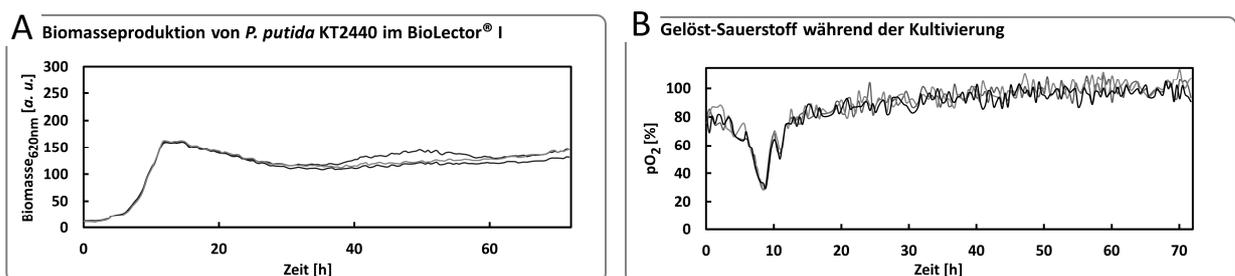
Insofern nicht anders beschrieben, wurden Mikroorganismen in Flüssigkulturen in EMK mit maximal 10%-Füllvolumen oder auf Agarplatten kultiviert. Bei vielen parallelen Flüssigkultivierungen wurde die Anzucht in Flowerplates® durchgeführt (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-OFF; 1 mL; 1000 rpm; ü. N.; Eppendorf AG; ThermoMixer® C oder Edmund Bühler GmbH; TiMix; **Tab. II-7**). Alle flüssigen Vorkulturen wurden, falls nicht abweichend beschrieben, stets mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit 100 µL einer Kryokultur inokuliert. Zudem befanden sich je nach Bedarf in einer Kultur zum Stamm adäquate Antibiotikakonzentrationen zur Einstellung eines Selektionsdruckes (**Tab. II-10**).

Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* DH5α wurde TB-Medium verwendet (**Tab. II-5**). Um das Wachstum von Uracil-auxotrophen, Plasmid-freien *S. cerevisiae* VL6-48 auszuschließen, wurde SD<sub>-Ura</sub>-Medium verwendet (II.2.7).

## II.2.1.1 Kultivierung von rekombinanten *P. putida* KT2440 für Expressions- und Produktionsstudien

Zur Kultivierung von *P. putida* KT2440 für verschiedene Expressions- und Produktionsstudien wurden LB- bzw. M9-Medien mit 10 bzw. 30 g/L Glucose in sterilen Flowerplates® verwendet und nach Angaben von m2p-labs GmbH zur optimalen Versorgung mit gelöst-Sauerstoff kultiviert (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-OFF; 1,2 mL; 30 °C; 1200 rpm; Eppendorf AG; ThermoMixer® C oder m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-B oder BOH; 1,2 mL; 30 °C; 1200 rpm; m2p-labs GmbH; BioLector® I). Hauptkulturen wurden aus einer entsprechenden Vorkultur auf eine  $OD_{580nm} = 0,05$  inokuliert und unter entsprechendem Selektionsdruck zur Repräsentation der logarithmischen Wachstumsphase maximal 6 h oder bis zu 48 h kultiviert. Hierbei wurde stets eine biologische Dreifachbestimmung durchgeführt. Vorausgesetzt, dass eine Induktion der Expression von Zielgenen notwendig war, wurde dies nach 3,5 h, insofern nicht anders angegeben, durch Zugabe des Induktors (maximal 3% des Gesamtvolumens; nach Tiso et al., 2020; s. **Tab. II-10**) erreicht.

Die Gewährleistung einer ausreichenden Sättigung des Mediums mit gelöst-Sauerstoff ist essenziell, da dies Einfluss auf das Zellwachstum, die Expression von Zielgenen, die Produktion von Sekundärmetaboliten aber auch die Reifung des Chromophors von GFP-basierten (Jung, 2012) Fluoreszenzproteinen (hier zur Verfolgung der Transkription der Zielgene verwendet (vgl. II.3.2; III.1.1.1)) haben kann (Drepper et al., 2010). Um die ausreichende Versorgung des Mediums mit gelöstem Sauerstoff unter diesen Konditionen während der Standardkultivierungsbedingungen (s. oben) grundsätzlich zu überprüfen, wurde mit Hilfe des Mikrobioreaktorsystems BioLector® I (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-BOH; 1,2 mL; 30 °C; 1200 rpm) das Wachstum des nicht rekombinanten *P. putida* KT2440 verfolgt und der dazugehörige Sauerstoffpartialdruck des hier verwendeten Standardmediums (LB-Medium + 10 g/L Glucose) über 72 h in Dreifachbestimmung bestimmt (**Abb. II-1**).



**Abb. II-1: Bestimmung des gelöst-Sauerstoffes im Medium im BioLector® I während der Kultivierung unter ausgewählten Bedingungen.**

Zur Bestimmung des gelöst-Sauerstoff Gehaltes im Medium während der Kultivierung von *P. putida* KT2440 im BioLector® I (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-BOH; LB-Medium + 10 g/L Glucose; 1,2 mL; 30 °C; 1200 rpm; Dreifachbestimmung einzeln dargestellt) wurden die Biomasseproduktion (A) und der Verlauf des Sauerstoff-Partialdruckes (B) über 72 h aufgenommen.

Unter den hier betrachteten Kultivierungsbedingungen im Mikrobioreaktorsystem von m2p-labs (BioLector® I) und bei Verwendung von Flowerplates® (LB-Medium + 10 g/L Glucose; 30 °C; 1200 rpm; 1,2 mL Kultivierungsvolumen) zeigte sich, dass *P. putida* KT2440 wie erwartet eine hohe Zellatmungsaktivität während der logarithmischen Wachstumsphase besitzt (**Abb. II-1**), sodass für einen Zeitraum von ca. 1-2 h der Sauerstoff-Partialdruck bei einer maximalen Wachstumsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  (vgl. II.3.1; **Abb. II-1 (A)**) auf 30% abfiel (**Abb. II-1 (B)**). Dies, sowie eine generell postulierte

verzögerte Fluoreszenzantwort der GFP-basierten Fluoreszenzproteine durch eine aufwändige Proteinfaltung und die Reifung des Chromophors (ca. 1 h; Drepper et al., 2010; Jung, 2012), könnte einen Effekt auf die Verfolgung der Zielgenexpression haben, wie es bereits für eYFP als Transkriptionsreporter gezeigt wurde (Drepper et al., 2010). Jedoch kann hier davon ausgegangen werden, dass die Sättigung des Mediums mit Sauerstoff ausreichend sein kann, um das Wachstum, sowie die Reifung des Chromophors und somit die Verfolgung der Transkriptionsstärke (vgl. II.3.2) zu gewährleisten.

## II.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* S17-1 Zellen (nach Bergmans et al., 1981) wurde die CaCl<sub>2</sub> + MgCl<sub>2</sub>-Methode verwendet. Hierzu wurde eine LB-Hauptkultur aus einer LB-Vorkultur (100 mL EMK; 10 mL; ü. N.; 37 °C; 130 rpm; Edmund Bühler GmbH; VKS 75 control) auf eine OD<sub>580nm</sub> = 0,05 inokuliert und bis zu einer OD<sub>580nm</sub> = 0,4-0,6 (II.3.1) inkubiert (1 L EMK; 50 mL; ca. 2 h; 37 °C; 130 rpm; Edmund Bühler GmbH; VKS 75 control). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (50 mL Sarstedt™ Tube; 10 min; 4 °C; 5000 rpm; Hettich GmbH & Co. KG; Rotina 380R; Rotor 1720) und das Pellet vorsichtig in MgCl<sub>2</sub>-Lösung (2,5 mL; 100 mM) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit (30 min; auf Eis) wurden die Zellen erneut pelletiert (10 min; 4 °C; 5000 rpm; Hettich GmbH & Co. KG; Rotina 380R; Rotor 1720). Mit vorgekühlter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (5 mL; 100 mM) wurde das Pellet resuspendiert und anschließend zu jeweils 150  $\mu$ L aliquotiert (Lagerung bei -80 °C möglich). Zur Validierung wurde mit einem Aliquot der erstellten kompetenten Zellen ein Antibiogramm in LB-Medium (II.2.3) erstellt (4 mL; ü. N.; 37 °C; Cole-Parmer GmbH; Rotator SB2). Die Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae* VL6-48 Zellen (nach Gietz und Schiestl, 2007; Domröse, 2016) erfolgte über die LiAc-Methode. Aus einer YPD-Vorkultur (100 mL EMK; 5 mL; ü. N.; 30 °C; 130 rpm; Infors AG; Multitron Standard) wurde eine YPD-Hauptkultur auf eine OD<sub>600nm</sub> = 0,25 (II.3.1) inokuliert und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,8-1,2 (II.3.1) inkubiert (1 L EMK; 50 mL; ca. 3,5 – 5 h; 30 °C; 130 rpm; Infors AG; Multitron Standard). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (50 mL Sarstedt™ Tube; 10 min; 4 °C; 5000 rpm; Hettich GmbH & Co. KG; Rotina 380R; Rotor 1720) und das Pellet vorsichtig in 25 mL VE-Wasser resuspendiert und erneut pelletiert (10 min; 4 °C; 5000 rpm; Hettich GmbH & Co. KG; Rotina 380R; Rotor 1720). Das Pellet wurde in LiAc-Lösung (1 mL; 100 mM) resuspendiert, in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1 min; 18.000 xg), in LiAc-Lösung (500  $\mu$ L; 100 mM) resuspendiert und anschließend zu je 50  $\mu$ L aliquotiert (Lagerung 2 Tage bei 4 °C möglich).

## II.2.3 Antibiotika- und Induktorkonzentrationen

Die eingesetzten Antibiotika und Induktoren wurden mit destilliertem Wasser, oder im Falle von (Anhydro-) Tetracyclin, Irgasan und Chloramphenicol, mit 70% Ethanol angesetzt und mit Hilfe eines Filters (VWR international GmbH; Spitzenvorsatzfilter; 0,2 µm; PES) steril filtriert. Die Antibiotika wurden zur Selektion und Kultivierung der Bakterien sowie für die Antibiotogramme (II.2.2) der erstellten kompetenten Zellen verwendet (Konzentrationen modifiziert nach Loeschcke, 2012; Domröse, 2016). Die Induktoren wurden zur Induktion (nach 3,5 h; vgl. Tiso et al., 2020) der Genexpression verwendet (II.2.1.1; Konzentrationen in Anlehnung an Chai et al., 2012; Wittgens, 2013; Calero et al., 2012; Hüsken et al., 2001; Hoffmann und Altenbucher, 2015).

**Tab. II-10: Übersicht über die Stammlösungen und verwendeten Antibiotika- und Induktorkonzentrationen in den Kultivierungsmedien der eingesetzten Bakterien.**

	Bezeichnung	Stammlösung [mg/mL]	<i>P. putida</i> KT2440	<i>E. coli</i> DH5α/-S17-1
			Arbeitskonzentration [µg/mL]	
Antibiotika	Ampicillin (Amp)	100	-	100
	Gentamicin (Gm)	25	25	10
	Tetracyclin (Tc)	10	50	10
	Kanamycin (Km)	100	25	50
	Spectinomycin (Spc)	400	-	100
	Streptomycin (Sm)	50	-	50
	Irgasan (Irg)	25	25	-
	Chloramphenicol (Cm)	25	25	50
Induktoren		Stammlösung [M]	Arbeitskonzentration [mM]	
	Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)	1	0,4	
	L-Arabinose	1	10	
	L-Rhamnose	1	10	
	Salicylat	1	2	
	D-Mannitol	1	2	
	Anhydrotetracyclin	0,001	0,0005	

Antibiotika- und Induktor-haltige Medien und Agarplatten werden im Folgenden mit einem Index gekennzeichnet, der das Antibiotikum/ den Induktor und die jeweilige Konzentration (µg/mL; mM) angibt (bspw. LB<sub>Sal2</sub> oder M9<sub>Gm25</sub>).

## II.2.4 Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* DH5α und S17-1 Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α und *E. coli* S17-1 Zellen (nach Hanahan, 1983) wurden 1-5 µL (bei Retransformation; Plasmidkonzentration: 10-400 ng/µL) bzw. 10 µL (bei Transformation mit *S. cerevisiae* VL6-48 Plasmidpräparation; II.2.7) DNA-Lösung zu einem 150 µL Aliquot der chemisch kompetenten Zellen (II.2.2) gegeben. Nach Inkubation (30 min; auf Eis) wurde ein Hitzeschock (120 s; 42 °C) durchgeführt. Anschließend wurden 700 mL LB-Medium hinzugefügt und zur Ausbildung des Resistenzphänotyps ohne Selektionsdruck inkubiert (1,5 – 3 h; 37 °C; Cole-Parmer GmbH; Rotator SB2). Schließlich wurde der pelletierte und in 100 µL resuspendierte Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechend zu selektierenden Antibiotikum ausgestrichen und inkubiert (ü. N.; 37 °C).

### II.2.5 *In vivo* Rekombination von Plasmid-DNA in *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48 Zellen

Für die *in vivo* Rekombination von Plasmid-DNA im Uracil auxotrophen *S. cerevisiae* VL6-48 Stamm (nach Gietz und Schiestl, 2007; Domröse, 2016) wurde ein Aliquot der LiAc-kompetenten *S. cerevisiae* VL6-48 Zellen durch Zentrifugation (1 min; 18.000 xg) sedimentiert und in LiAc-Lösung (36 µL; 1 M) resuspendiert. Anschließend wurden Lachssperma SS DNA-Lösung (50 µL; 2 g/L in TE-Puffer; vor Benutzung: 10 min auf 99 °C und anschließend auf Eis), die DNA (34 µL; linearisiertes, dephosphoryliertes Vektor-Rückgrat (II.2.9; DNA-Konzentration ~ 200 ng/µL) und ungereinigte(s) PCR Produkt(e) (DNA-Konzentration ~ 4000 ng/µL) im Verhältnis 1:2 bis 1:1,5:1,5 oder 1:1:1:1), sowie PEG 3350-Lösung (240 µL; 50% w/v) in dieser Reihenfolge hinzugegeben und inkubiert (30 min; 30 °C; 1000 rpm; Peqlab Biotechnologie GmbH; Thriller®). Nach dem Hitzeschock (30 min; 42 °C) wurde das Pellet (1 min; 18000 xg) in 100 µL VE-Wasser resuspendiert und zur Selektion auf SD-Ura-Agarplatten ausplattiert und inkubiert (48 h; 30 °C).

### II.2.6 Konjugation von Plasmid-DNA zu *Pseudomonas putida* KT2440

Zur Konjugation von Plasmid-DNA in *P. putida* KT2440 (nach Simon et al., 1983) wurde zunächst der *E. coli*-Donorstamm S17-1 mit dem gewünschten Konstrukt transformiert (II.2.2). Im Anschluss wurde je eine LB-Vorkultur mit den transformierten *E. coli* S17-1 sowie dem *P. putida* KT2440 Stämmen inokuliert und inkubiert (100 mL EMK; 10 mL; ü. N.; *E. coli* S17-1: 37 °C; *P. putida* KT2440: 30 °C; 130 rpm; Infors AG; Multitron Standard). Folgend wurden die *E. coli* S17-1 und *P. putida* KT2440 Übernachtskulturen vereinigt (je 0,5 mL; OD<sub>580nm</sub> ~ 4), pelletiert (1 min; 18000 xg) und resuspendiert (200 µL; LB-Medium), um die resuspendierten Zellen anschließend auf einen Filter (Whatman®; Celluloseacetat-Membran 0,2 µm; ø 25 mm), der auf eine LB-Agarplatte platziert worden ist, zu pipettieren und zu inkubieren (5 h oder ü. N.; 30 °C). Danach wurden die auf dem Filter befindlichen Zellen durch Vortexen mit 1 mL LB-Medium vom Filter abgelöst. Nach dem Pelletieren (1 min; 18000 xg) und Resuspendieren der Zellen in 100 µL LB-Medium, wurde die Mischung auf einer LB-Agarplatte mit dem jeweils zum konjugierten Plasmid und dem entsprechenden Antibiotikum und Irgasan, welches das Wachstum von *E. coli* S17-1 verhindert, ausgestrichen und inkubiert (ü. N.; 30 °C).

### II.2.7 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* DH5α und *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48

Kolonien von transformierte *E. coli* DH5α und *S. cerevisiae* VL6-48 wurden mittels steriler Zahnstocher in LB-Medium mit Antibiotika oder SD-URA-Medium überführt und inkubiert (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-OFF; 1 mL; *E. coli* DH5α: 37 °C; *S. cerevisiae* VL6-48: 30 °C; ü. N.; Eppendorf AG; ThermoMixer® C). Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des Plasmidpräparations-Kits (Analytik Jena AG; innuPREP Plasmid Mini Kit; **Tab. II-4**) nach Angaben des Herstellers nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender Aufreinigung über eine Plasmid Spin-Säulen durchgeführt. Für *S. cerevisiae* VL6-48 wurde das Pellet nach der

Aufnahme in 250  $\mu\text{L}$  Resuspensionspuffer aus dem innuPREP Plasmid Mini-Kit (Analytik Jena AG; **Tab. II-4**) zusätzlich mit 10  $\mu\text{L}$  Lyticase-Lösung versetzt und inkubiert (5 U/ $\mu\text{L}$ ; **Tab. II-5**; 37 °C; 2,5 – 5 h; Cole-Parmer GmbH; Rotator SB2; nach Domröse, 2016 - modifiziert).

Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 15-100  $\mu\text{L}$  steriles, auf 65 °C erwärmtes und RNAase freies  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet.

Bei einem höheren Kulturvolumen in TB-Medium (500 mL EMK; 50 mL; 37 °C; ü. N.; Infors AG; Multitron Standard) erfolgte die Plasmidisolierung ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (nach Birnboim und Doly, 1979) unter Verwendung des NucleoBond® Xtra Midi-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; **Tab. II-4**) nach Angaben des Herstellers. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

### II.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (nach Adkins und Burmeister, 1996) wurde sowohl analytisch zur Größenbestimmung hydrolysierter DNA (II.2.9), als auch präparativ zur Isolierung von DNA-Fragmenten (II.2.8.1) eingesetzt. Zunächst wurden die mit dem DNA-Probenpuffer (5x) versetzten Proben (**Tab. II-5**) auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei setzte sich das Gel aus Agarose, TBE-Puffer (0,5x) und 0,00125% MIDORI<sup>Green</sup> Advance zusammen und war, je nach gewünschter Auftrennung und Größe der zu trennenden DNA, verschieden hoch konzentriert. Zur Bestimmung der Größen wurden die Standards GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder oder GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific GmbH) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Wide Mini-Sub Cell GT horizontalen Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH; **Tab. II-7**), je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, ca. 25-45 min bei 105 – 130 Volt.

Zur Dokumentation wurden die Agarosegele mit dem Gel iXImager (Intas Science Imaging Instruments GmbH; **Tab. II-7**) erfasst. Dabei wird die DNA durch Bestrahlung mit einem Blue/Green LED Transilluminators (Nippon Genetics Europe GmbH; **Tab. II-7**; Ex: 430 – 530 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$ : ~ 520 nm) sichtbar, indem MIDORI<sup>Green</sup> Advance, welches an die DNA über ionische Wechselwirkungen bindet, angeregt wird.

#### II.2.8.1 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Im Anschluss an die Auftrennung (II.6.2.) wurden die zu isolierenden Banden aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpell auf einem Blue/Green LED Transilluminators (Nippon Genetics Europe GmbH; Ex: 430 – 530 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$ : ~ 520 nm) ausgeschnitten.

Die Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit dem Elutions-Kit (Analytik Jena AG; innuPREP DOUBLEpure; **Tab. II-4**) nach Angaben des Herstellers. Lediglich zur Elution der Plasmid-DNA wurden 10-30  $\mu\text{L}$  steriles, 65 °C warmes und RNAase freies  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet (Lagerung des Eluats bei -20 °C).

### II.2.9 Enzymatische hydrolytische Spaltung von DNA

Die enzymatische hydrolytische Spaltung von DNA (nach Sambrook et al., 1989) erfolgte nach Empfehlungen der Firma ThermoFisher Scientific GmbH und mit den vom Hersteller bereitgestellten Enzymen und Puffern. Testrestriktionen zur Analytik wurden mit einem Endvolumen von 20  $\mu\text{L}$  angesetzt und für Restriktionen eines präparativen Zwecks wurde ein 50  $\mu\text{L}$  Ansatz gewählt. Bei der Kombination von mehreren Restriktionsendonukleasen wurde das Online-tool DoubleDigest Calculator (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-8**) verwendet. Der Anteil der Enzyme und des Puffers haben dabei nie 10% des Gesamtvolumens überschritten, außer es wurde zur Erhöhung der Enzymaktivität empfohlen. Testrestriktionen wurden 2 h inkubiert, Restriktionen eines präparativen Zwecks über Nacht. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte nach Herstellerangaben in Abhängigkeit der Enzymeigenschaften. Linearisierte Vektor-Rückgrate, die zur *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 Zellen (II.2.5) eingesetzt wurden, wurden zudem mit FastAP Alkaline Phosphatase (5% v/v; **Tab. II-6**) behandelt (10 min; 37 °C).

### II.2.10 Isolierung von genomischer DNA aus Gram-negativen Bakterien

Gram-negative Bakterien wurden mittels Zahnstocher überführt und inkubiert (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-OFF; 1 mL; s. **Tab. II-9**; ü. N.; Eppendorf AG; ThermoMixer® C). Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (**Tab. II-4**) nach Herstellerangaben, jedoch erfolgte nach dem proteolytischen Verdau ein zusätzlicher RNA-Verdau mit RNase-Lösung (4  $\mu\text{L}$ ; 100 g/L; 2 min). Die Elution der genomischen DNA erfolgte mit Nuklease-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  (Lagerung bei -20 °C).

### II.2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die PCR (nach Saiki et al., 1988) eingesetzt. Sämtliche PCRs wurden im Tprofessional Basis Gradient Thermocycler (Biometra GmbH) unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (ThermoFisher Scientific GmbH) durchgeführt. Eine Übersicht der zur Amplifikation von DNA verwendeten Oligonukleotide ist in (**Tab. II-3**) angegeben. Als Matrize für eine Standard-PCR fungierte entweder Plasmid-DNA oder genomische DNA (II.2.7; II.2.10; 20-100 ng/ $\mu\text{L}$ ). Für eine Kolonie-PCR wurde eine Lösung aus einer mit dem Zahnstocher auf der Agarplatte aufgenommene Kolonie in 30  $\mu\text{L}$  Nuklease-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  (10 min  $\rightarrow$  99 °C) eingesetzt. Hierbei wurden die PCR-Ansätze auf Basis eines Standardprotokolls verwendet (**Tab. II-11**), die bei Bedarf verändert wurden. PCR-Programme wurden ausgehend von einem Standard-Programm (**Tab. II-11**) entsprechend der jeweils verwendeten DNA-Matrize, der Oligonukleotid-Primer (**Tab. II-3**), sowie der Amplikon-Länge (Elongationszeit 0,25-0,5 min/kbp) adaptiert. Die Hybridisierungstemperatur ( $T_M$ ) wurde nach Angaben des Oligonukleotid-/Polymerase-Herstellers gewählt. Bei langen Primersequenzen, die initial nicht mit der vollen Länge

binden und hohe Primer-Schmelztemperaturen besitzen, wurde ein zusätzlicher Amplifikationszyklus (+ 2-Step; **Tab. II-11**) durchgeführt, um die initiale Hybridisierung zu optimieren.

**Tab. II-11: Protokoll zum Erstellen eines PCR-Ansatzes und Programm-Vorlage zur Adaptierung eines individuellen PCR-Programms.**

Protokoll	Komponente	Kolonie-PCR [µL]	Standard-PCR [µL]	
	GC-Puffer (5x)	4	10	
dNTP Mix (10 mM)	0,4	1		
Primermix (10 µM; <b>Tab. II-3</b> )	2	5		
DMSO	2	5		
DNA-Matrize (1-50 ng/µL; <b>Tab. II-1</b> )	2	1		
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	0,4	1		
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	9,2	27		

Programm	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
			Standard	+ 2-Step
	I. Initiale Denaturierung	98	10	10
II. Denaturierung	98	-	0,5	
III. Hybridisierung	T <sub>M</sub>	-	0,3	
IV. Elongation	72	-	0,25-0,5 pro kbp	
II. Denaturierung	98	0,5	0,5	
III. Hybridisierung	T <sub>M</sub> / 72	0,3	0,3	
IV. Elongation	72	0,25-0,5 pro kbp	0,25-0,5 pro kbp	
V. Finale Elongation	72	10	10	

## II.2.12 Quantitative *real-time* PCR

Der Transkriptnachweis durch RT- (reverse Transkription) qPCR (quantitative *real-time* PCR) in *P. putida* KT2440 (nach Loeschcke, 2012; Domröse, 2016) erfolgte mit Hilfe von RNase-freien Chemikalien und Materialien (**Tab. II-4**; **Tab. II-7**).

### II.2.12.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. putida* KT2440

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus ausgewählten *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionskulturen (II.2.1.1) nach 6 und 24 h in biologischer Dreifachbestimmung. Hierzu wurde eine Zellmenge entsprechend einer OD<sub>580nm</sub> = 2 durch Zentrifugation (1 min; 18000 xg; Überstand verworfen) geerntet. Zur Aufbewahrung wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Die Präparation der Gesamt-RNA folgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; **Tab. II-4**) entsprechend der Herstellerangaben. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde zusätzlich eine DNase Behandlung auf der NucleoSpin® RNA Säule mit dem RNase-free DNase Set (Qiagen GmbH; **Tab. II-4**) durchgeführt. Hierfür wurde nach der bereits im Herstellerprotokoll vorgesehenen DNase Behandlung die NucleoSpin® RNA Säule zentrifugiert (15 s; 11000 xg) und mit 80 µL DNaseI-Mix (10 µL DNaseI + 70 µL RDD-Puffer) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde entsprechend des Herstellers des NucleoSpin® RNA Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; **Tab. II-4**) vorgegangen. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte mit 47 µL Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O. Folgend wurde das Eluat mit dem DNA-free™ DNA Removal Kit (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-4**) nach Herstellerangaben behandelt. Zum Schluss wurden 50 µL RNA in ein Mikroreaktionsgefäß überführt (Lagerung bei -80 °C; Konzentrationsbestimmung nach II.2.13).

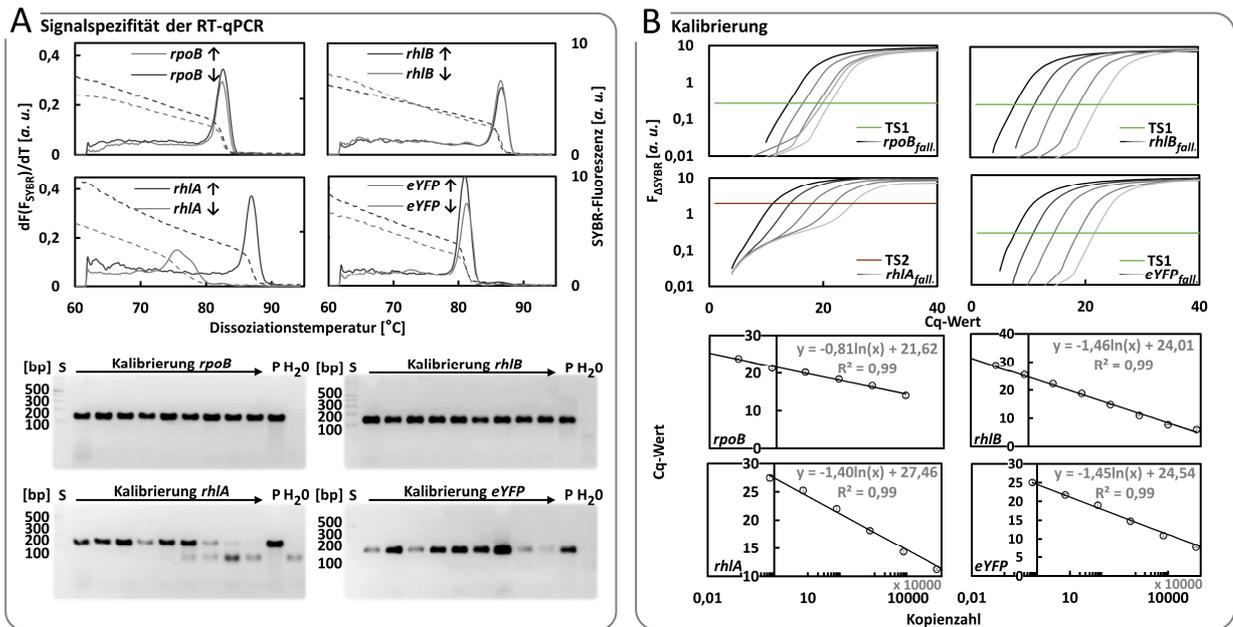
## II.2.12.2 Transkript-Quantifizierung durch RT-qPCR

Um einen Vergleich bezüglich der Expressionsstärke der Zielgene in den verschiedenen Proben zu ermöglichen, wurden bei der RT-qPCR 50 ng Gesamt-RNA als RNA-Matrize eingesetzt und diese mit Hilfe des Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kits (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-4**) nach Herstellerangaben am 7900HT Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-7**) mit Hilfe der Software SDS 2.3 (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-8**) durchgeführt. Die Primer für die RT-qPCR wurden mit dem Online-*tool* Primer3Web (**Tab. II-3**; **Tab. II-8**) erstellt und optimiert, wobei die Amplikonlänge aller PCR-Produkte  $135 \pm 2$  bp betrug. Für jede RT-qPCR Reaktion der zu untersuchenden Proben (RT) in biologischer Dreifachbestimmung wurde eine sogenannte No-RT Kontrolle, ohne Zugabe von reverser Transkriptase als DNA-Kontaminationskontrolle, mitgeführt (vgl. **Tab. II-12**). Als Referenz wurde für jede biologische Probe zusätzlich zu den Zielgenen die Transkriptionsstärke für das *P. putida* KT2440 Haushaltsgen *rpoB* ermittelt (nach Schmittgen und Livak, 2008), dessen Expression unter allen Bedingungen und Wachstumsstadien vergleichbar sein soll.

**Tab. II-12: Protokoll zum Erstellen eines RT-qPCR-Ansatzes und Programm der RT-qPCR.**

Protokoll	Komponente	RT [ $\mu$ L]	No-RT [ $\mu$ L]
		RNA-Matrize (50 ng)	9
	Primermix (10 pmol)	0,8	0,8
	RT Enzymmix (125x)	0,16	-
	PCR-MasterMix (2x)	10	10
	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	0,04	0,2
Programm	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
	I. Reverse Transkription	48	30
	II. Enzymaktivierung	95	10
	III. Denaturierung	95	0,25
	IV. Hybridisierung/ Elongation	60	1
	V. Initiale Denaturierung	95	0,25
	VI. Hybridisierung	60	0,25
	VII. Dissoziation	95	0,25

Die Bestimmung der Transkriptkopienzahl der in dieser Arbeit untersuchten Gene *rpoB*, *rhIA*, *rhIB* und *eYFP* wurde anhand einer Konzentrationsreihe der DNA-Matrize pYTSK40K\_1G7 und genomischer DNA von *P. putida* KT2440 (**Tab. II-1**; **Tab. II-2**; II.2.10) durchgeführt. Über die DNA-Konzentration und das Molekulargewicht der jeweiligen eingesetzten Matrizen (SMS2, DNA Molecular Weight; **Tab. II-8**) konnte die Anzahl der Transkriptkopien berechnet werden, anhand derer anschließend die Anzahl der Transkriptkopien in Messproben anhand des qPCR-Signals berechnet werden konnte. Die Qualität der qPCR wurden in Anlehnung an die MIQE-Richtlinien (Bustin et al., 2009) anhand der Spezifität und -präzision für jede individuelle PCR sichergestellt (**Abb. II-2 (A)**). Anschließend wurden die C<sub>q</sub>-Werte (*quantification cycle*; qPCR-Zyklus, ermittelt anhand definierter Tresholds) im linearen Messbereich der Konzentrationsreihe in Bezug zur Anzahl der Transkriptkopien gesetzt (**Abb. II-2 (B)**).



**Abb. II-2: Überblick über die Qualitätskontrolle und Kalibrierung der RT-qPCR-Messungen.**

**A:** Die Dissoziationskurven (Ableitung der SYBR-Fluoreszenz gegen die Zeit; oben links) für die Gene *rpoB*, *rhIB* und *eYFP* zeigen, dass die Primer sowohl an niedrigkonzentrierten DNA-Matrizen (↓ Kopienzahl ~ 700) als auch höherkonzentrierten DNA-Matrizen (↑ Kopienzahl ~ 70000000) spezifisch binden und nur ein PCR-Produkt bei der gewünschten Größe entsteht. Bei der anschließenden Evaluierung der PCR-Produkte (unten links) der Kalibrierungsreihe (sequentielle 1/10 Verdünnung der DNA-Matrize) konnte das PCR-Produkt mit Hilfe des GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladders (S) der Größe 135 ± 2 bp zugeordnet werden. Hierbei diente eine PCR über die jeweilige DNA-Matrize als Positivkontrolle (P) und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle.

**B:** Somit wurde für die Kalibrierung (unten rechts) in Anlehnung an die MIQE-Richtlinien (Bustin et al., 2009) ein Threshold von 0,2626895 (TS1) definiert (oben rechts) und die hieraus ermittelten Cq-Werte gegen die Kopienzahl aufgetragen, um einen linearen Bezug  $y = m \cdot \ln(x) + a$ , sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  anzugeben. Für das Gen *rhIA* konnte sowohl in den Dissoziationskurven als auch im Agarosegel bei niedrigkonzentrierten DNA-Matrizen (unter 70000 Kopien) die Bildung eines unspezifisches PCR Produktes (Primer-Dimere) beobachtet werden. Um eine Kalibrierungsgleichung zu erstellen, wurde für das Gen *rhIA* ein höherer Threshold von 1,9388019 (TS2) definiert, um die Dimerisierung der Primer aus der Kalibrierung auszugrenzen.

Hier zeigte sich, dass die PCR-Produkte für die Gene *rpoB*, *rhIB* und *eYFP* sowohl bei niedrigkonzentrierten als auch bei höherkonzentrierten DNA-Matrizen spezifische PCR Produkte bilden. Dies wird zum einen durch einen zusätzlichen Dissoziationsschritt am Ende der qPCR und die Ableitung der SYBR-Fluoreszenz nach der Zeit, und zum anderen durch die anschließende Auftragung auf einem Agarosegel (II.2.8) gezeigt. Für *rhIA* ergab sich bei niedrigkonzentrierten DNA-Matrizen eine Dimerisierung der Primer, welches sowohl an der Ableitung der SYBR-Fluoreszenz nach der Zeit bei der finalen Dissoziation im Agarosegel (**Abb. II-2 (A)**), als auch in den Signalen der No-RT Proben sichtbar ist. Aus diesem Grund wurde zur Ermittlung der Cq-Werte, die zur Erstellung der Kalibrierungsgleichungen benötigt werden, für *rpoB*, *rhIB* und *eYFP* in Anlehnung an die MIQE-Richtlinien (Bustin et al., 2009) ein Threshold von 0,2626895 (TS1; **Abb. II-2 (B)**) und für *rhIA* ein Threshold von 1,9388019 (TS2; **Abb. II-2 (B)**) gewählt, um möglichst keine Primerdimere im Messbereich zu berücksichtigen (s. a. **Abb. A-1**). Der lineare Messbereich für die Zielgene entsprach in Cq-Werten für *rpoB* bei 14,0-25,6, für *rhIA* bei 9,3 – 27,5, für *rhIB* bei 6,0 und 31,3 und für *eYFP* 6,0 und 25,0, sodass auch nur experimentelle Werte in diesen Bereichen akzeptiert wurden. Die methodische Präzision (technische Replikate in Dreifachbestimmung) der Kalibrierung lag bei ≤ 0,5 Zyklen. Anhand der hier erstellten Eichgeraden (**Abb. II-2 (B)**) kann der in der qPCR mit biologischen Proben ermittelte Cq-Wert in die Anzahl an Transkriptkopien umgerechnet werden und durch Normierung auf das Haushaltgen *rpoB* in Bezug zur Wachstumsphase der Zellen gebracht

werden, wodurch die Transkriptmengenänderungen zwischen verschiedenen Stämmen verglichen werden kann.

#### II.2.13 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA/RNA in 1  $\mu\text{L}$  wurde photometrisch über die Absorption ( $A$ ) bei 260 nm im NanoDrop 2000c Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-7**) bestimmt. Als Kontrolle diente das jeweilige Lösungsmittel. Zur Bestimmung von Verunreinigungen werden neben  $A_{260\text{nm}}$ , auch  $A_{280\text{nm}}$  und  $A_{230\text{nm}}$  gemessen. Der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  zeigt Proteinverunreinigungen ( $\sim 1,8$  für reine DNA;  $\sim 2,0$  für reine RNA), während der Quotient der  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  eine Verunreinigung mit Salzen/ Lösungsmitteln ermittelt ( $\sim 1,8-2,2$  für reine DNA/RNA).

#### II.2.14 Sequenzierung und *de novo* Synthese von Nukleinsäure

Zur Sequenzierung von DNA wurden 15  $\mu\text{L}$  des DNA-Konstrukts in Auftragsarbeit durch die Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) mit einer maximalen Auflösung von 1,5 kbp sequenziert. Die dazugehörigen Sequenzierungsprimer wurden entweder durch Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) bereitgestellt oder es wurden 2  $\mu\text{L}$  des Primers (10 pmol; **Tab. II-3**) im Voraus zur DNA hinzugegeben.

Transkriptomsequenzierungen wurden aus in Stickstoff eingefrorenen  $\text{OD}_{580\text{nm}} = 1$  Pellets von entsprechenden *P. putida* KT2440-Kulturen (1 min; 18000 xg; log. Wuchswachse; II.2.1.1) in Kooperationsarbeit durch das G2L, Georg-Augustus-Universität Göttingen durchgeführt mit anschließender Zuordnung der Gene und bioinformatischer Analyse.

Das DNA-Fragment YT\_core (999 bp; **Abb. A-2**) wurde als Auftragsarbeit durch GeneArt (ThermoFisher Scientific GmbH) *in vitro* synthetisiert und als Bestandteil des Plasmides pMK-RQ-YT\_core (**Tab. II-1**) geliefert.

## II.3 Detektion und Analytik

Die im Folgenden aufgelisteten analytischen Methoden behandeln den Umgang mit nicht kontaminierten Materialien und wurden im Sinne der empfohlenen Richtlinien durchgeführt. Alle genannten Methoden wurden mindestens in biologischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten experimentellen Daten entsprechen somit den arithmetischen Mittelwerten der Dreifachbestimmung, angegeben mit der entsprechenden Standardabweichung.

### II.3.1 Zelldichtebestimmung und Aufnahme von Wachstumskurven

Für die Zelldichtebestimmung wurde zur Ermittlung der optischen Dichte (OD; Sutton, 2011) von *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* S17-1 und *P. putida* KT2440 die OD<sub>580nm</sub> und im Falle von *S. cerevisiae* VL6-48 die OD<sub>600nm</sub> mit einem Spektrophotometer (Genesys10 S UV-VIS; ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-7**) aufgenommen (1 mL Messvolumen; VWR international GmbH; Halbmikroküvetten; 1 cm Schichtdicke; 1:10 verdünnte Kulturen in VE-Wasser).

Bei größeren Probenmengen in vergleichenden *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionsstudien wurde zu Normierungswecken zudem die A<sub>580nm</sub> in MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) im MTP-Fluoreszenzphotometer (TECAN Group Ltd.; Infinite<sup>®</sup> M1000 Pro; **Tab. II-7**), in dem jeweiligen zum Experiment adäquaten Volumen und der Verdünnung, gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**).

Die Aufnahme von zeitlich aufgelösten Wachstumskurven von *P. putida* KT2440 Kulturen (II.2.1.1) in Flowerplates<sup>®</sup> (m2p-labs GmbH; Flowerplate<sup>®</sup> MTP-B; **Tab. II-7**) wurden in einem BioLector<sup>®</sup> I (m2p-labs GmbH; **Tab. II-7**; Kanal: Biomass;  $\lambda_{Ex/Em} = 620$  nm (Streulicht); Gain: 20) in Echtzeit mit Hilfe des implementierten optischen Sensors in 20 min Intervallen durchgeführt und mittels der BioLecture 2 Software (m2p-labs GmbH; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) verfolgt und ausgewertet.

Die Wachstumsrate während der logarithmischen Wuchsphase wurde durch Verwendung der folgenden Formel ermittelt (Christian et al., 1982):

$$r_B(t) = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{\Delta t}$$

$r_B(t)$	Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]
$N_1$	Biomasse in der frühen logarithmischen Phase
$N_2$	Biomasse in der späten logarithmischen Phase
$t$	Zeit [h]

### II.3.2 Fluoreszenzintensitätsmessungen und Aufnahme von Fluoreszenzspektren/-veränderungen

Die Bestimmung der *in vivo* Fluoreszenzintensität (Wagnieres et al., 1998) in *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionskulturen (II.2.1.1) erfolgte in MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) im MTP-Fluoreszenzphotometer (TECAN Group Ltd.; Infinite® M1000 Pro; **Tab. II-7**; fluorescence intensity; gain: 5). Dazu wurden pelletierte *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionskulturen (1 mL; 1 min; 18000 xg) dreimal in Tris-HCl-Puffer (100 mM; pH 8; **Tab. II-5**) gewaschen (1 mL; 1 min; 18000 xg) und 200 µL dieser Suspension zur Messung eingesetzt. Hierbei wurden die zum Fluoreszenzreporter passende Anregungs- ( $\lambda_{Ex}$ ) und Emissionswellenlänge ( $\lambda_{Em}$ ; vgl. **Tab. II-13**) auf Basis der Empfehlungen der FPbase (**Tab. II-8**; FPbase.org; Stand: April 2020) ausgewählt und über die i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) ausgewertet.

**Tab. II-13: Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzreporter (nach FPbase.org; Stand April 2020).**

Fluoreszenzreporter	Ursprungsorganismus	$\lambda_{max_{Ex}}$ [nm]	$\lambda_{max_{Em}}$ [nm]	Referenz
mTagBFP2 (mBFP)	<i>Entacmaea quadricolor</i>	399	454	Subach et al., 2011
eYFP	<i>Aequorea victoria</i>	513	527	Spiess et al., 2005
mCherry	<i>Discosoma</i> sp.	587	610	Shaner et al., 2004

Zudem wurden, falls eine Normierung auf die Zelldichte benötigt wurde, die gemessenen Fluoreszenzintensitäten durch die entsprechenden  $A_{580nm}$  Werte geteilt (II.3.1).

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurde ein Fluoreszenzemission Scan (TECAN Group Ltd.; Infinite® M1000 Pro; **Tab. II-7**; fluorescence scan; gain: 5) bei der Fluoreszenzreporter-abhängigen Anregungswellenlänge (entsprechend  $\lambda_{Ex}$  in **Tab. II-13**) aufgenommen und mit Hilfe der i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) ausgewertet. Die Aufnahme von zeitlich aufgelösten *P. putida* KT2440 Fluoreszenzintensitätsveränderungen wurde in Flowerplates® (m2p-labs GmbH; Flowerplate® MTP-B; **Tab. II-7**) in einem BioLector® I (m2p-labs GmbH; **Tab. II-7**; Kanal: eYFP- oder mCherry fluorescence; eYFP Gain: 50,  $\lambda_{Ex}$  = 508 nm bzw.  $\lambda_{Ex}$  = 523 nm; Messwiederholung: je 20 min) nicht-invasiv mittels LED und Filtermodulen während der Kultivierung (II.2.1.1) durchgeführt und mit Hilfe der BioLecture 2 Software (m2p-labs GmbH; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) ausgewertet. Zur Zelldichtenormierung der Fluoreszenz wurden die hierzu parallel gemessene Biomasse (II.3.1) benutzt. Die spezifische Fluoreszenzzunahme wurde durch Verwendung der folgenden Formel (In Anlehnung an I.3.1) ermittelt:

$$\mu_F(t) = \frac{\ln(F_2) - \ln(F_1)}{\Delta t} * 1000$$

- $\mu_F(t)$  Fluoreszenzzunahme [ $h^{-1}$ ]
- $F_1$  normierte Fluoreszenz in der frühen Phase
- $F_2$  normierte Fluoreszenz in der späten Phase
- $t$  Zeit [h]

Zum qualitativen Nachweis der Fluoreszenz einzelner *P. putida* KT2440 Kulturen wurden entsprechende Stämme unter exprimierenden Bedingungen auf Agarplatten ausgestrichen (24 h; 30 °C). Anschließend wurde die Fluoreszenz von eYFP und mCherry auf einem Blue/Green LED Transilluminator (Nippon Genetics Europe GmbH; **Tab. II-7**;  $\lambda_{\text{Ex}}$ : 430 – 530 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$ : ~ 520 nm) und für mTagBFP2 (mBFP) auf dem CAMAG TLC<sup>®</sup> Visualizer 2 (CAMAG AG & Co. GmbH; **Tab. II-7**;  $\lambda_{\text{Ex}}$ : 366 nm;  $\lambda_{\text{Em}}$ : ~ 520 nm) visualisiert und dokumentiert.

### II.3.2.1 Zytometrische Bestimmung der Fluoreszenzintensität/-verteilung und -heterogenität

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität/-verteilung und der Heterogenität der Produktion von Fluoreszenzreportern (in Anlehnung an Arnfinnsdottir et al., 2016) während der Kultivierung von *P. putida* KT2440, wurde ein CellStream<sup>™</sup> Durchflusszytometer (Merck KGaA; **Tab. II-7**) verwendet, um eine Analyse auf Einzelzellebene zu ermöglichen. Dazu wurden *P. putida* KT2440 Zellen pelletiert (1 mL; 1 min; 18000 xg; II.2.1.1), dreimal in Tris-HCl-Puffer (100 mM; pH 8; **Tab. II-5**) gewaschen (1 mL; 1 min; 18000 xg) und eine optische Dichte (II.3.1) von  $OD_{580\text{nm}} = 0,05$  mit Tris-HCl-Lösung eingestellt.

Die vorbereiteten Proben (100  $\mu\text{L}$ ) wurden anschließend mit dem CellStream<sup>™</sup> Durchflusszytometer analysiert (Merck KGaA; **Tab. II-7**). Die Vorwärtsstreuung (FSC) wurde mit einem FSC-Laser mit 30% der Laserleistung (456/51 nm Bandpassfilter) gemessen. Für die Seitwärtsstreuung (SSC) wurde ein dedizierter Laser mit 100% der Laserleistung (773/56 nm Bandpassfilter) verwendet. Für die Messung der Fluoreszenz der untersuchten Reporter wurden die in **Tab. II-14** dargestellten Einstellungen getroffen.

**Tab. II-14: Parameter der Durchflusszytometrie.**

Fluoreszenzreporter	$\lambda_{\text{Ex}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Em}}$ [nm]	Bandpassbreite (Filter) [nm]	Laserintensität [mW]
mTagBFP2 (mBFP)	375	456	51	75
eYFP	488	528	46	200
mCherry	561	611	31	150

Im Anschluss an die Messung erfolgte die Analyse mit Hilfe der von Gerätehersteller bereitgestellten CellStream Analysis Software (Merck KGaA; **Tab. II-8**), indem basierend auf den Streudiagrammen (FSC/ SSC) die Bakterienzellen aus irrelevanten Zählungen für die Fluoreszenzanalyse ausgeblendet wurden. Dabei wurden zum einen die bakteriellen Events vom Hintergrundrauschen abgegrenzt und zum anderen Zellanhäufungen (Dubletten und Aggregaten) durch eine Dublettendiskriminierung ausgeschlossen. Die Zellen wurden hierfür hinsichtlich ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) analysiert, sodass möglichst einzelne Zellen betrachtet werden konnten. Die Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen das Verhalten der einzelnen Events im Streulicht lässt Schlüsse auf die Fluoreszenzintensität/-verteilung und die Heterogenität zu.

### II.3.3 Nachweis hämolytischer Aktivität

Zum Nachweis hämolytischer Aktivität von bakteriellen Kolonien (nach Mulligan et al., 1984) wurden (rekombinante) *P. putida* KT2440 Kulturen aus einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte (II.2.1) mit Hilfe eines Zahnstochers auf eine Blutagarplatte (**Tab. II-5**) mit dem jeweils zum Stamm adäquaten Antibiotikum und ggf. dem Induktor zur Induktion (**Tab. II-10**) der Produktion von hämolytischen Substanzen punktförmig übertragen und inkubiert (30 °C; ü. N). Bei einem hohen Durchsatz an zu analysierenden Kulturen wurden diese in Deepwell Platten (Eppendorf AG; **Tab. II-7**) kultiviert (vgl. II.2.1; 1 mL; 30 °C; ü. N.; 1200 rpm; Eppendorf AG; ThermoMixer® C) und mit Hilfe eines Mikroplatten-Replikators (Boekel Industries Inc.; **Tab. II-7**) auf Blutagarplatten aufgetragen. Zur Beobachtung der Entwicklung des Klärhofes wurden die Platten bei 4 °C gelagert und täglich im CAMAG TLC® Visualizer 2 (CAMAG AG & Co. GmbH; **Tab. II-7**) fortlaufend mit römischen Ziffern dokumentiert.

### II.3.4 Atomized-oil Test

Als Nachweis der Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch *P. putida* KT2440 Kolonien auf Agarplatten (nach Burch et al., 2010), wurden Agarplatten zur Beobachtung des Lichtbrechungsverhaltens kleinster Öltröpfchen mit mehreren für mindestens 18 h angezogenen Bakterienkolonien mit einem Spray aus dünnflüssigem Paraffinöl (Merck KGaA; **Tab. II-6**) mittels einer Airbrush Beginner ESB 100 (Revell GmbH; **Tab. II-7**) besprüht. Die bei indirekter Beleuchtung identifizierbaren Höfe wurden mit dem Stella Imaging Systems (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH; **Tab. II-7**) dokumentiert (Lichtquelle: white light; Apertur: 4,0 oder offen; gain: 4; binning 2x2; Belichtungszeit 10 ms; Stufe 2; Focus 205).

### II.3.5 Drop-collapsing und grid Test

Für den Nachweis von oberflächenaktiven Substanzen in Kulturüberständen von *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionskulturen wurden der *drop-collapsing* Test (nach Jain et al., 1991) oder der *grid* Test (nach Chen et al., 2007) eingesetzt. Bei ersterem wurden 10-20 µL Kultur oder Kulturüberstand (1 min; 18000 xg) auf eine Polystyrol-Petrischale gegeben und nach ca. 1 min die Tropfenform fotografiert. Der *grid* Test wurde in MTP (Greiner Bio-One International GmbH; **Tab. II-7**), unter die ein schwarz-weißes Raster (0,8 mm x 0,8 mm Zellengröße) gelegt und 100 µL je Well Kulturüberstand pipettiert wurde, durchgeführt. Im Anschluss wurde die optische Verzerrung der Linien im Vergleich zu reinem Medium oder zum Überstand der Kontrollkultur mittels des Stella Imaging Systems (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH; **Tab. II-7**) dokumentiert (Lichtquelle: white light; Apertur: 4,0 oder offen; gain: 4; binning 2x2; Belichtungszeit 10 ms; Stufe 1; Focus 309).

### II.3.6 CPC-BTB Test

Der CPC-BTB Test wurde zur Ermittlung der Surfactin-Konzentration in *Bacillus*-Kulturüberständen (nach Yang et al., 2015) entwickelt und in dieser Arbeit auf die Anwendbarkeit zur Quantifizierung von RL getestet. Hierzu wurden zur Vorbereitung ein Gemisch aus CPC-BTB (20 mL CPC-Lösung; 20 mL BTB-Lösung; **Tab. II-5**) erstellt. Im nächsten Schritt wurden in eine MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) 160  $\mu\text{L}$  je Well dieser Mischung hinzugegeben. Anschließend wurden 20  $\mu\text{L}$  zellfreie Kulturbrühe (1 min; 18000 xg) aus *P. putida* KT2440 Produktionskulturen (II.2.1.1) hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und inkubiert (5 min; 25 °C; 500 rpm; Eppendorf AG; ThermoMixer® C; **Tab. II-7**). Zur Kalibrierung diente eine Kalibrierungsreihe aus einem verdünnten mRL-Standard (**Tab. II-6**) in LB-Medium. Zur Detektion der chromatographischen Veränderung aufgrund von Tensiden im Überstand wurde der  $A_{625\text{nm}}$ - und  $A_{500\text{nm}}$ -Wert ermittelt (TECAN Group Ltd.; Infinite® M1000 Pro; **Tab. II-7**). Unter Anwendung der i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) wurde anhand der Berechnung des Quotienten von  $A_{615/500\text{nm}}$  (in dieser Arbeit zur Erhöhung der Auflösung verwendet) und mit Hilfe der zuvor erstellten Kalibrierungsgleichung der Messwert bestimmt, der einem Biotensid-Titer zugeordnet werden konnte.

### II.3.7 Flüssigchromatographie-Messung von 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoaten und Rhamnolipiden

Die quantitative Analyse von HAA- und RL-Kongeneren aus *P. putida* KT2440 Produktionskulturen (II.2.1), erfolgte durch HPLC-CAD. Zur Probenvorbereitung wurden die Kulturen zentrifugiert (1 min; 18000 xg), die zellfreie Kulturbrühe 1:1 mit Acetonitril gemischt und gelagert (4 °C; ü. N.). Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert (2 min; 18000 xg) und mit Phenex RC-Spritzenfiltern (Ausschlussgröße = 0,2  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex Inc.; **Tab. II-7**) in HPLC-Gefäße filtriert.

Die Durchführung, sowie die Auswertung und Aufreinigung der zugesendeten Proben in der HPLC erfolgte in Kooperationsarbeit durch Isabel Bator, iAMB, RWTH Aachen nach Bator et al., 2020. Hierbei wurde das HPLC-System Ultimate 3000 mit einem Corona™ Veo™ Charged Aerosol detector (ThermoFisher Scientific GmbH; Waltham; USA) verwendet. Zur Trennung wurde eine NUCLEODUR C18 Gravity 15 x 4,6 mm Säule (Partikelgröße: 3  $\mu\text{m}$ ; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) benutzt. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  und die Säulenofentemperatur auf 40 °C eingestellt. Ein Gradient aus Acetonitril (A) und 0,2% (v/v) Ameisensäure in ultrareinem  $\text{H}_2\text{O}$  (B) wurden als mobile Phase verwendet. Startbedingung war ein Verhältnis A:B von 70:30%, in einem linearen Gradienten über 8 min wurde ein Anteil von 80% A erreicht. Bis zu Minute 10 wurde linear auf 100% A erhöht, danach wiederum in einem linearen Gradienten zur Startbedingung zurückgekehrt. Die Methode endete nach 15 min.

Die Auswertung erfolgte anhand der zuvor im Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Universität Münster ermittelten Retentionszeiten der bekannten Kongenere (*P. aeruginosa*-Typ:

C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>; C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>; C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>; C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>; Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>; Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10:1</sub>; Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>; Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10:1</sub>; Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>) oder der Betrachtung von Chromatogrammen. Zur vereinfachten Darstellung wird jeweils die Summe der HAA und mRL-Kongenere präsentiert, da die Verteilung der verschiedenen Kongenere sich nicht maßgeblich ändert und Betrag gerundet für die Fettsäure-Kongenere C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>:C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>:C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>:C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> ein Verhältnis von ca. 1,5:22:5:6 (Behrens et al., 2016b, c). Zur Herstellung von Biotensid-Standards wurden rekombinante *P. putida* KT2440 Stämme verwendet, die HAA, mRL und dRL produzieren. Die Herstellung und Reinigung einzelner Kongenere erfolgte wie in (Blesken et al., 2020) beschrieben. Hier wurden nur die C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-Kongenere und somit die Hauptkongenere isoliert. Zur Normierung der resultierenden Titer wurde die Biomassemessung des BioLector (m2p-labs GmbH; BioLector® I; **Tab. II-7**) oder die OD<sub>580nm</sub> verwendet (vgl. I.3.1). Die Produktivität der Zelle zur Produktion von HAA und mRL wurde wie folgt berechnet:

$$P_B = \frac{B_{norm.} * K}{\Delta t} * 1000$$

$P_B$	Produktivität [ $\mu\text{g}_{norm.} \cdot \text{h}^{-1}$ ]
$B_{norm.}$	normierter Biotensid-Titer [ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]
$K$	Kultivierungsvolumen [mL]
$t$	Zeit [h]

### II.3.8 *Victoria Pure Blue BO*-Assay

Zur quantitativen Bestimmung von HAA- und RL in Kulturüberständen von *P. putida* KT2440 Expressions- und Produktionskulturen wurde in dieser Arbeit der *Victoria Pure Blue BO* (VPBO)-Assay entwickelt. Dieser basiert auf einer Methode zur Bestimmung der verbliebenen Tenside bei der Impfstoffaufarbeitung (Roosloot und Schoen, 2011). Zur Herstellung von VPBO-Platten wird eine Stammlösung von 0,1 g/L VPBO (Santa Cruz Biotechnology Inc.; **Tab. II-6**) in Isopropanol erzeugt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Methode gemäß Roosloot und Schoen, 2011 nur leicht modifiziert. Jedes Well einer Polystyrol-MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) wurde mit 50  $\mu\text{L}$  der zuvor hergestellten VPBO-Lösung gefüllt, um anschließend den Farbstoff in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf AG; Speed Vac-Konzentrator 5301; **Tab. II-7**; Exsikkatorfunktion; 60 min; 45 °C) zu trocknen. Danach wurde NaOH-Lösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit wurde diese wieder (300  $\mu\text{L}$  je Well; 10 min; RT; **Tab. II-5**) aspiriert und die MTP erneut in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf AG; Speed Vac-Konzentrator 5301; **Tab. II-7**; Exsikkatorfunktion; 60 min; 45 °C) getrocknet. Eine Lagerung der präparierten VPBO-Platten ist bei 4 °C mit Aluminiumfolie möglich.

Für die Referenzmessungen wurden Verdünnungsreihen (18 – 21 Konzentrationen zwischen 0,01 – 5 g/L) von reinen Biotensiden (C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-Kongenere von HAA, mRL und dRL; II.3.7) in LB-Medium (300  $\mu\text{L}$  je Well; **Tab. II-5**) hergestellt, die aus einer Stammlösung durch Addition von Wasser pipettiert wurden.

Für biologische Proben wurden ebenfalls 250  $\mu\text{L}$  zellfreie Kulturbrühe (1 min; 18000 xg; zusätzlich methodische Dreifachbestimmung; II.2.1.1) eingesetzt. Die Platten wurden mit einer Aluminiumfolie

versiegelt und auf einem Platteninkubator (750 rpm; Eppendorf AG; ThermoMixer® C; **Tab. II-7**) inkubiert (60 min; 23 °C). Danach wurden 200 µL je Probe auf eine saubere MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) überführt und die *VPBO*-abhängige Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 625 nm (TECAN Group Ltd.; Infinite® M1000 Pro; **Tab. II-7**) bestimmt. Im Anschluss konnte mit Hilfe der i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) die  $A_{625\text{nm}}$ -Werte ausgewertet werden und mit der in dieser Arbeit bestimmten Quantifizierungsgleichungen durch Berechnung aus der jeweiligen Kalibrierungskurven über Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) die jeweiligen Biotensid-Titer abgeleitet werden. Als Positiv- und Qualitätskontrolle zu jeder erstellten *VPBO*-beschichteten MTP diente 100 mM Tween 80-Lösung (**Tab. II-5**), welches zur vollständigen Solubilisierung des gesamten Farbstoffes führte, was einem Absorptionswert von  $A_{625\text{nm}} \sim 1,1$  entsprach.

Die pH-Kapazität für *VPBO* wurde anwendungsnah mit LB-Medium (pH 7) durchgeführt, das ggf. mit HCl- bzw. NaOH-Lösung (1 M und 0,5 M; **Tab. II-5**) titriert wurde, bis ein Farbumschlag sichtbar wurde. Die Absorptionsspektren wurden unter Verwendung eines Spektrophotometer (Genesys10 S UV-VIS; ThermoFisher Scientific GmbH; **Tab. II-7**) mit einer Quarzküvette (SUPRASIL® CG; 10,00 × 2,00 mm) aufgezeichnet und mit Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) ausgewertet.

### II.3.9 Orcinol Test

Zur Detektion von RL per Orcinol Test (nach Ochsner, 1993; Wittgens, 2013) wurden 100 µL Kulturbrühe dreimal mit 500 µL Ethylacetat (**Tab. II-6**) versetzt und zur Phasentrennung zentrifugiert (1 min; 18000 xg). Die organischen Phasen wurden jeweils abgenommen, vereinigt und das Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation (Eppendorf AG; Speed Vac-Konzentrator 5301; **Tab. II-7**; Programm 3; 60 min; 45 °C) vollständig evaporiert. Anschließend wurden die Pellets mit 20 µL VE-Wasser, 20 µL Orcinol-Lösung (**Tab. II-5**) und 160 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%; v/v; **Tab. II-6**) versetzt und in eine MTP (Greiner Bio-One International GmbH; MTP 96-well; **Tab. II-7**) überführt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und inkubiert (60 min; 80 °C; 800 rpm; Eppendorf AG; ThermoMixer® C; **Tab. II-7**). Nach einer Abkühlzeit von 10 min bei RT wurde die  $A_{421\text{nm}}$ -Wert am MTP-Fluoreszenzphotometer (TECAN Group Ltd.; Infinite® M1000 Pro; **Tab. II-7**) gemessen und mit Hilfe der i-control 1.11 Software (TECAN Group Ltd.; **Tab. II-8**) und Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) die Absorption ausgewertet. Parallel zu den zu untersuchenden Proben wurde eine Konzentrationsreihe von L-Rhamnose-Standard (**Tab. II-6**; Deziel et al., 2000; 20 µL je Well) mit Orcinol-Lösung und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, inkubiert und gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe und unter Verwendung der dazugehörigen Standardgeraden wurden die RL-Konzentrationen unter Verwendung von Microsoft Excel (Microsoft Corp.; **Tab. II-8**) in den Messproben bestimmt.

### II.3.10 Dünnschichtchromatographie von Rhamnolipiden

Zur Detektion von per Dünnschichtchromatographie (nach Ochsner, 1993; Wittgens, 2013) wurden 500 µL Kulturbrühe dreimal mit 500 µL Ethylacetat (**Tab. II-6**) versetzt und zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (1 min; 18000 xg). Die organischen Phasen wurden jeweils abgenommen, vereinigt und das Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation (Eppendorf AG; Speed Vac-Konzentrator 5301; **Tab. II-7**; Programm 3; 60 min; 45 °C) vollständig evaporiert und das resultierende Pellet in 10 – 20 µL Ethanol gelöst. Im Anschluss wurden 10 µL der Proben in Banden auf einer Linie mit auf einer ALUGRAM® SIL G/UV254 DC-Platte (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) aufgetragen. Neben den Proben wurden 10 µL eines RL-Standards (**Tab. II-6**) mit einer Konzentration von 1 g/L auf die DC-Platte aufgetragen. Die DC wurde in einer DC-Kammer mit einer mobilen Phase aus Chloroform, Methanol und Essigsäure im Verhältnis 65:15:2 (% v/v/v) entwickelt. Nach 15 min wurde die Chromatographie beendet und die Platte bei RT getrocknet. Anschließend wurde sie mit einem Detektionsreagenz (0,15 g Orcinol; 42 mL VE-Wasser; 8,4 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%, v/v)) mit dem TLC Sprayer (CAMAG AG & Co. GmbH; **Tab. II-7**) besprüht und gleichmäßig mit einem Heißluftgebläse erhitzt, bis die RL als braune Banden erkennbar waren. Die entwickelten DC-Platten wurden mit dem CAMAG TLC® Visualizer 2 (CAMAG AG & Co. GmbH; **Tab. II-7**) dokumentiert.

## III Ergebnisse und Diskussion

Rhamnolipide (RL) sind mikrobiell produzierte Tenside, die als leicht abbaubare und auf Basis nachwachsender Rohstoffe herstellbare Alternative zu Erdölderivaten angesehen werden. Bislang ist die jedoch die biotechnologische Zugänglichkeit durch hohe Rohstoffkosten, aufwändige Herstellungsprozesse und eine geringe Produktivität der Organismen erschwert. Aus diesem Grund sind Bestrebungen, die Rohstoff- und Produktionskosten zu senken, Ausbeuten zu erhöhen und Produkteigenschaften zu verbessern vielversprechende Ansätze, um die Konkurrenzfähigkeit von Biotensiden auf dem Markt zu steigern. Im Sinne einer nachhaltigen Bioökonomie sollten in dieser Arbeit verschiedene RL-Produzenten auf Basis des etablierten Produktionswirts *P. putida* KT2440 konstruiert und hinsichtlich ihrer RL-Produktion evaluiert werden. Hierzu soll im ersten Schritt eine genetische *toolbox* zur effizienten molekularbiologischen Konstruktion und zum Screening von RL-Produzenten generiert werden.

### III.1 Werkzeuge zur Konstruktion und zum Screening von Rhamnolipid-Produzenten

RL werden als Sekundärmetaboliten von verschiedenen Bakterien produziert. Wie typisch bei Sekundärmetaboliten ist die natürliche Produktion von RL durch komplexe Regulationsmechanismen gesteuert und limitiert (Reis et al., 2011). Viele Produzenten sekretieren außerdem neben RL eine Vielzahl von anderen Sekundärmetaboliten, wodurch die Reinigung bei der Produktgewinnung erschwert sein kann (Mukherjee et al., 2006). Zudem sind gerade die gut erforschten und deshalb genetisch zugänglichen Produzenten problematische Pathogene (vgl. I.2; Toribio et al., 2010). Hier stellt die heterologe Produktion in sicheren, etablierten Plattformorganismen eine geeignete Alternative zur Produktion von Sekundärmetaboliten wie RL dar (Ke und Yoshikuni, 2020). Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Integration von Expressionskassetten in das Genom des Wirtes, wodurch im Gegensatz zur bislang dominanten Expression auf Plasmiden (vgl. **Tab. I-3**; Tiso et al., 2017a), der Einsatz von Antibiotika, die Instabilität des genetischen Konstrukts und die Heterogenität der Expression minimiert werden kann (vgl. I.3.1). Jedoch stellt sowohl die effektive Konstruktion verschiedener Expressionskassetten als auch das Hochdurchsatz-Screening der Produktbildung eine große Hürde bei der Entwicklung und Evaluierung der Produktionsstämme dar. Aus diesem Grund wurde im ersten Schritt eine *yTREX-toolbox* mit standardisierten Rekombinationsstellen für genetische Elemente wie Promotoren, Biosynthesegene (BSG), Transkriptionsreporter- und Resistenzmarkerstellen und einen variablen Integrationsmechanismus auf Basis des bereits bekannten *yTREX*-Systems (Domröse et al., 2017) erstellt. Diese Entwicklung wurde in Kooperation mit Robin Weihmann, Dr. Andreas Domröse, Dr. Stephan Thies und Dr. Anita Loeschcke vorgenommen. Das Ziel dieser Arbeit war die Erweiterung des *yTREX-toolbox* Systems zur Ermöglichung der stabilen Integration von BSG in die

*attTn7*-Stelle bakterieller Genome (Choi und Schweizer, 2006) als Basis für die hier durchzuführenden komparativen Studien.

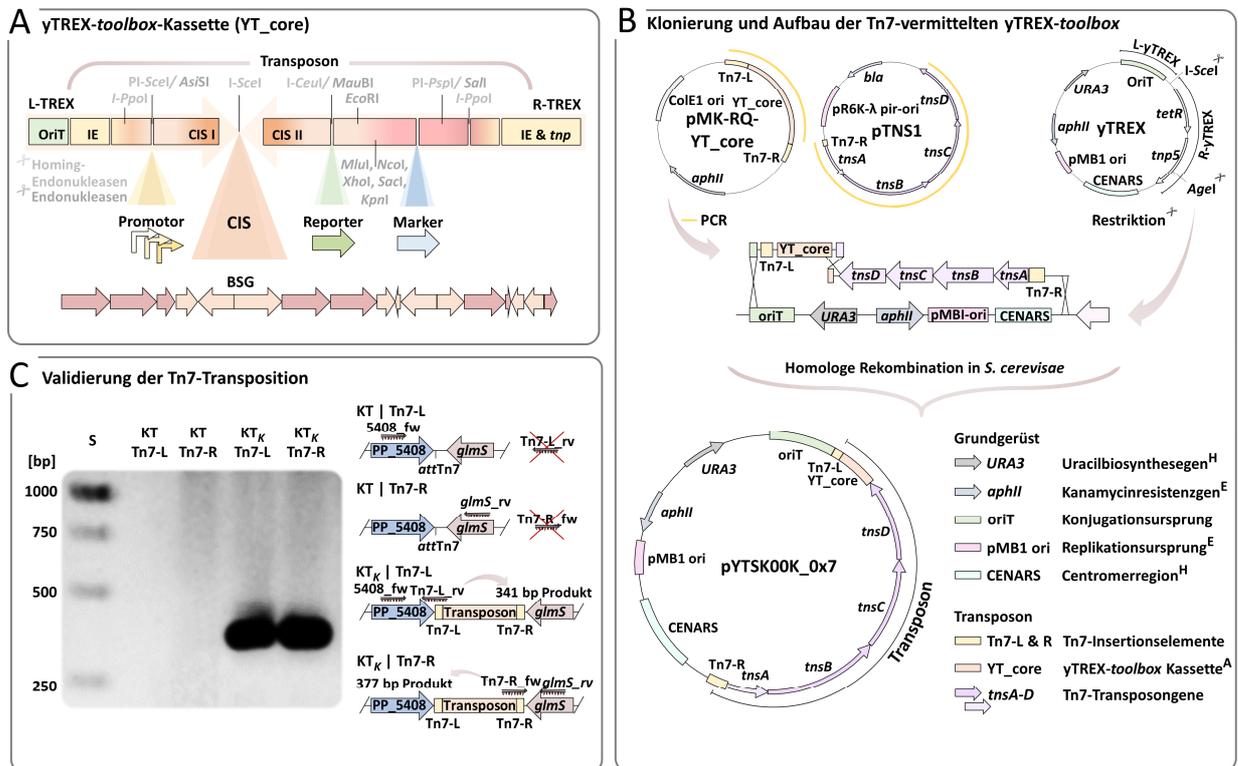
### III.1.1 Konstruktion der *attTn7*-Integration vermittelnden *yTREX-toolbox*

Für die einfache Erzeugung und vergleichende Evaluierung von bakteriellen Produktionsstämmen werden geeignete Vehikel benötigt, die eine standardisierte Integration der heterologen Gene in das Wirtsgenom ermöglichen. Bislang bestehende Systeme, insbesondere für die Produktion von RL (vgl. **Tab. I-3**), sind oftmals Plasmid-basiert und die entsprechenden Stämme müssen unter ständigem Selektionsdruck, z. B. durch ein Antibiotikum, kultiviert werden. Dadurch stellt die Verwendung von Plasmiden einen zusätzlichen Kostenfaktor im Produktionsprozess dar und trägt ferner zur Heterogenität der Expression und nicht reproduzierbaren Produktionstitern bei (vgl. I.3.1.1; Mairhofer et al., 2013; Wehrs et al., 2019). Hier stellt die Genomintegration von BSG eine geeignete Alternative dar (Domröse et al., 2017; Loeschcke und Thies, 2020). Dabei ist zu beachten, dass die Expressionsstärke chromosomal integrierter Zielgene aufgrund der geringeren Kopienzahl im Vergleich zu Plasmid-kodierten Zielgenen deutlich sinken kann und durch den Einsatz von starken Promotoren kompensiert wird (vgl. I.3.1.1; Mairhofer et al., 2013). Dies hat wiederum einen Einfluss auf die Menge der Enzyme, die die Biosyntheseschritte katalysieren, und kann somit prädominant den Titer der jeweiligen Sekundärmetaboliten beeinflussen.

Der Bedarf an molekularbiologischen Werkzeugen, die es erlauben die genetischen Informationen schnell und verlässlich zu manipulieren und stabil ins Genom zu integrieren, ist somit hoch (Luo et al., 2015; Ziemert et al., 2016; Xu et al., 2020) und eine standardisiertes System analog zur kohärenten SEVA-Plattform für Plasmide (Silva-Rocha et al., 2013) existiert noch nicht (Loeschcke und Thies, 2020; vgl. I.3.1.2).

Mit dem Ziel verschiedene Expressionsmodule mit unterschiedlich starken Promotoren zu konstruieren, wurde bei der Konstruktion des Transfer-, Integrations-, und Expressions-*tools* somit auf eine Standardisierung der Klonierungskassette bzgl. definierter genetischer Module Wert gelegt. Dies ermöglicht eine einheitliche Klonierungsstrategie und dient der Sicherstellung einer guten Vergleichbarkeit unterschiedlicher Expressionskassetten. Zudem sollte zur Gegenüberstellung der *rhIAB*-Expressionsstärke verschiedener Promotoren, die positionsspezifische Integration mithilfe der Tn7-Transposase in die einmalig vorkommende *attTn7*-Stelle in *P. putida* KT2440 genutzt werden, um Positionseffekte durch unterschiedliche Integrationsorte zu vermeiden (Zobel et al., 2015; vgl. I.3.1.2). Ferner lässt dies eine Auswahl geeigneter Expressionskassetten zur RL-Produktion zu (vgl. III.2). Auf Basis des bereits bekannten *yTREX*-Systems (Domröse et al., 2017; vgl. **Abb. I-5**) wurde eine *YT\_core*-Sequenz mit standardisierten Rekombinationsstellen für bestimmte genetische Abschnitte wie Promotoren, BSG, Transkriptionsreporter- und Selektionsmarkergenen erstellt (s. a. **Abb. A-2**; Kooperationsprojekt, nicht veröffentlicht). Hierdurch soll eine einfache Klonierung und Integration, basierend auf homologer Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 (s. a. **Abb. I-5**), ermöglicht werden, aber auch eine Standardisierung der Anordnung genetischer Elemente. Das Ziel

dieser Arbeit war somit im Speziellen die Erzeugung von Vektoren, die die Tn7-vermittelte Transposition in die *attTn7*-Stelle in bakteriellen Genomen ermöglichen (**Abb. III-1**).



**Abb. III-1: Konstruktion, Aufbau und Validierung der yTREX-toolbox zur Tn7-vermittelten Transposition und Expression von genetischen Elementen.**

**A:** Die yTREX-toolbox Kassette (YT\_core; Kooperationsprojekt) besteht aus einer standardisierten Rekombinationssequenz von homologen Bereichen und einer Kombination aus (*Homing*-)Endonukleaseschnittstellen, welche definierte Regionen zur Integration von Promotoren, Transkriptionsreporter- und Resistenzmarkergenen besitzt. Die *cluster integration site* (CIS) dient der Insertion von BSG. Diese Rekombinationssequenzen werden flankiert von Insertionselementen (IE), einem oriT (beinhaltet *mob*-Gen/ Konjugations-Erkennungssequenz) in der L-TREX Kassette und je nach Integrationsmodus von einem Transposasagen/ -operon (*tnp*) in der R-TREX Seite, die zusammengefasst das Transposon bilden.

**B:** Zur Klonierung des pYTSK00K\_0x7 Basisvektors wurde das YT\_core, das Tn7-L IE, die Transposasogene *tnsABCD* und das IE Tn7-R mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern, die die homologen Überhänge zu den jeweils zu verknüpfenden Sequenzen beinhalten, aus den Vektoren pMK-RQ-YT\_core und pTNS1 über PCR amplifiziert. Zudem wurde der yTREX-Vektor, der bereits die genetischen Elemente zur *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 und Amplifikation in *E. coli* DH5α enthält, als Grundgerüst verwendet. Der entstandene pYTSK00K\_0x7 Basisvektor beinhaltet hierbei im Grundgerüst die Gene *URA3*, *aphII*, die Bereiche pMB1 ori und CENARS, sowie das oriT. Das Transposon beinhaltet die Tn7 IE, die Gene *tnsA-D* sowie das YT\_core aus (**A**).

**C:** Zur Validierung der Tn7-vermittelten Integration in die *attTn7*-Stelle wurde eine Kolonie-PCR mit den Oligonukleotid-Primern, die zum einen vor und hinter der *attTn7*-Stelle zwischen den Genen PP\_5408 und *glmS* im Genom von *P. putida* KT2440, sowie den Primern, die an der Tn7-L und Tn7-R binden, durchgeführt. Die resultierenden DNA-Abschnitte des genomadaptierten Stammes (KT<sub>K</sub>) wurden mit den PCR-Fragmenten des Kontrollstammes *P. putida* KT2440 (KT) ohne integrierte Transposonkassette im Agarosegel durch Verwendung des GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder (S) verglichen. Die Bildung eines PCR-Produktes (341 bzw. 377 bp) indiziert die erfolgreiche Integration der genetischen Information in die *attTn7*-Stelle des Genoms.

Es wurde zunächst eine standardisierte Kassette (YT\_core; **Abb. III-1 (A)**; Kooperationsprojekt) *in silico* erstellt und durch Gensynthese (vgl. **Tab. II-1**) erhalten. Diese besteht aus einer L-TREX und R-TREX-Region, die später die einzufügenden BSG flankieren. Bei der Erstellung der Rekombinationsbereiche NHB\_v, HB\_P\_fw, CIS I, CIS II, HB\_R\_rv, MC, HB\_M\_fw, HB\_M\_rv und NHB\_h (vgl. **Abb. A-2**; CIS I/II in **Abb. III-1 (A)**) wurden mit Hilfe des Random DNA sequence generator (**Tab. II-8**) sowie außerdem durch Kombination mehrerer Online-tools zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen, RBS-Sequenzen, Promotoren und Terminatoren (RNAstructure Webserver; RBS calculator v2.0; BPPROM; ARNold; **Tab. II-8**) randomisierte DNA-Sequenzen gewählt, die frei von solchen genetischen Elementen sind, die die Expression der BSG behindern könnten. Durch die entstehende Größe des yTREX-Vektors, besonders bei der möglichen

Integration großer Biosynthesecluster (z. B. Prodigiosin-Biosynthesecluster; 22 kbp; s. Domröse et al., 2017), ist es zudem von Nöten, neben Endonuklease- auch sogenannte *Homing*-Endonukleaseschnittstellen einzubauen. Diese gewährleisten mit ihrer langen und selten vorkommenden Erkennungssequenz, dass an bestimmten Stellen des yTREX-Vektors stets eine Linearisierung und nachträgliche Modifikation des Zielgenclusters möglich ist, auch wenn dieser durch genetische Elemente zum Zweck der Produktionsoptimierung oder Produktderivatisierung ergänzt wird. Bei der Erstellung der Oligonukleotide (**Tab. II-3**) zur Klonierung der RL-BSG, wurde aus diesem Grund stets darauf geachtet, dass die *Homing*-Endonukleaseschnittstellen bei dem Einbringen neuer genetische Elemente regeneriert werden.

Die L-TREX-Region beinhaltet neben dieser Kombination aus homologen Rekombinations- und Endonukleaseschnittstellen zur Klonierung bzw. dem Austausch des Promotors, des Integrationsmodus, und der linken Flanke der *cluster integration site* (CIS I), zudem auch einen oriT, um viele verschiedene Expressionswirte adressieren zu können. Außerdem beinhaltet die L-TREX in der hier verwendeten Variante ein Tn7-L als Insertionselement (IE), welches impliziert, dass das zu integrierende Cluster für die Tn7-Transposition flankiert ist. Die R-TREX besteht neben der rechten Flanke der CIS (CIS II) auch aus den homologen Rekombinations- und Endonukleaseschnittstellen für das Transkriptionsreporter- und Selektionsmarkergen, sowie aus dem rechten Tn7-R IE und den damit überlappend kodierten Genen der Tn7-Transposase.

Alle Vektoren, die diese yTREX-*toolbox* Kassette (**Abb. III-1 (A)**; YT\_core) tragen, werden anhand eines einheitlichen Nomenklatur-Standards beschrieben, indem aus jedem Namen eines yTREX-*toolbox* Vektors anhand einer Abkürzungstabelle (**Tab. A-1**) hervorgeht, welchem Reporter, Resistenzmarker, Integrationsmodus, Ersteller und fortlaufender Nummer dieser Vektor zugeordnet werden kann.

Um zunächst einen Basisvektor zu erstellen, der die genannten yTREX-*toolbox*- sowie Transposon Tn7-Elemente enthält, und damit eine vereinfachte Klonierung und stabile Integration gewünschter biosynthetischer Cluster in die *attTn7*-Stelle bakterieller Genome ermöglicht, wurde zunächst der yTREX-*toolbox* Vektor pYTSK00K\_0x7 erzeugt. Dies erfolgte mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 (II.2.5; **Abb. III-1 (B)**).

Im ersten Schritt wurden PCRs mit Oligonukleotiden (**Tab. II-3**) durchgeführt, die zur Amplifikation des IE Tn7-L und der synthetischen yTREX-*toolbox* Kassette (**Abb. A-2**; YT\_core) ausgehend vom pMK-RQ-YT\_core Vektor (**Tab. II-1**) dienen. Außerdem wurde die kodierende Sequenz für die Tn7-Transposase (*tnsABCD*), in deren Promotorbereich das Tn7-R IE enthalten ist, ausgehend vom pTNS1 Vektor amplifiziert (**Tab. II-1**). Mit Hilfe dieser Oligonukleotide konnte, über homologe Überhänge mit einer Größe von ca. 30 bp zu den jeweiligen Rekombinationssequenzen, die *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 (II.2.5) durchgeführt werden. Gleichzeitig wurde der yTREX-Vektor (Domröse et al., 2017), der bereits die kodierende Sequenz für den oriT, den pMB1 ori, das *aphII* Gen, die CENARS Region und das *URA3* Gen beinhaltet (**Abb. I-5**), mittels der Restriktionsendonukleasen *I-SceI* und *AgeI* linearisiert und anschließend mit FastAP dephosphoryliert (II.2.9). Im Anschluss an die *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 (II.2.5)

wurde der Vektor isoliert, in *E. coli* DH5 $\alpha$  amplifiziert (II.2.7; II.2.4) und mit Hilfe der entsprechenden Oligonukleotide (**Tab. II-3**; hier AD42 und Seq\_yTREX\_Cluster\_rv) durch Sequenzierung validiert. Nach diesem Hefe-basierten Klonierungsablauf wurden unter Nutzung verschiedener Rekombinationsstellen unterschiedliche Basisvektoren und ausgehend vom jeweiligen Basisvektor alle yTREX-*toolbox* Vektoren, die in dieser Arbeit zu Expression der *rhl*-Gene konstruiert wurden, erstellt (**Tab. II-1**).

Als yTREX-*toolbox* Basisvektoren werden fortan diese bezeichnet, die direkt zur Adaption für die Produktion alternativer Sekundärmetaboliten zur Verfügung stehen. Beispielsweise wurde zur Integration der Transkriptionsreportergene die Schnittstelle *MauBI* verwendet (HB\_R\_rv; **Abb. A-2**) und für die Resistenzmarkergene (in dieser Arbeit immer Gentamicin) die Schnittstelle *SaII* (HB\_M\_rv; **Abb. A-2**). Hierdurch konnte durch Auswahl der passenden Sequenzen für die in den Oligonukleotiden kodierten Überhänge (**Tab. II-3**), die Integration des Reporters/ Markers in den Vektor erfolgen. Eine Übersicht der hier erzeugten *attTn7*-Integration vermittelnden yTREX-*toolbox* Basisvektoren, ist in **Tab. II-1** (kursiv) enthalten. Diese *toolbox* beinhaltet sowohl die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren mit unterschiedlicher Antibiotikaresistenz im Grundgerüst (pYTSKVK/A\_0G7) als auch Vektoren mit unterschiedlichen Reportersystemen (pYTSKVK\_1-3/6-8G7) sowie einen Vektor zur nachträglichen Addition eines beliebigen Selektionsmarkers im Transposon (pYTSK00K\_0x7; vgl. **Tab. II-1**; **Tab. A-1**).

Für die Klonierung von Promotoren und BSG wurde der jeweilige Basisvektor zur Integration in die CIS mit *I-SceI* linearisiert. Durch Verwendung der standardisierten RBS am Anfang des *rhl*-Biosynthesecusters (BCD2; Mutalik et al., 2013), welches als Verknüpfungselement zwischen Promotor und BSG diente (s. hierzu auch Kapitel III.2), konnte die *in vivo* Rekombination durch lange überlappenden Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation der DNA-Sequenzen (**Tab. II-3**) in Hefe ermöglicht werden.

Jeder komplettierte Vektor wurde mit Hilfe von *E. coli* S17-1 in den Zielstamm *P. putida* KT2440 konjugiert (II.2.6), in dem durch die Aktivität der Tn7-Transposase die Transposition des Transposons in die *attTn7*-Stelle des Genoms erfolgte. Zur Validierung der Tn7-Transposition wurde der Vektor pYTSK01K\_0G7, der innerhalb des Transposons weder ein BSG noch einen Transkriptionsreportergen, aber das Gen zur Vermittlung der Gentamycin-Resistenz enthält, in den *P. putida* KT2440 Stamm konjugiert (erhaltene Klone mit entsprechendem Resistenzphänotyp wurden mit *P. putida* KT $\kappa$  bezeichnet; **Tab. II-2**). Die Verifizierung der Integration wurde über Kolonie-PCR (II.2.3), mit den in der Literatur vorgegebenen Oligonukleotid-Primern zur Verifikation der Tn7-Transposition in *P. putida* KT2440 (Choi et al., 2005; **Tab. II-3**), durchgeführt und mit dem Kontrollstamm *P. putida* KT2440 (KT) ohne integrierte Transposonkassette verglichen (**Abb. III-1 (C)**). Hierbei zeigte sich anhand des Vergleichs der jeweiligen PCR-Produkte mit dem Stamm KT $\kappa$  die erfolgreiche Integration des Transposons.

Zur weiteren Bewertung der Tn7-vermittelten Integration innerhalb des hier konstruierten yTREX-*toolbox* Systems wurde die Transposonstabilität des Stammes KT $\kappa$  in der assoziierten Bachelorarbeit von Xu Li (Li, 2019) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass transponierte Stämme

nach mindestens 12 Passagierschritten auf LB-Agarplatten unter nicht selektierenden Bedingungen keinen Verlust der Transposonkassette verzeichnen. Dies zeigt, dass die hier erzeugten Stämme mit *attTn7*-integrierten Genen vermutlich eine ähnliche genetische Stabilität besitzen, wie es bereits für *P. putida* KT2440 Stämme, die die genetische Information durch randomisierte Tn5-Integration in rRNA-Operons enthalten, beschrieben wurde (Domröse et al., 2019); dort sogar anhand der Stabilität der Sekundärmetabolitproduktion (Prodigiosin) als zusätzliche metabolische Belastung untersucht. Hierbei kann die Produktion eines Sekundärmetaboliten einen zusätzlichen *metabolic burden* und evolutionären Druck ausüben (Brenner et al., 2008; Song et al., 2014; Zhou et al., 2015) während der durch Li, 2019 ermittelte Befund lediglich die Stabilität des genetischen Konstruktes ohne Selektionsdruck bewertet. Die Etablierung von Produktionsstämmen, die über längere Zeit stabil sind, stellt einen wichtigen Aspekt für die Anwendung innerhalb großskaliger Prozesse dar (Yang, 2007; Zhang et al., 2016; Vandermies und Fickers, 2019) und kann durch die Verwendung von Plasmiden nicht gewährleistet werden (Mi et al., 2016; Nora et al., 2019).

Somit stellt das *yTREX-toolbox* System mit der Tn7-vermittelten Integration von genetischen Elementen ein effizientes Werkzeug zur Klonierung und Erzeugung von genetisch stabilen rekombinanten bakteriellen Zellen dar. Die *yTREX-toolbox* bietet jedoch in ihrer Gesamtheit eine immense Vielseitigkeit an Anwendungsmöglichkeiten, sodass für diverse Fragestellungen zukünftig passende Konstrukte gewählt werden können. Im Hinblick auf immer größer werdende Datenbanken (Wang et al., 2017) mit genetischen Informationen von neu identifizierten Genclustern die durch *Next-Generation* Sequenzierung von Metagenomdatenbanken und bioinformatische *tools* zur Identifikation solcher Gencluster (Weber und Kim, 2016) zugänglich werden, können mit diesem Werkzeug BSG von potenziell biotechnologisch interessanten Sekundärmetaboliten leicht kloniert und die Produktionsstämmen hinsichtlich ihrer Eignung getestet werden (s. a. Domröse, 2016). Neben der Insertion von genetischer Information durch randomisierte Tn5-Transposition oder Interposon-Integration, die in der Dissertation von Robin Weihmann behandelt werden, sowie der gezielten Tn7-Integration (diese Arbeit; vgl. III.2/ III.4.1) oder auch der Möglichkeit zur Neuarrangierung von Genclustern und somit gezielter Änderung der kodierten Synthesewege von Sekundärmetaboliten (Domröse et al., 2017), bietet die *yTREX-toolbox* auch die Möglichkeit zum effektiven *pathway* und *metabolic engineering*. Zum Beispiel lassen sich durch Interposon-Rekombinationen Expressionsstärken von Genen im Genom adaptieren, die für Vorstufen eines spezifischen Sekundärmetaboliten kodieren, welches für die zusätzliche Optimierung eines genetisch stabilen *Chassis* zur Etablierung großskaliger Produktionsprozesse von großer Bedeutung sein kann.

Neben der Integration der genetischen Information zur Produktion von Sekundärmetaboliten, lassen sich auch Reporter- und Markergene flexibel austauschen. Bei Stämmen, die natürlicherweise Resistenzen oder Defizienzen aufweisen oder in die später Plasmide eingebracht werden sollen, kann auf die Verwendung eines kompatiblen Resistenz- oder Komplementierungsmarkers geachtet werden. Ebenso kann bei Autofluoreszenz von Stämmen oder Medien ein Fluoreszenzreporter gewählt werden, der einen anderen spektralen Bereich adressiert oder ein Reporter, der auf einen indirekteren Nachweis der Expression über einen zweiten enzymatischen Schritt, z. B. durch eine

hydrolytische Reaktion, abzielt (vgl. **Tab. II-1**; **Tab. A-1**). In Zukunft sollte das System jedoch noch z. B. durch FRT (Flippase)-Stellen, die die Resistenzmarker flankieren, ergänzt werden (Hoang et al., 1998; Choi und Schweizer, 2006), um eine schnelle Eliminierung des Resistenzgens zu ermöglichen und somit die Erzeugung eines voranschreitend multiresistenten Stammes zu vermeiden.

Im Vorfeld zur komparativen Evaluierung verschiedener Promotorsysteme für die RL-Produktion, sollte zunächst die Nutzbarkeit verschiedener Transkriptionsreporter innerhalb der *attTn7*-Integration vermittelnden *yTREX-toolbox* zur Echtzeit-Abschätzung der Expressionsleistung untersucht werden. Drei verschiedene Transkriptionsreportergene, die für die Fluoreszenzproteine mBFP, eYFP und mCherry kodieren sollten dafür in Kombination mit dem Beispielexpressionssystem *PA\_rhIAB* zur RL-Biosynthese unter Kontrolle eines Salicylat-induzierbaren Promotors getestet werden.

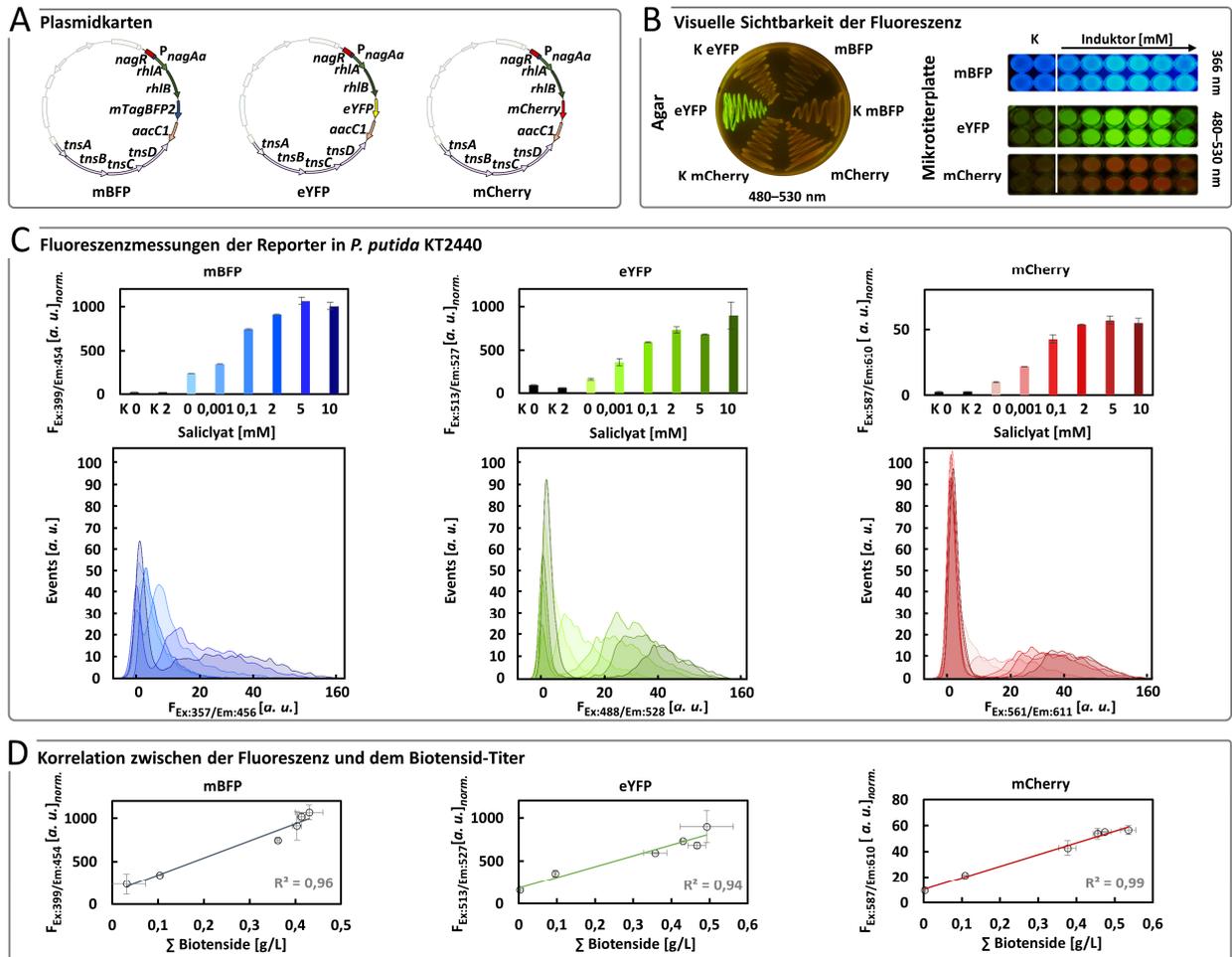
#### III.1.1.1 Identifizierung eines geeigneten Reportersystems zur heterologen Expression von *PA\_rhIAB*

Im Folgenden soll die Nutzbarkeit der *yTREX-toolbox* vermittelten *attTn7*-Integration von Biosynthesegenen evaluiert werden. Hierfür sollte die Transkriptionsstärke und die Expressionshomogenität von BSG in Transkriptionsfusion mit drei verschiedenen Fluoreszenzreporter auf qualitativer und quantitativer Ebene anhand ihrer Fluoreszenzintensität bewertet werden. Weiterhin sollte die durch den hier ausgewählten Promotor induzierte Expression und die daraus resultierende Fluoreszenz der Reporter charakterisiert werden. Die beobachtbare Fluoreszenzintensität der jeweiligen Reporterproteine sollte ferner mit der jeweiligen Expressionsstärke des so erzeugten synthetischen Operons korrelieren. Indirekt könnten dadurch die Produktionsraten der Sekundärmetaboliten abgeschätzt werden. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass die Expressionsstärke unter den gegebenen Bedingungen der dominierende Faktor für den Produktions-Titer und der Einfluss von z. B. Vorläufermolekülmangel, Enzyminhibition und Produktdegradation eher minimal ist. Fluoreszenzsignale sind hierbei, im Gegensatz zur invasiven Quantifizierung, in vielen Kultivierungsapparaturen (z. B. BioLector® I; m2p-Labs GmbH oder BioFlo® 320; Eppendorf AG) in Echtzeit und nicht-invasiv ermittelbar (Rao et al., 2002; Busse et al., 2017; Chopda et al., 2017). Ferner können Fluoreszenzreporter zusätzlich bei qualitativer und visueller Betrachtung (z. B. bei der Selektion Expressions-starker Zellen) aber auch quantitativ (z. B. bei der statistischer Bewertung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen) die Expression relevanter Zielgene unmittelbar indizieren. Dadurch können Fluoreszenz-basierte Reporter beim Vergleich vieler unterschiedlicher Produktionsstämme und -bedingungen hilfreich sein. Die hier betrachteten Fluoreszenzproteine adressieren dabei jeweils einen alternativen spektralen Bereich (spektrale Bereiche s. **Tab. II-13**), sodass eine *toolbox* für verschiedene experimentelle Anforderungen entsteht.

Im Speziellen sollten die promotorlosen Reportergene *mTagBFP2*, *mCherry* und *eYFP* stromabwärts der RL-BSG *rhIA* und *rhIB* kloniert werden, die sich hier unter Kontrolle eines Salicylat-

induzierbaren Promotors, der bekanntermaßen eine geringe Basalexpression besitzt (Becker et al., 2010; I.3.1), befinden. Ein induzierbares System, wie das Salicylat-induzierbare  $P_{NagAa}/NagR$ , erlaubt die graduelle Steuerung der Expressionsstärke. Diese ermöglicht erst, im Vergleich zum konstitutiven Expressionssystem, durch Einstellung mehrerer Expressionsstärken über die Induktorkonzentration, die hier durchzuführende Korrelation der Fluoreszenzintensität mit dem resultierenden Produkt-Titer (hier Biotenside: HAA und mRL). Ferner kann mit diesem Experiment eine Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzreporters für die komparative Evaluierung verschiedener Rhamnolipid-Produzenten (III.2) und die Echtzeit-Verfolgung der *rhl*-Expression getroffen werden. Im ersten Schritt wurden die *yTREX-toolbox* Vektoren pYTSK40K\_1G7/ pYTSK57K\_3G7 und pYTSK61K\_2G7 (Transposon:  $P_{nagAa}/nagR+BCD2+PA\_rhlAB+Reporter$ ; s. **Tab. II-1; Tab. A-1**) wie in III.1.1 beschrieben konstruiert und zur Transposition der gewünschten Gene in *P. putida* KT2440 konjugiert (II.2.6; **Abb. III-2 (A)**). Nach demselben Schema wurden die Vektoren zur Erzeugung der Kontrollstämme pYTSK31K\_1G7/ pYTSK55K\_2G7 und pYTSK56K\_3G7 (Transposon: nur Reporter; s. **Tab. II-1; Tab. A-1**) erhalten, die zusätzlich Aufschluss über die Hintergrundexpression im *attTn7*-Locus durch stromaufwärts gelegene wirtseigene Promotoren geben können. Die Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^B$ ,  $KT_{sal/mRL}^E$  und  $KT_{sal/mRL}^C$  und die promotorlosen Kontrollstämme  $KT_{\kappa}^B$ ,  $KT_{\kappa}^E$ ,  $KT_{\kappa}^C$  wurden anschließend zur visuellen und qualitativen Betrachtung der Fluoreszenz auf  $LB_{sal5/Gm25}$ -Agarplatten mit zusätzlichen 12 mg/L  $FeSO_4$  inkubiert (ü. N.; II.3.2; **Abb. III-2 (B)**). Die Supplementation von zweiwertigen Eisenionen ist hierbei wichtig, um die Produktion von Pyoverdinen (PVD), die in *P. putida* KT2440 bei Eisenlimitierung vermehrt gebildet werden, zu verhindern (Molitor et al., 2020). Ansonsten könnte die PVD-Fluoreszenzemission ( $\lambda_{max_{Ex}} = 398$  nm;  $\lambda_{max_{Em}} = 455$  nm) mit den Fluoreszenzsignalen der hier betrachteten Fluoreszenzreporter (vgl. **Tab. II-13**) interferieren.

Zur zusätzlichen quantitativen Bewertung der Expressionsstärke anhand der Reporterfluoreszenz und der Korrelation mit dem resultierenden Produkt-Titer, wurden die Stämme zusätzlich wie in II.2.1.1 beschrieben kultiviert (LB; 10 g/L Glucose mit 12 mg/L  $FeSO_4$ ), die Expression nach 3,5 h mit einer Konzentrationsreihe von Salicylat (0-10 mM; für die Kontrollstämme 0 und 2 mM) induziert und die Stämme für insgesamt 24 h inkubiert (II.2.1.1). Nach anschließender Sedimentierung und dem Waschen der Zellen in Tris-HCl-Puffer wurde die Fluoreszenzintensität und -verteilung analysiert (II.3.2; II.3.2.1; **Abb. III-2 (C)**). Zudem wurde der Biotensid-Titer (II.3.7;  $\Sigma$  Biotenside; Summe aller HAA und mRL-Kongenere) ermittelt und mit der Fluoreszenz korreliert (**Abb. III-2 (D)**).



**Abb. III-2: Vergleich verschiedener Reportersysteme in *Pseudomonas putida* KT2440 hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und derer Korrelation zur Biotensid-Produktion in der *attTn7*-Integration vermittelnden *yTREX-toolbox*.**

**A:** Plasmidkarten der *yTREX-toolbox* Vektoren pYTSK61K\_2G7 (mBFP), pYTSK57K\_3G7 (mCherry) und pYTSK40K\_1G7 (eYFP) zur Erzeugung der Stämme  $KT_{sal}mRL^B$ ,  $KT_{sal}mRL^E$  und  $KT_{sal}mRL^C$ , zur Salicylat-induzierbaren Expression des synthetischen Operons *rhlAB+reporter*. Die Annotation der Karte wurde lediglich für die Bereiche des Transposons (vgl. **Abb. III-1**) vorgenommen. Die nicht dargestellten Plasmidkarten der Kontrollstämme (K mBFP, K eYFP und K mCherry) beinhalten das Reporterogen ohne Promotorsystem  $P_{nagAa}/nagR$  und RL-Gene  $PA_{rhlAB}$ .

**B:** Qualitative Betrachtung der Fluoreszenz der verschiedenen Stämme auf  $LB_{Gm25/Sal5}$ -Agarplatten und in Tris-HCl-Puffer gewaschenen Zellen in Wells einer Mikrotiterplatte (MTP) kultiviert mit 12 mg/L  $FeSO_4$  nach ü. N. Inkubation. Angeregt wurde bei  $\lambda_{Ex} = 480-530$  nm; bei Flüssigkultivierungen für mBFP bei  $\lambda_{Ex} = 366$  nm (mBFP = Blau; eYFP = grün; mCherry = rot).

**C:** Für die Betrachtung der Zelldichte-normierten Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzverteilung wurden die Stämme mit mBFP, eYFP und mCherry (mBFP = Blau; eYFP = grün; mCherry = rot) sowie die jeweiligen Kontrollstämme für 24 h in  $LB_{Gm25}$ -Medium mit 12 mg/L  $FeSO_4$  kultiviert. Die Induktion der Zielgenexpression erfolgte mit einer Konzentrationsreihe von Salicylat (0; 0,001; 0,1; 2; 5; 10 mM; Kontrollen mit 0 und 2 mM) nach 3,5 h Inokulation. Die Fluoreszenzintensität (obere Reihe) wurde im MTP-Fluoreszenzphotometer analysiert (Mittelwert + Standardabweichung von drei Kulturen), die Populationsheterogenität in Bezug auf die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (zur Veranschaulichung ist eine von drei sehr ähnlichen Messungen gezeigt).

**D:** Die Korrelation zwischen Zelldichte-normierter Fluoreszenzintensität nach 24 h (F; s. a. **C**, obere Reihe) der jeweiligen Reporter und dem Zelldichte-normierten Biotensid-Titer (HAA + mRL; Mittelwert + Standardabweichung von drei Kulturen;  $R^2 \geq 90\%$ ).

Die Untersuchung der hier betrachteten Transkriptionsreporter mBFP, eYFP und mCherry auf qualitativer Ebene zeigte, dass die Expression der Fluoreszenzreportergene in der *attTn7*-Stelle im Genom von *P. putida* KT2440 unter Kontrolle des Salicylat induzierbaren Systems (vgl. **Abb. III-2 (A)**) ausreicht, um ein optisch sichtbares Fluoreszenzsignal für eYFP und mCherry bei  $\lambda_{Ex} = 480-530$  nm auf  $LB_{Gm25/Sal5}$ -Agarplatten zu erhalten (**Abb. III-2 (B)**; links). Jedoch konnte auf den  $LB_{Gm25/Sal5}$ -Agarplatten die Fluoreszenz von mBFP nicht visualisiert werden (**Abb. III-2 (B)**; links), da bei  $\lambda_{Ex} = 366$  nm des CAMAG TLC® Visualizer 2 (**Tab. II-7**) neben mBFP ( $\lambda_{max_{Ex}} = 399$  nm; **Tab. II-13**) auch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid (NADH;  $\lambda_{max_{Ex}} = 340$  nm; s. a. FPbase.org) angeregt wird, welches im Hefeextrakt des LB-Mediums enthalten ist und das Signal überlagert (vgl.

**Abb. A-3).** Deshalb wurden für die nachfolgenden quantitativen Analysen der Fluoreszenz die Zellen nach Kultivierung in LB mit Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die qualitative Betrachtung der Fluoreszenz der gewaschenen Zellen in MTP (**Abb. III-2 (B)**; rechts) zeigte, dass auch für mBFP ein sichtbares Fluoreszenzsignal zu beobachten ist. Hier lässt sich zudem auch erkennen, dass bei hohen Induktorkonzentrationen, die Fluoreszenz schwächer erscheint, was auf das reduzierte Wachstum der Zellen zurückzuführen ist.

Sowohl visuell als auch bei quantitativer Analyse (vgl. **Abb. III-2 (B und C)**) ist erkennbar, dass der *attTn7*-Locus eine geringfügige Hintergrundexpression schon ohne Promotor vorweist. Besonders gut lässt sich dies am Stamm *P. putida*  $KT_{K^E}$  (K eYFP) mit dem Fluoreszenzprotein eYFP beobachten, welches im Vergleich zu den Proteinen mBFP (s. K mBFP) und mCherry (s. K mCherry) ohne Induktor und ohne Promotorsystem/ *PA\_rhlAB*, ein höheres Fluoreszenzsignal aufweist. Eine Ergänzung der *yTREX-toolbox* um bekannte Transkriptionsterminatoren (Amarelle et al., 2019) an den Enden des Transposons wäre in Zukunft eine sinnvolle Weiterentwicklung. Insbesondere bei der hier betrachteten Tn7-Variante ist dies wünschenswert, um den Einfluss wirtseigener Promotoren zu verhindern, die Gene des Transposons adressieren könnten.

Die Induktion der Zielgenexpression innerhalb der Flüssigkulturen *P. putida*  $KT_{sal}mRL^B$ ,  $KT_{sal}mRL^E$  und  $KT_{sal}mRL^C$  (mBFP, eYFP und mCherry) mit verschiedenen Salicylatkonzentrationen zeigte, dass mit steigenden Salicylatkonzentrationen auch das Zelldichte-normierte Fluoreszenzsignal steigt. Dies weist auf eine von der Induktorkonzentration abhängige Erhöhung der Transkriptionsstärke des synthetischen Operons bis zu einer Konzentration von ca. 2 mM hin (vgl. **Abb. III-2 (C)**; obere Reihe). Bei Zugabe von höheren Induktorkonzentrationen kommt es zwar zu einer Erhöhung der Fluoreszenzsignalstärke einzelner Zellen (vgl. **Abb. III-2 (C)**; Durchflusszytometrie), jedoch ebenfalls zu einer größeren Streuung in der Intensität der Fluoreszenz. Weiterhin nimmt mit zunehmenden Induktorkonzentrationen die Heterogenität der Fluoreszenz-positiven Events zu, wodurch auch vermehrt nicht fluoreszierende Events vorzufinden sind (vgl. **Abb. III-2 (C)**; Wertetabelle s. **Tab. A-2**). Ebenfalls ist keine weitere deutliche Erhöhung der normierten Fluoreszenz bei einer Induktorkonzentration von über 2 mM Salicylat zu erkennen (vgl. **Abb. III-2 (C)**; obere Reihe). Dies könnte auf einen Selektionsdruck ausgehend von RL bei starker Expression der *rhl*-Gene hindeuten aber auch bedeuten, dass ab diesem Zeitpunkt alle Aktivatorproteine des  $P_{nagAa}/NagR$ -Promotorsystem vollständig gesättigt und keine weitere Induktion der Expression mehr möglich ist. Diese Stagnation der Expressionsleistung ab 5 mM Salicylat kann aber auch auf einen konzentrationsabhängigen Einfluss von Salicylat zurückzuführen sein, der bereits visuell und durch das reduzierte Wachstum der Zellen beobachtet werden konnte (**Abb. III-2 (B)**; rechts).

Dies könnte ebenfalls die beobachtete Fluoreszenz-Heterogenität erklären (vgl. **Abb. III-2 (C)**; **Tab. A-2**; assoziierte Bachelorarbeit Dias, 2019; III.3.1.1). Jedoch zeigte Li, 2019 in seinen Untersuchungen zur Expressionshomogenität eines frisch konjugierten *P. putida*  $KT_{sal}mRL^E$  in der logarithmischen Wachstumsphase, dass nach Induktion mit 2 mM Salicylat und anschließender achtstündiger Kultivierung, 97,5% der untersuchten Zellen (Events) mit einer zu erwartenden

Fluoreszenzintensitätsverteilung (s. a. Arnfinnsdottir et al., 2016) fluoreszieren, wodurch die Expression als homogen angesehen werden kann. Die Ursache, der in dieser Arbeit beobachteten Expressionsheterogenität, könnte somit auf eine längere Kultivierungsdauer, das Absterben der Zellen, den Einfluss des höher-konzentrierten Induktors und die starke Produktion der Sekundärmetaboliten zurückzuführen sein. Zudem könnten die gebildeten RL-Sekundärstrukturen (pH-abhängig zwischen 0,02 (Mizellen) bis zu 0,3  $\mu\text{m}$  (Vesikel); Sekundärstrukturen vgl. **Abb. A-4 (B)**; Champion et al., 1995) aber auch morphologisch nicht veränderte abgestorbene Zellen hier als Events durch das Zytometer dokumentiert werden. Zukünftig könnte zusätzlich eine Anfärbung mit Propidiumiodid vorgenommen werden, um abgestorbene Zellen vollständig zu diskriminieren. Dieser fluoreszierende Farbstoff dringt selektiv in tote Zellen ein und zeigt ein signifikantes Fluoreszenzsignal ( $\lambda_{\text{maxEx}} = 535 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{maxEm}} = 617 \text{ nm}$ ) nach Interkalierung in DNA (Jones und Senft, 1985). Weiterhin könnte eine zeitlich aufgelöste Aufnahme der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer Aufschluss über die Veränderung der Heterogenität während der Kultivierung bzw. Produktion von RL geben.

Quantitativ ließ sich durch Berechnung des Verhältnisses zwischen der Kontrolle des Reporters und dem Signal des jeweiligen Reporters bei 2 mM Salicylat bezogen auf die Messung im MTP-Fluoreszenzphotometer (**Tab. II-7**) ein gerätespezifisches Signal-zu-Rausch Verhältnis (SNR) für die Reporter mBFP, eYFP und mCherry von 99/1, 97/3 und 99/1 ermitteln, d. h. in allen Fällen ist nur wenig Hintergrundsignal vorhanden. Die Induzierbarkeit, welche die prozentuale Steigerung des Signals bei 2 mM Salicylat bezogen auf die Basalexpression bei 0 mM Salicylat angibt, ist bei allen betrachteten Reportersystemen ähnlich.

Die Gegenüberstellung der normierten Fluoreszenz mit den ermittelten Biotensid-Titern nach 24 h (**Abb. III-2 (D)**) ergab, dass innerhalb von  $\text{KT}_{\text{sal}}\text{mRL}$  und der Induktion der Expression mit verschiedenen Salicylatkonzentrationen eine Korrelation von  $R^2 \geq 90\%$  bei allen hier betrachteten Fluoreszenzreportern sichtbar war. Das zeigt, dass die Verfolgung der Expression des  $\text{PA}_{\text{rhlAB}}$  Operons über die Fluoreszenz dieser Transkriptionsreporter unter den gewählten Bedingungen sich prinzipiell zur zeitaufgelösten Indikation der Produktion von hier mRL eignen könnte. Eine Übertragung dieser Befunde auf andere Sekundärmetaboliten als RL aber auch die Ermittlung des exakten Biotensid-Titers kann jedoch aufgrund unterschiedlicher Einflüsse auf Proteinebene, der Reifung des Chromophors und der variierenden metabolischer Flüsse anhand der Fluoreszenz nicht erfolgen. Dies sollte für jeden Produktionsstamm individuell eruiert und nur als Ergänzung für quantitative Methoden zur Ermittlung des Produkt-Titers bzw. als initiale Einschätzung verstanden werden.

Zusammenfassend konnten anhand der hier durchgeführten Expressionsstudien die Stämme *P. putida*  $\text{KT}_{\text{sal}}\text{mRL}^{\text{B}}$ ,  $\text{KT}_{\text{sal}}\text{mRL}^{\text{E}}$  und  $\text{KT}_{\text{sal}}\text{mRL}^{\text{C}}$  hinsichtlich ihrer Eigenschaften der Expression der Reporterproteine mBFP, eYFP und mCherry untersucht und ihre Expressionsantwort in Bezug zur Eignung für die in dieser Arbeit zu untersuchenden RL-Produzenten-Stämme bewertet werden (vgl. **Tab. III-1**).

**Tab. III-1: Bewertung der Fluoreszenzreporter mBFP, eYFP und mCherry auf die Anwendbarkeit als Transkriptionsreporter für die heterologe Rhamnolipid-Produktion in *P. putida* KT2440 im attTn7-Integration vermittelnden yTREX-toolbox System.**

Reporter	Stamm	Qualitativ		Quantitativ			Anwendbarkeit	
		ohne Reinigung <sup>II</sup>	visuelle Signalintensität	SNR <sup>III</sup>	Induzierbarkeit <sup>V</sup> [%]	Homogenität <sup>VI</sup> [%]	Transkriptionsreporter <sup>IV</sup>	Echtzeitmessung
mBFP	KT <sub>SD</sub> /mRL <sup>B</sup>	-	+++	99 / 1	74	29	+	(+)
eYFP	KT <sub>SD</sub> /mRL <sup>E</sup>	+	+++	97 / 3	78	83 (97')	+	+
mCherry	KT <sub>SD</sub> /mRL <sup>C</sup>	+	++	99 / 1	81	46	+	+

I: nach 8 h Kultivierung (Li, 2019).

II: durch Interferenz mit Zell- und Medienkomponenten.

III: Signal-zu-Rausch Verhältnis bezogen auf die Messung im BioLector® I, m2p-labs GmbH (Tab. II-7).

IV: Korrelation zwischen Biotensid-Titer und Fluoreszenz  $\geq 90\%$  nach 24 h und Induktion mit verschiedenen Salicylat-Konzentrationen.

V: prozentuale Erhöhung der Fluoreszenzantwort zwischen nicht und mit 2 mM Salicylat induzierten Stämmen.

VI: Homogenität betrachtet für die diskriminierten Events nach 24 h Kultivierung.

Die Anwendung von Fluoreszenzproteinen zur Ermittlung der Transkriptionsstärke wurde bereits oft als hilfreich beschrieben (Aymoz et al., 2016) und ermöglicht hierbei u. a. die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), was eine automatische Unterscheidung und Sortierung von Zellen anhand des Fluoreszenzsignals und die Überprüfung von ca.  $10^7$  Zellen pro Stunde (Francisco et al., 1993) auf ihre Fluoreszenz ermöglicht. Darüber hinaus können verschiedene Fluoreszenzreporter innerhalb einer Mischkultur nahezu zeitgleich betrachtet und isoliert werden, wodurch Interspezies-Interaktionen innerhalb mikrobieller Gemeinschaften aufgeschlüsselt werden können (Burmeister et al., 2019). Neben den hier betrachteten Fluoreszenzreporter der GFP-Familie gibt es eine Vielzahl weiterer Fluoreszenz-basierter Reporter, die gewisse Vorteile gegenüber den hier betrachteten haben. Hierzu zählen z. B. auch die Flavinmononukleotid- (FMN) bindenden Fluoreszenzproteine (FbFP), auch als LOV-basierte Fluoreszenzproteine bekannt, die aufgrund ihrer geringeren Größe, ihrer Sauerstoff- und pH-Unabhängigkeit und ihrem Chromophor FMN als Alternative zu den Fluoreszenzreportern der GFP-Familie zählen (Drepper et al., 2007).

Aber auch Reporter, die aufgrund einer biochemischen Reaktion ein Signal erzeugen, können das hier vorgestellte Set ergänzen. So können hydrolytisch aktive Enzyme wie  $\beta$ -Galactosidase oder  $\beta$ -Glucuronidase (Frampton et al., 1988; Weihmann et al., 2020) nicht nur durch Verwendung von X-Gal- /X-Gluc-Agarplatten (Frampton et al., 1988; Domingues et al., 1997) bereits bei der Selektion von geeigneten Stämmen helfen, sondern zur Verfolgung der Transkriptionsstärke (allerdings nicht in Echtzeit) genutzt werden. Die erzeugte kolorimetrische Antwort durch die enzymatische Signalamplifikation (Iyer et al., 2001) ist meist sensitiver und linear quantifizierbarer als die fluorimetrische (Weihmann et al., 2020). Aufgrund dessen werden bei bspw. geringeren Expressionsleveln sensitivere Methoden zur Detektion benötigt und Enzyme als Reportersysteme in Betracht gezogen (Iyer et al., 2001). Zudem könnte die Korrelation zwischen hydrolytischer Reaktion des Enzyms, wie im Fall der Spaltung von ONPG durch LacZ (Weihmann et al., 2020), besser mit der Reaktion, die zur Produktion der Sekundärmetaboliten durch die zu produzierenden Enzyme aus dem zu exprimierenden biosynthetischen Cluster dienen, übereinstimmen. Somit stellt die hier entwickelte yTREX-toolbox und das Set an Tn7-toolbox Basisvektoren (vgl. Tab. II-1) eine effiziente und geeignete Weiterentwicklung der bestehenden Systeme dar, um eine Expression zu verfolgen und die Klonierung zu vereinfachen (vgl. III.1.1).

Für diese Arbeit wurde aufgrund der geringen Interferenz von Zell- und Medienkomponenten und der höheren Signalintensität sowie der Kompatibilität mit dem hier verwendeten Mikrobioreaktorsystem (**Tab. II-7**) eYFP als Transkriptionsreporter verwendet, um die Expression der RL-Gene in den weiteren Experimenten zu verfolgen. Neben einer geeigneten Methode zur Verfolgung der PA\_*rhIAB* Expression stellt die einfache und schnelle Detektion und der quantitative Vergleich von RL-Titern eine Herausforderung dar. Viele Methoden sind hierbei Tensid-spezifisch, besitzen eine geringe Genauigkeit und sind oftmals zur Evaluierung mehrerer Proben nicht geeignet (Varjani und Upasani, 2017). So sollten als weitere Voraussetzung für diese Arbeit verschiedene beschriebene Assays kritisch evaluiert werden.

#### **Zusammenfassung | Stammerzeugung mit Hilfe der yTREX-toolbox Tn7-Variante**

- (1) Die Entwicklung eines Sets an Basisvektoren unterschiedlicher Resistenz- und Reportergene auf Basis des Tn7 Transposons stellt als Erweiterung des yTREX-toolbox Systems ein vielseitiges *tool* zur stabilen Integration ins bakterielle Genom dar.
- (2) Der Vergleich verschiedener Fluoreszenz-basierter Transkriptionsreporter demonstriert deren Eignung zur Verfolgung der Expression der PA\_*rhIAB* Gene in Echtzeit. Ferner können Sie als Indikatoren für die Produktion von Biotensiden dienen.
- (3) Die hier entwickelte *attTn7*-Integration vermittelnde yTREX-toolbox in Kombination mit dem Fluoreszenzreporter eYFP soll auf Basis dieser Ergebnisse zur Verfolgung der *rhIAB*-Expressionsstärke dienen.

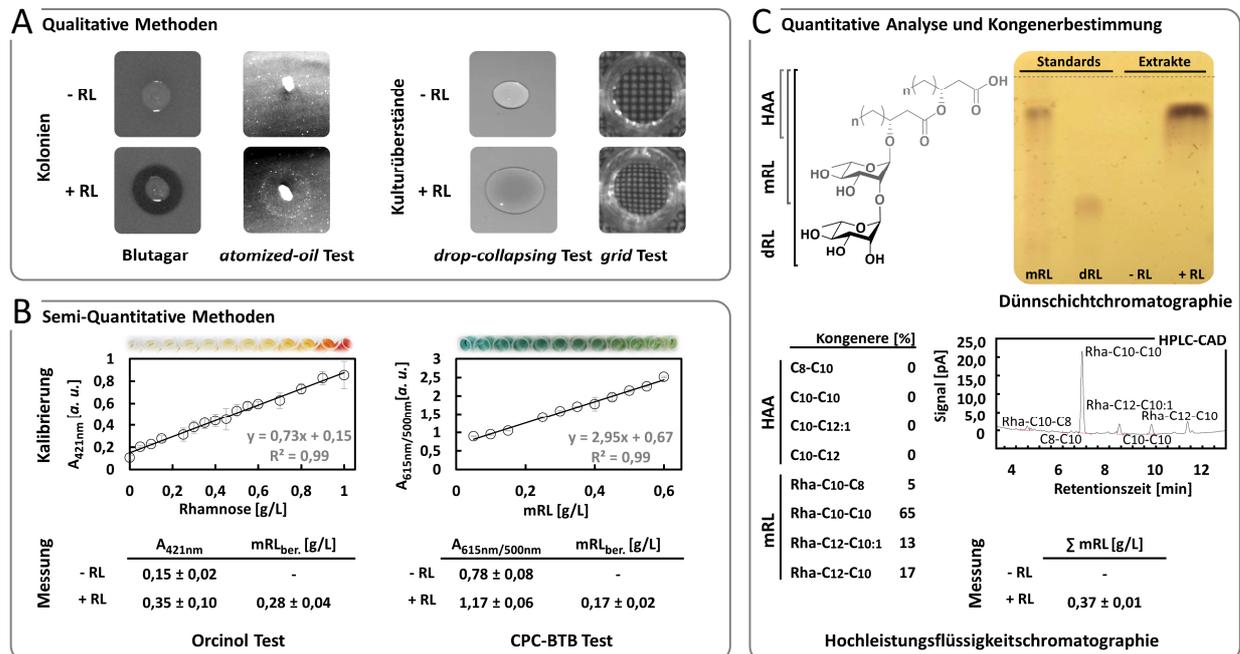
#### III.1.2 Evaluierung verschiedener Methoden zum Screening von Rhamnolipid-Produzenten

Zur initialen Evaluierung der in dieser Arbeit mit Hilfe der *attTn7*-Integration vermittelnden yTREX-toolbox zu konstruierenden Stammbibliothek sowie der vergleichbarer Bewertung verschiedener Kultivierungsbedingungen wird ein robuster, genauer, zeit- und kosteneffizienter und im Hochdurchsatz durchführbarer Assay für die Quantifizierung der RL-Produktion initial erzeugter Stämme benötigt.

In der Literatur wurden bereits mehrere Methoden zum Nachweis der Produktion von Biotensiden wie RL beschrieben (Varjani und Upasani, 2017). Diese Methoden beruhen auf hämolytischer Aktivität, der Komplexierung von Pigmenten oder Fluorophoren, Nachweisreaktionen mit Komponenten wie Zuckern oder der Visualisierung von reduzierter Oberflächenspannung von Wassertröpfchen (I.1.1.1).

Im ersten Schritt sollten diese Methoden im Hinblick auf die RL-Produktion in *P. putida* KT2440 pPS05 verglichen und die Zuverlässigkeit dieser Methoden bewertet werden. Hierfür wurden Kulturüberstände und Extrakte nach 24 h von in LB-Medium kultivierten *P. putida* KT2440 pPS05-Stämmen (II.1.1; II.2.1) und der Kontrolle *P. putida* KT2440, aber auch ganze Zellen, sowohl im Blutagar zum Nachweis hämolytischer Aktivität (II.3.3), im *atomized-oil* Test (II.3.4), im *drop-collapsing* und *grid* Test (II.3.5), im CPC-BTB Test (II.3.6), im Orcinol Test (II.3.9) als auch

analytisch in der Dünnschichtchromatographie (II.3.10) und der Flüssigchromatographie (HPLC-CAD; II.3.7) evaluiert (**Abb. III-3**).



**Abb. III-3: Evaluierung verschiedener Literatur bekannter Methoden zur Ermittlung der Rhamnolipid-Produktion in *Pseudomonas putida* KT2440 + pPS05.**

**A:** *P. putida* KT2440 (-RL) sowie *P. putida* KT2440 + pPS05 (+RL) Kulturen wurden auf einer Blutagarplatte oder einer LB-Agarplatte (ü. N.; 30 °C) inkubiert und im Fall des *atomized-oil* Tests vor dem Fotografieren mit einer dünnen Schicht Paraffinöl besprüht. Hierbei bilden sich bei RL-Produktion (+RL) Höfe um die Kolonien. Zudem wurde RL-Produktion durch Flüssigkultivierungen der genannten Stämme detektiert, indem 20 µL Kulturüberstand auf eine leere Petrischale pipettiert wurde (*drop-collapsing* Test), der bei RL-Anwesenheit zerläuft oder durch Überführung von 100 µL Kulturüberstand in eine MTP, wobei hier das Verzerren des darunterliegenden Gitters beobachtet werden kann (*grid* Test).

**B:** Die Kalibrierungen wurden mit Hilfe einer L-Rhamnose- oder mRL-Konzentrationsreihe erstellt, indem für diese im Fall des Orcinol Tests der A<sub>421nm</sub>-Wert gemessen und im Fall des CPC-BTB Tests das Verhältnis A<sub>615nm</sub>/A<sub>500nm</sub> ermittelt wurde. Diese Absorptionwerte und -verhältnisse werden mit der RL-Konzentration korreliert, um Regressionsgeraden (Orcinol Test:  $y = 0,73x + 0,15$ ,  $R^2 = 0,99$ , linearer Bereich: 0-1 g/L mRL; CPC-BTB Test:  $y = 2,95x + 0,67$ ,  $R^2 = 0,99$ , linearer Bereich: 0,05-0,6 g/L mRL) zu erstellen. Für die Messung der (extrahierten) Kulturüberstände von *P. putida* KT2440 (-RL) sowie *P. putida* KT2440 + pPS05 (+RL) ergaben sich mRL-Konzentrationen von 0,28 g/L (Orcinol Test; Abweichung HPLC-Messung aus (C): 24%) und 0,17 g/L (CPC-BTB Test; Abweichung HPLC-Messung (C): 54%).

**C:** Für die DC wurden *P. putida* KT2440 (-RL) und *P. putida* KT2440 + pPS05 (+RL) Extrakte auf eine Kieselgelplatte getüpfelt und nach Entwicklung mit Orcinollösung angefärbt (Laufmittelfront durch gestrichelte Linie angedeutet). Hierdurch wurden die zuckerhaltigen Substanzen durch Interaktion mit Orcinol sichtbar. mRL- (+RL) und dRL-Spezies sowie Abbauprodukte ließen sich auf Grund des unterschiedlichen Laufverhaltens identifizieren. In der HPLC-CAD ließen sich verschiedene Kongenere auftrennen, die sich in den Fettsäurekettenlängen unterscheiden.

Die qualitativen Assays zeigten (**Abb. III-3 (A)**), dass sowohl die Methoden die auf Basis von Kolonien auf Agarplatten, als auch die Tests, die mit zellfreien Kulturüberständen funktionieren, sich gut eignen um einen ersten Hinweis auf RL-Produktion in einem *P. putida* Stamm zu liefern. Bei den Agarplatten-basierten Methoden war die Produktion von RL durch die Bildung von Höfen um die Kolonien zu erkennen. Bei dem *grid* und dem *drop-collapsing* Test war dies durch das Zerlaufen des Tropfens oder der Verzerrung des darunterliegenden Gitters zu beobachten, was auf die Verringerung der Oberflächenspannung des Mediums durch die darin enthaltenen RL hinwies. Dadurch erschienen diese qualitativen Methoden ideal geeignet zum Screenen von großen Stammbibliotheken, jedoch nur bedingt zu einer quantitativen Einschätzung, da sich die beobachteten Effekte nicht nur auf das Biotensid (vgl. Varjani et al., 2007; Afshar et al., 2008) oder den Titer des jeweiligen Biotensids (hier RL) zurückführen lassen können. Denn auch die Biotensidart und das Kongenerverhältnis (z. B. einen Gemisch aus HAA und mRL mit verschiedenen Kongeneren), welches variieren kann, kann deren Fähigkeit zur Hämolyse von Blut und zur

Verringerung der Oberflächenspannung beeinflussen (Varjani und Upsani, 2017). Zudem stellt eine Kalibrierung dieser Methoden eine große Herausforderung dar, denn sowohl im Blutagar als auch im *atomized-oil* Test kann aufgrund unterschiedlicher Diffusionsverhalten durch den Agar, das wiederum auch vom Molekulargewicht, der Porengröße und der Temperatur abhängig ist, bzw. der Unklarheit welche Konzentration des Biotensides für die Ausbildung des beobachtbaren Effekts (Hämolyse bzw. Ordnung der Paraffintröpfchen) verantwortlich ist, nicht festgestellt werden, wieviel Zielprodukt produziert wurde. Bei oberflächenspannungsabhängigen Tests wie dem *drop-collapsing* und *grid* Test können nur schwer Aussagen zu Konzentrationen oberhalb der CMC gemacht werden, hier stellt zudem die Dokumentation ein Problem dar, da die Tropfen entweder zu schnell zerlaufen, um eine gleichzeitige Dokumentation zu ermöglichen, oder dass bei leichten Erschütterungen im *grid* Test der Linseneffekt sich umdreht und gestört wird (Varjani und Upsani, 2017).

Demgegenüber stehen Methoden, die zusätzlich zur qualitativen Antwort eine semi-quantitative Einschätzung der RL-Konzentration geben. RL werden in der Regel von den Bakterien in den Kulturüberstand sekretiert, was eine einfache Bestimmung von Produkt-Titern oder Ausbeuten möglich macht (vgl. I.1.1.1). Prominente Beispiele sind zum einen der Orcinol Test (**Abb. III-3 (B)**; links) und der CPC-BTB Test (**Abb. III-3 (B)**; rechts; Ochsner et al., 1994; Yang et al., 2015). Letzterer hat lt. Literatur den großen Vorteil, dass er mit reinen Kulturüberständen durchgeführt werden kann und Extraktionen nicht nötig sind, im Gegensatz zum Orcinol Test, der in den Quellen immer mit Extrakten durchgeführt wurde. Für die beiden Assays wurden Kalibrierungen mit Hilfe von L-Rhamnose- bzw. mRL- (AGAE Technologies, LLC; >98% mRL-Anteil nach Herstellerangaben) Konzentrationsreihen erstellt. Diese Absorptionswerte und -verhältnisse wurden mit der RL-Konzentration korreliert, um Regressionsgeraden (Orcinol Test:  $y = 0,73x + 0,15$ ,  $R^2 = 0,99$ , linearer Bereich: 0-1 g/L mRL; CPC-BTB Test:  $y = 2,95x + 0,67$ ,  $R^2 = 0,99$ , linearer Bereich: 0,05-0,6 g/L mRL) zu erhalten. Für die Extrakte aus Kulturüberständen von *P. putida* KT2440 (- RL) und *P. putida* KT2440 + pPS05 (+ RL) ergaben sich somit aus den gemessenen Absorptionswerten mRL-Konzentrationen von 0,28 g/L im Orcinol- und 0,17 g/L im CPC-BTB Test. Verglichen mit den Ergebnissen, der HPLC-Messung ergaben sich Abweichungen von rund 24% beim Orcinol- und 54% beim CPC-BTB Test. Beim Orcinol Test könnten hier Extraktionseffizienz und Interferenz mit Zell- und Medienkomponenten eine Rolle spielen. Weiterhin könnten andere unwissentlich extrahierte Substanzen mit Zuckerresten mit Orcinol interagieren und so mit der RL-Bestimmung interferieren (Varjani und Upsani, 2017), wie am Beispiel IPTG gezeigt (Wittgens, 2013). Aus diesem Grund, sowie wegen der niedrigen Sensitivität des Assays, ist eine direkte Messung im Kulturüberstand nicht möglich, sondern die Methode erfordert einen Extraktions- und Konzentrierungsschritt in Ethylacetat. Der optimale Übergang in die organische Phase ist dabei u. a. von Proteinkonzentration und pH-Wert des Mediums abhängig (Biselli et al., 2020). Der CPC-BTB Test wurde ursprünglich für das Lipopeptid Surfactin entwickelt und funktioniert vermutlich über ionische Komplexierung von CPC, wodurch BTB frei wird und gemessen werden kann (Yang et al., 2015). Vor allem Verbindungen mit emulgierenden Eigenschaften oder organische Säuren die zusammen mit einem Biotensid von Interesse produziert werden und sich durch die fehlende Extraktion noch in der Probe

befinden könnten, können den Assay natürlich stören (Heuson et al., 2018). So könnte sich die relativ hohe Abweichung gegenüber den in der HPLC ermittelten Werten erklären lassen.

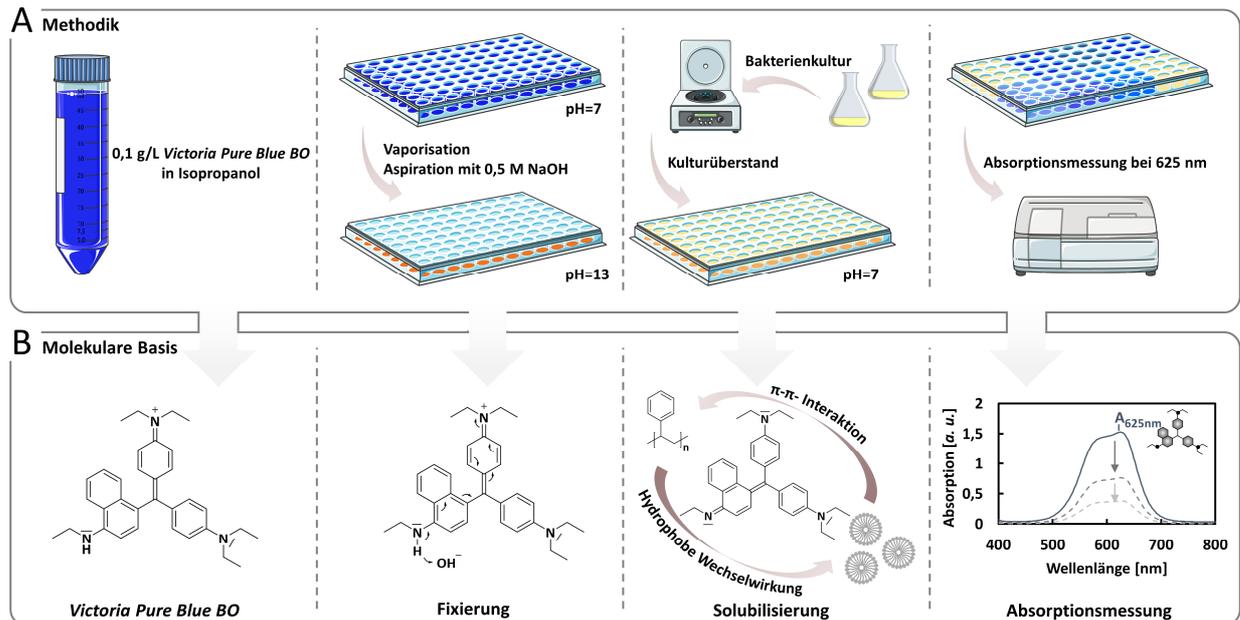
Zur Ermittlung der Zusammensetzung des Biotensids aus verschiedenen Spezies (HAA, mRL oder dRL), der Kongener-Zusammensetzung (hier: Länge und Sättigungsgrad der Fettsäuren) sowie zur absoluten Quantifizierung eigneten sich bedingt die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-CAD; **Abb. III-3 (C)**). Die Visualisierung der DC funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie der Orcinol Test, indem im Anschluss an die Chromatographie der Extrakte zuckerhaltige Moleküle durch Interaktion mit Orcinol sichtbar gemacht werden, wodurch sich mRL und dRL-Spezies über die Laufweite (bzw.  $R_f$ -Werte) im Vergleich mit einem Standard auseinanderhalten, sowie z. B. zuckerhaltige Abbauprodukte erkennen lassen. Jedoch kann durch die ungleichmäßige Derivatisierung der DC mit der Orcinol-Färbelösung und Entwicklung durch Erhitzen nur äußerst eingeschränkt eine quantitative Aussage über die RL-Konzentration gemacht werden. Die Methode mit der höchsten Genauigkeit stellt die HPLC dar, in der sich mit Hilfe eines *charged-aerosol* Detektors (CAD) verschiedene Kongenere (Die zuvor über MS zugeordnet wurden) auseinanderhalten lassen, die sich in den Fettsäurekettenlängen unterscheiden (Behrens et al., 2016a, b, c). Hier ergab sich für *P. putida* KT2440 + pPS05 (+ RL) somit als Hauptkongener das mRL mit den Kohlenstoffketten  $C_{10}$ - $C_{10}$  und ein absoluter mRL-Titer von 0,37 g/L (vgl. **Abb. III-3 (C)**). Eine Hochdurchsatz-Anwendung zur initialen komparativen Bewertung verschiedener Tensid-produzierender Stämme und Bedingungen ist damit jedoch nur bedingt möglich, da sie eine sehr zeit- und kostenintensiv Methode darstellt.

Zusammengefasst erfordern viele der hier betrachteten Konzepte zeitaufwendige Extraktionsverfahren oder liefern keine zuverlässigen quantitativen Informationen spezifisch für nur ein Biotensid, da diese nur bedingt mit RL funktionieren, oder mit anderen Medienkomponenten oder Metaboliten interferieren. Das schränkt die Anwendung für einen Hochdurchsatz-Vergleich verschiedener RL-Produzenten ein.

#### III.1.2.1 Etablierung des VPBO-Assay zur Hochdurchsatz-Quantifizierung von Biotensiden

In Anbetracht der Einschränkungen anderer Literatur basierter Assays zur RL-Quantifizierung (III.1.2) sollte als Alternative hier die Detergenz-abhängige Solubilisierung des Farbstoffs VPBO, der kommerziell in Filzstiften verwendet wird (Miller und Wade, 1958), auf die Anwendbarkeit zur Hochdurchsatz-Bestimmung von RL untersucht werden. Grundlage dafür bot die bereits beschriebene Eignung des Stoffes zur robusten und zuverlässigen Bestimmung von Restmengen kationischer und nichtionischer Detergenzien (CTAB, C12E8, Tween 80) in Impfstoffpräparaten unter definierten Bedingungen (Roosloot und Schoen, 2011), was sogar die CMC-Bestimmung von definierten Detergenzien erlaubt (Vulliezlenormand und Eisele, 1993; Little et al., 1994; Chandran und Nibert, 1998). Ziel war ein robuster und empfindlicher kolorimetrischer Assay für den Nachweis und die Quantifizierung von RL-Biotensiden in Kulturüberständen von rekombinanten

*P. putida* KT2440-Produktionsstämmen (Kubicki et al., 2020). Die experimentelle Methodik und putative molekulare Basis des Assays ist in **Abb. III-4** schematisch dargestellt.



**Abb. III-4: Methodik und molekulare Basis des Victoria Pure Blue BO-Assays zur Semi-Quantifizierung von Biotensiden in Kulturüberständen von Mikroorganismen.**

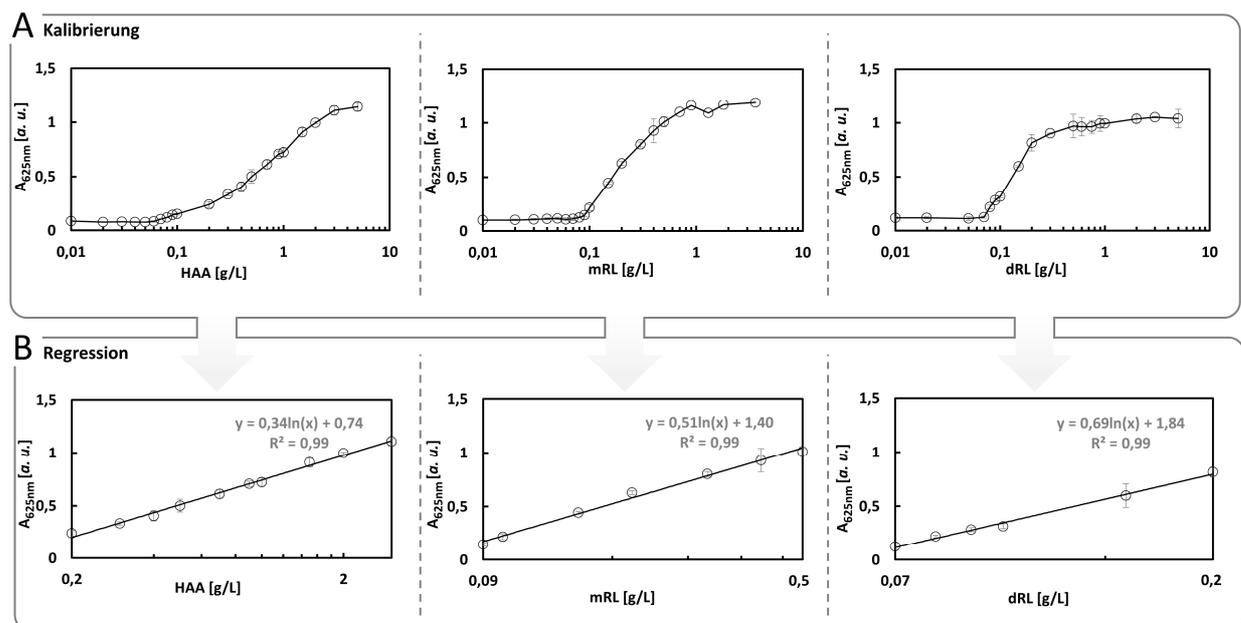
**A:** Veranschaulichung der experimentellen Methodik: Eine VPBO-Lösung von 0,1 g/L VPBO in Isopropanol wird nach Vaporisation auf einer MTP und anschließender Behandlung mit 0,5 M NaOH-Lösung auf einer Polystyrol-Oberfläche immobilisiert. Für den Nachweis von Biotensiden in Kulturüberständen werden diese auf die Platte gegeben, was nach einer einstündigen Inkubationszeit zu einer quantifizierbaren Solubilisierung des blauen Farbstoffs führt. Im Anschluss kann die Solubilisierung in einer sauberen MTP bei 625 nm aufgrund der in Mizellen gelösten Farbstoffreaktion nachgewiesen werden. Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Common-Lizenz (CC BY 3.0).

**B:** Die mögliche molekulare Basis des Assays: Eine Deprotonierung von VPBO könnte durch einen Ladungsausgleich zu einer anschließenden Fixierung des Farbstoffes an die Polystyrol-Oberfläche über  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion führen. Bei der Supplementierung von Kulturüberständen die Tensid-Mizellen beinhalten, steht diese Interaktion mit der Polystyrol-Oberfläche in Konkurrenz mit der Invagination in Tensid-Mizellen, wodurch eine Tensid-konzentrationsabhängige Veränderung der Absorption bei 625 nm ermittelbar ist. Die demonstrativen Spektren wurden mit verdünnten 100 mM Tween 80-Lösungen (absteigende Konzentration) im Anschluss an den VPBO-Assay (II.3.8) aufgenommen.

Im ersten Schritt (**Abb. III-4 (A)**) wird eine 0,1 g/L Lösung von VPBO in Isopropanol in 96-well-Platten getrocknet und mit NaOH behandelt, was zu einem Farbverlust und zur Immobilisierung des Farbstoffs auf der Polystyrol-Oberfläche führt. Anschließend erfolgt die Farbstoffsolubilisierung und damit die Erhöhung der Absorption in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Tensid über CMC im Kulturüberstand (Roosloot und Schoen, 2011). Die Menge des freigesetzten Farbstoffs kann nach dem Transfer der Flüssigkeit auf eine saubere MTP bei 625 nm spektrophotometrisch quantifiziert werden. Es kann spekuliert werden, dass aufgrund der Deprotonierung des VPBOs es zu einem Ladungsausgleich kommt, wodurch VPBO seine kolorimetrische Eigenschaft verliert und farblos erscheint. Gleichzeitig wird hierdurch vermutlich die Fixierung mit an der Polystyrol-Oberfläche der MTP durch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen gefördert, wodurch wässrige Lösungen keine Solubilisierung des Farbstoffes ermöglichen. Bei der Supplementierung von Kulturüberständen, die Tensid-Mizellen beinhalten, steht diese Interaktion in Konkurrenz mit der Invagination des VPBO über hydrophobe Wechselwirkungen in die Mizellen. Die Absorptionsmessungen (**Abb. III-4 (B)**; rechts) deuten darauf hin, dass je mehr Mizellen gebildet werden, umso mehr VPBO geht in die Flüssigkeit über und desto höher ist folglich der VPBO-spezifische  $A_{625\text{nm}}$ -Wert. Dennoch muss dieser Mechanismus durch weitere Analysen, z. B. mit Hilfe von NMR, endgültig bestätigt werden.

Die vollständige Solubilisierung des an den Kunststoff eines Wells gebundenen *VPBO* wurde mit 250  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Tween 80 Lösung (Positivkontrolle des Assays; nicht gezeigt) erreicht und führt zu einem Absorptionswert von etwa 1,1. Dies definiert die obere Grenze des Assay bei nachfolgenden Experimenten und dient der Qualitätsüberprüfung jeder Plattencharge bei der Herstellung. Das Absorptionsverhalten von *VPBO* erwies sich als recht pH-stabil; Änderungen der Absorptionsspektren und somit Farbumschläge zeigten sich erst bei pH-Werten unter 4 und über 10 (vgl. **Abb. A-4 (A)**). Dennoch ist es aufgrund der oft pH-abhängigen Veränderungen der Makrostrukturen des Biotensid-Assembly-Verhaltens (**Abb. A-4 (B)**; Champion et al., 1995; Brandt et al., 2018) und der potenziellen Extraktion der Mizellen wichtig, in einem pH-Bereich zu bleiben, der die Bildung von Farbstoff-solubilisierenden Biotensid-Mizellen ermöglicht.

Um den *VPBO*-Assay auf die Eignung zur Quantifizierung der physikalisch-chemisch unterschiedlichen HAA, mRL und dRL-Biotenside (aus dem Biosyntheseweg für RL; vgl. **Abb. I-3**; Tiso et al., 2017a) zu testen, wurden serielle Verdünnungen von  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{10}$ -Kongeneren dieser Biotenside, die von *P. putida* KT2440-Produktionsstämmen gereinigt wurden (II.3.7; Blesken et al., 2020), in sterilem LB-Medium angefertigt und auf den *VPBO*-Assay angewendet (**Abb. III-5**).



**Abb. III-5: Kalibrierungsreihen der  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{10}$ -Kongeneren von 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoat, Monorhamnolipid und Dirhamnolipid im *Victoria Pure Blue BO*-Assays.**

**A:** Der immobilisierte Farbstoff *VPBO* wurde durch die Anwesenheit der RL-Biotenside  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{10}$ -HAA,  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{10}$ -mRL und  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{10}$ -dRL solubilisiert. Die  $A_{625\text{nm}}$ -Werte sind als Funktion der Biotensid-Konzentrationen in der log-Skala dargestellt. Hierbei lässt sich ein logarithmischer Anstieg der Absorption in einem Bereich zwischen von 0,2 und 3 g/L für HAA, 0,09 und 0,5 g/L für mRL und 0,07 g/L und 0,2 g/L für dRL beobachten. Der maximale  $A_{625\text{nm}}$ -Wert liegt bei ca. 1,1 und somit der vollständigen Solubilisierung des Farbstoffes, verglichen mit einer 100 mM Tween 80-Lösung (vgl. II.3.8).

**B:** Die Kalibrierung zur Quantifizierung wurde im linearen Bereich der Daten durchgeführt. Die logarithmische Regression für die quantitative Analyse liegt für HAA bei  $y = 0,34\ln(x) + 0,74$  in einem Bereich von etwa 0,2 und 3 g/L, für mRL bei  $y = 0,51\ln(x) + 1,40$  in einem Bereich von etwa 0,09 und 0,5 g/L und für dRL bei  $y = 0,69\ln(x) + 1,84$  für einen Bereich von etwa 0,07 und 0,2 g/L.

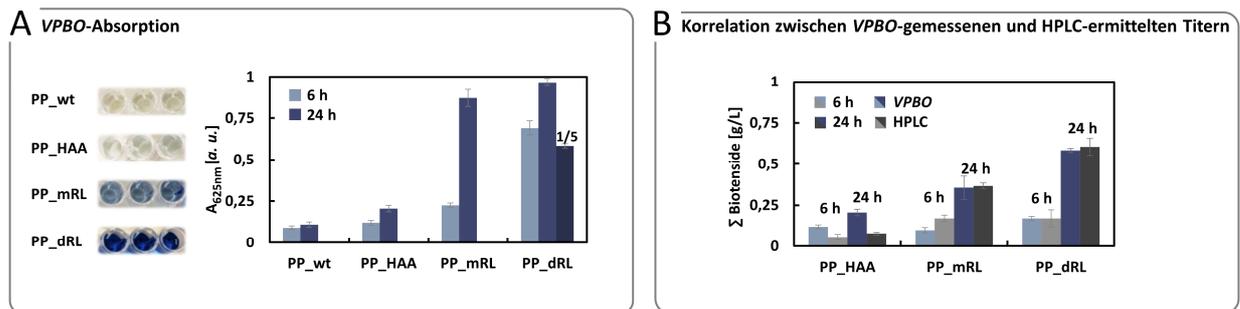
In allen Fällen wurde in einer logarithmischen Darstellung ein von der Biotensid-Konzentration abhängiger Anstieg der Absorption nach einer sigmoidalen Kurve beobachtet (**Abb. III-5 (A)**). Die verschiedenen Biotenside zeigten unterschiedliche Solubilisierungskurven, die mit ihren spezifischen Oberflächenaktivitäten zusammenhängen könnten. Für HAA zeigte die Kurve von der Absorption relativ zur Konzentration eine geringe Steigung auf einer logarithmischen Skala. Die Absorption beginnt bei einer HAA-Konzentration von etwa 0,1 g/L zu steigen und erreicht die

maximale Absorption von  $A_{625\text{nm}} \sim 1,1$  bei etwa 3 g/L, welche die Solubilisierung des gesamten Farbstoffs markiert. Im Fall von mRL ist die Steigung höher, wodurch die Solubilisierung des Farbstoffs durch dieses Biotensid wirksamer zu sein scheint. Sie beginnt bei etwa 0,08 g/L und erreicht ein Absorptionsmaximum bei einer Konzentration von 0,6 g/L. Bei dRL ist eine noch höhere Steigung zu beobachten, die bei einer Konzentration von 0,06 g/L beginnt und bei 0,2 g/L endet.

Die tensidabhängige VPBO-Solubilisierung wurde ursprünglich als ein einfaches Werkzeug zur Bestimmung der CMC von Tensiden beschrieben (Vulliezlenormand und Eisele, 1993), wodurch eine Anwendung des Assays zur Charakterisierung von Biotensiden möglich sein könnte, was über die bloße Auswertung der Produktion von RL hinausgehen könnte. Die aus den Solubilisierungskurven (**Abb. III-5 (A)**) abgeleiteten CMC-Werte der vier Biotenside lagen für HAA bei etwa  $0,15 \pm 0,05$  g/L, für mRL bei etwa  $0,09 \pm 0,01$  g/L und für dRL bei etwa  $0,06 \pm 0,01$  g/L. Beschriebene CMC-Werte liegen für Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> mRL bei 0,04 g/L, für das dRL Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> bei etwa 0,005 g/L und für eine gereinigte Mischung von HAA bei 0,113 g/L (Rahman et al., 2002; Tiso et al., 2017b). Der Vergleich zeigt, dass für HAA und mRL die aus dem VPBO-Assay abgeleiteten CMC mit der Größenordnung im Bereich der publizierten Werte übereinstimmt. Die Abweichung des ermittelten dRL CMC ist jedoch nicht überraschend, da die Literatur bekannten CMC sowohl für mRL als auch dRL zwischen 0,05 und 0,23 g/L, vermutlich in Abhängigkeit von Verunreinigungen, Mischungen, Kettenlänge und Sättigungsgrad schwanken (Syldatk et al., 1985; Abalos et al., 2001; Dubeau et al., 2009; Rocha et al., 2020). Darüber hinaus hängt der CMC-Wert von der Temperatur, dem pH-Wert und der Salzkonzentration ab (Tiso et al., 2017a), wodurch sie von den Bedingungen hier abweichen können (25 °C; LB-Medium; pH 7; Kubicki et al., 2020). Die genaue Bewertung der Zuverlässigkeit der CMC-Bestimmung mit VPBO könnte das Ziel zukünftiger Studien sein, um den VPBO-Assay gezielt zur Charakterisierung von Biotensiden in Kulturüberständen einzusetzen, was besonders interessant für schwer aufzureinigende Biotenside sein kann.

Aus den Messungen mit gereinigten Substanzen (**Abb. III-5 (A)**) wurden anschließend Kalibrierungen ermittelt (**Abb. III-5 (B)**), um zu beurteilen, inwieweit die Titer von Tensiden in Produktionskulturen überhaupt absolut quantifizierbar sein könnten. Zu diesem Zweck wurden Absorptionsdatenpunkte in den Steigungsbereichen mittels einer logarithmischen Regression angepasst. Dieser Ansatz ergab Kalibrierkurven in einem Bereich von 0,2 und 3 g/L für HAA, 0,09 und 0,5 g/L für mRL und 0,07 g/L und 0,2 g/L für dRL.

Um nun das Potenzial zur Quantifizierung von Biotensiden auf der Grundlage der mit den gereinigten Standards (C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-Kongenere) erhaltenen Kalibrierungen aus dem RL-Syntheseweg zu bewerten, sollten rekombinante *P. putida* KT2440-Stämme, welche das Plasmid pSB01 mit PA\_*rhlA*-Gen, pPS05 mit PA\_*rhlAB*-Genen und pWJ02 mit PA\_*rhlABC*-Genen zur Herstellung von HAA, mRL bzw. dRL enthalten (Tiso et al., 2016, 2017b), verwendet werden. Die Stämme wurden in LB Medium + 10 g/L Glucose (II.2.1.1) für 6 und 24 h kultiviert sowie anschließend im VPBO-Assay (II.3.8) getestet (s. a. **Tab. A-3**). Zum Vergleich wurde zusätzlich der Biotensid-Titer über die HPLC-CAD Messung (II.3.7) ermittelt (**Abb. III-6**).



**Abb. III-6: Quantifizierung von Rhamnolipid-Biotensiden in Kulturüberständen im *Victoria Pure Blue BO*-Assay.**

**A:** Die Darstellung der  $A_{625nm}$ -Werte (rechts) von zellfreier Kulturbrühe aus *P. putida* KT2440 (PP\_wt), *P. putida* KT2440 pSB01 (PP\_HAA), *P. putida* KT2440 pPS05 (PP\_mRL) und *P. putida* KT2440 pWJ02 (PP\_dRL) im VPBO-Assay nach 6 und 24 h Kultivierung. Für PP\_dRL wird ein zusätzlicher Wert für den 1:4 in LB-Medium verdünnten Kulturüberstand gezeigt, um eine RL-Konzentration innerhalb des Kalibrierbereichs sicherzustellen. Illustrative Bilder der untersuchten Kulturüberstände nach 24 h Kultivierung sind links dargestellt.

**B:** Die Genauigkeit der Quantifizierung von PP\_HAA, PP\_mRL und PP\_dRL in zellfreien Überstandsproben nach 6 und 24 h Kultivierung mittels VPBO-Assay im Vergleich zu HPLC-CAD-Messungen.

Die Überstände der Produktionskulturen führten zu VPBO-Solubilisierung in einem viel größeren Ausmaß als der Kontrollüberstand von *P. putida* KT2440 ohne Plasmid (**Abb. III-6 (A)**). Darüber hinaus führten die nach 24 h in den Biotensid-produzierenden Stämmen entnommenen Kulturüberstände zu einer höheren Solubilisierung als die nach 6 h entnommenen Proben. So kann davon ausgegangen werden, dass nach 24 h mehr Biotenside produziert wurden, was durch die HPLC-Analyse bestätigt wurde (vgl. **Tab. A-4**). Diese zeigte außerdem, dass *P. putida* KT2440 pWJ02 dRL mit einem kleinen Anteil von mRL produziert. Dies war zu erwarten, da in natürlichen Produktionssystemen keine vollständige Konversion von mRL zu dRL-Biosynthese stattfindet (vgl. I.2.1; Behrens et al., 2016a).

Der Kontrollstamm zeigt ein Absorptionswert von etwa 0,1, welcher im Bereich von LB ohne Tenside liegt (**Abb. III-5 (A)**), sodass davon ausgegangen werden kann, dass von *P. putida* KT2440 ohne Plasmid keine solubilisierenden Metaboliten gebildet werden. Während sich die für *P. putida* KT2440 pPS05 gemessenen Extinktionswerte im Bereich der Kalibrierungen befanden, lag der aus *P. putida* KT2440 pSB01 erhaltene Wert unter dem HAA-Kalibrierungsbereich. Gemäß der hohen CMC von HAA, die aus den Daten des VPBO-Assays abgeleitet wurden (**Abb. III-5 (A)**), ist es nicht überraschend, dass die HAA-Produktion, die durch die Expression von *rhlA* in *P. putida* KT2440 erreicht wird, nicht hoch genug ist, um sie in diesem Test zu quantifizieren. *P. putida* KT2440 pWJ02-Überstände führen zu einer Absorption von ca. 1, was vermuten lässt, dass der dRL-Titer über der Konzentration lag, die ausreichend war, um den gesamten Farbstoff zu solubilisieren. Daher wurde der Überstand von *P. putida* KT2440 pWJ02 1:4 in LB verdünnt und erneut getestet. Die bestimmten Absorptionen bei 625 nm wurden verwendet, um die Biotensid-Titer basierend auf den mit gereinigten Kongeneren erhaltenen Kalibrierungen (**Abb. III-5 (B)**) zu berechnen (**Abb. III-6 (B)**). Die erhaltenen Werte wurden mit den Ergebnissen der HPLC-Quantifizierung (**Tab. A-4**) verglichen, um die Genauigkeit des Assays zu bewerten. Für *P. putida* KT2440 pPS05 nach 6 h und *P. putida* KT2440 pSB01 nach 6 und 24 h Kultivierungsdauer passen die per VPBO berechneten Mengen wie bereits erwartet nicht zu den HPLC-ermittelten Mengen, da die Titer nicht im Kalibrierungsbereich zwischen 0,2 und 3 g/L für HAA, 0,09 und 0,5 g/L für mRL liegen. Für Proben aus *P. putida* KT2440 pPS05 nach 24 h und *P. putida* KT2440 pWJ02 nach 6 und 24 h Kultivierungsdauer in 1:4

Verdünnung, stimmt die berechnete Menge an Biotensiden mit den durch HPLC bestimmten Titern mit einer kleinen Abweichung, trotz des Vorhandenseins mehrerer Kongenere in den Überständen der Produktionsstämme, überein.

Die HPLC-Analyse (**Tab. A-4**) zeigte die typische Aufteilung der Fettsäure-Kongenere C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> und C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>, die durch heterologe Produktion von HAA, mRL und dRL durch Expression der *P. aeruginosa rhlABC*-Genen in *P. putida* KT2440 auftritt (Behrens et al., 2016a). Das Hauptkongener bleibt jedoch in allen Fällen das C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-Kongener mit einem Anteil von über 70%. Bemerkenswerterweise funktionierte die Quantifizierung der Menge an Tensid unter Verwendung der Gleichungen für mRL (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) und dRL (Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) mit der jeweiligen Gewichtung mit nur geringer Abweichung gut.

Zusammenfassend bietet der *VPBO*-Assay im Gegensatz zu den in (III.1.2) beschriebenen qualitativen und semi-quantitativen Methoden quantitative Informationen, erfordert aber weniger Aufwand als die derzeitigen kolorimetrischen semi-quantitativen Methoden oder die HPLC. Der *VPBO*-Assay ist somit zur schnellen Bestimmung der RL-Konzentrationen geeignet, wenn die Konzentration oder die der Verdünnung innerhalb des Kalibrierungsbereichs liegt, was im Rahmen dieser Arbeit mit dem Ziel der schnellen Einschätzung des produzierten RL-Titers voraussichtlich ausreichend ist. Zusätzlich kann die Solubilisierungseffizienz von *VPBO* und damit die Steigung der Kurve, die sich zwischen den verschiedenen RL-Biotensiden unterscheidet, Aufschluss über ihr Assemblierungsverhalten (z. B. die Form der Mizellen/Liposomen) oder sogar ihre Wirksamkeit als Tensid geben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *VPBO*-Assay für den Nachweis eines breiten Spektrums von Tensiden in Kulturmedien anwendbar sein könnte (Kubicki et al., 2020). Somit wurde hier ein effizienter und empfindlicher kolorimetrischer Assay entwickelt, der, wenn geeignete Standardpräparationen einer bestimmten Verbindung zur Verfügung stehen, sogar zur absoluten Quantifizierung eingesetzt werden kann. Eine Einordnung der Effektivität, der Sensitivität und der Anwendbarkeit des hier entwickelten *VPBO*-Assays gegenüber der Literatur bekannten Methoden (III.1.2) wurde im Folgenden vorgenommen (**Tab. III-2**).

**Tab. III-2: Vergleich verschiedener Methoden zur Detektion mikrobieller Biotensid-Produktion.**

Methode	Eingangsmaterial	Effektivität		Sensitivität		Anwendbarkeit		
		Vorbereitung	Zeit- und Kostenaufwand	Quantitativ	Auflösungsebene	Hochdurchsatz	Entwicklungszeit	Tensid-Spezifität
<b>Blutagar atomized-oil drop-collapsing grid</b>	Kolonie	++	++	-	+	+++	++	+
	Kolonie	+++	+++	-	+	+++	+++	+++
	Kultur	+++	+++	-	+	++	+++	++
	Kultur	+++	+++	-	+	+++	+++	++
<b>Orcinol</b>	Kultur	++	++	++	+	+++	+++	+
<b>CPC-BTB</b>	Kultur	++	++	++	+	+++	+++	n. d.
<b>DC</b>	Kultur	++	++	-	++	+	++	++
<b>HPLC</b>	Kultur	+	+	+++	+++	+	+	+++
<b>VPBO</b>	Kultur	++	+++	++	+	+++	+++	+++
		Tage	hoch	nein	Tensid	ungeeignet	Tage	gering
		+	+	-	+	+	+	+
		Stunden	mittel	µg bis mg	Tensidart	möglich	Stunden	mittel
		++	++	++	++	++	++	++
		Minuten	gering	pg bis g	Kongener	geeignet	Minuten	hoch
		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

\*n. d. = nicht definiert

Im Vergleich zu anderen beschriebenen Hochdurchsatz-Assays zur Bestimmung von RL-Titern ist der *VPBO*-Assay einfach zu präparieren und die eingesetzten "*ready-to-use*"-Platten können gelagert werden. Da er sich auf *VPBO* als Hauptkomponente stützt, dass ein in großem Maßstab hergestelltes Pigment darstellt, erscheint er zudem vergleichsweise kostengünstig. Die Sensitivität ist vergleichbar mit bereits bekannten semi-quantitativen Methoden wie dem CPC-BTB und dem Orcinol Test, da sich Konzentrationen im Bereich von  $\mu\text{g}$  bis  $\text{mg}$  differenzieren lassen. Natürlich kann eine Quantifizierung nur dann durchgeführt werden, wenn ein gereinigter Standard der hergestellten Verbindung sowie ihrer Mischungen ggf. bestehend aus verschiedenen Biotensiden und Kongeneren zur Verfügung steht. Wenn dies der Fall ist, kann der *VPBO*-Assay ausgearbeitete, hochauflösende Analyse- und Quantifizierungsmethoden wie die HPLC-Analyse und NMR/Massenanalyse zur Bestimmung der Tensidart und der Kongener-Zusammensetzung ergänzen, jedoch nicht ablösen, da jener lediglich auf die solubilisierenden Eigenschaften des hier zu untersuchenden Kulturüberstandes zurückgreift. Eine weitere Limitierung stellt auch eine ggf. sehr effektive Solubilisierung des Farbstoffs durch Biotenside dar, die zu einem kleinem Arbeitsbereich einer Kalibrierkurve führen könnten, da die Solubilisierung des gesamten Farbstoffs bereits bei Konzentrationen erreicht werden kann, die nur etwas höher als die CMC sind. Dies kann jedoch zusätzlich durch die Vorbereitung einer seriellen Verdünnung behoben werden, wenn eine Quantifizierung gewünscht wird, wie sie hier für einen *P. putida* KT2440, der hauptsächlich dRL produziert, durchgeführt wurde (**Abb. III-6 (A)**).

Ferner kann der Assay auch für qualitative Zwecke, z. B. dem Screening von Metagenom-Datenbanken, in Kombination mit anderen Methoden wie den Blutagarplatten (Mulligan et al., 1984) oder dem *atomized-oil* Test (Burch et al., 2010) verwendet werden, um die Effizienz und den Durchsatz zu erhöhen, die für die Auswahl der Produzenten von physiochemisch unterschiedlichen Biotensiden aus großen Bibliotheken erforderlich sind (Kennedy et al., 2011; Jackson et al., 2015; Thies et al., 2016). Diese Hochdurchsatz-Anwendbarkeit wird auch durch den Aspekt gestützt, dass Ergebnisse in relativ kurzer Entwicklungszeit, durch die Erzeugung/Lagerung von "*ready-to-use*"-Platten, erhalten werden können. Dies ist bei (Extraktions-basierten) Methoden, die zunächst das Wachstum der Zellen und die Entwicklung eines Hofes erfordern, nicht durchführbar. Im Gegensatz zu den auf BTB oder CPC basierenden Assays (Yang et al., 2015), die z. B. für die Hochdurchsatz-Bewertung von Surfactin-Titern oder Orcinolreaktionen für Glycolipide beschrieben werden, weist die hier vorgestellte Methode die Tensideigenschaften der hergestellten Verbindungen direkt nach und beruht nicht auf der Komplexbildung, Ladung oder Nachweisreaktion mit bestimmten Bausteinen, wie das Spektrum der in dieser Arbeit verwendeten Biotenside (HAA, RL) zeigt. Er scheint daher weniger anfällig für die Anwesenheit anderer Metaboliten, z. B. aus der Glucose Metabolisierung, zu sein, wie für CPC-basierte Methoden berichtet wurde (Heuson et al., 2018).

Zusammenfassend bietet der *VPBO*-Assay eine Reihe von Anwendungen, darunter das Hochdurchsatz-Screening von Mutagenese-Bibliotheken und die komparative Bewertung verschiedener Kultivierungsbedingungen im Zusammenhang mit der schnellen Charakterisierung der Produktion von Biotensiden. Er stellt ein geeignetes Werkzeug für die Quantifizierung von RL-Biotensiden unmittelbar in Kulturüberständen dar und ergänzt die bestehenden Konzepte für das Screening und die Quantifizierung von Biotensid-Produzenten und Titern.

**Zusammenfassung | Quantifizierung von Rhamnolipiden mittels *Victoria Pure Blue BO***

- (1) Viele bekannte Methoden eignen sich zwar zur Identifikation, Quantifizierung und Analyse von Rhamnolipiden, jedoch ermöglicht keine eine akkurate und schnelle Hochdurchsatz-Anwendung zur Quantifizierung und Bewertung der Monorhamnolipid-Produktion in dem zu erwartenden Maßstab an Stämmen und Bedingungen.
- (2) Eine neue und schnelle Hochdurchsatz-Methode zur Quantifizierung von Rhamnolipiden basierend auf dem Farbstoff *Victoria Pure Blue BO* wurde entwickelt, sodass die hier zu untersuchenden Monorhamnolipide in (verdünnten) Kulturüberständen in einem Konzentrationsbereich von 0,09 und 0,5 g/L detektiert und quantifiziert werden können.

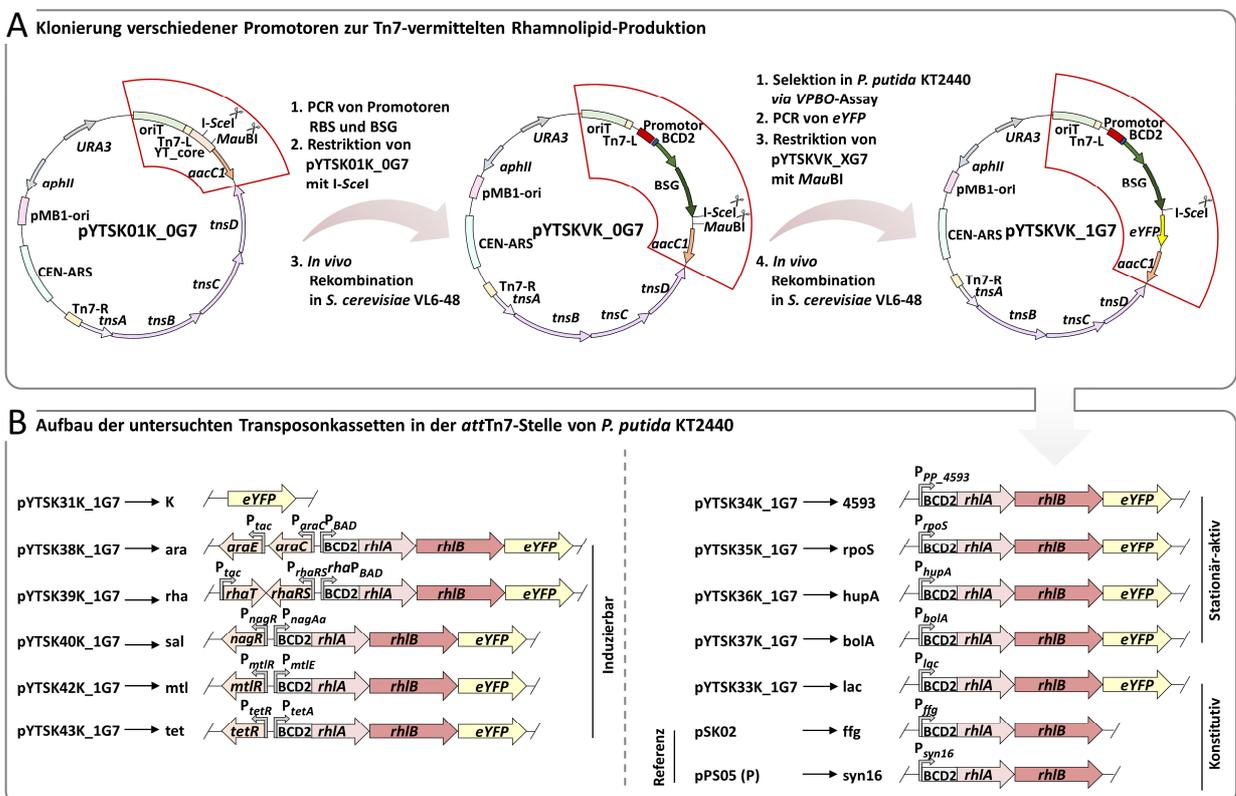
## III.2 Konstruktion von *Pseudomonas putida* Zellfabriken für die Rhamnolipid-Produktion

Viele in der Literatur beschriebene natürliche RL-Produzenten sind oftmals aufgrund von Pathogenität, komplexen Regulationsmechanismen der Biosynthese und daraus resultierenden geringen Titern, schlechter Modifizierbarkeit sowie einer möglichen hohen Anzahl an anderen Sekundärmetaboliten und dadurch notwendige aufwändigere Isolierungsverfahren für großskalige Prozesse ungeeignet (vgl. I.2). Die heterologe Genexpression und Metabolitproduktion, insbesondere im vielfältig genutzten *P. putida* KT2440, kann somit eine geeignete Alternative darstellen (I.3.1; Loeschcke und Thies, 2020). Jedoch ist die heterologe Expression, aufgrund der Nutzung von Plasmid-basierten Systemen mit starken synthetischen und konstitutiv aktiven Promotoren, oftmals ungeeignet zur Skalierung der Produktion. Die einhergehende genetische Instabilität, schlechte Reproduzierbarkeit sowie geringe Produktionstiter (vgl. I.3.1.1; I.3.2; Del Vecchio, 2015; Mi et al., 2016) erschweren den Aufbau eines konkurrenzfähigen Produktionsprozesses im Vergleich zu anderen bereits erhältlichen kommerziellen (Bio-)Tensiden (vgl. I.1; I.1.2). Eine Möglichkeit diese Problematik zu adressieren besteht in der chromosomalen Integration der BSG (Loeschcke und Thies, 2020) zur Produktion von RL.

Mit den neu entwickelten Werkzeugen zur effizienten Erzeugung von RL-Produzenten mit genomintegrierten Kassetten zur heterologen Expression der RL-Gene durch verschiedene Promotoren ( $\gamma$ TREX-*toolbox* Tn7-Variante; III.1.1), sowie der Hochdurchsatz Validierung der RL-Produktion (VPBO-Assay; III.1.2) sind nun die Voraussetzungen gegeben, um einen geeigneten mRL-Produktionsstamm zu entwickeln, der die Bedingungen einer hohen Produktionsstabilität, Reproduzierbarkeit und eines hohen Produktionstiters ( $> 1$  g/L im Batch-Labormaßstab) erfüllt. Das Hauptaugenmerk soll zunächst auf der Produktion von mRL liegen, um die verschiedenen Einflüsse der Promotoren auf die mRL-Produktion zu eruieren. Im Gegensatz zu Plasmid-basierten Systemen stellt hierbei die Promotorstärke den dominierenden Faktor bei der Expression der Gene dar, die maßgeblich für den resultierenden Titer entscheidend sein könnte. Ein Ansatzpunkt, der von vornherein bei der Konstruktion mit einbezogen werden sollte und für weitere Optimierungen im Blick auf den zielgerichteten Einsatz eines Stammes in großskaligen Prozessen vorteilhaft sein könnte (Santala et al., 2018), ist die Entkopplung der Biomassebildung von der RL-Produktion (Vandermies und Fickers, 2019). Die Verwendung eines induzierbaren Promotorsystems kann hierzu, sowie zu einer Erhöhung der genetischen Stabilität, beitragen und stellt somit eine geeignete Alternative zu den bislang überwiegend genutzten konstitutiv aktiven Systemen dar. Hierbei sollte die Wahl vor allem auf Induktoren fallen, die aus möglichst günstigen Substraten gebildet und durch *P. putida* KT2440 nicht metabolisiert werden können, um eine potenzielle Maßstabsvergrößerung des zukünftigen Produktionsprozesses zu ermöglichen. Als Alternative dafür könnten sich homologe Promotorsysteme eignen, die erst nach Bildung ausreichender Biomasse (nahe der stationären Phase) zur Expression von Genen führen. Der Transkriptions-starke T7-Promotor aus dem Bakteriophagen T7, welcher durch die T7-RNA-Polymerase hochspezifisch zu einer

bekanntermaßen starken Produktion von Proteinen führt (Studier und Moffatt, 1986), wurde nicht betrachtet, da eine hohe Expressionsrate der relevanten Gene gerade für die mRL-Produktion nicht vorteilhaft zu sein scheint (Du et al., 2017; Wittgens, 2017).

In dieser Arbeit wurden aufgrund dieser ökonomischen und prozessrelevanten Gründe verschiedene aus der Literatur (Miksch und Dobrowolski, 1995; Yuste et al., 2006; Nickel und de Lorenzo, 2018; vgl. **Tab. A-5**) abgeleitete, und für *P. putida* KT2440 bereits als funktional gezeigten konstitutiv aktiven und induzierbaren Promotoren ausgewählt. Zudem wurden Promotoren, die putativ beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase aktiv werden (lt. Datensatz: GEO DataSet Accession Nr. GSE85578), herangezogen. In Kombination mit den PA\_rihAB-Genen wurden mithilfe der oben beschriebenen Vektoren-toolbox (III.1.1) *P. putida* KT2440 mRL-Produzenten erzeugt, die resultierende mRL-Produktion dieser Produzenten mittels des VPBO-Assays validiert und funktionale Stämme auf dieser Basis vorselektiert (**Abb. III-7**).



**Abb. III-7: Schematischer Überblick über die Erzeugung und Kollektion von Expressionskassetten zur heterologen Rhamnolipid-Produktion in *Pseudomonas putida* KT2440.**

**A:** Die Erzeugung der attTn7-Integration vermittelnden yTRES-toolbox Vektoren erfolgte wie in III.1.1 beschrieben (rot markierter Bereich zeigt den Fortschritt der Klonierung). Die Klonierung der Promotoren und BSG in die CIS wurde sowohl durch Einsatz der standardisierten RBS (BCD2) als auch den homologen Rekombinationsstellen der CIS I/II bewerkstelligt. Damit konnten die über PCR amplifizierte Fragmente durch *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 zusammen mit dem I-SceI linearisierten Basisvektor pYTSK01K\_0G7 verknüpft werden. Die hieraus entstandenen pYTSKVK\_0G7 Vektoren wurden zunächst, u. a. *via* VPBO-Assay, selektiert und anschließend um das Transkriptionsreportergen *eYFP* in der HB\_R\_rv-Stelle des Transposons, indem diese mit *MauBI* linearisiert und mittels *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 mit dem über PCR amplifizierte *eYFP*-Fragment zu den pYTSKVK\_1G7 Vektoren verknüpft wurden, ergänzt.

**B:** Darstellung der 11 ausgewählten synthetischen Operons, integriert in die attTn7-Stelle von *P. putida* KT2440 über die attTn7-Integration vermittelnde yTRES-toolbox, die im Folgenden untersucht werden (vgl. **Tab. II-2**). Für *ara* und *rha* wurden zusätzlich zu den Genen des Transkriptionsregulators, PA\_rihAB und *eYFP*, die transporterkodierenden Gene *araE* und *rhaT* unter Kontrolle des  $P_{lac}$ -Promotors integriert. Zur Kontrolle diente in allen Fällen der über den yTRES-toolbox Vektor pYTSK31K\_1G7 konstruierte *P. putida* KT<sub>K</sub><sup>E</sup> (K), der lediglich die kodierende Sequenz des Transkriptionsreporters *eYFP* integriert hat. Als Referenz diente ein aus der Literatur bekannter starker konstitutiv aktiver Promotor (pSK02 → *P. putida* KT<sub>ffg</sub>mRL; Köbbing et al., 2020). Als zusätzliches, nicht genomintegriertes, sondern Plasmid-basiertes (P) Referenzsystem zur Transkriptionsstärke wurde *P. putida* KT2440 + pPS05 (syn16; Tiso et al., 2016), dessen Promotor aus einem synthetisch optimierten *lac*-Derivat besteht, eingesetzt.

Als Quelle für die regulatorischen Elemente (Promotor, Transkriptionsfaktor) dienten für L-Arabinose-, L-Rhamnose- und Anhydrotetracyclin-Promotorsysteme, der Vektor pAra-final, das Genom von *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. der Vektor pASKInt11 (vgl. **Tab. II-1**; **Tab. II-3**). Das D-Mannitol-induzierbare System mit  $P_{mtlE}/mtlR$ -Regulon wurde in dieser Arbeit aus dem Genom von *P. protegens* PF-5 isoliert (II.2.10; **Tab. II-2**; vgl. Hoffmann und Altenbucher, 2015). Das Salicylat-Promotorsystem aus *C. testosteroni* wurde aus dem pBNT-mcs-3-Vektor amplifiziert (vgl. **Tab. II-1**; Verhoef et al., 2010). Neben dem Promotorsystem inklusive der zugehörigen Regulatorgenen, wurden für *ara* und *rha* zusätzlich die Transportergene *araE* und *rhaT* unter Kontrolle des  $P_{tac}$ -Promotors koexprimiert, um den Transport des Induktors in die Zellen zu verbessern, was zu einer Verringerung der zur Induktion benötigten Konzentration führen und aus ökonomischer Sicht für einen großskaligen Prozess eine Relevanz darstellen könnte (vgl. I.3.1; Calero et al., 2016).

Im ersten Schritt konnten mittels der *attTn7*-Integration vermittelnden *yTREX-toolbox* die Vektoren mit verschiedenen Promotorsystemen wie in III.1.1 beschrieben kloniert werden (**Abb. III-7 (A)**). Hierzu wurden die in die CIS zu integrierenden Promotoren und BSG mit Hilfe der standardisierten RBS am Anfang des Biosynthesecusters (BCD2; Mutalik et al., 2013), welche als Verknüpfungselement zwischen regulatorischen und BSG-Fragmenten diente und dementsprechend in das Design der entsprechenden Oligonukleotid-Primer (**Tab. II-3**) integriert wurde, über *in vivo* Rekombination in *S. cerevisiae* VL6-48 (II.2.5) mit dem Basisvektor verknüpft. Die BCD2 ist eine bicistronisch angelegte RBS, die aus zwei Shine-Dalgarno-Sequenzen, in einem kurzen Abstand (43 bp) zueinander, zusammengesetzt ist (Mutalik et al., 2013). Die erste Shine-Dalgarno-Sequenz initiiert die Translation eines 17 AS langen Peptids und die zweite die des Proteins RhlA. Für komparative Studien verschiedener Promotorsysteme ist die Verwendung einer bicistronischen RBS zur Sicherstellung, dass durch die intrinsische Helikaseaktivität des Ribosoms potenzielle Sekundärstrukturen des davorliegenden Bereiches keinen Einfluss auf die Translationsinitiation (Mutalik et al., 2013) bzw. den resultierenden Produkt-Titer haben, wichtig. Die hieraus entstandenen pYTSKVK\_0G7 *yTREX-toolbox* Vektoren wurden durch Sequenzierung validiert und die korrekte Transposition nach Konjugation in *P. putida* KT2440 verifiziert (III.1.1), um Fehler in der Stammkonstruktion auszuschließen. Danach erfolgte die qualitative Validierung der Biotensid-Produktion durch diese Stämme mit Hilfe des *VPBO*-Assays, wobei hier grundsätzlich positive Kandidaten für die weiteren Experimente zur vergleichenden Evaluierung ausgewählt wurden.

Diese entsprechenden Integrons wurden um *eYFP* als Transkriptionsreportergen in der HB\_R\_rv-Stelle des Transposons ergänzt (**Abb. III-7 (A und B)**); In der Stammbezeichnung durch den Index „E“ symbolisiert), um eine Verfolgung der Expressionsleistung (III.1.1.1) in der anschließenden Charakterisierung dieser Stämme (III.2.1-3) zu ermöglichen. Schlussendlich wurden 11 rekombinante *P. putida* KT2440 mRL-Produzenten ausgewählt. Im Folgendem wird die Konstruktion dieser Stämme und der Aufbau des Transposons beschrieben.

Zu den 11 ausgewählten Stämmen gehören im Speziellen die induzierbaren Promotorsysteme in *P. putida*  $KT_{ara}mRL^E$ ,  $KT_{rha}mRL^E$ ,  $KT_{sal}mRL^E$ ,  $KT_{mtl}mRL^E$  und  $KT_{tet}mRL^E$  (ara, rha, sal, mtl und tet), die auf den Zucker(-alkoholen) L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Mannitol sowie dem aromatischen Salicylat und dem Antibiotikum Tetracyclin als Induktoren basieren.

Zusätzlich wurden aus der Literatur abgeleitete *P. putida* KT2440 eigene Promotoren (GEO DataSet Accession Nr. GSE85578; Miksch und Dobrowolski, 1995; Yuste et al., 2006; **Tab. A-5**), die nach Bildung ausreichender Biomasse bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase aktiv werden sollen (stationäre Phase-Promotoren), ausgewählt, welche, alternativ zu den induzierbaren Promotoren, sich ebenfalls zur Entkopplung der Biomassebildung und der Produktion von RL eignen könnten. So wurden aus der Literatur (Yuste et al., 2006) die Promotoren  $P_{rpoS}$  und  $P_{hupA}$  ausgewählt, die nachweislich ab einer  $OD_{600nm} = 2,2$  in *P. putida* KT2440 aktiv werden. Zudem wurde  $P_{bolA}$  betrachtet, der lt. Miksch und Dobrowolski, 1995 erst in der stationären Wachstumsphase aktiv wird. Zum Abschluss wurde ein Transkriptomdatensatz aus der GEO-Datenbank des NCBI (GEO DataSet Accession Nr. GSE85578), welcher Daten zum Vergleich der Transkriptlevel aller *P. putida* KT2440-Gene in LB-Medium in drei verschiedenen Wachstumsstadien enthält, herangezogen, um die Transkriptionsstärke der ausgewählten Promotoren  $P_{rpoS}$ ,  $P_{hupA}$  und  $P_{bolA}$  zu betrachten und um ggf. noch weitere potenzielle „stationäre“ Promotoren zu finden. Durch Betrachtung des FC [log] (Transkriptänderung auf einer logarithmierten Skala; **Tab. A-5**) zwischen der stationären Wachstumsphase und der logarithmischen Wachstumsphase konnte so der Mengenunterschied beurteilt werden, sodass von einer erhöhten Transkriptionsrate in der stationären Wachstumsphase ausgegangen werden kann. Auf Basis dessen wurde hier zusätzlich der Promotor  $P_{PP\_4593}$  ausgewählt, der einen FC [log] von 5,44 zeigte (43-fache Transkriptzunahme des Gens PP\_4593 zur stationären Wachstumsphase hin). Deren putative Promotorbereiche (150 bp vor Startcodon des Gens) wurden über Oligonukleotid-Primer (**Tab. II-3**) mit BCD2 und *rhlAB* (vgl. III.1.1) zur Konstruktion der pYTSK34-37K\_1G7 fusioniert, welche wiederum zur Erzeugung der Stämme *P. putida*  $KT_{4593}mRL^E$ ,  $KT_{rpoS}mRL^E$ ,  $KT_{hupA}mRL^E$  und  $KT_{bolA}mRL^E$  (4593, rpoS, hupA und bolA) benutzt wurden.

Bislang wurde die RL-Produktion in *P. putida* KT2440 hauptsächlich durch konstitutive Expression der BSG realisiert. Deshalb wurden als Vergleichsset für die neuen Expressionskassetten drei konstitutive Expressionssysteme konstruiert bzw. genutzt. Der ohne das Repressorprotein LacI konstitutiv aktive *lac*-Promotor (de Lorenzo et al., 1993); pYTSK33K\_1G7 → *P. putida*  $KT_{lac}mRL^E$  findet in vielen bekannten Plasmid-basierten Systemen Verwendung (I.3.1.1) und ein auf  $P_{lac}$ -basierendes System zur Produktion von RL wurde bereits patentiert (Schaffer et al., 2015). Weiterhin soll als Referenz ein aus der Literatur bekannter starker konstitutiv aktiver Promotor, bestehend aus drei aufeinanderfolgenden derivatisierten Promotorsequenzen (pSK02 → *P. putida*  $KT_{ffg}mRL$ ; Bator et al., 2020; Köbbing et al., 2020) sowie der Plasmid-basierte *P. putida* KT2440 + pPS05 Stamm (syn16; Tiso et al., 2016), der bislang in vielen wissenschaftlichen Arbeiten zur RL-Produktion benutzt wurde (Behrens et al., 2016a, c; Germer et al., 2020), betrachtet werden. Als Kontrolle für die nachfolgenden vergleichenden Experimente diente der über den yTRES-toolbox Vektor pYTSK31K\_1G7 konstruierte *P. putida*  $KT_K^E$  (K)-Stamm, der lediglich die kodierende

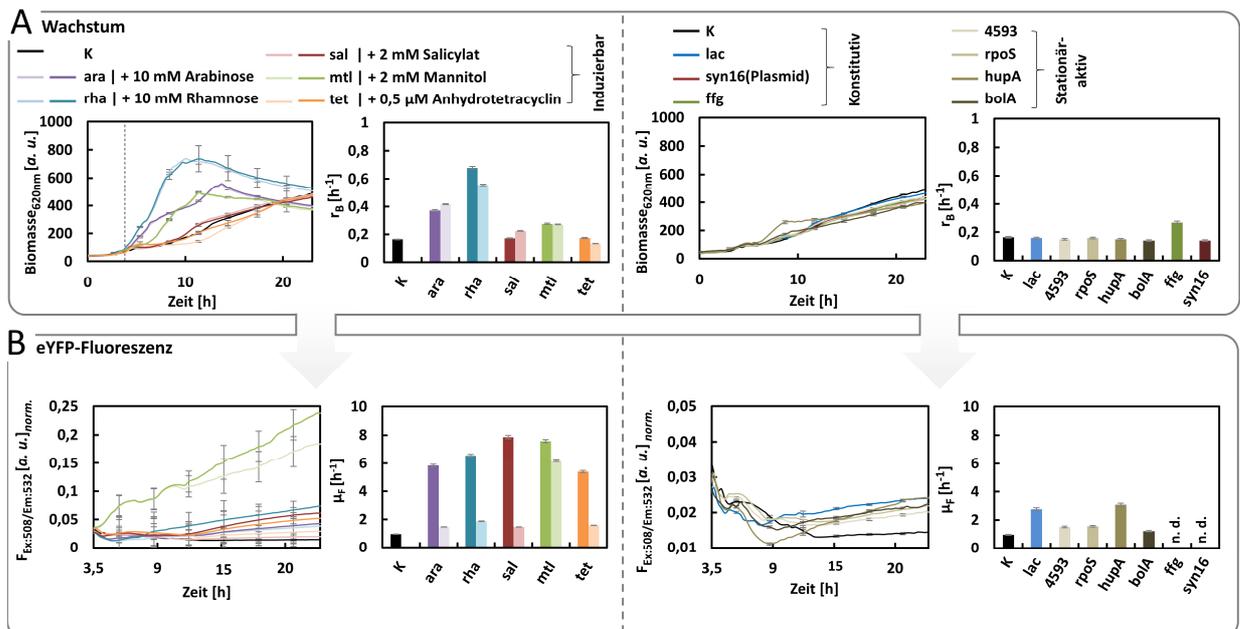
Sequenz des Transkriptionsreporters eYFP ohne regulatorische Elemente in der CIS integriert hat. Dadurch, dass das Transkriptionsreportergen ohne Promotor in der *attTn7*-Stelle vorliegt, ist die eYFP-Fluoreszenz somit ein direktes Maß für die Hintergrundexpression in diesem Locus (III.1.1.1). Folgend sollten alle konstruierten Stämme auf Ebenen des Wachstums, der Induzierbarkeit, der Transkript- und Produktformation sowie der Stabilität der Produktion komparativ charakterisiert werden, mit dem Ziel, ein geeignetes Promotorsystem zur Induktion der *rhIAB*-Expression auszuwählen.

### III.2.1 Komparative Analyse rekombinanter Rhamnolipid-Produzenten

Die Charakterisierung der mikrobiellen Fabrik auf den Ebenen des Wachstums, der Transkription und der Biotensid-Produktivität soll Aufschluss über die grundsätzliche Eignung der Stämme (vgl. III.2) zur Produktion von RL geben und die zellulären Prozesse, die zu den Unterschieden in den oben genannten Bereichen führen, einhergehend beschreiben. Die einzelnen Stämme mit unterschiedlichen Promotorsystemen sollen im Folgenden in Gruppen eingeteilt und hinsichtlich ihrer Eignung zur Produktion von RL charakterisiert werden. Zudem sollen die zugrundeliegenden Mechanismen und Limitierungen eruiert und potenzielle Verbesserungsvorschläge diskutiert werden.

Produktionsstämme (vgl. III.2) mit verschiedenen Metabolit- (*ara*, *rha*, *sal*, *mtl*, *tet*) und Wuchsphasen-induzierbaren (*4593*, *rpoS*, *hupA*, *bolA*) sowie konstitutiv aktiven (Referenz-) Promotoren (*lac*, *syn16* (Plasmid), *ffg*) sollten im ersten Schritt im Hinblick auf das Wachstum und die produzierte eYFP-Fluoreszenzentwicklung über den Kultivierungszeitraum verfolgt werden. Dies soll einen Einblick in die zeitlich aufgelöste Expression der *rhIAB*-Gene (vgl. III.1.1.1) sowie die *fitness* in Bezug auf das Wachstum unter Produktionsbedingungen (LB-Medium + 10 g/L Glucose) und somit während der Produktion von RL/ der Supplementation mit Induktor geben.

Die Stämme wurden in LB-Medium mit 10 g/L Glucose kultiviert und insgesamt über 24 h im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1) bzgl. ihrer Biomassebildung und Fluoreszenzzunahme (Zelldichte-normiert) betrachtet. Im Fall der induzierbaren Stämme wurde nach 3,5 h der Induktor in der **Tab. II-10** angegebenen Konzentration supplementiert, um die Transkription der RL-BSG zu initiieren und mit Kulturen der gleichen Stämme ohne Induktorzugabe verglichen. Zur Beurteilung des Wachstums und der Expression wurden sowohl Wachstumsraten  $r_B(t)$  als auch die Fluoreszenzzunahme  $\mu_F(t)$  ermittelt (II.3.1-2), um das Wachstum und den Fluoreszenzanstieg zu beurteilen (**Abb. III-8**).



**Abb. III-8: Biomassebildung und Zunahme der Transkriptions-gekoppelten eYFP-Fluoreszenz in rekombinanten Rhamnolipid-produzierenden *Pseudomonas putida* KT2440-Stämmen.**

*P. putida* KT2440 Stämme (K, ara, rha, sal, mtl, tet, lac, syn16, ffg, 4593, rpoS, hupA und bolA) wurden mit einer  $OD_{580nm} = 0,05$  inokuliert, für 24 h kultiviert (30 °C; LB + 10 g/L Glucose; II.2.1) und hinsichtlich ihres Wachstums (**A**; II.3.1) sowie ihrer Fluoreszenzzunahme (**B**; II.3.2) verfolgt. Fluoreszenzwerte (F) wurden auf die Zelldichte normiert und erst nach Beginn des logarithmischen Wachstums (3,5 h) gezeigt. Für die induzierbaren Stämme (Induktion nach 3,5 h; Induktor (-konzentrationen) angegeben) sind jeweils auch die Daten der nicht induzierten Kulturen (heller dargestellt) gezeigt. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet (biologische Triplikate). Die Wachstumsrate  $r_B(t)$  (**A**) und die Fluoreszenzzunahme  $\mu_F(t)$  (**B**) wurden zwischen der frühen und der späten logarithmischen Phase bestimmt (II.3.1; II.3.2). Für ffg und syn16 wurde aufgrund des Fehlens des eYFP-Reportergens  $\mu_F(t)$  nicht ermittelt (n. d.).

Die Wachstumskurven (**Abb. III-8 (A)**) zeigen, dass das Wachstum der Zellen, bis auf die Stämme ara, rha und mtl, mit Wachstumsraten  $r_B(t)$  zwischen 0,1-0,25  $h^{-1}$  ähnlich ist. Dabei erreichen lediglich die Stämme ara, rha, und mtl die stationäre Wuchsphase, wobei für die anderen Stämme bei längerer Kultivierungsdauer gezeigt wurde, dass die stationäre Phase nach maximal 28 h erreicht wird (Daten nicht gezeigt).

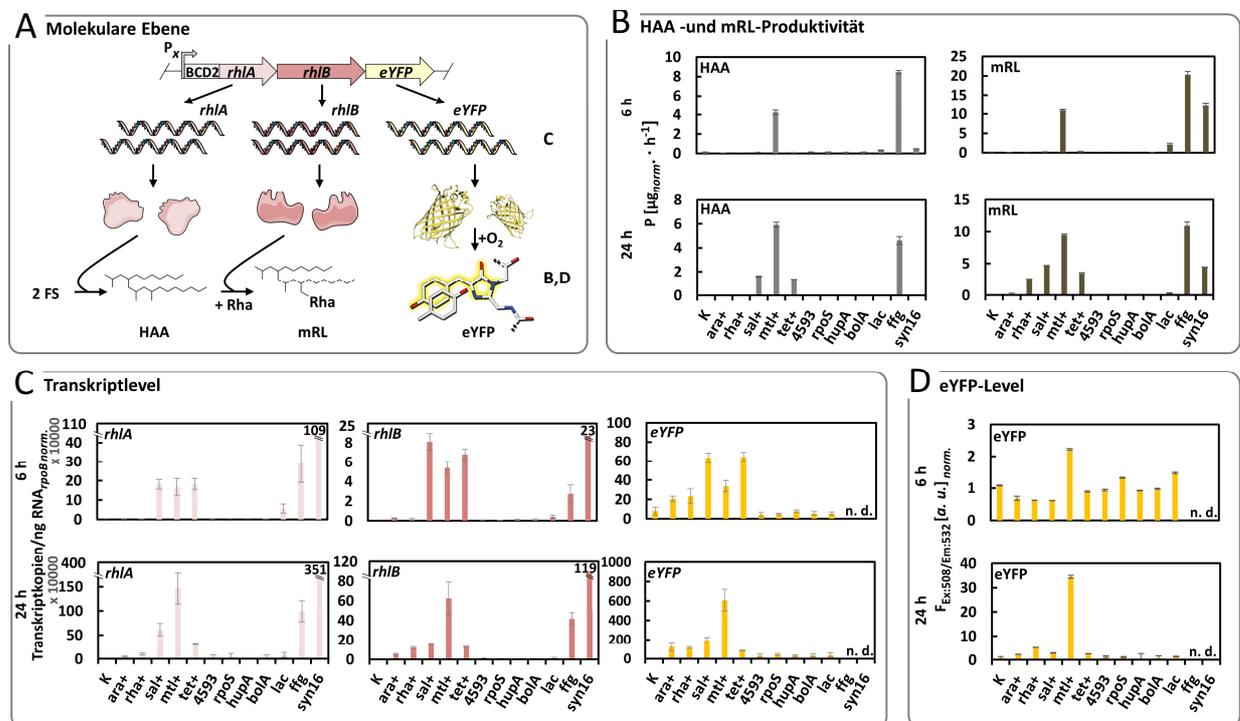
Trotz gleicher Kultivierungsbedingungen bei den Stämmen ara, rha und mtl lässt sich hier ein deutlich gestiegenes Wachstum verzeichnen. Vor allem die Wachstumsraten von ara und rha, mit  $r_B(t)$  von 0,41 bzw. 0,56  $h^{-1}$  liegen um ca. 50% höher als der des Kontrollstammes ( $\sim 0,2 h^{-1}$ ). Dadurch dass in den Stämmen ara und rha neben den Genen, die für regulatorischen Proteine kodieren und somit zur Induktion nötig sind, auch die entsprechenden heterologen Transportergene exprimiert werden (vgl. **Abb. III-7 (B)**), könnte es sein, dass diese die generelle Zuckeraufnahme anregen, wodurch das Wachstum beschleunigt werden könnte. Auch ist bekannt, dass Zuckertransporter in der Lage sind alternative Zucker zu transportieren (Henderson und Maiden, 1990). Da LB-Medium auch zum Teil aus Hefeextrakt und somit unterschiedlichen Zuckerkomponenten in geringer Konzentration besteht (**Tab. II-5**), könnte dies ein Grund für den positiven Wachstumseffekt sein, wobei auch in mtl, der keinen zusätzlichen Transporter produziert, dieser Effekt beobachtet werden kann. Der Effekt des diauxischen Wachstums, welches insbesondere bei ara beobachtet werden kann und für *E. coli* bereits beschrieben ist (Sezonov et al., 2007), ist vermutlich ebenfalls auf das LB-Medium zurückzuführen. Durch die Erschöpfung eines Metaboliten in der komplexen Zusammensetzung des Mediums (Sezonov et al., 2007), bei ara vermutlich zusätzlich verstärkt

durch die Produktion des AraE Transporters und somit der ggf. besseren Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen, ist eine frühe Unterbrechung der logarithmischen Wachstumsphase zu beobachten. Eine Metabolisierung von L-Arabinose, L-Rhamnose und D-Mannitol kann jedoch ausgeschlossen werden, da diese Effekte auch in den nicht mit Induktor supplementierten Stämmen beobachtet werden kann und *P. putida* KT2440 die dafür benötigten Abbauelemente nicht besitzt (Rodionova et al., 2013; Hoffmann und Altenbucher, 2015; Wang et al. 2019). Beispielweise fehlen in *P. putida* KT2440 drei Gene, *araB*, *araA* und *araD* (kodierend für eine Ribulokinase, L-Arabinose-Isomerase und L-Ribulose-Phosphat-4-Epimerase) zur Verwertung von L-Arabinose (Wang et al., 2019b). Wang et al., 2019b zeigte, dass bei heterologer Produktion der Enzyme AraBAD in *P. putida* KT2440, die die Umwandlung von L-Arabinose über L-Ribulose und L-Ribulose-5-Phosphat in D-Xylulose-5-Phosphat katalysieren, dieses anschließend in den PP-Weg eingespeist und als Kohlenstoffquelle verwertet werden kann (vgl. **Abb. I-6**). Jedoch sollte das diauxische Wachstum bei *ara* die RL-Produktion durch den Überschuss an Glucose als Kohlenstoffquelle nicht beeinflussen. Auch scheint das Wachstum mit einer Rate von über  $0,25 \text{ h}^{-1}$  keinen großen Effekt auf die Ausbildung der eYFP-Fluoreszenz (**Abb. III-8 (B)**; II.2.1.1) zu haben, da speziell in den Stämmen *ara*, *rha* und *mtl* hier keine verzögerte Fluoreszenzzunahme, im Vergleich zu den anderen Stämmen, beobachtet werden kann.

Die Supplementierung der induzierbaren Expressionsstämme nach 3,5 h mit Induktor (Konzentration s. **Tab. II-10**) bewirkte in keinem der Fälle eine Änderung des weiteren Wachstums. Jedoch konnte eine Aktivierung der Expression der Transkriptionsfusion *rhIA-rhIB-eYFP* in den Stämmen *ara*, *rha*, *sal* und *tet*, verglichen zu den nicht induzierten Stämmen, beobachtet werden, was anhand der Zunahme der normierten eYFP-Fluoreszenzen zu erkennen ist (**Abb. III-8 (B)**). Für *sal* ist die Induktion der Expression am stärksten. Durch die Ermittlung der spezifischen Fluoreszenzzunahme  $\mu_F(t)$ , lässt sich ebenfalls eine starke Expression in *mtl* erkennen, die sich nicht stark von der des nicht induzierten unterscheidet. Im nicht (zusätzlich) induzierten *mtl* könnte die Induktion auf Basis des vorhandenen D-Mannitols oder unbekannter alternativer Induktoren erfolgen, die wahrscheinlich im verwendeten Vollmedium vorhanden sind. Für das ähnliche Promotorsystem aus dem verwandten Organismus *Pseudomonas fluorescens* DSM50106 wurden dazu passend ebenfalls eine hohe Basalexpression in *P. putida* KT2440 und alternative Induktoren wie D-Arabitol und D-Sorbitol eingesetzt, die in dem hier verwendeten LB-Medium vorhanden sein könnten (Hoffmann und Altenbucher, 2015). Im Fall der konstitutiv und „stationär“ eYFP-exprimierenden Stämme, lassen sich lediglich bei den Stämmen *lac* und *hupA* eine geringfügige Expression feststellen (vgl. **Abb. III-7 (B)**). Die potenziell Wachstumsphasen-induzierbaren Stämme (Daten nicht gezeigt), zeigen auch bei längerer Kultivierungsdauer keine Erhöhung der Fluoreszenz.

Der Zusammenhang zwischen Transkription, HAA- bzw. mRL-Produktivität aber auch der resultierenden eYFP-Fluoreszenz ist entscheidend zur Charakterisierung und Bewertung der bakteriellen Fabrik und zur Aufschlüsselung der zellulären Mechanismen, die der RL-Produktion zugrunde liegen.

Um diese eYFP-Expressionsantwort auf Basis der Fluoreszenz des eYFP-Fluoreszenzproteins mit den tatsächlichen *rhIA*- und *rhIB*-Transkripten (RNA und *rpoB* normiert; vgl. II.2.12.2) zu korrelieren und auf die HAA bzw. mRL-Produktivität hin zu beziehen (**Abb. III-9 (A)**), wurden aus diesen Kulturen sowohl zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (nach 6 h, ggf. 2,5 h nach Induktion) sowie nach 24 h Proben entnommen und in einer RT-qPCR (II.2.12) sowie mit Hilfe der HPLC (II.3.7) analysiert. Die ermittelten Transkriptlevel (II.2.12.2) und Produktivitäten (II.3.7) wurden im Zusammenhang zu der in **Abb. III-8 (B)** ermittelten eYFP-Fluoreszenz nach 6 bzw. 24 h betrachtet (vgl. **Abb. III-9 (B-D)**).



**Abb. III-9: Übersicht über die *rhIA*-, *rhIB*-, und *eYFP*-Transkriptionsprofile, 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoat- und Monorhamnolipid-Produktivität sowie eYFP-Fluoreszenz in Bezug zur Zelldichte verschiedener *Pseudomonas putida* KT2440 Stämme.**

*P. putida* KT2440 Stämme (K, ara, rha, sal, mtl, tet, lac, syn16, ffg, 4593, rpoS, hupA und bolA; induziert = (+)) wurden für 6 und 24 h kultiviert (30 °C; LB + 10 g/L Glucose; II.2.1). Die Werte repräsentieren Mittelwerte biologischer Triplikate und wurde auf die jeweilige Zelldichte normiert. Für ffg und syn16 ist aufgrund des Fehlens des eYFP-Reportergens bzw. für die Kontrolle (K) aufgrund des Fehlens der Gene *rhIA* und *rhIB* kein Transkriptlevel/ keine Fluoreszenz ermittelbar (n. d.). Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Commons-Lizenz (CC BY 3.0).

**A:** Übersicht des zellulären Prozesses; ausgehend von Promotor ( $P_x$ ) werden die Gene *rhIA*, *rhIB* und *eYFP*, die sich in einer Transkriptionsfusion befinden, zu RNA transkribiert. Aus den Transkripten *rhIA* und *rhIB* erfolgt anschließend die Translation zu den Enzymen RhlA und RhlB, die die Bildung von mRL aus 2 Fettsäuren (FS) katalysieren. Das aus dem Transkript *eYFP* gebildete Protein eYFP (PDB: 3V3D; visualisiert mit Chimera 1.14) besitzt ein Chromophor (Darstellung aus Rizzo et al., 2009), das die spezifische Fluoreszenz ausbildet.

**B:** Die ermittelte HAA- und mRL-Produktivität (P; II.3.7) wurde aus der HPLC-CAD-Messung über einen Zeitraum von 6 bzw. 24 h extrapoliert.

**C:** Zellen der oben genannten Stämme wurden nach 6 und 24 h geerntet und nach Isolierung der Gesamt-RNA (II.2.12.1) in einer RT-qPCR (II.2.12.2) analysiert und ausgewertet. Dargestellte Transkriptkopien/ng RNA (II.2.12.2) wurden auf das Transkript des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *rpoB* normiert, um die *rhIA*, *rhIB* und *eYFP*-Transkriptveränderung in Bezug zum Kontrollstamm (K) sowie die Expression der Zielgene in Relation zur Expressionsleistung der Zelle zu betrachten.

**D:** Die ermittelte Zelldichte-normierte eYFP-Fluoreszenz (F; II.3.2) nach 6 bzw. 24 h.

Es zeigte sich, dass alle hier untersuchten Expressionsstämme ein anderes Transkriptions- (**Abb. III-9 (C)**) und Produktionsprofil (**Abb. III-9 (B und D)**) auf den unterschiedlichsten Ebenen der zellulären Prozesse (**Abb. III-9 (A)**) aufwiesen.

Zunächst scheint bei der Betrachtung des Transkriptlevels der Kontrolle (**K; eYFP; Abb. III-9 (C)**) auffällig zu sein, dass die *attTn7*-Stelle generell eine geringfügige Basalexpression durch ggf. vorhandene Transposon-vorangestellte Promotoren vor allem in der logarithmischen Wachstumsphase (6 h) besitzt. Diese Basalexpression ist auch bei Betrachtung der eYFP-Fluoreszenz im Kontrollstamm (**K; Abb. III-9 (D)**) erkennbar und überraschend, da die Kontrolle lediglich das *eYFP*-Gen (integriert in die *attTn7*-Stelle) und keinen vorangestellten Promotor enthält. Verstärkt wird die Basalexpression des genomintegrierten Locus vermutlich durch den Positionseffekt in der Nähe des Replikationsursprungs des Genoms (I.3.1.2; Craig, 1966; vgl. *Pseudomonas* GenomeDB; **Tab. II-8**), wodurch während des Wachstums und der voranschreitenden Replikation des Genoms der Locus mit dem Transposon, und somit auch die genetische Information zur Produktion von HAA/mRL und dem Protein eYFP, mindestens in zweifacher Kopie vorliegt (Slager und Veening, 2016; Chaves et al., 2020). Diese Hintergrundexpression scheint aber nicht ausreichend zu sein, um *rhIA* und *rhIB* stark genug zu exprimieren, um eine Produktivität von HAA bzw. mRL herbeizuführen (**K; Abb. III-9 (B)**).

Das Plasmid-basierte Referenz-Expressionssystem **syn16** zeigte die stärkste Akkumulation des *rhIA* und *rhIB*-Transkriptes (~ Faktor 3 höher im Gegensatz zum durchschnittlichen Transkriptlevel der Stämme mit genomintegrierten Expressionskassetten; **Abb. III-9 (C)**). Gründe hierfür könnten möglicherweise im Zusammenhang mit dem Expressions-starken synthetischen *syn16*-Promotor (Tiso et al., 2016) sowie mit einem Gendosierungseffekt stehen. Letzteres könnte durch die höhere Kopienzahl des Plasmides im Vergleich zu den Stämmen mit genomintegrierten Expressionskassetten hervorgerufen werden. Bemerkenswert ist, dass der Plasmid-tragende Stamm nach 24 h einen im Vergleich zu anderen Stämmen (bspw. *mtl*, *ffg*) kaum HAA- und eine geringere mRL-Produktivität besitzt (**Abb. III-9 (B)**; s. a. Biotensid-Titer **Tab. A-6**). Die hohe Transkription scheint in diesem Zusammenhang nicht unbedingt vorteilhaft für die Produktakkumulation zu sein. Dieses Phänomen wird durch Berichte über eine vergleichsweise schlechte Leistung der hochprozessiven T7-RNA-Polymerase in Bezug auf die Ausbeute des Produkts eines exprimierten Biosynthesewegs in *P. putida* oder *E. coli* unterstützt (Wittgens, 2013; Domröse et al., 2015; Calero et al., 2016; Du et al., 2017). Überraschenderweise zeigte *syn16* jedoch kaum eine HAA-Akkumulation.

Für die untersuchten *P. putida* Expressionsstämme **rpoS**, **hupA**, **bolA** und **4593**, bei denen erst zu Beginn der stationären Wachstumsphase (hier: 24 h) eine Zunahme der *rpoB*-normierten Expression von *rhIA*, *rhIB* und *eYFP* erwartet wurde, konnte kaum messbares Transkript und somit auch keine Produktivität nachgewiesen werden (**Abb. III-9 (B und C)**), obwohl eine leichte eYFP-Fluoreszenz im Fall des Expressionsstammes *hupA* sichtbar war (**Abb. III-8 (B)**). Auch bei längerer Kultivierungsdauer (bis zu 72 h; Daten nicht gezeigt) zeigen diese Stämme keine RL-Produktivität und keine höhere eYFP-Fluoreszenz. Der Grund für die generell schwache Expression induziert

durch diese putativ stationär-aktiven Promotoren könnte an der Auswahl der kodierenden Sequenz des Promotors, den Regulationsmechanismen der Promotoren kombiniert mit der Integration in die *attTn7*-Stelle, sowie an RNA-Degradationsmechanismen liegen: Die betrachteten Promotoren können aufgrund ihrer Aktivierung in der stationären Wachstumsphase vermutlich durch einen alternativen  $\sigma$ -Faktor reguliert werden (Paget und Helmann, 2003). Somit könnte es sein, dass die Auswahl des Promotorbereiches 150 bp vor dem hochregulierten Gen nicht die vollständige Promotorsequenz beinhaltet, da die entsprechenden Bereiche alternativer  $\sigma$ -Faktoren auch deutlich weiter stromaufwärts (z. B. 300 bp) des kodierenden Gens liegen können (Meyers et al., 2019). Zudem kann vermutet werden, dass andere Expressionsorte, wie die *attTn7*-Stelle, ggf. durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit der chromosomalen DNA, nicht den gewünschten stationär-aktivierenden Effekt besitzen, da die Expression von Genen durch alternative  $\sigma$ -Faktoren ggf. über die Umgebung der umliegenden DNA-Region (über den hier ausgewählten Sequenzbereich hinaus) reguliert werden könnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass putative stationäre-aktive Promotoren bei der Verwendung zur heterologen Expression von Genen generell eine schwächere Expression zeigen (Meyers et al., 2019). Die Optimierung der Sequenz, bspw. durch Austausch der -10 Erkennungssequenz solcher stationär-aktiven Promotoren zur Adressierung des Haupttranskriptionsfaktors der  $\sigma^{70}$  Familie, kann die Expression erhöhen (Meyers et al., 2019), wodurch von einer generell schwächeren Transkriptionsrate für diese alternativen  $\sigma$ -Faktoren an anderen Integrationsorten oder einer nicht ausreichenden Auswahl der kodierenden Sequenz ausgegangen werden kann. Ein weiterer Effekt, der hier eintreten könnte und bereits für *E. coli* beschrieben wurde (Chen und Deutscher, 2005), ist, dass heterolog produzierte mRNA beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase zunehmend instabil und angreifbar für intrazelluläre RNAsen wird, was zu einer Kurzlebigkeit des Transkriptes und einer nicht ausreichenden Expression führt.

Beim  $P_{lac}$ -basierten Expressionssystem (**lac**), dessen Promotor bzw. Derivate in einer großen Zahl prokaryotischer Expressionsplasmide Verwendung finden (vgl. I.3.1.1), lässt sich *rhIA* und *rhIB* Transkript und eine geringe HAA- und mRL-Produktivität lediglich in der logarithmischen Phase (6 h) nachweisen (**Abb. III-9 (B und C)**), die auch in einem geringen mRL-Titer von 0,02 g/L nach 6 h und 0,06 g/L nach 24 h resultiert (vgl. **Tab. A-6**). Dadurch dass die  $P_{lac}$ -induzierte Expression zur stationären Wachstumsphase hin zurückgeht, vermutlich ebenfalls auf RNA-Degradationseffekte zurückzuführen (s. oben; Chen und Deutscher, 2005), lässt sich zu diesem Zeitpunkt auch kaum HAA- und mRL-Produktivität bzw. eYFP-Fluoreszenz nachweisen (**Abb. III-9 (B-D)**).

Im Gegensatz zu den untersuchten potenziell stationär-aktiven und den schwach konstitutiv aktiven Promotoren, konnte innerhalb der untersuchten induzierbaren Stämme **ara**, **rha**, **sal**, **mtl** und **tet** eine Erhöhung der Transkriptionsleistung durch Induktion (+) hervorgerufen werden (s. a. **Abb. A-5**). Diese zeigen, vor allem in den Stämmen **sal**, **mtl** und **tet**, eine ähnlich hohe Akkumulation der Transkripte *rhIA* und *rhIB* in Relation zur Referenz ffg (**Abb. III-9 (C)**). Der direkte Vergleich der Transkriptions- und Produktionsprofile nach 6 und 24 h Kultivierung (**Abb. III-9 (B-D)**), deren Gesamt-RNA-Mengen sich generell um den Faktor 4-10 unterscheiden (**Abb. III-9 (C)**), lässt zu, die Produktionsstämme ffg, **sal**, **tet** und **mtl** in zwei unterschiedliche Gruppen einzuteilen: Während zu

Beginn der Kultivierung (6 h) die mtl- und ffg-Expressionsstämme weniger *rhIA* und *rhIB* Transkripte als sal bzw. tet vorweisen, kehrt sich dieses Muster nach 24 h um, sodass mtl und ffg deutlich mehr Transkript besitzen (**Abb. III-9 (C)**). Diese Gruppierung spiegelt sich auch in der normierten Produktivität wider (**Abb. III-9 (B)**). Wohingegen zu Beginn der Kultivierung (6 h) die HAA- und mRL-Produktivitäten bei sal und tet gering sind, sind diese bei mtl und ffg trotz des eher geringeren Transkriptlevels hoch. Vermutlich liegt dies am konstitutiv aktiven Promotor des  $P_{ffg}$ -basierten Expressionsstammes sowie der hohen Basalexpression des mtl-Stammes (vgl. **Abb. III-8 (B)**; links; hellgrün), wodurch das Transkript in den ersten Stunden ausreichend aktives Enzym zur Produktion von RL und somit eine hohe Biotensid-Produktivität hervorrufen kann (**Abb. III-9 (B)**; 6 h). Verglichen mit der Biotensid-Produktivität für sal und tet in der logarithmischen Wachstumsphase (**Abb. III-9 (B)**) lässt sich eine Steigerung der Produktivität von HAA bzw. mRL um 3441 und 1599% bzw. 2612 und 1313% zur stationären Wachstumsphase hin feststellen, wohingegen die Produktivitätssteigerung in mtl lediglich 40 (HAA) und 13% (mRL) beträgt. Bei ffg ist sogar eine Verringerung der Produktivität von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase hin zu beobachten: hierbei fällt die HAA-Produktivität um 84% und die mRL-Produktivität um 86%. Ein ähnliches Phänomen ist auch im nicht induzierten mtl-Stamm zu erkennen (s. a. **Abb. A-5**), bei der die Steigerung der HAA-Produktivität 19% beträgt und die mRL-Produktivität um 12% sinkt. Somit scheint eine frühe Expression der Gene einerseits zu hohen RL-Titern (**Tab. A-6**) in den Stämmen ffg und mtl zu führen, jedoch sinkt die Produktivität zur stationären Wachstumsphase hin. Diese erhöhte Produktivität des induzierten mtl im Vergleich zum nicht induzierten, lässt sich vermutlich durch die zwar geringfügige jedoch zusätzliche Aktivierung des Promotors erklären, wodurch mehr Transkript beim Vorhandensein des Induktors gebildet wird. Dieser Verlust der insbesondere HAA- aber noch deutlicher mRL-Produktivität zur stationären Wachstumsphase hin ist äußerst überraschend. Eine Erklärung wäre, dass die Produktion ausgehend von D-Gluconat/2-Keto-D-gluconat, die relativ schnell durch die zügige Umsetzung der D-Glucose stattfindet (Nikel et al., 2015) ein Grund für den Verlust der Biotensid-Produktivität der Stämme sein könnte (Bator, 2020; Karmainski, 2020). Vor allem im mtl, der sich vermutlich bereits in der stationären Wachstumsphase befinden könnte, wäre diese Erklärung möglich (vgl. **Abb. III-8 (A)**). Tiso et al., 2020 zeigte für den sal-Stamm, dass bereits nach 10 h Kultivierung die D-Glucose vollständig durch die Zellen metabolisiert wurde; Jedoch wurden diese Experimente im Minimalmedium (M9-Medium + 17 g/L Glucose) durchgeführt und können somit nicht auf die hierigen Kultivierungsbedingungen übertragen werden. Es könnte trotzdem ein Indiz sein, dass die Vorstufen, insbesondere dTDP-L-Rhamnose einen limitierenden Faktor im späteren Verlauf der Kultivierung zur Produktion von mRL darstellen, denn diese werden bevorzugt aus G6P gebildet, welches direkt über die Glucokinase Glk aus D-Glucose gebildet werden kann; bei Glucosemangel über akkumulierendes D-Gluconat/2-Keto-D-gluconat über mehrere enzymatische Schritte (vgl. I.3.2; Nickel et al., 2015). Jedoch kann eine generelle Glucose-Limitierung als Ursache für die hier beobachteten Effekte ausgeschlossen werden, da mit Hilfe von FeedBeads® (Kuhner Shaker GmbH), die eine graduelle Freilassung und eine kontinuierliche Zuführung von Glucose erlauben, bei sal bzw. mtl ein ähnlicher oder sogar geringerer Biotensid-Titer beobachtet

wurde (Daten nicht gezeigt) und die beobachtete Abnahme hier lediglich die Stämme mtl und ffg betrifft. Diese differenzielle Produktivität ausgehend von unterschiedlich starker Transkriptionsleistung spiegelt sich auch in den resultierenden Titern wider (**Tab. A-6**). Für sal und tet kann erst nach 24 h ein messbarer Biotensid-Titer verzeichnet werden, wobei diese für tet, der auch eine geringe zelluläre Transkription von *rhlA* bzw. *rhlB* vorweist (**Abb. III-9 (C)**), deutlich geringer ausfällt.

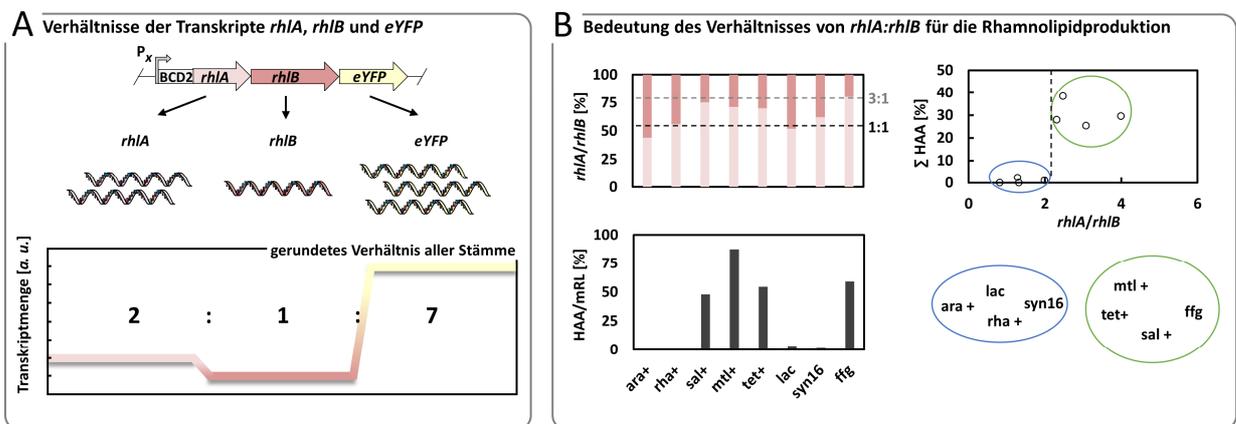
Im direkten Vergleich zu diesen starken Expressionsstämmen, zeigen die Produktionsstämme **rha** und **ara** hingegen erst in der stationären Wachstumsphase (24 h) messbare *rhlA* und *rhlB* Transkriptlevel (**Abb. III-9 (C)**). Analog zu sal und tet ist bei ara und rha kaum eine Basalexpression vorhanden und die Expression der Gene wird erst durch die Induktoren, in diesen Fällen L-Rhamnose und L-Arabinose, induziert. Jedoch ist die Expressionsrate gering und die Induktion der Gene verzögert (vgl. **Abb. III-8 (B)**; **Abb. III-9 (C)**).

Ein Grund könnte, wie bereits oben beschrieben, die  $P_{tac}$ -induzierte Expression der Transporter-kodierenden Gene sein. Da bereits die *lac*-basierte Expression (*lac*; **Abb. III-9 (C)**) hier eine schwache Expression zeigt, ist zu vermuten, dass auch der  $P_{tac}$ -Promotor als Derivat des *lac*-Promotors (de Lorenzo et al., 1993), der standardmäßig auf Plasmiden der Serie pVLT vorhanden und für seine starke Expression und erfolgreiche Produktion von Sekundärmetaboliten bekannt ist (Thies et al., 2014; Johnson et al., 2016), eine nicht ausreichende Expression der Gene für die Transporter RhaT oder AraE in der hier dargestellten genomintegrierten Variante besitzt. Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde gezeigt, dass der Austausch des *araE*-Promotors die Produktion des Transporters AraE fördert sowie die Expressionsleistung des  $P_{BAD}$ -Promotors erhöhen kann (Khlebnikov et al., 2001; Afroz et al., 2015). Der Austausch des Promotors sollte beim Einsatz des *BAD*-Promotorsystems für die induzierte Expression von genomintegrierten BSG zukünftig in Betracht gezogen werden. Somit könnte die geringe Expression des *araE*-Gens mitunter ein Grund dafür sein, dass in ara kaum Biotensid-Produktivität sichtbar ist, wodurch sich lediglich ein Titer von rund 0,01 g/L nach 24 h ergibt (**Tab. A-6**).

Für rha lässt sich eine mRL-Produktivität ermitteln, die um den Faktor 2 gegenüber dem sal, bzw. Faktor 4 gegenüber mtl und ffg, niedriger ist (**Abb. III-9 (B)**). Ein Grund hierfür könnte, analog zum ara-Stamm, auf der schwachen  $P_{tac}$ -induzierten Transkription des *rhaT*-Transportergens basieren. Zusätzlich könnte hier aber auch die Anordnung des *tac*-Promotors im genetischen Konstrukt eine Relevanz besitzen: Der davorliegende und in selber Orientierung zum *rhaP<sub>BAD</sub>* integrierte *tac*-Promotor, der vor dem *rhaT*-Gen liegt, könnte dazu führen, dass eine RNA-Polymerase ausgehend vom  $P_{tac}$  über das Transposon und somit die Gene *rhaRS* (Kein Transkriptionsstopp vorhanden) liest (vgl. **Abb. III-7 (B)**). Hierbei ist bekannt, dass die Bildung von solchen *antisense* Transkripten die Expression der Gene massiv beeinträchtigen kann und ferner sogar gezielt zur Regulation von Genen eingesetzt werden können (Georg und Hess, 2011; Loeschcke et al., 2013). Somit könnte die  $P_{tac}$ -induzierte Bildung von *antisense* Transkript zu den Regulatorproteinen RhaR und RhaS des *rhaP<sub>BAD</sub>*-Regulons (Brautaset et al., 2009), eine Minimierung des RhaRS-Spiegels

verursachen, wodurch weniger Aktivatorprotein, folglich weniger Transkription und Produktbildung auftritt.

Die Betrachtung der hier untersuchten Stämme zeigte, dass diese abhängig vom jeweiligen Promotorsystem ein individuelles Transkriptmuster besitzen. Zudem scheinen die einzelnen Transkripte, obwohl diese ausgehend von einem Promotor als Transkriptionsfusion transkribiert werden, unterschiedlich hoch exprimiert zu sein. Da die Transkriptlevel der einzelnen Gene einen Einfluss auf die Produktion von HAA und mRL haben können, sollen Im Folgenden diese Transkriptmuster und deren Einfluss auf die Produktion der hier betrachteten Biotenside HAA für die einzelnen Stämme (Promotorsysteme) verglichen und potenzielle Ursachen eruiert werden (**Abb. III-10**).



**Abb. III-10: Unterschiede im mRNA-Level der Gene *rhIA*, *rhIB* und *eYFP* und Verhältnisse der Transkripte/Tensid-Titer.** Die Betrachtung basiert auf den induzierten (+) *P. putida* KT2440 Produktionsstämmen *ara+*, *rha+*, *syn16*, *lac*, *sal+*, *mtl+*, *tet+* und *ffg* nach 24 h Kultivierung (30 °C; LB + 10 g/L Glucose; II.2.1).

**A:** Die Betrachtung der Gesamtheit der Transkripte der Gene *rhIA*, *rhIB* und *eYFP*, bestimmt durch RT-qPCR (II.2.12.2), zeigt einen Unterschied in der Transkriptdosis. Das Verhältnis der Transkriptmenge *rhIA*:*rhIB*:*eYFP* berechnet durch die in II.2.12.2 ermittelten Kalibriergeraden beträgt gerundet in allen untersuchten Fällen ungefähr 2:1:7. Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Commons-Lizenz (CC BY 3.0).

**B:** Die Aufschlüsselung der Transkriptmengen von *rhIA* und *rhIB* zeigt: Das Verhältnis der *rpoB*-normierten Transkripte *rhIA*:*rhIB* am Gesamt-Transkript war bei den Stämmen *ara+*, *rha+*, *lac* und *syn16* nahezu 1:1 (links oben; schwarze gestrichelte Linie), was letztendlich zu einer vollständigen Umsetzung von HAA zu mRL führt (links unten; Verhältnis von HAA zu mRL am Gesamt-Biotensid unter Berücksichtigung der Molaren Masse). Die Transkripte der Stämme, die die höchste RL-Produktion vorwiesen (*sal+*, *mtl+*, *tet+* und *ffg*) zeigten hingegen eine Verteilung von *rhIA*:*rhIB* von 3:1 (links oben; grau gestrichelte Linie). Es bilden sich zwei Cluster (blau/grün; Anordnung in der Legende entspricht den Punkten im Diagramm rechts oben) die auf Basis des Verhältnisses von *rhIA*:*rhIB* eine Akkumulation von HAA zeigen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken.

Generell auffällig sind hierbei die unterschiedlichen RNA-Level (*rpoB* normiert) der Gene *rhIA*, *rhIB* und *eYFP*, welche gerundet für alle hier betrachteten Expressionsstämme in einem ungefähren Verhältnis von *rhIA*:*rhIB*:*eYFP* von 2:1:7 stehen und kein Artefakt aus der RT-qPCR (vgl. II.2.12.2) darstellen können (**Abb. III-10 (A)**). Bekannt ist, dass mit steigendem Abstand zum Promotor weniger Transkript gebildet wird (Loeschcke et al., 2013). Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass sich die RNA-Polymerase statistisch häufiger von der DNA-Matrize löst. Jedoch ist zum einen der Abstand der Promotoren zu den Genen aufgrund des eher kleinen Operons (3,1 kbp) hier vermutlich nicht die einzige Ursache, zum anderen ist die Transkriptmenge von *eYFP*, welches am weitesten vom Promotor entfernt ist um den Faktor 7 größer als die des davorliegenden Gens *rhIB*. Da bei der Konstruktion der intergenischen Region der *yTREX-toolbox* Kasette zwischen den biosynthetischen Genen und dem Reporter gen mit Hilfe von Online-*tools* zur Vorhersage von Sequenzmotiven darauf geachtet wurde, keine Sequenzelemente wie Promotoren und Sekundärstrukturen zu erzeugen, die

eine unabhängige Expression des Reportergens verursachen könnten (vgl. III.1.1; **Tab. II-8**), können lediglich RNA-Motive (bspw. Sekundärstrukturen und Erkennungssequenzen für Promotoren, Terminatoren oder RNAsen) innerhalb der Gene oder der nativen intergenischen Region zwischen *rhIA* und *rhIB* verantwortlich für dieses Muster sein. Auch der Kontrollstamm ohne Promotor (K), welches lediglich das *eYFP*-Gen enthält (vgl. **Abb. III-7 (B)**), bestätigt diese Vermutung, da dessen Basalexpression im Vergleich zu den Transkriptleveln der *rhIAB*-Gene der RL-Produzenten (bspw. *sal*, *mtl*, *ffg*; s. Achsenskalierung; vgl. **Abb. III-9 (C)**) deutlich erhöht ist. So könnte bspw. eine noch unbekannt Promotorsequenz im Gen *rhIB*, die massive Degradierung der *rhIA*- bzw. *rhIB*-mRNA und/oder eine hohe Stabilisierung der *eYFP*-mRNA gegen Degradation Gründe für dieses Muster liefern. Das *rhIAB*-Operon wurde sequenzidentisch, ohne Rearrangement oder Codonoptimierung, aus *P. aeruginosa* übernommen, sodass native Regulatoren in der mRNA-Sequenz zur Einstellung von HAA- und RL- Gleichgewichten noch vorhanden sein könnten. Die differenzielle Transkriptakkumulation des nativen Operons in *P. aeruginosa*, wurde auch durch eine *northern blot* Analyse in Pearson et al., 1997 bestätigt. Die molekularen Hintergründe dafür sind aber noch nicht aufgeklärt.

So postulierte bereits Wittgens, 2013, nach Entfernung von 45 bp der insgesamt 65 bp großen intergenischen Region zwischen *rhIA* und *rhIB*, dass dieser Bereich möglicherweise intercistronische Transkriptionsterminatoren enthält, sodass bei Expression des nativen Operons mehr Transkript von *rhIA* als von *rhIB* vorliegt. Bislang konnten keine Terminatormotive identifiziert werden, allerdings besitzt die DNA-Sequenz einen G/C-reichen Bereich mit einem *inverted repeat*, der vielleicht eine Haarnadelstruktur (*stem-loop*) bilden könnte, jedoch fehlt die für Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren typische Abfolge von Thyminen in der stromabwärts gelegenen DNA-Sequenz (Ray-Soni et al., 2016; Wittgens, 2013), wodurch spekuliert werden kann, dass es sich ggf. um ein protektorisches Element, welches ebenfalls in einer Haarnadelstruktur kodiert sein kann, handelt (Dar und Sorek, 2018). Zumindest für *E. coli* ist sehr gut beschrieben, dass ein differenzieller Zerfall von polycistronischen Operonen möglich ist und eine Kombination aus der Stabilisierung von 3'- bzw. 5'- Enden durch Sekundärstrukturen, Ribosomen sowie dem Verdau durch Ribonukleasen dafür verantwortlich sein kann (Newbury et al., 1987; Dar und Sorek, 2018). Somit wäre auch ein Abbau von *rhIB* durch Ribonukleasen denkbar (Pearson et al., 1997; Wittgens, 2013). Die Hydrolyse von RNA durch Ribonukleasen stellt einen natürlichen Prozess zur Regulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene dar, wobei Endoribonukleasen die Phosphodiesterbindungen innerhalb einer RNA-Sequenz initial hydrolysieren, und Exonukleasen die RNA vom 3'-Ende aus vollständig durch Abspaltung von Nukleotiden degradieren (Chen und Deutscher, 2005; s. a. Wittgens, 2013). *P. putida* KT2440 besitzt hierbei ebenfalls zahlreiche Endo- und Exonukleasen (Winsor et al., 2011) und für *E. coli* als Modell ist diese gezielte Prozessierung von mRNA gut beschrieben: Eine zentrale Rolle spielt das Degradosom, dass u. a. die Endoribonuklease RNaseE und die Exoribonuklease PNPase enthält (Carpousis, 2007; Hadjeras et al., 2019), die ebenfalls im Genom von *P. putida* KT2440 kodiert sind (Nelson et al., 2002; s. a. Wittgens, 2013). Hierbei kann die Aktivität dieser RNAsen durch weitere Sekundärstrukturen

reguliert werden (Nozawa et al., 2018). Wittgens, 2013 zeigte in diesem Zusammenhang, dass die im nativen Wirt (*P. aeruginosa*) enthaltene stromaufwärts gelegene Region der Gene *rhIAB*, vermutlich durch die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen, dazu führt, die RNA effektiver vor der Hydrolyse durch RNasen zu schützen, wodurch ein höherer RL-Titer erreicht werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der native stromaufwärts liegende Bereich des *rhIAB*-Operons durch eine alternative RBS, welches hier für die Klonierung und die Standardisierung zum Vergleich der Konstrukte benutzt wurde, ersetzt. Die Investigation des Einflusses der RBS, hier BCD2, im Vergleich u. a. zur nativen RBS, könnte das Ziel zukünftiger Studien zur Untersuchung der mRNA-Stabilität sein.

Weiterhin scheint, wie bereits beschrieben, das Verhältnis von *rhIA:rhIB* eine Relevanz für die Produktion von RL, speziell die Akkumulation von HAA, zu besitzen (**Abb. III-10 (B)**). Bei genauer Betrachtung der Verhältnisse, ergibt sich in bestimmten Fällen eine Abweichung des über alle Stämme gerundeten Verhältnis *rhIA:rhIB* von 2:1. Während in den schwachen Expressionsstämmen *ara*, *rha*, *lac* und dem Plasmid-basierten Expressionsstamm *syn16* das *rhIA:rhIB* Transkriptverhältnis gleichverteilt ist und kaum HAA akkumuliert, beträgt das Verhältnis der mRNA von *rhIA:rhIB* bei den stark exprimierenden und Transkript-akkumulierenden Stämmen *sal*, *mtl*, *tet* und *ffg* hingegen gerundet 3:1 und eine Anreicherung von HAA ist zu beobachten (**Abb. III-10 (B)**; links). Dadurch lassen sich zwei Cluster bilden (**Abb. III-10 (B)**; rechts; blau; grün), die zeigen, dass ab einem *rhIA:rhIB* Verhältnis von ca. 2:1 (gestrichelte Linie) eine Akkumulation von HAA wahrscheinlich sein könnte bzw. das ab einer starken Expression der Gene (ausgenommen des Plasmid-basierten Systems *syn16*) HAA zunehmend akkumuliert. Ein Grund für die Akkumulation von HAA könnte wie bereits oben beschrieben darin liegen, dass zum Ende des Wachstums eine Limitierung von dTDP-L-Rhamnose, verursacht durch voranschreitende abfließende Prozesse, bspw. der Synthese der LPS und der Alginate, oder die Herabregulierung des gesamten Rhamnose-Biosyntheseweges (vgl. I.3.2) vorliegt. Jedoch könnte die aktive Degradation der mRNA von *rhIB* auf eine grundlegende physiologische Rolle der RL im Ursprungsorganismus *P. aeruginosa*, zurückzuführen sein: HAA und RL haben einen gegensätzlichen Effekt auf die bakterielle Fortbewegung, wobei beschrieben worden ist, dass dRL das *swarming* und die oberflächenassoziierte Migration von Bakterien im Biofilm und damit die anfängliche Mikrokoloniebildung und Differenzierung der Biofilmstruktur stimulieren, wohingegen HAA dieses inhibieren (I.2.1). Somit könnte, eine hohe Produktion von HAA am Anfang der Kultivierung im natürlichen Habitat sinnvoll sein, um Bakterien im Zellverbund zusammenzuhalten und somit Zell-Zell Interaktionen, den Austausch von Nährstoffen und die Ausbildung des Biofilms zu fördern. Sekundärstrukturen in der mRNA der Proteine RhIA und RhIB, die die Bildung von HAA oder RL steuern, könnten somit ein natürlicher Regulationsprozess sein. Berichte von ähnlichen Transkriptionsmustern zwischen den homologen und dem heterologen Expressionswirt existieren, wobei die Ursache vermutlich in den hochkonservierten Mechanismen der RNA-Degradationsmaschinerien liegt (Evguenieva-Hackenberg und Klug, 2009; Hui et al., 2014). Ismail et al., 2014 zeigte bspw., dass das *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* Verhältnis eines kürzlich isolierten RL-Produzenten (*Pseudomonas* sp. AK6U) sich durch äußere Einflüsse abwandeln ließ.

Hier konnte durch die Stimulation mit Dibenzothiophen, das Verhältnis zwischen den Genen *rhIA:rhIB* erhöht werden, was schlussendlich in einem um den Faktor 2-3 höheren Biotensid-Titer resultierte, die jedoch in dieser Studie nicht in ihre Spezies und Kongenere aufgeschlüsselt wurden. Somit wäre es auch denkbar, dass *P. putida* KT2440 ebenfalls die zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Modifikation der mRNA und somit zur Steuerung der Transkriptlevel benötigt werden, besitzt. Die hier beobachteten Effekte der unterschiedlichen mRNA-Level lassen den Schluss zu, dass die Mechanismen der posttranskriptionalen mRNA-Prozessierung eine maßgebliche Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielen.

Zusammengefasst zeigen die präsentierten Profile, dass die hier charakterisierten Produktionsstämme mit induzierbaren Promotoren, insbesondere *mtl*, *sal*, *rha* und *tet*, vielversprechend für die Produktion von RL sein könnten. Zudem ist die Ermittlung der Transkription relevanter Gene mit Hilfe der eYFP-Fluoreszenz, durch die Transkriptionsfusion des kodierenden eYFP-Gens an die Gene *rhIAB*, möglich und konnte hier nochmal bestätigt werden (III.1.1.1; **Abb. III-8 (B)**; **Abb. III-9 (D)**; **Abb. A-6**). Dies kann somit einen ersten Hinweis auf eine erfolgreiche Genexpression und RL-Produktion liefern. Weiterhin scheint die Stärke und die Regulation der Transkripte eine maßgebliche Rolle bei der Produktion von RL zu spielen. Die RL-Stämme mit den höchsten Produktivitäten (*ffg*; *mtl*) zeigten dabei eine Abnahme der mRL-Produktivität nach 24 h. Um die Stabilität der Produktion zu untersuchen und die RL-Produktion als Ursache für die Abnahme der Produktivität auszuschließen, sollten diese Stämme im Folgenden mit einem induzierbaren System (*sal*) auf die Produktion von RL über mehrere Generationen hinweg untersucht werden.

#### **Zusammenfassung | Komparative Evaluierung verschiedener Promotorsysteme**

- (1) Die ermittelten Transkriptlevel resultierend aus der induzierbaren  $P_{nagAa^-}$ ,  $P_{mtlE^-}$ ,  $rhaP_{BAD}$  und  $P_{tetA^-}$ -basierten Expression befinden sich in derselben Größenordnung wie die des stark konstitutiv exprimierenden Referenzstamms *P. putida* KT<sub>ffg</sub>mRL. Die Plasmid-basierte Expression (pPS05) unter Kontrolle eines starken synthetischen Promotors ( $P_{syn16}$ ) zeigt ein hohes Transkriptlevel (Faktor 3 höher); jedoch führt dies zu einer geringere mRL-Produktivität (24 h;  $4 \mu g_{norm.} \cdot h^{-1}$ ).
- (2) Die konstitutive Expression unter Kontrolle starker Promotoren (hier:  $P_{ffg}$ ;  $P_{mtlE}$  aufgrund Basalexpression) führt zu einer hohen mRL-Produktivität (6 h; 11 bzw. 20  $\mu g_{norm.} \cdot h^{-1}$ ), die jedoch im Verlauf der Kultivierung abnimmt (24 h; auf 9 bzw. 10  $\mu g_{norm.} \cdot h^{-1}$ ). Die Verwendung induzierbarer Promotorsysteme (hier:  $P_{nagAa}$ ;  $rhaP_{BAD}$ ;  $P_{tetA}$ ) zeigt eine Zunahme der mRL-Produktivität im Kultivierungsverlauf.
- (3) Die Transkriptionsfusion *rhIA-rhIB-eYFP* kann auf DNA/RNA-Ebene bestimmte Sequenzmotive besitzen, die u. a. zur Prozessierung der RNA und somit zu einer Akkumulation von HAA und einer Abnahme der mRL-Produktivität führt.

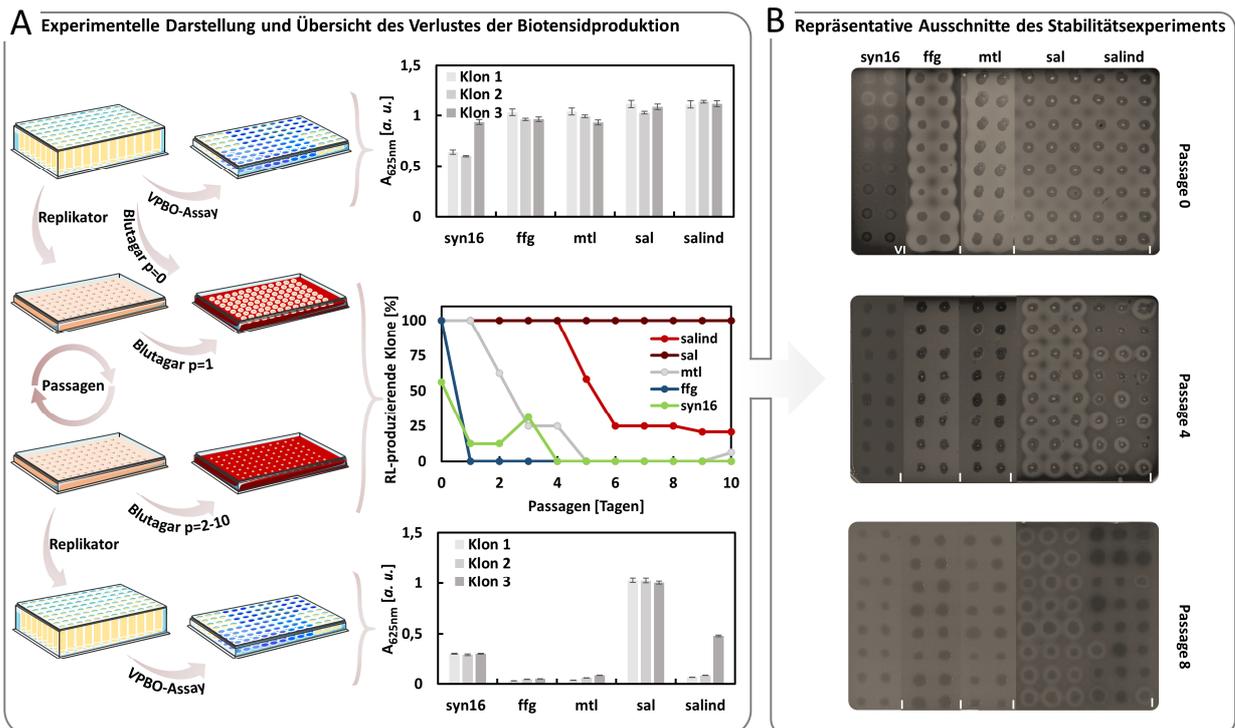
### III.2.2 Rhamnolipid-Produktionsstabilität verschiedener Produzenten

In der Vergangenheit wurde *P. putida* KT2440 aufgrund seiner hervorragenden Erfahrungen im Bereich der Produktion von Sekundärmetaboliten (Loeschcke und Thies, 2020) und seiner hoher Toleranz gegenüber RL für die Produktion dieser Biotenside eingesetzt (Wittgens et al., 2011; vgl. I.3; I.3.2). Zu diesem Zweck wurden bislang prädominant Plasmide für die heterologe Expression des *rhIAB*-Operons aus *P. aeruginosa* eingesetzt, wobei oft so starke synthetische konstitutiv aktive Promotoren wie möglich eingesetzt wurden (**Tab. I-3**). Ein allgemein anerkannter Vorteil von genomintegrierten Expressionskassetten gegenüber der Verwendung von Plasmiden ist jedoch die Stabilität des resultierenden Produktionsstammes (I.3.1.1-2; Khalidi et al., 2016; Ademakinwa et al., 2017). Durch die Genomintegration von genetischer Information lässt sich eine stabile Weitervererbung, gleichmäßige Expression und somit Reproduzierbarkeit erreichen (Nora et al., 2019).

Jedoch zeigen die Ergebnisse aus der RT-qPCR (III.2.1) im Vergleich zum Plasmid-basierten  $P_{syn16}$ -System (*syn16*), dass zwar die Transkriptdosis im Plasmidstamm deutlich höher ist (Faktor 3), dies aber nicht unbedingt zu einem höheren RL-Titer führt. Weiterhin führte eine starke konstitutive Expression der Gene *rhIA* und *rhIB* zu Beginn der Kultivierung, trotz Integration in das Genom (vgl. *mtl* (aufgrund Basalexpression), *ffg*), zwar zu einer hohen Biotensid-Produktivität, die jedoch bei voranschreitenden Kultivierungsdauer zunehmend abnahm. Ursachen hierfür wurden diskutiert und könnten in der Instabilität des genetischen Konstruktes, aber auch der Limitierungen von RL-Vorstufen liegen.

Im Folgenden soll nun zusätzlich die RL-Produktionsstabilität über mehrere Generationen und somit der Einfluss der RL auf die genetische Stabilität untersucht werden. Hierzu soll der Einfluss von Plasmid-basierter im Vergleich zur genomintegrierten *rhIAB*-Expression aber auch ein potenzieller evolutiver Druck ausgehend von RL eruiert werden. Letzteres würde in großskaligen Prozessen, bei denen hohe Zelldichten erreicht werden sollen, bedeuten, dass die RL-Produktivität nach einigen Generationen zunehmend sinken würde und sich somit einstellen könnte.

Um diese RL-Produktionsstabilität in dem konstitutiv aktiven Plasmid-basierten System *P. putida* KT2440 *pPS05* (*syn16*) sowie den *attTn7*-integrierten und stark konstitutiv exprimierenden Stämmen *ffg* und *mtl*, sowie dem Salicylat-induzierbaren System *sal* zu evaluieren, sollten diese hinsichtlich ihrer Stabilität der Produktionsfähigkeit von RL über viele Generationen hinweg verglichen werden (**Abb. III-11**).



**Abb. III-11: Produktionsstabilität der rekombinanten *Pseudomonas putida* KT2440 Produzenten bei andauernder Rhamnolipid-Produktion.**

Zur Untersuchung der RL-Produktionsstabilität über mehrere Tage wurden mehrere Klone des *atTn7*-integrierten konstitutiv aktiven *ffg*-, des Plasmid-basiert-konstitutiv aktiven *syn16* sowie, aufgrund der Basalexpression ebenfalls konstitutiv aktiven *mtl*-, aber auch des induzierbaren *sal*-Stammes (*sal*= nicht induziert passagiert; *salind*= dauerhaft induziert passagiert) kultiviert. Anschließend wurden initial (A; rechts oben) alle Stämme unter induzierten Bedingungen auf ihre RL-Produktion mit Hilfe des VPBO-Assays überprüft (Hier demonstrativ 3 Klone gezeigt). Die weitere Passagierung der Klone erfolgte auf LB-Agarplatten mit Hilfe eines Replikators über mehrere Tage unter Selektion mit dem entsprechend zum Stamm adäquaten Antibiotikum und im Falle des *salind*-Stammes zusätzlich unter induzierten Bedingungen ( $LB_{Gm25/Sal5}$ -Agarplatten). Täglich wurde unter induzierten Bedingungen geprüft, ob die Stämme ihre Fähigkeit zur Produktion von RL besitzen und dies fotografisch festgehalten (B; Repräsentative Fotografien von Passage (p) = 0, 4 und 8; römische Zahlen indizieren die zusätzlichen Inkubationstage der Platte bei 4 °C vor Fotografie) und ausgezählt. Zum Schluss konnte dies in einem zeitlichen Verlauf festgehalten werden (A; mitte rechts). An p=10 erfolgte die abschließende Kultivierung in Flüssigmedium und die Überprüfung der Produktion im VPBO-Assay (A; rechts unten; Hier demonstrativ 3 Klone gezeigt). VPBO-Assay wurde in methodischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Commons-Lizenz (CC BY 3.0).

Zu diesem Zweck wurde ein Passagierungsexperiment auf LB-Agarplatten durchgeführt, bei dem die Stämme über mehrere Tage hinweg unter produzierenden Bedingungen umplattiert wurden (Abb. III-11 (A)). Der Selektionsdruck durch Antibiotika wurde während des gesamten Experiments aufrechterhalten, um einen bloßen Plasmid- oder Integronverlust zu vermeiden. Lediglich der Salicylat-induzierbare Stamm (*sal*) wurde zusätzlich unter nicht induzierenden LB-Agarplatten passagiert. Der Nachweis der Fähigkeit zur RL-Produktion erfolgte durch Transfer von der jeweiligen LB-Agarplatte auf Blutagarplatten (II.3.3). Die Passagierung der Kolonien auf LB- anstatt Blutagarplatten wurde gewählt, um eine Beeinflussung der RL-Produktion durch Komponenten im Blutagar zu verhindern.

Für die Inokulation der ersten LB-Platte wurden aus Kryostocks LB-Vorkulturen der Stämme *mtl*, *ffg*, *syn16* und *sal* angezogen, mit denen anschließend 16 Wells in einer 96-well Deepwell Platte (Tab. II-7) inokuliert wurden. Mit der Vorkultur des *sal*-Stammes wurden 48 Wells inokuliert; davon wurden 24 Wells mit 2 mM Salicylat supplementiert. Hierdurch wurde eine konstitutive Expression des *rhlAB*-Operons simuliert (Im Folgenden als *salind*-Stamm bezeichnet).

Diese 96 Kulturen wurden ü. N. angezogen, und anschließend mit Hilfe eines Mikroplatten-Replikators mit 96 Pins (Tab. II-7) auf Blutagarplatten (Blutagar<sub>Sal5</sub> im Falle von *sal*/*salind*-Stämmen),

um die Situation zu Beginn der sequentiellen Passage zu bestimmen ( $p=0$ ), sowie auf selektiven, und im Fall vom salind-Stamm in LB<sub>Sal5</sub>-Agarplatten, übertragen.

Zur initialen qualitativen Bestimmung der Produktion von RL wurde der *VPBO*-Assay (II.3.8) mit den Kulturüberständen aus der Deepwell Plate durchgeführt. Hierbei zeigte der *VPBO*-Assay, ( $p=-1$ ; **Abb. III-11 (A)**; rechts oben; exemplarisch an 3 Klonen gezeigt), dass alle Stämme zu Beginn eine *VPBO*-Aktivität besitzen und somit Biotenside produzierten, jedoch schon nach dieser initialen Kultivierung des syn16 eine gewisse Heterogenität in der Produktion von RL zeigte. Nach einer Inkubation ü. N. auf der ersten Blutagarplatte, wurde die  $p=0$  Situation visualisiert (**Abb. III-11 (B)**; oben). Diese zeigte, dass alle Klone jeden Stammes einen sichtbaren Hof auf Blutagarplatten besitzen, mit Ausnahme des Plasmid-basierten Stammes; hier war eine deutliche Produktionsheterogenität zu beobachten. Aus der gleichzeitig inkubierten LB-Agarplatte wurden die insgesamt 96 Klone erneut auf Blutagarplatten ( $p=1$ ; mit 5 mM Salicylat für sal/salind) und wieder auf frische LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum (salind auf Platte mit Induktor) übertragen (**Abb. III-11 (A)**). Dieser Prozess wurde 10 Mal wiederholt und die Bildung der Klärhöfe der Kolonien täglich dokumentiert, wobei einige Blutagarplatten zusätzlich bis zu 6 Tage (Tage I-VI; **Abb. 11 (B)**; weiße Indizes) bei 4 °C inkubiert wurden, um eine verzögerte Hofentwicklung zu erkennen. In **Abb. 11 (B)** wurden die Fotografien der Tage  $p=0, 4$  und 8 exemplarisch dargestellt.

Die tägliche Zählung der Blutagar-positiven Kulturen zeigte (**Abb. III-11 (A)**; mitte rechts), dass die Fähigkeit zur Produktion von RL unter Verwendung eines genomintegrierten Systems zunächst stabil und homogen ist, während der Plasmid-tragende Stamm bereits bei  $p=0$  Heterogenität zeigte (**Abb. III-11 (B)**; oben links), welches sich bereits im *VPBO*-Assay für die  $p=-1$  -Situation andeutete (**Abb. III-11 (A)**; oben rechts). Bei  $p=5$  hatten alle hier betrachteten syn16-Klone ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines Klärhofs auf Blutagarplatten und somit vermutlich der Produktion von RL verloren. Die genomintegrierten, stark konstitutiv aktiven P<sub>ffg</sub>-basierten Klone, die nach dem ersten Transfer ( $p=0$ ) eine sehr starke Hämolyse zeigten, verloren ebenfalls rasch die Fähigkeit zur RL-Produktion (nach  $p=1$ ), sodass bereits nach einer Passagierung keine RL-Produktion beobachtet werden konnte. Bei den mtl Klonen ging der Trend in dieselbe Richtung: bei  $p=4$  (**Abb. III-11 (B)**; mitte) konnten nur noch drei der Klone einen erkennbaren Klärhof ausbilden. Nach der fünften Passagierung konnte schließlich auch hier kein Klärhof detektiert werden (**Abb. III-11 (A)**; mitte rechts). Interessant war, dass die durch Salicylat-Supplementation stetig mit Induktor-gehaltenen salind-Klone bis  $p=4$  keinen vollständigen Produktionsverlust zu verzeichnen hatten. Jedoch konnte bereits hier eine auftretende Heterogenität durch die Größe der Höfe vermutet werden, sodass schließlich bis  $p=10$  nur noch drei salind-Klone einen sichtbaren Hof auf den Platten erzeugen konnten. Auffällig ist, dass während der gesamten Laufzeit des Experimentes die nicht induzierten sal-Klone die Fähigkeit zur Bildung von Klärhöfen auf den Blutagarplatten nicht verloren. Abschließend wurde die *VPBO*-Aktivität der Klone durch erneutes Animpfen einer 96-well Deepwell Platte (**Tab. II-7**) ermittelt (**Abb. III-11 (A)**; unten rechts), wodurch bestätigt wurde, dass einzig die Klone des sal-Stammes, die nicht unter exprimierenden Bedingungen passagiert wurden, keinen Verlust der RL-Produktion zu verzeichnen hatten.

Durch eine anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes (II.2.11; **Tab. II-3**; Primer: Pput-glmS\_fw/ PA-rhIA\_rv-RT) auf Basis der genomischen DNA (II.2.10) eines zufällig ausgewählten Klons jeden Stammes wurde validiert, dass im Fall von mtl und salind keine Mutationen in der attTn7-integrierten Promotorsequenz und der RBS (sowie dem Beginn des Gens rhIA) vorzufinden waren, wohingegen bei ffg ein vollständiger Verlust des Bereiches zwischen Tn7-L und BCD2-rhIAB inklusive der P<sub>ffg</sub>-Sequenz (aber auch der in diesem Konstrukt dort eingefügten Gm-Resistenzkassette (Köbbing et al., 2020)) sequenziert werden konnte, obwohl der Stamm erstaunlicherweise kontinuierlich unter selektiven Bedingungen (LB<sub>Gm25</sub>-Agar) gewachsen ist. So kann bei den nicht mehr produzierenden Klonen für die P<sub>ffg</sub>-basierte Expression der rhIAB-BSG geschlossen werden, dass die genetische Instabilität des Promotors zusammen mit dem hohen Selektionsdruck ausgehend von der Produktion von RL zu einem Verlust der Promotorsequenz, ggf. durch Rekombinationsereignisse, führt, wodurch ein potenzieller großskaliger Produktionsprozess erheblich beeinträchtigt sein könnte (Peng und Liang, 2020).

Zusammenfassend scheint die konstitutive Expression der rhIAB-Gene im generellen einen starken Selektionsdruck auszuüben, obwohl dies aus den Wachstumskurven (**Abb. III-8**) nicht direkt ersichtlich war. Dieser Selektionsdruck, der offenbar durch RL ausgeübt wird, ist bis zu einem gewissen Grad erstaunlich, da *P. putida* KT2440 dafür bekannt ist, hohen Konzentrationen im Medium zu widerstehen (Wittgens et al., 2011) sowie Stoffwechselflüsse wieder ins Gleichgewicht zu bringen, um die Produktion essenzieller Metabolite aufrechtzuerhalten (Ebert et al., 2011; Tiso et al., 2016). Darüber hinaus gilt dieser Plattformstamm eigentlich als sehr robust hinsichtlich der Produktion bioaktiver Verbindungen, u. a. aufgrund einer Fülle von Exportpumpen (Martínez-García und de Lorenzo, 2017). Beispielsweise erschienen konstitutiv produzierende Stämme für die bioaktive Verbindung Prodigiosin sehr stabil und erreichten nach mehreren Passagen immer noch die gleichen Titer (Domröse et al., 2019). Jedoch könnten RL als amphiphile Moleküle doch einen zu hohen Stress auf die zellulären Membranen ausüben (Herzog et al., 2020), sodass eine Mutation, wie im Falle der P<sub>ffg</sub>-basierten Expression beobachtet, einen evolutiven Vorteil darstellt und sich durchsetzt. Es kann aber auch spekuliert werden, dass der beobachtete Selektionsdruck auch mit der Biosynthese zusammenhängen könnte, bspw. während der P<sub>mtlE</sub>-basierten Expression, und sich durch einen massiven Abfluss von Lipidvorläufern oder der aktivierten L-Rhamnose während der frühen Wachstumsphasen ausprägt (Tiso et al., 2020).

Zusammenfassend zeigt dieser voranschreitende Verlust der RL-Produktion sowohl in Plasmid-basierten als auch genomintegrierten konstitutiven Expressionssystemen, dass durch die Anwendung von Genomintegration in Kombination mit induzierbarer Expression (hier demonstrativ P<sub>nagAa</sub>-basiert) und damit produktionsfreie Vorkulturführung die Stabilität der Produktion massiv erhöht wird. Die hier gewonnene Erkenntnis sollte Bedenken bei dem Einsatz von konstitutiv aktiven Promotoren zur heterologen Produktion von RL in *P. putida* KT2440 geben, da durch ungünstige Vorkulturführung oder den Einsatz bereits älterer Produktionsstämme eine reproduzierbare und verlässliche Produktion nicht gewährleistet werden könnte.

### Zusammenfassung | Stabilität – konstitutiv aktive versus induzierbare Promotoren

- (1) Ein Selektionsdruck ausgehend von Rhamnolipiden führt bei *rhIAB*-Expression unter Kontrolle konstitutiv aktiver Promotoren (hier:  $P_{ffg}$ ;  $P_{mtIE}$  aufgrund Basalexpression) trotz Integration der *rhIAB*-Gene in das Genom, zu einem rapiden Verlust der Fähigkeit zur Bildung von Rhamnolipiden (2 Passagierschritte auf LB-Agar).
- (2) Durch den Einsatz eines induzierbaren Promotors ( $P_{nagAa}$ ), kann die Produktion von Rhamnolipiden über einen langen experimentellen Zeitraum (12 Passagierschritte auf LB-Agar) aufrechterhalten werden.

### III.2.3 Evaluierung der Induktions- und Biotensidprofile induzierbarer Rhamnolipid-Produzenten

Die rekombinanten *P. putida* KT2440 RL-Produzentenstämme mit induzierbaren Promotoren basierend auf den Induktoren L-Rhamnose, Salicylat, D-Mannitol und Anhydrotetracyclin zeigten sich als vielversprechend (Transkriptionsstärke, Biotensid-Produktivität; III.2.1; **Abb. A-5**) für die Produktion und weitere Optimierung der RL-Produktion. Im Gegensatz zu den Plasmid-basierten (*syn16*;  $\sum$  mRL 0,69 g/L) und/oder stark konstitutiv aktiven (*ffg*;  $\sum$  mRL 1,31 g/L) Expressionssystemen, die bereits in der Literatur verwendet wurden (Tiso et al., 2016, 2020) erreichten insbesondere die Produktionsstämme *sal* und *mtl* ( $\sum$  mRL 0,97 und 1,44 g/L) vergleichbare oder höhere Titer (vgl. **Tab. A-6**). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit in Hinblick auf die genetische und metabolische Stabilität der Stämme einen entscheidenden Faktor für die Produktion von RL über einen längeren Zeitraum darstellen kann (III.2.2).

In allen bislang durchgeführten Experimenten wurden die in der Literatur-empfohlenen Induktorkonzentrationen gewählt (vgl. II.2.3), die jedoch teilweise in *E. coli*-Expressionsstämmen bzw. auf Basis von heterologer Expression auf Plasmiden ermittelt wurden (I.3.1; Calero et al., 2016). Um die Induktionsprofile der in dieser Arbeit konstruierten induzierbaren *P. putida* KT2440 Stämme in Hinblick auf die Expression der *rhIAB*-Gene sowie den resultierenden RL-Titer besser zu charakterisieren, wurden diese in LB-Medium mit 10 g/L Glucose und insgesamt 24 h im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1; II.3.1) bzgl. ihrer Biomassebildung und eYFP-Fluoreszenz (nicht normiert, um eine Echtzeit-Beurteilung des Verhältnisses der resultierenden Fluoreszenz und des Biotensid-Titers zu illustrieren) betrachtet. Zur Induktion wurden nach 3,5 h die verschiedenen Induktoren L-Arabinose, L-Rhamnose, Salicylat, D-Mannitol und Anhydrotetracyclin in unterschiedlichen Konzentrationen supplementiert. Nach der Kultivierung wurden die Überstände zu HPLC-Messung aufgearbeitet und die HAA und mRL-Titer analysiert (II.3.7). Um die beobachtete Basalexpression des D-Mannitol-induzierbaren Expressionssystems, die durch D-Mannit oder Analoga, die vermutlich in geringen Mengen im LB-Medium enthalten sind, zu minimieren, wurde dieser Stamm zusätzlich dieser in M9 Mineral-Medium mit 30 g/L Glucose (**Tab. II-5**; in Anlehnung

an Beuker et al., 2016b) kultiviert, um die Induzierbarkeit des Systems bewerten zu können (Abb. III-12).

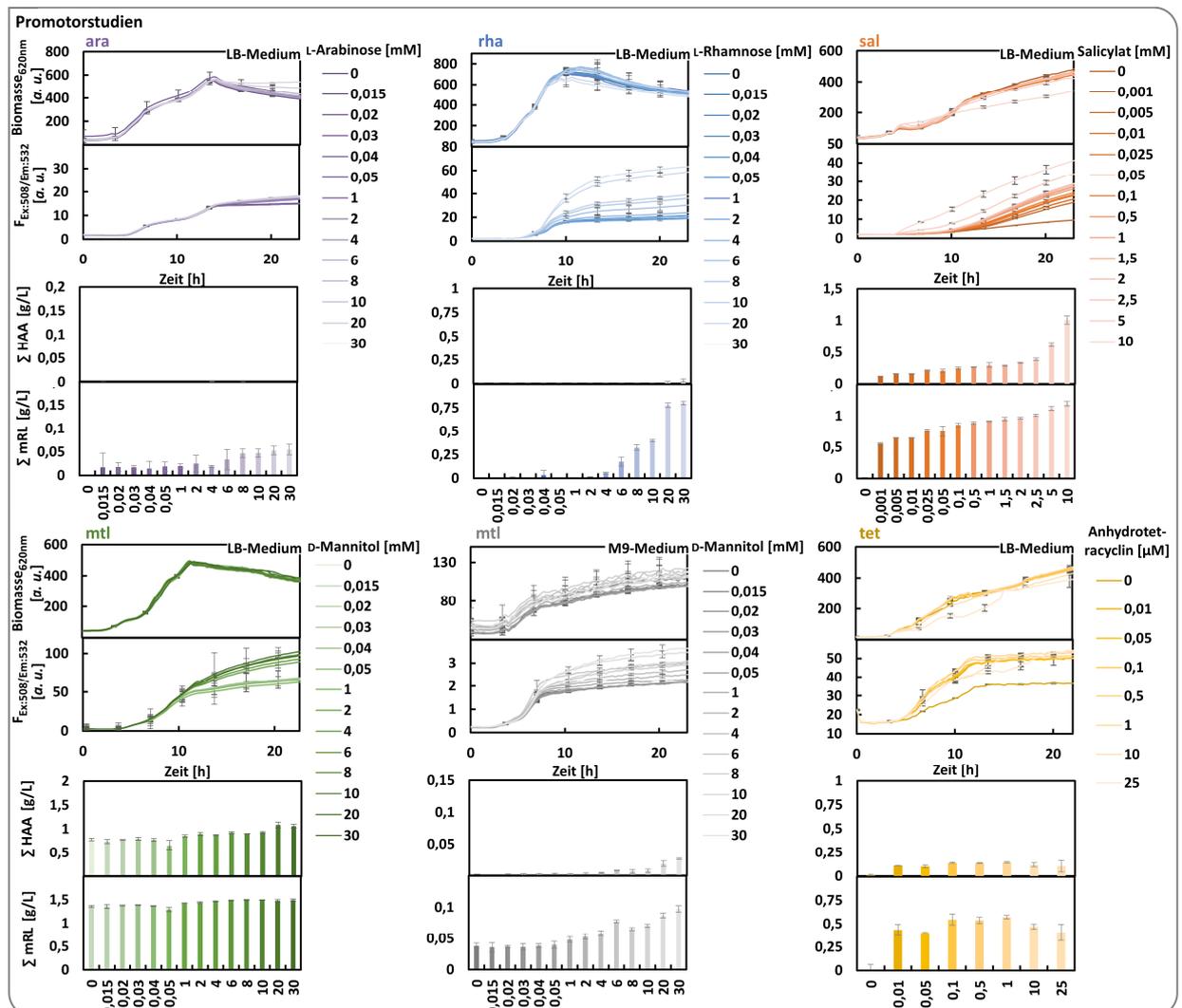


Abb. III-12: Wachstums-, Expressions- und Produktionsprofile der induzierbaren *Pseudomonas putida* KT2440 Rhamnolipid-Produzenten bei Variation der spezifischen Induktorkonzentration.

Die induzierbaren *P. putida* KT2440 Produktionsstämme *ara*, *rha*, *sal*, *mtl* und *tet* wurden nach Induktion (3,5 h) mit unterschiedlichen Konzentrationen der promotor-spezifischen Induktoren für weitere 20 h in LB-Medium + 10 g/L Glucose kultiviert und währenddessen das Wachstum (Biomassezunahme) und die eYFP-Fluoreszenz (F) aufgenommen (II.2.1.1; III.3.1). Im Anschluss wurden die HAA- und mRL-Titer mittels HPLC-CAD (II.3.7) bestimmt. Zur Bestimmung der Induzierbarkeit des D-Mannitol-induzierbaren Stammes, wurde dieser zusätzlich in M9-Medium + 30 g/L Glucose kultiviert (*mtl*). Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. Zur besseren Veranschaulichung der BioLector-Daten wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet

Für die hier untersuchten Stämme ergaben sich somit individuelle Wachstums-, Expression- und Biotensid-Produktionsprofile, die sich aufgrund der unterschiedlichen Promotorsysteme in Abhängigkeit zur Induktorkonzentration unterschieden.

So ließ sich hier, aber auch bereits Zelldichte-normiert für eine einzelne Konzentration (vgl. Abb. III-8) erkennen, dass der L-Arabinose-induzierbare Produktionsstamm (Abb. III-12; *ara*) erst nach ca. 12 bzw. 13 h nach Inokulation der Kultur und kurz vor dem Erreichen der stationären Wuchsphase mit der Bildung von eYFP beginnt, welches als Transkriptionsreportersystem hier ein Maß für Transkriptionsstärke ist (Abb. A-6; III.1.1.1; III.2.1). Aufgrund der verzögerten und geringen Fluoreszenzentwicklung ist es weniger überraschend, dass die erreichten mRL-Titer im Bereich von 0,05 bis 0,1 g/L liegen. Wie bereits im vorherigem Kapitel erwähnt (III.2.1), wird diese verspätete

Induktion vermutlich mit der geringen Produktion des Transporters AraE bzw. der geringen Menge des von Genom aus exprimierten *araE*-Gens, welcher unter Kontrolle des  $P_{tac}$ -Promotors exprimiert wird (vgl. **Abb. A-7 (B)**), zusammenhängen. Auch eine Erhöhung der Induktorkonzentration auf 30 mM L-Arabinose lieferte hierbei keine Erhöhung des Produkt-Titers. Eine weitere Erhöhung, scheint im Vergleich der Wirtschaftlichkeit des gesamten Prozesses (III.2) und unter Anbetracht der üblichen Arbeitskonzentrationen von 0,01 und 10 mM (Calero et al., 2016), nicht zielfördernd zu sein. Für den zukünftigen Einsatz dieses Promotorsystems bei der Integration ins Genom in *P. putida* KT2440 sollte somit überlegt werden, ob eine stärkere Produktion des AraE-Transporters bzw. eine Mutagenese der -10 bzw. -35 Region des  $P_{BAD}$ -Promotors (Khlebnikov et al., 2001; Afroz et al., 2015), um die Stärke der Bindung der RNA-Polymerase zu erhöhen ohne Einbußen z. B. durch Erhöhung der Basalexpression, sinnvoll wäre. Plasmid-basiert, z. B. auf dem pAra-final, wird dieses System aber vermutlich für die Expression von Genen und Translokation von L-Arabinose über die Membran ausreichend sein, wie es bereits für *E. coli* für das Sekundärmetabolit Violacein gezeigt wurde (Binder et al., 2016).

Für das L-Rhamnose-induzierbare Expressionssystem konnte mit steigenden Induktorkonzentrationen eine graduelle Erhöhung der eYFP-Fluoreszenz erreicht werden (**Abb. III-12; rha**), die jedoch im Vergleich zu anderen Systemen relativ spät induziert wird, was auch hier ein gewisse verspätete Aktivierung der Expression hindeutet. Dies kann vermutlich auch auf den Transporter RhaT zurückzuführen sein, der ebenfalls vermutlich nicht ausreichend produziert wird. Jedoch konnte mit diesem System durch Induktorkonzentration-Erhöhung auf 20 mM L-Rhamnose ein mRL-Titer von 0,83 g/L erreicht werden und eine im Verhältnis dazu sehr geringe HAA-Akkumulation.

Für das Salicylat-induzierbare System (**Abb. III-12; sal**) lässt sich ebenfalls eine graduelle Erhöhung der eYFP-Fluoreszenz und somit der Transkriptionsstärke in Abhängigkeit zur Salicylatkonzentrationen feststellen. Jedoch ist bei einer Konzentration von 10 mM Salicylat eine Wachstumseinbuße zu erkennen, die hier jedoch die Expression und Produktion nicht einschränkt, wodurch mit 10 mM Salicylat ein mRL-Titer von ca. 1,2 g/L erreicht wurde. Was jedoch hier analog zur Kultivierung in III.2.1 zu beobachten ist, ist die starke Akkumulation von HAA in Abhängigkeit der Salicylatkonzentrationen. Während das Verhältnis von HAA/mRL unter Berücksichtigung der molaren Masse bei einer Konzentration von 0,001 mM Salicylat ca. 15% beträgt, beträgt diese bei einer Konzentration von 10 mM Salicylat schon ca. 37%. Dies bestätigt wiederum die in III.2.1 postulierte zunehmende *rhlB*-mRNA-Prozessierung, die vermutlich bei einer Erhöhung der Transkriptionsstärke bzw. durch natürliche mRNA-Degradationsprozesse ausgelöst werden könnte. Die Hauptursache der HAA-Akkumulation wird jedoch vermutlich bei der bereits postulierten Limitierung an RL-Vorstufen liegen (vgl. III.2.1).

Das D-Mannitol-induzierbare Expressionssystem (**Abb. III-12; mtl**) konnte neben der höchsten ermittelten eYFP-Fluoreszenz (s. a. III.2.1; **Abb. III-9**) ebenfalls einen hohen mRL-Titer (1,49 g/L) erzielen. Jedoch akkumuliert HAA hier sehr stark, da der Expressionsverlauf durch die hohe Basalexpression einem konstitutiv aktiven Mechanismus stark ähnelt (vgl. III.2.1). Um die

Basalexpression zu verringern und die Induzierbarkeit des *mtlE*-Promotorsystems bewerten zu können, wurde ebenfalls eine Kultivierung in M9-Medium durchgeführt (**Abb. III-12**; *mtl*). Dadurch, dass M9-Medium ein Minimalmedium ist und lediglich notwendige Spurenelemente, Salze und Ionen beinhaltet, ist das Wachstum auf Basis des Zuckers stark eingeschränkt (ca. Faktor 5). Jedoch konnte dadurch auf der Ebene der eYFP-Fluoreszenz sowie bei den Produkt-Titern eine graduelle Induktion gezeigt werden. Auch hier tragen die Effekte, die bereits beim Salicylat-induzierbaren Stamm (**Abb. III-12**; *sal*), sowie in Kapitel III.2.1 beobachtet wurden, zu einer Akkumulation von HAA bei. Hier betrug das Verhältnis von HAA/mRL unter Berücksichtigung der durchschnittlichen molaren Masse beim Einsatz von 30 mM D-Mannitol, und somit der höchsten Induktorkonzentration in M9-Medium 19% und in LB-Medium 50%. Aufgrund des geringen Wachstums und Biotensid-Titers lässt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, ob eine Kultivierung in Minimalmedium bzw. die erhöhte Glucose Supplementation (30 g/L statt 10 g/L), die Umsetzung von HAA zu mRL fördert, sodass die verwendete Glucose eher zur Produktion von RL anstatt für die Bildung von Biomasse verwendet wird (vgl. **Abb. I-6**).

Beim Anhydrotetracyclin-induzierbaren System (**Abb. III-12**; *tet*) konnte hingegen innerhalb des betrachteten Induktorkonzentrations-Bereiches keine graduelle Induktion zwischen der niedrigsten (0,01  $\mu\text{M}$ ) und der höchsten (25  $\mu\text{M}$ ) Induktorkonzentration in YFP-Fluoreszenz sowie den RL-Titern erkennen beobachtet werden. Die Basalexpression ist sehr gering; Als einziges hier getestetes induzierbares System, welches über eine negative Regulation kontrolliert wird (vgl. I.3.1; Becker et al., 2010), scheint die hier getestete niedrigste Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  ausreichend gewesen zu sein, um den Repressor aktiv vom Operator zu lösen. Jedoch reicht die Expressionsstärke lediglich für einen mRL-Titer von ca. 0,5 g/L aus und HAA-Akkumulation in einem Verhältnis von 17% ist ebenfalls zu beobachten.

Zusammenfassend zeigt die hier durchgeführte komparative Evaluierung bekannter *attTn7*-integrierter Promotorsysteme in *P. putida* KT2440, dass die Regulons durch die Genomintegration andere, aber auch vergleichbare, Induktionseigenschaften im Vergleich zu den Plasmid-basierten Pendanten besitzen (Terpe, 2006; Calero et al., 2016; Chen et al., 2018; **Tab. III-3**). Für die Anwendbarkeit der hier konstruierten Tn7-basierten *yTRES-toolbox* in *P. putida* KT2440, sind die hier gezeigten Studien am Beispiel der induzierbaren Expression der *rhlAB*-Gene aus *P. aeruginosa* eine gute Orientierung und lässt sich durch die gemessene eYFP-Fluoreszenz ggf. auf alternative Sekundärmetaboliten übertragen. Zur genaueren Charakterisierung wurde somit neben der Basalexpression auch die dynamische Spanne bestimmt (**Tab. III-3**). Die dynamische Spanne gibt an, um welchen Faktor sich die Expression nach Zugabe eines Induktors erhöht. Umso höher die dynamische Spanne ist, desto stärker lässt sich die Expression durch den Induktor steigern. Um die dynamischen Spannen zu ermitteln, wurde die Biomasse-normierten Fluoreszenzwerte betrachtet und der prozentuale Unterschied zwischen dem nicht induzierten und der höchsten eYFP-Fluoreszenz angegeben.

**Tab. III-3: Übersicht über relevante Expressionseigenschaften und resultierenden maximalen Titern der untersuchten induzierbaren Stämme.**

Positiv-regulierte Promotorsysteme sind mit (+), negativ-regulierte mit einem (-) gekennzeichnet.

Akronym	Regulation	Induktor →	Preis/kg <sup>a</sup>	Medium	Basal-expression <sup>b</sup>	Dynamische Spanne <sup>c</sup>	graduelle Induktion	max. mRL-Titer [g/L]
ara	+	L-Arabinose →	200 €	LB	gering (75)	gering (20)	Ja	0,05
rha	+	L-Rhamnose →	190 €	LB	gering (59)	hoch (224)	Ja	0,8
sal	+	Salicylat →	80 €	LB	gering (29)	hoch (329)	Ja	1,2
mtl	+	D-Mannitol →	70 €	LB/M9	hoch (507)/ mittel (114)	mittel (59/70)	Ja	1,1/0,1
tet	-	Anhydrotetracyclin →	226 Mio. €	LB	gering (23)	-	Nein	0,4

<sup>a</sup> Preise der Induktoren berechnet von der Carl Roth Website im Mai 2020 für 1 kg und > 99% Reinheit (in Anlehnung an Binder, 2016).

<sup>b</sup> prozentualer Anstieg der eYFP-Fluoreszenz der Kontrolle *P. putida* KT<sub>K</sub><sup>E</sup> zum nicht induzierten induzierbaren Produktionsstamm KT.mRL<sup>E</sup>.

<sup>c</sup> prozentualer Unterschied zwischen der nicht induzierten zur höchsten eYFP-Fluoreszenz.

Bezogen auf die Basalexpression sind die untersuchten Stämme, mit Ausnahme des mtl-Expressionsstammes, sehr dichte Systeme, sodass ohne Induktion keine Biotensid-Produktion ausgelöst wird. Hoffmann und Altenbucher, 2015 berichteten bereits, dass das mtlE-Promotorsystem aus *P. fluorescens* DSM 50106 auf den Vektor pJOE7771.1 in *P. putida* KT2440 zu einer 3,4-fach höheren Basalexpression, als bspw. das L-Arabinose- und L-Rhamnose-Promotorsystem auf vergleichbaren Vektoren in *P. putida* KT2440 auslösen. Hierbei wurde dort zur Optimierung, die -35 Region des mtlE-Promotors mutiert, wodurch eine um den Faktor 10 niedrigere Basalexpression erreicht wurde, jedoch mit gleichzeitigem Verlust der Expressionsleistung. Jedoch könnte das hier gezeigte D-Mannitol-induzierbare Promotorsystem aus *P. protegens* Pf-5 aufgrund seines kostengünstigen Induktors und seiner hohen Transkriptionsleistung interessant sein, eine Produktion gezielt zu einem bestimmten Zeitpunkt der Kultivierung zu verstärken. Zudem wäre es interessant auch andere Induktoren auszuprobieren, wie z. B. D-Arabitol oder D-Sorbitol, welche als alternative Induktoren für das D-Mannitol-abhängige Promotorsystem beschrieben wurden (Hoffmann und Altenbucher, 2015).

Weniger zielführend im Zusammenhang mit der Produktion von biotechnologisch relevanten Metaboliten scheint das Anhydrotetracyclin-Promotorsystem (Adams et al., 2005) zu sein. Neben der Tatsache, dass Anhydrotetracyclin bei hohen Konzentrationen toxisch für die Zellen ist (hier ab ca. 10 µM; Halling-Sørensen et al., 2002), ist die geringe Transkriptions- und Produktionsleistung sowie der Preis (vgl. **Tab. III-3**), der trotz der geringen Arbeitskonzentrationen von 0,01 µM hoch ist, ausschlaggebend, dass dieses System sich für eine Skalierung einer Produktion nicht eignet. Die Verwendung des P<sub>tetA</sub>/TetR-Regulons zur Aufklärung bspw. zellulärer Prozesse könnte jedoch, aufgrund seiner Sensitivität und der schnellen Induktion der Expression, die hier zwar nicht untersucht, jedoch für Antibiotika-basierte Induktoren bekannt ist (Ehrt, 2005), hilfreich sein.

Die Zucker-induzierbaren Expressionsstämme, die im Falle des rha-Expressionssystems ebenfalls hohe Titer erreichen konnten, eignen sich auch hier aus ökonomischen Gründen aufgrund der hohen benötigten Induktorkonzentrationen im Bezug zur Skalierung des Prozesses nicht. Hierbei sind jedoch gerade Pentosen, wie L-Arabinose, die vorherrschenden Zucker in Hemicellulosen und machen bis zu 25% der Zuckermenge in bspw. Lignocellulosen aus, insbesondere in Harthölzern und Gräsern wie Weizen, Mais und Reis, und stellen damit eine weltweit verfügbare nachhaltige und kostengünstige Ressource dar, wodurch die Zufütterung dieser Substrate in einem großskaligen Prozess einen entscheidenden ökonomischen Vorteil liefern könnte (Kumar et al., 2009; Brodeur

et al., 2011). Somit könnten zukünftige Optimierungen, z. B. am Transport der Zucker in die Zellen, die benötigte Induktormenge senken und diese Systeme interessant machen. Das diese Strategie erfolgsversprechend ist, zeigte (Chen et al., 2018) an einer Reihe Liganden-induzierbarer *E. coli* Expressionssysteme.

Ein Expressionsstamm kristallisierte sich hier jedoch in besonderem Maße heraus, der für die heterologe Produktion von RL von bedeutendem Interesse sein könnte. Das  $P_{nagAa}/NagR$  Promotorsystem, welches den Induktor Salicylat, eine wichtige natürlich vorkommende Verbindung, die verschiedene physiologische Funktionen und kommerzielle Anwendungen (Ren et al., 2015). besitzt, benutzt und der im Salicylat-induzierbare mRL-Produktionsstamm enthalten ist, scheint für die Skalierung der Produktion (Preis/kg; mRL-Titer) sowie für die Entkopplung der Biomassebildung und Produktion von RL (geringe Basalexpression (s. a. **Abb. A-5**; hohe dynamische Spanne) vom besonderen Interesse sein (**Tab. III-3**).

Zusammenfassend bietet jedes dieser induzierbaren Expressionssysteme unterschiedlichen Eigenschaften die unterschiedlichen Anforderungen in der Biotechnologie oder der Wissenschaft gerecht werden. Je nachdem welchen Nutzen eine Expression haben soll, kann somit eine große Biomasseentwicklung, eine geringe Basalexpression, eine starke Transkription oder eine hohe Produktivität ausschlaggebend für die Wahl des geeigneten Expressionssystems sein.

Im Hinblick auf die biotechnologische Skalierung der RL-Produktion ist maßgeblich der Produktionstiter ausschlaggebend. Mit einem maximalen mRL-Titer von 1,2 bzw. 1,1 g/L für die Produktionsstämme sal und mtl, stellen diese vielversprechenden Kandidaten für die weitere Optimierung, mit dem Ziel einen optimalen RL-Produktionsstamm zu erhalten, dar. Aufgrund seiner vielversprechenden Expressions- und Produktionseigenschaften (II.2.1-3) wurde *P. putida*  $KT_{sal}mRL^E$  und somit die Salicylat-induzierte *rhlAB* Expression in der *attTn7*-Stelle im Genom von *P. putida* als Ziel für weitere Optimierung der RL-Produktion ausgewählt.

#### **Zusammenfassung | Induktions- und Biotensid-Produktionsprofile**

- (1) Alle hier betrachteten induzierbaren Expressionssysteme besitzen unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf die Induktion der Expression (graduelle Induktion, dynamische Spanne, Basalexpression) und die Produktion von Biotensiden.
- (2) Besonders der Salicylat-, aber auch der D-Mannitol-induzierbare Expressionsstamm, besitzen vielversprechende Expressions- ( $P_{nagAa}$ : geringe Basalexpression; graduelle Induktion;  $P_{mtlE}$ : hohe Expressionslevel) und Produktionseigenschaften (hohe Titer; max.  $\Sigma$  mRL-Titer: 1,2 bzw. 1,1 g/L) basierend auf ihrem Promotor-basierten Regulon.
- (3) Eine starke Akkumulation von HAA in Abhängigkeit der Expressionsstärke konnte beobachtet werden (max. HAA/mRL: 50% für  $P_{mtlE}$ ; 37% für  $P_{nagAa}$ ).

### III.3 Optimierung der Salicylat-induzierten Rhamnolipid-Produktion in *Pseudomonas putida*

Aufgrund seiner hohen Produktionsstabilität sowie seiner vielversprechenden Expressionseigenschaften und Biotensid-Titer (II.2), wurde das Salicylat-induzierbare Promotorsystem zur Expression der RL-BSG ausgewählt, um weitere Optimierungen hinsichtlich des RL-Titers und der -Qualität (vollständige Umsetzung von HAA zu mRL) durchzuführen. Mit einem bislang maximalen mRL-Titer von 1,2 g/L ist er hierbei konkurrenzfähig zu den bislang beschriebenen *P. putida* KT2440 Expressionssystemen (**Tab. I-3**). Jedoch konnte gezeigt werden (II.2.1), dass bei einer starken Transkription die mRL-Vorstufe HAA akkumuliert. Hierbei wurde postuliert, dass dies, neben möglichen natürlichen mRNA-Degradationsprozessen, auf eine Limitierung der Vorstufen, die zur Bildung von RL benötigt werden, hindeuten kann.

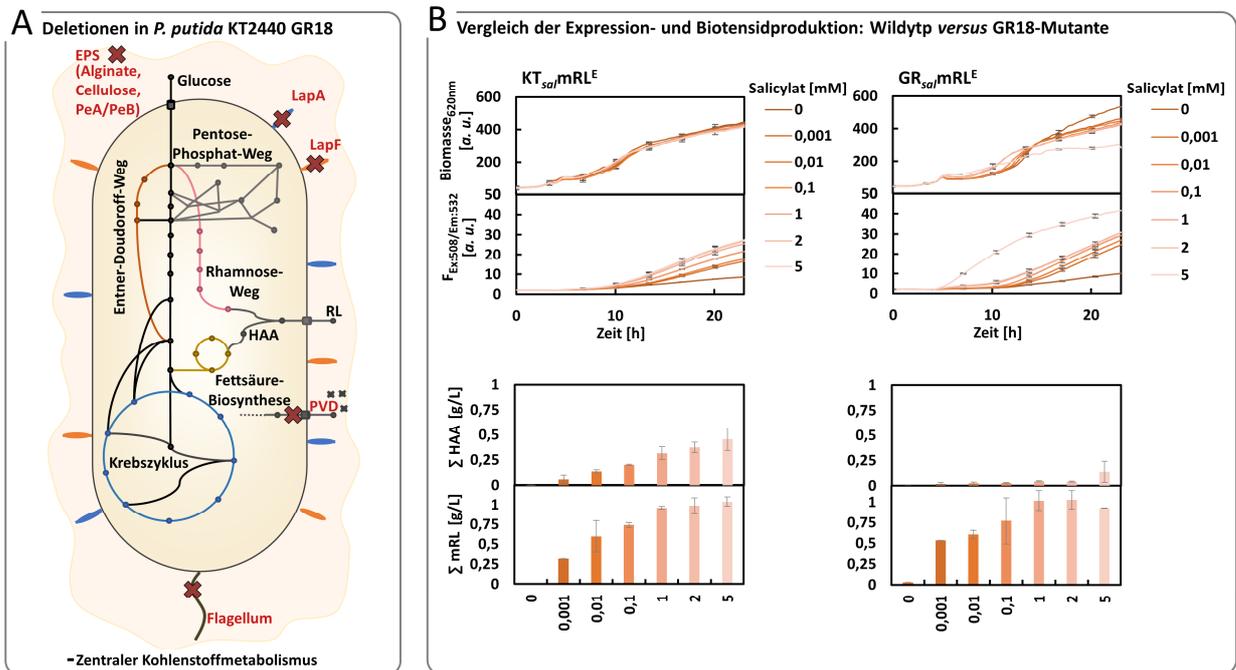
Eine Strategie, um die Vorstufenbereitstellung zu optimieren ist im Rahmen des *metabolic engineering* die gezielte Deletion von Biosynthesewegen, die um die Vorstufen der RL in Konkurrenz stehen, sowie die generelle Erhöhung der *fitness* durch Deletion energieintensiver Biosynthesewege (I.3.2; Liang et al., 2020). Die Auswirkungen einer solchen potenziellen Flussänderung zur Optimierung der RL-Biosynthese auf die Salicylat-induzierbare RL-Produktion wurde innerhalb einer Kooperationsstudie im genomreduzierten *P. putida* KT2440 GR18 getestet, der durch Isabel Bator, RWTH-Aachen, bereitgestellt wurde. In GR18 sind die Biosynthesewege für PVD, Flagellen, Alginate, Cellulose, der EPS A und B sowie der Oberflächenproteine LapA und LapF (vgl. I.3.2) deletiert (Bator, 2020; **Tab. A-7**), um mehr Ressourcen und Vorläufermetaboliten, insbesondere die Vorstufe dTDP-L-Rhamnose durch Mutation der EPS-Biosynthese (u. a. für Alginate; Rahim et al., 2000; Poon et al., 2008; vgl. I.3.2), für die RL-Synthese bereitzustellen.

#### III.3.1 Steuerung des metabolischen Flusses zur Optimierung der Produktion und des Wachstums

Um die Menge verfügbarer Edukte, insbesondere durch Deletion der Alginatebiosynthese, sowie die generelle *fitness* der *attTn7*-integrierten, Salicylat-induzierbaren Expression der *P. putida* KT2440 Plattform zu steigern und somit die beobachtete Akkumulation von HAA zu verhindern bzw. die mRL-Produktion zu fördern (III.2.1; III.2.3) sollte eine genomreduzierte *P. putida* KT2440 Mutante zur Produktion von RL verwendet werden.

Hierzu wurde der RL-Produzent *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> (**Tab. II-2**) mit Hilfe des *yTREX-toolbox* Vektors pYTSK40\_1G7 (**Tab. II-1**) konstruiert (vgl. III.1.1). Nach erfolgter Verifizierung der Integration über Kolonie-PCR (vgl. III.1.1), erfolgte die Kultivierung der Stämme *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> sowie GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> in LB-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1) mit unterschiedlichen Salicylatkonzentrationen, die nach 3,5 h mit verschiedenen Salicylatkonzentrationen supplementiert, und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz für

24 h verfolgt wurden (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7; vgl. **Abb. III-13**).



**Abb. III-13: Vergleich zwischen dem wildtypischen und dem optimierten Stammhintergrund in Bezug zur Salicylat-induzierbaren Produktion von Rhamnolipiden.**

**A:** *P. putida* KT2440 GR18 (Bator, 2020) enthält sowohl Deletionen von ganzen Biosynthesewegen zur Bildung von Alginat, Cellulose und PeA und PeB (wichtiger Bestandteile der EPS), sowie der Produktion von Pyoverdinen (PVD) und der großen Oberflächenproteine LapA und LapF als auch der BSG zur Ausbildung der Flagelle. Die verwendete Abbildung ist unter der Creative-Commons-Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) geschützt (Tiso et al., 2017b).

**B:** *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> sowie GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> wurden zur Betrachtung der Auswirkung der Deletion von energieintensiven und konkurrierenden Biosynthesewegen in LB-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem mit unterschiedlichen Salicylatkonzentrationen, die nach 3,5 h supplementiert wurden, kultiviert (II.2.1.1) und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz (F) für 24 h verfolgt (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7). Zur besseren Veranschaulichung wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus biologischen Replikaten.

*P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> zeigte im Vergleich zum *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> (**Abb. III-13 (B)**), eine geringere Akkumulation von HAA bei steigender Expressionsstärke und höheren Induktorkonzentrationen (**Abb. III-13 (B)**). Somit reduziert sich das molare Verhältnis von HAA/mRL, bei einer Induktorkonzentration von bspw. 2 mM Salicylat, von 26% für den *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> auf ein Verhältnis von 2% (GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup>) bei gleichbleibenden Expressionsstärken, was anhand der eYFP-Fluoreszenz erkennbar ist. Da bestimmte Biosynthesewege im Stamm GR18, bspw. von Alginat (vgl. I.3.2; Bator, 2020), deletiert sind, die um das Edukt dTDP-L-Rhamnose zur Bildung von mRL aus HAA konkurrierend stehen, belegt diese verringerte HAA-Akkumulation, dass dTDP-L-Rhamnose limitierend für die mRL-Produktion ist und durch eine verbesserte Verfügbarkeit die HAA-Akkumulation verhindert werden kann. Überraschenderweise konnte jedoch keine Steigerung des mRL-Titers beobachtet werden, entgegen anderer Studien, in denen durch die Optimierung des metabolischen Flusses und die Eliminierung energieintensiver Biosynthesewege (vgl. **Abb. III-13 (A)**) ein höherer RL-Titer erreicht werden konnte (Tiso et al., 2020; Wittgens, 2013). In diesem Zusammenhang zeigte bspw. Wittgens, 2013 eine um 118% gestiegene RL-Produktion bei Verwendung eines Stammes mit Alginat-Defizienz. Dies konnte in dieser Arbeit im multiplen Deletionsstamm nicht beobachtet werden. Im Gegenteil: Es erschien sogar, dass die Biotensid-

Produktivität sinkt, da bspw. bei einer Induktorkonzentration von 2 mM Salicylat in *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> (vgl. **Abb. III-13 (B)**) ein HAA-Titer von 0,37 g/L und ein mRL-Titer von 0,98 g/L, während bei GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> ein HAA-Titer von nur 0,04 g/L und ein ähnlich hoher mRL-Titer von 1,02 detektiert wurde (Verringerung des Biotensid-Titers um 16%). Folglich scheinen die multiplen Deletionen im GR18-Stamm (vgl. **Tab. A-7**) zwar die Vorstufenbereitstellung zu verbessern, jedoch nicht die Produktion, obwohl bekannt ist, dass der robuste Stoffwechsel *P. putida*'s den Energieabfluss in bemerkenswerter Weise ausgleichen kann (Ebert et al., 2011).

So könnte es sein, dass die Bereitstellung von aktivierten Fettsäuren durch unvorteilhafte Deletionen gehindert ist und zu der beobachteten Verringerung des Biotensid-Titers führt. Neben der Aufschlüsselung der Auswirkungen einzelner Deletionen, könnten auch weitere eingeführt werden, um zusätzlich die Verfügbarkeit von aktivierten Fettsäuren zur Bildung von HAA zu fördern. Hierbei wurde gezeigt, dass der *knockout* der BSG zur Ausbildung der PHA, die in direkter Konkurrenz um die aktivierten (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren stehen (vgl. I.3.2; Rehm et al., 2001), zu einer um 78-115% gestiegenen RL-Synthese führte (Wittgens et al., 2011; Tiso et al., 2020), was wiederum auf eine ebenfalls limitierende Menge an (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren hinweisen könnte (Wittgens, 2013). Somit könnte auch die Deletion des PHA-Operons interessant für die Erhöhung des Salicylat-vermittelten RL-Titers sein. Jedoch konnte in *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass die Produktion von RL durch Inaktivierung der PHA-Synthese nicht gesteigert wird (Choi et al., 2011), was wiederum auf die komplexe Regulation der *rhlAB*-Expression (vgl. I.2; Reis et al., 2011) und einen linearen Fluss der (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren nur in Richtung PHA-Synthese (und nicht zu RL) zurückzuführen sein könnte (Choi et al., 2011). Die Expression des *rhl*-Operons ist jedoch im heterologen Wirt *P. putida* KT2440 entkoppelt von der nativen Regulationsmaschinerie, sodass hier der Überschuss an (*R*)-3-Hydroxyfettsäuren für die RL-Synthese verwendet werden könnte (Wittgens, 2013).

Weiterhin konnte in der multiplen Mutante *P. putida* KT2440 GR18 auch keine Verbesserung der generellen *fitness* in Bezug auf Wachstumsrate und Biomasse-Ausbeute während der Produktion von RL beobachtet werden. Demnach könnten einzelne Mutationen (wie bspw. für PeB und LapF in *P. putida* KT<sub>ffg</sub>mRL gezeigt; s. Bator, 2020) ggf. in Kombination miteinander nicht vorteilhaft sein. Auch die in Bator, 2020 beschriebene zunehmende Schwierigkeit den GR18-Stamm zu modifizieren, bestätigt die hier beobachteten Phänomene bezüglich der Robustheit des Stammes. Die Aufschlüsselung dieser Kombinationen könnte grundlegende Kenntnisse über die metabolische Last ausgehend von solchen multiplen Deletionen liefern. Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass *metabolic engineering* zur Optimierung der metabolischen Flüsse sowie zur Erhöhung der Produktivität und *fitness* der mikrobiellen Zellfabrik beitragen kann. Dies wurde auch durch *knockout* verschiedener BSG im Expressionswirt *P. taiwanensis* VLB120 mit einer um 15% höheren Wachstumsrate sowie Biomasse-Ausbeute gezeigt (Wynands et al., 2019).

Zusammenfassend ist es in Zukunft essenziell aufzuklären, welche der einzelnen Deletionen vorteilhaft ist, um herauszufinden, welche Deletion welchen Einfluss in Bezug auf die *fitness*, die Produktionsleistung und die Bereitstellung von Edukten hat.

In Bezug zur Salicylat-vermittelten Produktion von RL scheint der Induktor Salicylat eine besondere Relevanz bzgl. der generellen *fitness* der mikrobiellen Fabrik zu besitzen. Bei Betrachtung des Wachstums von *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> fällt auf (**Abb. III-13 (B)**), dass im Vergleich zum wildtypischen Pendant Wachstumsdefekte bei einer Salicylatkonzentration von 5 mM zu beobachten sind. Weiterhin konnte zum Ender der Kultivierung hin eine intensive dunkle Färbung der Kultur beobachtet werden, die bereits für die Mutante ohne *rhlAB*-Expression beschrieben wurde (Dias, 2019). Deshalb sollte zunächst der Einfluss des Induktors Salicylat auf das Wachstum und den Metabolismus von *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> untersucht werden.

#### III.3.1.1 Einfluss des Induktors Salicylat auf das Wachstum und die Rhamnolipid-Produktion

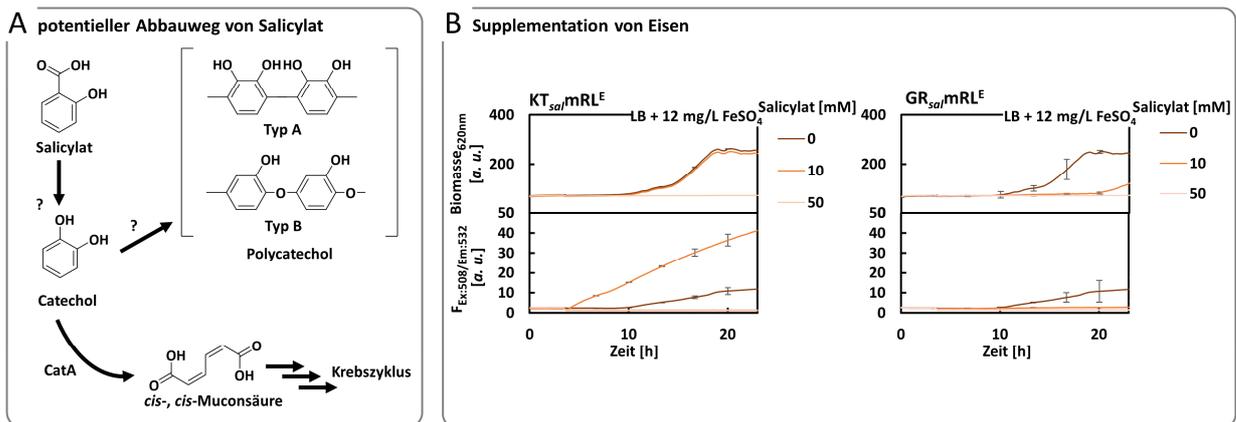
Das Salicylat-induzierbare Expressionssystem zeigte in *P. putida* vielversprechende Eigenschaften (III.2.1-3), sodass dieser hinsichtlich der RL-Produktion optimiert werden sollte. Es fiel jedoch auf, dass die multiple Mutante *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup>, die eine vollständige Umsetzung von HAA zu mRL gewährleistete (III.3.1), noch empfindlicher gegenüber Salicylat reagierte als der *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup>.

In der assoziierten Bachelorarbeit von Fabio Manuel Anzalone Dias (2019), die sich mit der physiologischen Antwort von *P. putida* KT2440 und *P. putida* KT2440 GR18 (ohne den Einfluss auf die Produktion der RL) auf den Induktor Salicylat beschäftigte, wurde bestätigt, dass der Wildtyp und die Mutante sich bzgl. der Toleranz gegenüber Salicylat deutlich voneinander unterschieden, wobei der Wildtyp Salicylat besser tolerieren konnte. Am stärksten war der Einfluss von Salicylat in der rekombinanten Mutante *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL, der exemplarisch bei 3 mM Salicylat eine Reduzierung des Wachstums um 42% zeigte. Zudem wurde eine Braunfärbung als phänotypische Antwort der *P. putida* GR18-Stämme auf Salicylatzugabe beobachtet (Dias, 2019). Deshalb wurde vermutet, dass das Salicylat in *P. putida* KT2440 GR18 abgebaut werden könnte (Dias, 2019), was allerdings für *P. putida* KT2440 noch nicht beschrieben wurde (Denome et al., 1993; Carmona et al., 2009; M. Kohlstedt, persönliche Mitteilung; vgl. **Abb. III-14 (A)**; nach KEGG: **Tab. II-8**). Dies würde auch mit Berichten einer *P. putida* KT2440 PVD-Mutante ( $\Delta$ PP\_4219; s. a. **Tab. A-7**) übereinstimmen, die im Vergleich zum Wildtypen nach Supplementation von Benzylalkoholen (Aromaten), vermutlich aufgrund der Limitierung von intrazellulärem Eisen, ein vermindertes Wachstum zeigte (Joshi et al., 2014).

So könnte auch hier vermutet werden, dass Salicylat durch ein noch unbekanntes Enzym zu Catechol katabolisiert wird, welches unter oxidativem Stress spontan braun-gefärbte Polymere, wie z. B. Polycatechol, bildet (Dubey et al., 1998; M. Kohlstedt, persönliche Mitteilung). Sowohl Catechol, als auch das gebildete Polycatechol, können auf den betreffenden Organismus toxisch wirken (Benndorf et al., 2006; van Duuren et al., 2012). Wahrscheinlicher ist jedoch der voranschreitende Abbau von Catechol durch das Enzym CatA (Catechol-1,2-dioxygenase) und weitere enzymatische Schritte, wodurch *cis*-, *cis*-Muconsäure und schließlich Succinyl-CoA im Krebszyklus verwertet werden können (vgl. **Abb. III-14 (A)**; nach KEGG: **Tab. II-8**). Jedoch hat Dias, 2019 auch gezeigt,

dass sowohl im Wildtyp als auch in Stämmen bei denen letale Effekte durch Salicylatsupplementation beobachtet wurden, weder ein massiver Abbau von Salicylat noch die Akkumulation von Abbauprodukten nachgewiesen werden konnte. Das heißt, dass zum Ende der Kultivierung noch mindestens 95% der zu Beginn supplementierten Salicylatmenge vorhanden ist, wodurch die hiesige Induktion der *rhIAB*-Expression nicht eingeschränkt sein sollte. Jedoch ist weiterhin ein Wachstumsdefekt, insbesondere bei der Mutante *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL, bei der Zugabe von hohen Salicylatkonzentrationen (ab 3 mM) zu beobachten, wodurch folglich eine Erhöhung der Induktorkonzentration zur Verstärkung der *rhIAB*-Expression nicht vorteilhaft zu sein scheint und auch im Wildtyp, selbst bei niedrigen Konzentrationen (unter 3 mM), einen Einfluss haben könnte. Ein wichtiger Faktor für den Abbau von Aromaten, zu denen auch Salicylat gehört, ist die Verfügbarkeit von Eisen. Die Enzyme, die für die Spaltung des charakteristischen Rings der Aromaten verantwortlich sind, wie bspw. CatA, gehören zu den Eisen-abhängigen Oxygenasen (Dinkla et al., 2001; Dinkla und Janssen, 2003; vgl. **Abb. III-14 (A)**). Aufgrund der häufig geringen Mengen von freiem Eisen, z. B. im verwendeten LB-Medium, kann man hier von einem limitierenden Faktor für den Aromatenabbau sprechen (Lamont et al., 2002). Aufgrund der fehlenden PVD, die als Siderophore in *P. putida* einen wichtigen Bestandteil des Systems zur Akquirierung von Eisen darstellen (Cornelis, 2010), könnte in *P. putida* KT2440 GR18 sowie dem RL-Produzenten GR<sub>sal</sub>mRL durch das supplementierte Salicylat eine Eisenmangel-abhängige Stressantwort ausgelöst werden, die zu einer Reduzierung des Wachstums führt. Dies lässt auch die Annahme zu, dass bei einem durch Eisenmangel nicht funktionierenden Abbau von Salicylat und speziell dem potenziell entstehenden Catechol, es zu einer Anreicherung von Catechol und einer darauffolgenden Polymerisation kommen kann (**Abb. III-14 (A)**). Dies könnte die Ursache der besonders bei *P. putida* KT2440 GR18 beobachteten braunen, dunklen Färbung der Kulturen nach der Kultivierung, des reduzierten Wachstums und der fehlenden Nachweisbarkeit von Abbauprodukten wie Catechol und *cis*-, *cis*-Muconsäure sein (Dias, 2019).

Um herauszufinden, ob der Mangel an Eisen der Grund für das reduzierte Wachstum darstellt, wurde sowohl *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> als auch GR<sub>sal</sub>mRL<sup>E</sup> in LB-Medium + 10 g/L Glucose und 12 mg/L FeSO<sub>4</sub>-Lösung nach 3,5 h ohne, mit 10 und 50 mM Salicylat supplementiert und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz für 24 h verfolgt (II.3.1; II.3.2; vgl. **Abb. III-14 (B)**).



**Abb. III-14: Potenzieller Abbau von Salicylat: Reduzierung des Wachstums aufgrund der Limitierung von Eisen?**

**A:** Potenzieller Abbauweg von Salicylat (Dias, 2019; nach KEGG und in Anlehnung an Denome et al., 1993; Dubey et al., 1998; Carmona et al., 2009). Salicylat könnte durch ein noch unbekanntes Enzym zu Catechol abgebaut werden, welches nach Dubey et al., 1998 zu Polycatechol (Typ A oder Typ B) polymerisieren und der Grund für die beobachtete Braunfärbung sowohl in dieser Studie als auch in Dias, 2019, sein könnte.

**B:** *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$  sowie  $GR_{sal/mRL}^E$  wurden in LB-Medium + 10 g/L Glucose und 12 mg/L  $FeSO_4$  im Mikrobioreaktorsystem mit 0, 10 und 50 mM Salicylat, die nach 3,5 h supplementiert wurden, kultiviert (II.2.1.1) und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz (F) für 24 h verfolgt (II.3.1; II.3.2). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus biologischen Replikaten. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet.

Die gemessenen Wachstumskurven und eYFP-Fluoreszenz zeigen (**Abb. III-14 (B)**), dass der erhoffte positive Effekt auf das Wachstum durch Supplementierung von Eisen auf *P. putida*  $GR_{sal/mRL}^E$  hier nicht beobachtet werden konnte: Während der wildtypische  $KT_{sal/mRL}^E$ -Stamm bei Induktion mit 10 mM Salicylat ein kaum verändertes Wachstum zeigte, verringerte sich das Wachstum von *P. putida*  $GR_{sal/mRL}^E$  bei gleicher Induktorkonzentration um 51%. Bei einer Induktorkonzentration von 50 mM Salicylat konnte sowohl in der genomreduzierten Mutante  $GR_{sal/mRL}^E$ , aber auch im wildtypischen  $KT_{sal/mRL}^E$ -Stamm kein Wachstum mehr beobachtet werden.

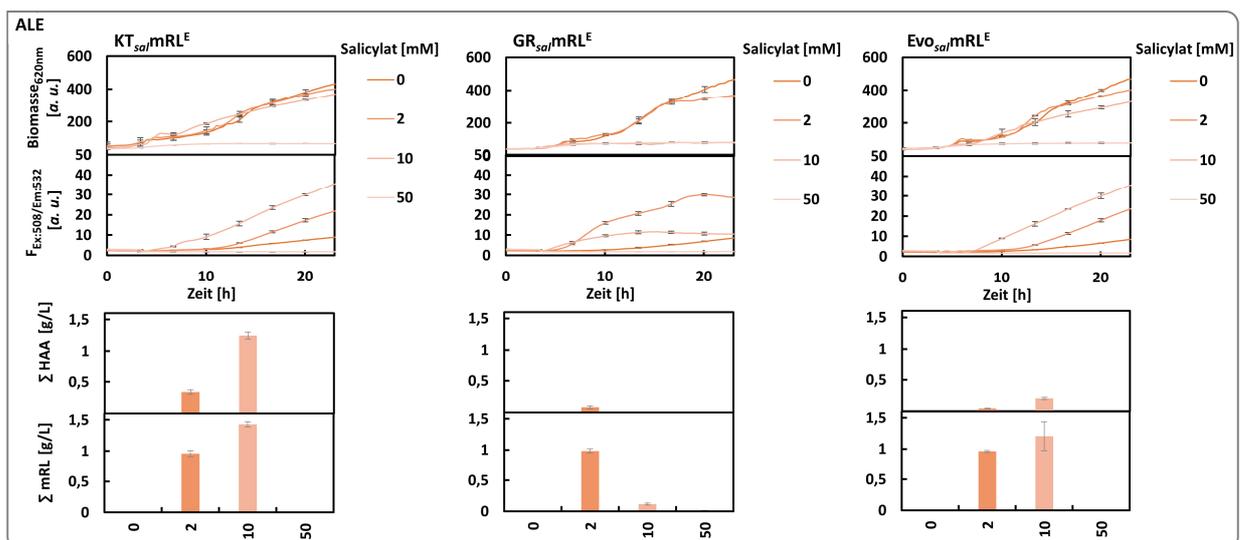
Die Vermutung liegt nahe, dass die Reduzierung des Wachstums im  $GR_{sal/mRL}^E$ -Stamm auf eine verminderte Stresstoleranz gegenüber dem Stressor Salicylat zurückzuführen ist, was als mögliche Auswirkung einer Genomreduktion bekannt ist (Lieder et al., 2015). Dies könnte durch die mangelnde Aufnahmefähigkeit von Eisen (durch die Deletion der PVD-BSG) verstärkt werden. Diese verringerte Stresstoleranz könnte neben der Deletion der PVD-BSG bspw. mit dem *knockout* von Bestandteilen der EPS-Schicht und der großen Oberflächenproteine LapA und LapF zusammenhängen, welche die Hydrophobizität der Zelloberfläche, beeinflussen (Martínez-García et al., 2014c; Lahesaare et al., 2016). Dadurch könnten die Zellen ggf. angreifbarer gegenüber Salicylat, aber unter Umständen auch höheren RL-Titern (hier nicht betrachtet), sein.

Eine Methode, einen Organismus toleranter gegenüber toxischen Substanzen zu machen, ist das Verfahren der *adaptive laboratory evolution* (ALE), welches Einblicke in die grundlegenden Mechanismen der molekularen Evolution und in die adaptiven Veränderungen des Organismus unter kontrollierten Laborbedingungen zulässt (Dragosits und Mattanovich, 2013). Durch diesen Ansatz konnte in der assoziierten Bachelorarbeit von Fabio Manuel Anzalone Dias, 2019 auf Basis der Mutante *P. putida* KT2440 GR18 eine stabile Alternative mit hoher Toleranz gegenüber Salicylat generiert werden (*P. putida* KT2440 EvoSal). Verglichen mit Wachstumskurven von *P. putida* KT2440 GR18 bei gleicher Salicylat-Konzentration, wurde eine doppelt so große Biomassebildung wie beim Ausgangsstamm, ähnlich zu der des Wildtypen, beobachtet. Dieser Stamm zeigte zudem

keine Farbänderung mehr, die auf eine mögliche Bildung von Polycatechol schließen lassen könnte. Eine verstärkte Verstoffwechslung von Salicylat konnte hierbei ausgeschlossen werden (Dias, 2019). Somit könnten Mutationen im unbekanntem Abbau von Salicylat zu Catechol oder der Polymerisation von Catechol zu Polycatechol entstanden sein, wodurch die Vergiftung der Zelle inhibiert wird.

Als eine mögliche Ursache für den in *P. putida*  $GR_{sal/mRL}^E$  verringerten RL-Titer wurden die Wachstumsdefekte durch Salicylat angenommen. Daher wurde nachfolgend das Wachstum, die Expression des PA\_rihAB-Operons und der resultierende RL-Titer des Salicylat-induzierbaren RL-Produktionsstammes *P. putida*  $Evo_{sal/mRL}^E$  (Tab. II-2) der analog zu III.1.1 und konstruiert und validiert wurde, beobachtet/analysiert/untersucht. Die Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$ ,  $GR_{sal/mRL}^E$  sowie  $Evo_{sal/mRL}^E$  wurden in LB-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1) kultiviert, mit unterschiedlichen Salicylatkonzentrationen nach 3,5 h supplementiert und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz für 24 h verfolgt (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7; vgl.

**Abb. III-15).**



**Abb. III-15: Rhannolipid-Produktion im evolvierten *Pseudomonas putida*  $Evo_{sal/mRL}^E$ .**

*P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$ ,  $GR_{sal/mRL}^E$  und  $Evo_{sal/mRL}^E$ , wurden in LB-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem mit unterschiedlichen Salicylatkonzentrationen, die nach 3,5 h supplementiert wurden, kultiviert (II.2.1.1) und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz (F) für 24 h verfolgt (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus biologischen Replikaten. Zur besseren Veranschaulichung wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet.

Hier zeigte sich, dass *P. putida*  $Evo_{sal/mRL}^E$  nach Zugabe des Induktors Salicylat keine Braunfärbung und auch deutlich geringere Wachstumsdefekte entwickelt. Im Gegensatz zu *P. putida*  $GR_{sal/mRL}^E$ , das kein Wachstum bei 10 mM Salicylat zeigt, bestätigte sich, wie in Dias, 2019 für *P. putida* KT2440 EvoSal ohne *rihAB*-Kassette gezeigt, dass *P. putida*  $Evo_{sal/mRL}^E$  ein wildtypisches Wachstumsverhalten hat (vgl. **Abb. III-15**). Zudem wurde hier analog zu *P. putida*  $GR_{sal/mRL}^E$  für  $Evo_{sal/mRL}^E$  demonstriert, dass nach Induktion der *rihAB*-Expression mit 2 mM, aber auch mit 10 mM Salicylat eine geringere HAA-Akkumulation als im Wildtyp zu beobachten ist. Das molare Verhältnis von HAA- zu mRL bei einer Induktion mit 10 mM Salicylat betrug für *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$  62% und  $Evo_{sal/mRL}^E$  11% ( $GR_{sal/mRL}^E$  aufgrund minimiertem Wachstum nicht ermittelbar) und damit eine

deutlich höhere Reinheit des resultierenden mRL-Titers ( $KT_{sal}mRL^E$ : 1,42 g/L;  $Evo_{sal}mRL^E$ : 1,22 g/L). Jedoch zeigte der evolvierte Stamm eine deutlich minimierte Menge an Biotensid (HAA+mRL). Diese betrug für *P. putida*  $KT_{sal}mRL^E$  bei 10 mM Salicylat 6,3 mM Biotensid und für  $Evo_{sal}mRL^E$  nur 2,9 mM Biotensid und somit einem Verlust von ca. 54%.

Dieses Beispiel zeigt, dass obwohl *metabolic engineering* ein effektives Werkzeug zur Optimierung eines Produktionsstammes ist, stets die Auswirkungen, vor allem beim potenziell wechselnden Bedingungen, betrachtet werden müssen (Liang et al., 2020). Denn wie hier beispielhaft an der genomreduzierten Mutante gezeigt wurde (vgl. III.3.1), können Mutationen für die Produktion auch negative Auswirkungen, z. B. auf die Stresstoleranz, haben. Diese müssen vor allem in Bezug auf die Konstruktion eines robusten Produktionsstammes in Betracht gezogen werden (vgl. 3.2.1; Yang, 2007; Liang et al., 2020). Eine solche potenzielle Optimierung kann im Labormaßstab vorteilhaft sein, birgt jedoch die Gefahr, dass bei der Projektion auf eine großangelegte Produktion (*up-scaling*) unerwartete Effekte auftreten können (Peng und Liang, 2020). So wird bspw. beim Betrieb von großen Reaktoren zur Produktion von Sekundärmetaboliten oder Naturstoffen meistens nicht mit reinen Substraten gearbeitet, sondern es werden hierfür z. B. landwirtschaftliche Erzeugnisse oder Abfälle in Betracht gezogen (Potthast et al., 2011; Löwe et al., 2020), um die Kosten des Gesamtprozesses zu minimieren. Exemplarisch besteht flüssige Zuckerrohrmelasse, ein für die großtechnische Produktion diskutiertes Substrat (Halema, 2014), lediglich zu 50–60% aus Zucker (Saccharose oder Raffinose); der Rest setzt sich zumeist aus einer komplexen Mischung von organischen Säuren, Betain, Vitaminen und anorganischen Salzen zusammen (Ternes, 2005).

Zwar können Ansätze wie ALE die Stresstoleranz, wie am Beispiel *P. putida*  $EvoSal$  gezeigt (Dias, 2019), erhöhen, jedoch birgt dies auch die Gefahr zusätzliche Mutationen zu generieren die wiederum nicht vorteilhaft für den gewünschten Produktionsprozess sein können (Vickers et al., 2010). In Zukunft sollte beachtet werden, dass besonders die Wirkung einzelner (oder mehrerer) Mutationen getrennt voneinander betrachtet und nur vorteilhafte Mutationen in den Stamm implementiert werden sollten, jedoch stets unter voranschreitender Eruierung der resultierenden *fitness*, Stresstoleranz und des gewünschte Produkttiters. Bator, 2020 zeigte in diesem Zusammenhang bei der Konstruktion des *P. putida* KT2440 GR41 ( $\Delta pvd\Delta flag\Delta alg\Delta bcs\Delta pea\Delta lapA/F\Delta pha\Delta pili1/3/4/5$ ), dass diese sequentielle Optimierung des metabolischen Flusses und des Energiehaushaltes zu einer höheren  $P_{ffg}$ -Expression-basierten mRL-Produktion führte. Zur weiteren Bestimmung dieser Auswirkungen könnten auch *in vitro* Modellierungen zu den regulatorischen Flüssen innerhalb der Zelle beitragen, die aufgrund des gut aufgeschlüsselten Stoffwechsels von *P. putida* KT2440 bereits Verwendung gefunden haben (Nogales et al., 2008, 2020; Zieringer und Takors, 2018). Zudem konnten erste Versuche zur computergestützten Modellierung und Aufschlüsselung potenzieller Optimierungsstrategien der heterologen RL-Produktion in *P. putida* KT2440 vorgenommen werden (Occhipinti et al., 2018).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die Verwendung der *P. putida* KT2440 GR18-Mutante zur Salicylat-induzierten Produktion von RL zwar zu einer geringeren Akkumulation von HAA, jedoch zu einer Verringerung des Biotensid-Titers und der Stresstoleranz, hier gegenüber dem Aromaten

Salicylat aufgefallen, geführt hat. Es hat somit anscheinend keine stärkere Konversion von HAA zu mRL stattgefunden, sodass die Aufschlüsselung einzelner Mutationen und deren Einfluss auf die RL-Produktivität und die *fitness* eruiert werden sollten. Eventuell ist die Bereitstellung der aktivierten L-Rhamnose-Vorstufen ein *bottleneck* in der Produktion. Deshalb soll im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine heterologe Koexpression von Genen zur Bildung von RL-Vorstufen im Salicylat-toleranteren wildtypischen Hintergrund einen ebenfalls positiven Effekt auf die vollständige Konversion zu mRL, ohne die Minderung des Biotensid-Titers, haben könnte.

#### **Zusammenfassung | Optimierung des metabolischen Flusses und Salicylatstresstoleranz**

- (1) Die Verwendung einer genomreduzierten Mutante zur Produktion von RL ( $GR_{sal}mRL^E$ ) kann die Akkumulation von HAA minimieren (HAA/mRL: 2%), jedoch einhergehend mit einer Verringerung des Biotensid-Titers um 16%.
- (2)  $GR_{sal}mRL^E$  zeigt Wachstumsdefizite bei hohen Salicylatkonzentrationen und somit eine geringe Toleranz, vermutlich aufgrund einzelner unvorteilhafter Mutationen. Eine Supplementation von Eisen, welches in dieser PVD-Mutante limitierend sein könnte, kann die *fitness* nicht erhöhen.
- (3) Die Salicylat-vermittelte Produktion im evolvierten *P. putida* KT2440 EvoSal ( $Evo_{sal}mRL^E$ ) zeigt im Gegensatz zu  $GR_{sal}mRL^E$  ein verbessertes Wachstum und einhergehend eine höhere mRL-Produktion ( $\sum$  mRL-Titer: 1,2 g/L) und kaum eine Akkumulation von HAA (HAA/mRL: 11%); Dies ist jedoch nur durch den Einsatz von 10 mM Induktor und einer anhaltenden Verringerung des Biotensid-Titers um 54% im Vergleich zu  $KT_{sal}mRL^E$  möglich.

### III.3.2 Expression von zusätzlichen Genen für die Bereitstellung von Rhamnolipid-Vorstufen

Durch *metabolic engineering* (Bator, 2020) und *adaptive laboratory evolution* (Dias, 2019) konnte in *P. putida*  $Evo_{sal}mRL^E$  eine Reduktion der verbleibenden HAA im Gesamt-Biotensid zu einem HAA/mRL Verhältnis von 11% und einem Titer von 1,2 g/L erreicht werden (III.3.1.1). Der Rückgang der HAA-Akkumulation führte jedoch nicht zu einem weiterem Anstieg des RL-Titers, sondern dementsprechend zu einer Verringerung des Biotensid-Titers, was vermutlich mit der Einführung einzelner Deletionen im Rahmen der Konstruktion des *P. putida* KT2440 GR18 zusammenhängen könnte (vgl. **Tab. A-7**), die sich nachteilig auf die Biotensid-Produktion ausgewirkt haben. Zudem konnte der mRL-Titer in *P. putida*  $Evo_{sal}mRL^E$  (1,2 g/L) nur mit einer Salicylatkonzentration von 10 mM erreicht werden. Dieser Titer war nur wenig höher als die erhaltenen mRL-Titer im wildtypischen *P. putida*  $KT_{sal}mRL^E$  bei Induktion mit 2 mM Salicylat (ca. 1 g/L). Die Optimierung des wildtypischen Produzenten mit einer Induktorkonzentration von 2 mM Salicylat scheint im Hinblick auf die Vermeidung höherer Kosten in einem potenziellen großskaligen Bioraffinerieprozess durch eine Verfünffachung der Induktorkonzentration (vgl. **Tab. III-3**), aber auch aufgrund der beobachteten Salicylat-induzierten Stressantwort (vgl. III.3.1.1), und des bisher höchsten Biotensid-Titers (bei 2 mM Induktor: 3,47 mM Biotensid (HAA+mRL)) erstrebenswerter zu sein. Die Bereitstellung der aktivierten L-Rhamnose-Vorstufen schien hierbei der *bottleneck* in der vollständigen Konversion von HAA zu mRL zu sein (vgl. II.2.1; III.3.1).

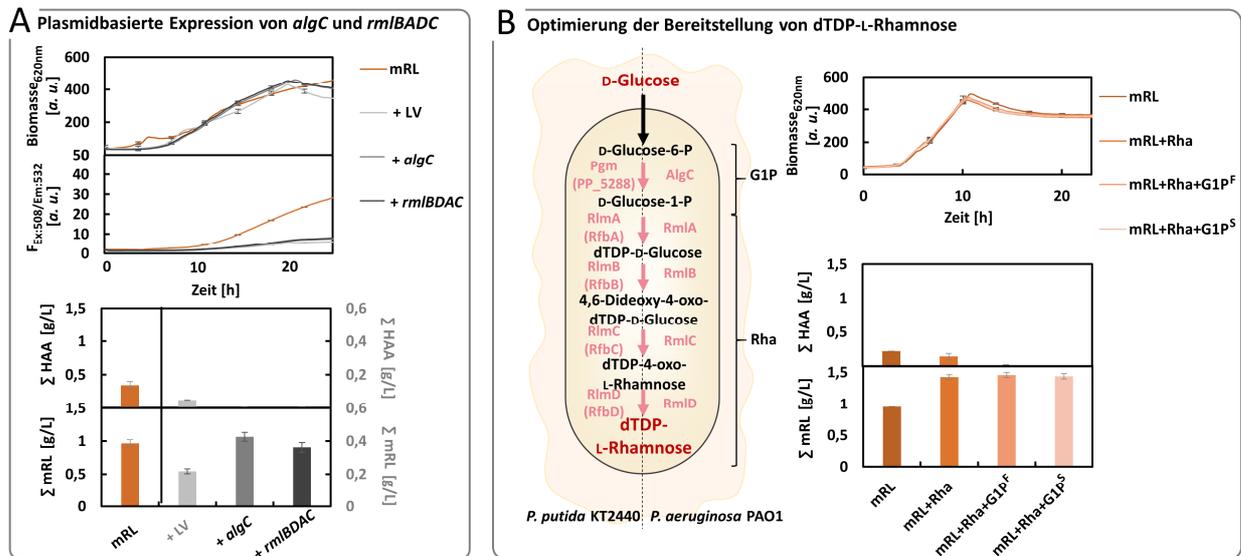
Deshalb sollte die heterologe Expression von Genen zur Bereitstellung von dTDP-L-Rhamnose im wildtypischen Hintergrund als alternative Strategie zur Verringerung der HAA-Akkumulation bzw. weiteren Steigerung der RL-Produktion angewandt werden. Das gerade in rekombinanten Produktionsstämmen eine verbesserte Bereitstellung von Edukten durch die zusätzliche Expression heterologer Gene zu einer Optimierung von Produktflüssen und einer Steigerung des Produkt-Titers führen kann, wurde bereits in einigen Beispielen, über *P. putida* und die RL-Biosynthese hinaus, gezeigt (Cabrera-Valladares et al., 2006; Zhang et al., 2012; Wittgens, 2013; Sánchez-Pascuala et al., 2019; Troost et al., 2019).

Im Folgendem sollten die *P. aeruginosa* – Gene kodierend für die Phosphoglucomutase AlgC, die zur Bildung von G1P, sowie für die Enzyme RmlABCD, welche für die weitere Umsetzung von G1P zu dTDP-L-Rhamnose benötigt werden (I.3.2), in *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$ -exprimiert werden. Hierbei haben die im *rml*-Operon sowie auf dem *algC*-kodierten Proteine aus *P. aeruginosa* auf Proteinebene wenig Identität mit den postulierten homologen Proteinen (RfbABCD/ PP\_5288) in *P. putida* KT2440 (60 bis 80%; Wittgens, 2013), sodass von einer anderen Enzymkinetik ausgegangen werden kann. Wittgens, 2013 zeigte in diesem Zusammenhang, dass die (Plasmid-basierte) heterologe Expression des *rmlBDAC*-Operons aber auch des *algC*-Gens unter Kontrolle des  $P_{tac}$ -Promotors zu einer höheren RL-Produktion beitragen könnte.

Auf dieser Basis sollten die Gene *rmlBDAC* und anschließend *algC<sup>F/S</sup>* aus *P. aeruginosa* in Transkriptionsfusion als zusätzlicher Baustein hinter die bereits bestehenden *rhlAB*-Gene im Vektor pYTSK10\_0G7 kloniert werden. Dies ist durch die Architektur der *yTRES-toolbox* Kasette durch die Klonierung in die *I-SceI*-Schnittstelle (Klonierung analog zu III.1.1) möglich. Hierdurch konnten die Vektoren pYTSK51\_0G7 bzw. pYTSK62-63\_0G7 generiert werden. Der Unterschied zwischen dem  $AlgC^F$  und  $AlgC^S$  liegt darin, dass  $AlgC^S$  nur die katalytisch aktive Domäne des AlgC-Enzyms beinhaltet, analog zum pVLT33\_*algC* Vektor (Wittgens, 2013), während  $algC^F$  das vollständige Protein mit der enzymatisch nicht aktiven Domäne kodiert (Zielinski et al., 1991). Mithilfe der *yTRES-toolbox* Vektoren pYTSK51\_0G7 bzw. pYTSK62-63\_0G7 wurden die Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}+Rha$  (*rhlABrmlBDAC*) und  $KT_{sal/mRL}+Rha+G1P^{F/S}$  (*rhlABrmlBDACalgC*) erzeugt (vgl. III.1).

Zur Einschätzung der Effekte der Expression des heterologen *rml*-Operons und *algC*-Gens auf die vollständige Konversion von HAA zu mRL und auf den Biotensid-Titer, sowie des Unterschieds von *attTn7*-integrierter Expressionskasette und  $P_{tac}$ /Plasmid-basierter (vgl. Wittgens, 2013), wurden die Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$ , sowie  $KT_{sal/mRL}^E + pVLT33$  (Kontrolle),  $+ pVLT33\_algC$  und  $+ pVLT33\_rmlBDAC$  in  $LB_{Sal2/1PTG0,4/(Km25)}$ -Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1), die nach 3,5 h induziert wurden, kultiviert (vgl. **Abb. III-16 (A)**). Parallel hierzu wurden die generierten Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}$ ,  $KT_{sal/mRL}+Rha$  und  $KT_{sal/mRL}+Rha+G1P^{F/S}$  ebenfalls in  $LB_{Sal2}$ -Medium + 10 g/L Glucose, kultiviert. Alle Stämme wurden für 24 h hinsichtlich ihrer Biomassezunahme und im Fall der Stämme *P. putida*  $KT_{sal/mRL}^E$  sowie  $KT_{sal/mRL}^E + pVLT33$  (Kontrolle),  $+ pVLT33\_algC$  und  $+ pVLT33\_rmlBDAC$  auch hinsichtlich ihrer eYFP-Fluoreszenz verfolgt (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und

mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7). Somit konnten das Wachstum und die eYFP-Fluoreszenz sowie der HAA- und mRL-Titer ermittelt werden (vgl. **Abb. III-16**).



**Abb. III-16: Plasmid-basierte und Genomintegron-basierte heterologe Koexpression von Genen zur Bildung der Rhamnolipid-Vorstufe dTDP-L-Rhamnose.**

Die heterolog exprimierten Gene *algC* und *rmlBDAC* aus *P. aeruginosa* PAO1 kodieren die Proteine Phosphoglucomutase (AlgC), G1P-Thymidyltransferase (RmlA), dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase (RmlB), dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-Epimerase (RmlC) und dTDP-4-Dehydrorhamnose-Reductase (RmlD), die die ersten fünf Syntheseschritte zur Bildung von dTDP-L-Rhamnose (Rha) über G1P aus G6P katalysieren (**B**; links). Zur besseren Veranschaulichung wurde nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus biologischen Replikaten.

**A:** Die Plasmid-basierte Koexpression erfolgte mit *P. putida* KT<sub>sa</sub>mRL<sup>E</sup>, sowie KT<sub>sa</sub>mRL<sup>E</sup> + pVLT33 (Kontrolle), + pVLT33<sub>*algC*</sub> und + pVLT33<sub>*rmlBDAC*</sub>, die in LB<sub>Km25</sub>-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1) mit 2 mM Salicylat und 0,4 mM IPTG (Induktionszeitpunkt: 3,5 h) kultiviert und hinsichtlich ihrer Biomasse- und eYFP-Fluoreszenz (F) für 24 h verfolgt wurden (II.3.1; II.3.2). Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7).

**B:** Die genomische Koexpression erfolgte mit *P. putida* KT<sub>sa</sub>mRL, KT<sub>sa</sub>mRL+Rha und KT<sub>sa</sub>mRL+Rha+G1P<sup>F/S</sup>, die in LB-Medium + 10 g/L Glucose im Mikrobioreaktorsystem (II.2.1.1) mit 2 mM Salicylat (Induktionszeitpunkt: 3,5 h) kultiviert wurden. Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Quantifizierung des HAA- und mRL-Titers mittels HPLC (II.3.7).

Es fiel auf, dass das Einbringen von Plasmiden in *P. putida* KT<sub>sa</sub>mRL<sup>E</sup> (**Abb. III-16 (A)**) zu einem erheblichen Verlust der Expressionsleistung der integrierten Gene (vgl. **Abb. III-16 (A)**); eYFP-Fluoreszenz) führte, was in einem um 78% reduzierten Biotensid-Titer (HAA+mRL) resultierte, obwohl die Zellen kein reduziertes Wachstum vorwiesen. Dies unterstreicht, dass schon die Erhaltung eines Plasmides in einen Organismus zu einer hohen metabolischen Last führen kann und die internen Zellmaschinerien erheblich beeinträchtigt werden. Es ist bekannt, dass die Erhaltung von Plasmiden in Mikroorganismen aufgrund des *metabolic burden* zu einer Verringerung der Wachstumsrate und zu ungewünschten Rückkopplungen hinsichtlich der Expression von Genen führen kann (Bailey et al., 1986; Gyorgy et al., 2015). Es scheint, als würden zelluläre Ressourcen auf die Replikation und Beibehaltung des Plasmides gelenkt werden, wodurch vermutlich interne metabolische Flüsse dazu führen, dass die Expression genomintegrierter Gene herabreguliert wird. Dies könnte in den hier untersuchten KT<sub>sa</sub>mRL + pVLT33, + pVLT33<sub>*algC*</sub> und + pVLT33<sub>*rmlBDAC*</sub> Produzenten zu der beobachteten Reduktion RL-Titers beitragen. Nichtsdestotrotz lässt sich im Vergleich zum Leervektor (pVLT33) ein Trend erkennen (vgl. **Abb. III-16 (A)**): Schon durch die Plasmid-basierte Koexpression von *algC* und *rmlBDAC* kann die Produktion von mRL im Vergleich zum Leervektor um ca. 90% erhöht und die HAA-Akkumulation verringert werden. Dies stimmt ungefähr mit der vormals gemachten Beobachtung einer Steuerung des RL-Titers um 109% bei

Plasmid-basierter Koexpression des *rmIBDAC*-Operons bei hier ebenfalls Plasmid-basierten *rhIAB*-Expression in *P. putida* KT2440 überein (Wittgens, 2013).

Im nächsten Schritt wurde das *rmIBDAC*-Operon und anschließend das Gen *algC* hinter das *rhIAB*-Operon in Transkriptionsfusion kloniert, sodass die Expression aller genomintegrierter Gene durch den Salicylat-Promotor initiiert werden kann (vgl. **Abb. III-16 (B)**). Dieses Vorgehen führte dazu, dass die zusätzliche Expression von *rmIBDAC* zu einer Erhöhung des mRL-Titers um 49% beiträgt und das molare Verhältnis von HAA/mRL von 16% auf 7% verringert werden kann. Die zusätzliche Expression von *algC* ( $KT_{sal}mRL+Rha+G1P$ ), unabhängig vom Einsatz des vollständigen Gens (F) oder der lediglich aktiven Domäne (S), zeigte hingegen eine vollständige Konversion von HAA zu mRL und einem resultierenden mRL-Titer von 1,45 g/L, jedoch einhergehend mit einem geringen Verlust des Biotensid-Titers.

Damit scheint die native Expression des *rfbBDAC*-Operons und des *pgm*-Gens einen limitierenden Faktor zur Produktion von RL in *P. putida* darzustellen (**Abb. III-16 (B)**; links). Gründe hierfür können vielfältig sein: Vermutlich wird durch die zusätzliche heterologe Expression dieser Gene und der daraus höheren Menge der dTDP-L-Rhamnose die Synthesegeschwindigkeit erhöht, sodass die Konversion von HAA zu mRL noch vor dem Einsetzen bestimmter postulierter RNA-Degradationsprozesse erfolgen kann. Hierbei im Speziellen die Degradation von *rhIB*-mRNA, wodurch weniger aktives Enzym für die Umwandlung von HAA zu mRL durch zunehmendes Alter des Transkriptes (vgl. III.2.1.1) zur Verfügung steht.

Weiterhin könnte auch die rapide Konversion von D-Glucose zu dTDP-L-Rhamnose zu einer besseren Bereitstellung der dTDP-L-Rhamnose führen. Trotz der recht hohen eingesetzten Glucosekonzentration (10 g/L), könnte die Produktion von dTDP-L-Rhamnose aus akkumulierendem D-Gluconat/2-Keto-D-gluconat (Karmainski, 2020; vgl. **Abb. I-6**) nach dem Verbrauch der Glucose erschwert sein. Der vollständige Abbau der D-Glucose zum Entnahmezeitpunkt der Proben (24 h) wurde hier zwar nicht bestimmt, scheint aber möglich. Die Plasmid-basierten Produzenten (**Abb. III-16 (A)**) scheinen sich im Gegensatz zu den Stämmen mit genomintegrierten Expressionskassetten (**Abb. III-16 (B)**) bereits in der stationären Wachstumsphase zu befinden, sodass analog zu Tiso et al., 2020 die Produktion von RL aufgrund der fehlenden Glucose zurückgefahren werden könnte (vgl. Tiso et al., 2020; M9-Medium + 17 g/L Glucose; Glucose verbraucht nach 10 h Kultivierung bei einsetzender stationären Wachstumsphase; s. a. Bator, 2020; Karmainski, 2020).

Aber auch die generell erhöhte Enzymkonzentration in der spät-logarithmischen Phase kann eine Relevanz besitzen. Für *P. aeruginosa* wurde eine erhöhte Expression des *rmI*-Operons in der spät-logarithmischen Phase gezeigt (Aguirre-Ramírez et al., 2012), sodass die mutmaßlich verstärkte Synthese von dTDP-L-Rhamnose hier auf die erhöhte Enzymkonzentration besonders zur stationären Wachstumsphase hin, zurückzuführen sein kann (s. a. Wittgens, 2013). Ebenso kann die Kinetik der aus *P. aeruginosa* stammenden Enzyme eine Bedeutung haben, die vermutlich optimaler auf die Synthese der RL abgestimmt sind (Wittgens, 2013) und somit ein interessantes Forschungsfeld zur Aufschlüsselung der metabolischen Flüsse in *P. putida* KT2440 zur heterologen RL-Produktion sein könnten.

Zusammenfassend legen die hier durchgeführten Experimente nahe, dass die Menge an verfügbarer dTDP-L-Rhamnose eine Limitation bei der Umsetzung von HAA zu mRL in *P. putida* KT2440 darstellen könnte. Eine höhere Bereitstellung von aktivierter L-Rhamnose könnte die RL-Produktion fördern. Um die Produktion von RL in *P. putida* KT2440 weiter zu steigern, wäre es zukünftig auch interessant, die homologen BSG für die Produktion von dTDP-L-Rhamnose bestehend aus den Genen PP\_5288 sowie dem *rhlBDAC*-Operon (vgl. I.3.2) hoch zu regulieren oder unter Kontrolle eines synthetischen Promotors zu bringen. Dies könnte gezielt die Limitierung an dTDP-L-Rhamnose minimieren ohne zusätzliche Gene einzubringen und eine daraus mögliche entstehende metabolischen Last zu erzeugen, die hier eventuell durch die Reduktion des Biotensid-Titers durch die zusätzliche genomintegrierte Expression des *algC*-Gens beobachtet werden konnte. Neben dTDP-L-Rhamnose sollte auch die Bereitstellung der Edukte der Lipiddomäne, durch Koexpression heterologer Gene oder der Hochregulierung von nativen Genen aus dem FAS-II-Zyklus oder der  $\beta$ -Oxidation, aber auch dem gezielten *metabolic engineering* oder ALE der Zelle zur Erhöhung des Fettsäurespiegels in Betracht gezogen werden (vgl. **Abb. I-6 (A)**). Dieses Edukt könnte vor allem zur stationären Wuchsphase hin, in der sich die Fettsäure-Zusammensetzung der Zellen ändert (Härtig et al., 2005), einen limitierenden Faktor darstellen. Auch die heterologe  $\beta$ -Ketoacyl Reduktase RhlG aus dem FAS-II-Zyklus (homologe Enzym FabG; vgl. **Abb. I-6 (A)**), welche für die Produktion von HAA und damit auch von RL in *P. aeruginosa* von großer Bedeutung ist (Miller et al., 2006), könnte den RL-Titer, produziert durch *P. putida* KT2440, weiter erhöhen.

Abschließend ist der Erfolg der hier durchgeführten sequenziellen Optimierung des Salicylat-induzierbaren RL-Produktionsstammes in **Tab. III-4** dargestellt.

**Tab. III-4: Übersicht der resultierten Produktionsparameter bei der Verwendung der Salicylat-induzierbaren Rhamnolipid-Kassette und einer Induktorkonzentration von 2 mM.**

Kapitel	<i>P. putida</i> -Stamm	$\Sigma$ HAA [g/L]	$\Sigma$ mRL [g/L]	HAA/mRL [%]	$\Sigma$ Biotensid [mM]
III.3.1	KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup>	0,37	0,98	27	3,47
III.3.1	GR <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup>	0,04	1,02	3	2,92
III.3.1.1	EvO <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup>	0,02	0,96	1	2,72
III.3.2	KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> + pVLT33	0,04	0,21	14	0,66
III.3.2	KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> + pVLT33_ <i>rmIBDAC</i>	0	0,42	0	1,17
III.3.2	KT <sub>sal</sub> mRL <sup>E</sup> + pVLT33_ <i>algC</i>	0	0,36	0	1
III.3.2	KT <sub>sal</sub> mRL+Rha	0,14	1,42	7	4,24
III.3.2	KT <sub>sal</sub> mRL+Rha+G1P <sup>F</sup>	<b>0,01</b>	<b>1,45</b>	<b>0</b>	<b>4,06</b>

So konnte gezeigt werden, dass der Biotensid-Titer lediglich in den hier konstruierten genomintegrierten Varianten mit heterologer Expression der Gene *rmIBDAC* und *algC* erhöht wurde. Zudem konnte die HAA-Akkumulation minimiert werden, wodurch ein reineres mRL-Extrakt gewonnen werden kann. Damit schafft *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL+Rha+G1P<sup>F</sup> eine Grundlage für die RL-Produktion, welche wohl trotz Kultivierung im Labormaßstab mit einem Titer von 1,45 g/L bei einer Skalierung (*up-scaling*) wohl nicht mit den in *P. aeruginosa* erzielten bis zu 150 g/L (Fed-Batch-Verfahren; Speiseölaufütterung) konkurrieren kann (Gong et al., 2015; Dobler et al., 2017; He et al., 2017). Dennoch bietet das entstandene *Cargo* eine Grundlage für weiterführende Optimierungen, um die RL-Produktion in der versatilen und nicht-pathogenen *P. putida*-Plattform als

nachhaltige Alternative für Erdöl-basierten Tensiden in einem prozessrelevanten Maßstab zu ermöglichen.

**Zusammenfassung | Heterologe Expression zur Bereitstellung von dTDP-L-Rhamnose**

- (1) Die Verwendung von Plasmiden zur heterologen Koexpression relevanter Edukt-Synthasen führte zu einem rapiden Verlust der Expressionsstärke des *rhlAB*-Operons einhergehend mit einer massiven Minderung des Produktionstiters.
- (2) Die beste Strategie zur Erhöhung des Biotensid-Titers bei gleichzeitiger vollständiger Konversion von HAA zu mRL stellte die genomintegrierte heterologe Koexpression von Genen, die für die Proteine AlgC und RmlBDAC kodieren, in *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL+Rha+G1P dar. Hierdurch konnte bei einer Induktorkonzentration von 2 mM Salicylat ein HAA-bereinigtes mRL-Produkt mit einem Titer von 1,45 g/L erreicht werden.

### III.4 Ansatzpunkte zur zukünftigen Weiterentwicklung der *Pseudomonas putida* Rhamnolipid-Plattform

Um die *P. putida* KT2440 Zellfabrik für die RL-Produktion zu optimieren, wurden auf Basis der hier konstruierten Werkzeuge (III.1) stabile Produzenten mit unterschiedlichen Promotoren konstruiert und validiert sowie in Bezug zum resultierenden RL-Titer untersucht. Dabei standen besonders die Charakterisierung des Transkriptions-, Stabilitäts-, Produktions- und Induktionsprofils (III.2) sowie die Optimierung des metabolischen Flusses zur Verringerung der HAA-Akkumulation und der Erhöhung des RL-Titers im Vordergrund (III.3). Hierzu wurde die Menge der resultierenden Transkripte in Bezug zur Biosynthese von RL gebracht (III.2.1), die Produktionsstabilität der RL-Produzenten mit dem höchsten resultierenden Titer untersucht (III.2.2) und die Induktions- und Produktionsprofile verschiedener induzierbarer Promotoren bewertet (III.2.3). Zudem wurde die Salicylat-induzierbare RL-Kassette in einer metabolisch optimierten Mutante integriert (III.3.1) und deren Stresstoleranz evaluiert (III.3.1.1). Weiterhin wurde die genomintegrierte Koexpression der heterologen Gene aus *P. aeruginosa* zur verbesserten Bereitstellung des Eduktes dTDP-L-Rhamnose vorgenommen (III.3.2).

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte hinsichtlich Aufwand und Erfolg in Bezug auf die Salicylat-induzierbare Genexpression, mögliche Optimierungen und Erweiterungen sowie auf den grundsätzlichen Einsatz dieses Stammes in Bezug auf die Skalierung der Produktion beurteilt. Zusätzlich wurden in Kooperation mit dem G2L-Göttingen Ergebnisse aus einem Transkriptomdatensatz evaluiert und die möglichen Herausforderungen der Skalierung der Produktion anhand von Beispielen aus der Literatur diskutiert. Abschließend sollen anhand von alternativen *rhl*-Biosynthesegenen die Limitierungen der Produktion der RL, ausgehend vom Genom und der Salicylat-induzierbaren Expression, aufgezeigt und Blicke auf zukünftige Perspektiven zur Etablierung von maßgeschneiderten Biotensiden vorgestellt werden.

#### III.4.1 Evaluierung der *Pseudomonas putida* Zellfabrik zur weiteren Optimierung der Rhamnolipid-Produktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zur Konstruktion geeigneter heterologer *P. putida* KT2440 RL-Produzenten eine *toolbox* zur effektiven Klonierung bzw. zur Integration der *rhlAB*-Gene aus *P. aeruginosa* PAO1 in die *attTn7*-Stelle im Genom (III.1.1) und eine Methode – der *VPBO*-Assay (III.2.1.1) – etabliert werden, mithilfe derer ein *pool* an interessanten Produzenten mit unterschiedlichen Promotoren gewonnen werden konnte (III.2). Dieser *pool* an vielversprechenden Produktionsstämmen wurde sequenziell auf Ebenen der Transkription, der Produktionsstabilität, der Induktion und des resultierenden RL-Titers hin untersucht und mit bekannten Referenzstämmen aus der Literatur verglichen (III.2.1-3).

Ein Vergleich verschiedener Promotoren stellt hierbei eine sinnvolle Strategie zur Optimierung der resultierenden Expression und ggf. des entstehenden Produkttiters dar. Beispielsweise konnte Zobel

et al., 2015 eine Bibliothek an unterschiedlichen synthetischen Promotoren anhand der Expression von GFP und ihrer resultierenden Fluoreszenz evaluieren und die entsprechende Expressionsstärke bewerten (s. a. Köbbing et al., 2020). Dass der Vergleich verschiedener Promotorsysteme zur Optimierung der heterologen Naturstoffsynthese sinnvoll ist, wies auch Gemperlein et al., 2017 für die Coronatin-Produktion in *P. putida* KT2440 nach. Hier zeigte sich, dass die Verwendung des induzierbaren  $P_M/XylS$  (vgl. **Tab. I-2**) Promotorsystems zu einer schlechteren Produktion von Coronatin führte und dass die Expression der kodierenden Gene ausgehend von einem konstitutiv aktiven Promotor in diesem Zusammenhang erstrebenswerter ist. Weiterhin setzte Wittgens, 2013 die Strategie der Erstellung und Durchmusterung einer synthetischen Promotorbibliothek zur Optimierung des RL-Titers ein. Durch Plasmid-basierte Expression ausgehend von der dort konstruierten  $P_{syn}$ -Promotorbibliothek konnte diese evaluiert werden, sodass die geeignetsten Verwendung in Plasmiden wie pSB01, pWJ02 und pPS05 (Tiso et al., 2016, 2017b) fanden (ähnliches Konzept s. a. Wigneswaran et al., 2016).

Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen (III.2.1-2; III.3.2) gezeigt werden, dass die Plasmid-basierte Expression der *rhl*-Gene, hier repräsentativ anhand des *P. putida* KT2440 pPS05 (Tiso et al., 2016) gezeigt, nicht geeignet zur Generierung eines robusten Produktionsstammes ist. Durch Plasmid-basierte *rhlAB*-Expression konnten zwar hohe Transkriptionslevel im Vergleich zu den hier konstruierten Stämmen mit genomintegrierten Expressionskassetten erreicht werden (**Abb. III-9**), die jedoch im Vergleich zu einigen dieser Stämme ( $KT_{mt}mRL^E$ ,  $KT_{sal}mRL^E$ ,  $KT_{ffg}mRL^E$ ) mit einem deutlich geringeren Biotensid-Titer einhergingen.

Diese starke Plasmid-basierte Überexpression, vermutlich bedingt durch die konstitutiv aktive Expression des stark synthetisch optimierten Promotors sowie der hohen Kopienzahl des Plasmides und somit der Gene, könnte die Bildung von *inclusion bodies* fördern. So könnten die Rhl-Proteine aufgrund der erhöhten Konzentration eher zur Aggregation neigen, welches durch den Austausch des Promotors durch eine schwächere Variante ggf. behoben werden könnte (s. a. Wittgens, 2013). Die Bildung von *inclusion bodies* ist sehr gut erforscht und kann zu einer starken Inhibierung der zu katalysierenden Reaktion führen (Kopito, 2000). *Inclusion bodies* können aber auch gezielt als enzymatische Plattformen für die Darstellung vollständiger Biosynthesewege dienen (Krauss et al., 2017) und bei entsprechender Optimierung eine interessante Grundlage für die *in vitro* Biokatalyse zur Bildung von RL (Magario et al., 2009; Gehring et al., 2016) sein.

Ein anderer Grund für den geringen Titer trotz eines hohen Transkriptionslevels könnte der Verlust des Plasmides in einigen Zellen aufgrund der stochastischen Ungleichverteilung während der Zellteilung sein (Nora et al., 2019). Auf einer geringen Zeitskala konnte hier (vgl. III.2.2; **Abb. III-11**) gezeigt werden, dass eine Heterogenität der RL-Produktion zu beobachten ist, die dazu führt, dass die mRL-Produktion trotz weiterer Kultivierung auf selektivem LB-Agar rapide verloren geht. Dieses weitere Wachstum unter selektiven Bedingungen ist überraschend und könnte an den bereits postulierten möglichen Mutationen in den essenziellen Biosynthesegenen oder regulatorischen DNA-Abschnitten liegen (vgl. III.2.2; Peng und Liang, 2020). Es könnte aber auch ein Indiz für die

spontane Rekombination des Plasmides durch den erzeugten metabolischen Stress, ausgehend von Plasmid und RL-Produktion, in das Genom der Wirtszelle sein. Zusätzlich konnte die metabolische Last ausgehend vom Plasmid auch bei der simplen Integration und Beibehaltung eines Leervektors in den rekombinanten Rhamnolipid-produzierenden Stämmen beobachtet werden (vgl. III.3.2; **Abb. III-16**). Hierbei nahm die Expressionsleistung der genomisch-integrierten *rhlAB*-Gene ab. Umso erstaunlicher ist, dass in nahezu allen der bisher etablierten rekombinanten RL-Produzenten (**Tab. I-3**; Wittgens et al., 2011; Cao et al., 2012; Wigneswaran et al., 2016; Tiso et al., 2016; Noll et al., 2019) die Expression der *rhl*-Gene auf Basis von Plasmiden realisiert wurde.

Hierfür könne verschiedene Gründe vorliegen: So lässt sich die Klonierung und Generierung eines RL-Produzenten vermeintlich viel schneller auf Basis von Plasmiden umsetzen, da die entsprechende Plasmid-*toolbox* zur Manipulation in *P. putida* KT2440 (SEVA; Silva-Rocha et al., 2013) deutlich ausgeprägter und erforschter ist (vgl. I.3.1.1; Loeschcke und Thies, 2020). Zudem lassen sich durch den Einsatz von *broad-host-range* Plasmiden verschiedene Wirte adressieren und durch Plasmide mit unterschiedlichen Kompatibilitäten und Resistenzen auch mehrere Plasmide in einen Stamm integrieren, wodurch eine gewisse Flexibilität des untersuchten Konstrukts gewährleistet werden kann (De Gelder et al., 2008). Weiterhin konnte Beuker et al., 2016a, vermutlich durch geschickte Prozessführung, durchaus mit einem Plasmid-basierten Produktionsstamm hohe RL-Titer (14,9 g/L) erzielen.

Im Hinblick auf einen großskaligen Prozess, bei dem Robustheit (hohe Stresstoleranz), hohe Produkttiter (resultierend aus ausgewogenen Transkriptraten und homogener Expression) und geringe Kosten (keine teuren Additive wie Antibiotika) gefordert werden (Yang, 2007; Henkel et al., 2012), sollte möglichst vom Einsatz von Plasmiden abgesehen werden. Die im Rahmen zweier Arbeiten gemeinschaftlich konstruierte *yTREX-toolbox* (diese Arbeit und Weihmann, nicht veröffentlicht) kann durch ihre Modularität und den Einbezug der Transposasen- oder Interposon-basierten Integration ein Meilenstein für die schnelle Generierung von robusten industriellen Produktionsstämmen sein. Dabei stellt die Integration in die einzigartige *attTn7*-Stelle im Rahmen dieser Arbeit eine wichtige Voraussetzung dar. Sie erlaubt den Vergleich von Transkript- und Produktionsraten (Zobel et al., 2015), hier beispielhaft anhand verschiedener Fluoreszenzreporter (III.3.1.1) und (induzierbarer) Promotoren (III.2.1; III.2.3) gezeigt. Jedoch wäre es für die Weiterentwicklung der heterologen RL-Produktion in *P. putida* KT2440 auch interessant, die Expression an anderen Integrationsorten als der *attTn7*-Stelle zu überprüfen, um Positionseffekte (Sauer et al., 2016; Chaves et al., 2020) in Bezug zur RL-Produktion zu eruieren. So konnte bspw. Domröse et al., 2019 zeigen, dass die Integration des *pig*-Operons in die rRNA-Operons zu einer hohen Produktion des Sekundärmetaboliten Prodigiosin in *P. putida* KT2440 führt (Domröse et al., 2019).

Die konstitutive Produktion von RL, die bspw. durch randomisierte Integration der genetischen Information zur Adressierung eines alternativen Integrationsortes entstehen könnte (Domröse et al., 2017), scheint jedoch, aufgrund des beobachteten Selektionsdrucks durch RL (III.2.2), nicht erstrebenswert zu sein. Dieser Selektionsdruck ausgehend von RL zeigt eindrucksvoll, welchen

Einfluss die genetische Stabilität des Produzenten auf den potenziellen Produktionsprozess haben kann (Peng und Liang, 2020). Die genetische Stabilität, die Stabilität des Transkriptes und die metabolische Robustheit sind somit wichtige Parameter, die bei der Optimierung eines Produzenten betrachtet werden sollten, da es sonst zu negativen Rückkopplungen kommen könnte (Nikel und de Lorenzo, 2018; Martínez-García und de Lorenzo, 2019; Peng und Liang, 2020). In dieser Arbeit konnte anhand des Einfluss der RL-Produktion über mehrere Generationen hinweg (III.2.2) sowie der starken Expression von Genen (III.2.1) und der Supplementation mit dem Induktor Salicylat (III.3.1) gezeigt werden, dass dies den RL-Titer massiv beeinträchtigen kann.

Auf Basis dessen scheinen die induzierbaren Promotoren aufgrund ihrer geringen Basalexpression, der graduellen Steuerung von Expressionsleveln (III.2.3), aber auch der geringen Kosten der Induktoren (**Tab. III-3**), besonders gut geeignet für eine Skalierung des RL-Produktionsprozesses zu sein. Weitere Strategien zur Optimierung, hier beispielhaft anhand der Salicylat-induzierbaren RL-Kassette durch heterologe Produktion bestimmter Edukt-Synthasen gezeigt (III.3.2), konnten im Rahmen dieser Arbeit zur weiteren Erhöhung des resultierenden Produkttiters um 48% auf 1,45 g/L beitragen.

In Zukunft sollte der Fokus zur weiteren Optimierung der *P. putida* KT2440 RL-Plattform auf zwei unterschiedliche Betrachtungsweisen gelenkt werden, die jedoch eng miteinander zusammenhängen und die Kooperation verschiedener Experten auf der Ebene der Mikro- und Molekularbiologie sowie Biotechnologie und Verfahrenstechnik benötigt (Wehrs et al., 2020). Zum einen sollte die Optimierung der Zellmaschinerie und die Aufklärung molekularer Zusammenhänge vorangetrieben, zum anderen sollte die Anpassung und Verbesserung des Produktionsstammes hinsichtlich des großskaligen Produktionsprozesses betrachtet werden (Tiso et al., 2020).

Auf zellulärer Ebene sollte vor allem die Optimierung des metabolischen Flusses sowie die Stabilisierung der DNA-/RNA-Struktur der *rhlAB*-Gene und Transkripte ins Auge gefasst werden, um potenzielle Degradationseffekte (III.2.1) zu minimieren. Weiterhin sollte, wie in dieser Arbeit durch ausgewählte heterologe Gene gezeigt (III.3.2), versucht werden, den Zufluss zu den Vorstufen HAA und dTDP-L-Rhamnose zu verbessern.

Für die Aufklärung weiterer Ansätze zur Optimierung der Salicylat-induzierbaren zellulären Plattform, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Kooperation mit dem G2L, Georg-Augustus-Universität Göttingen eine vollständige Transkriptom-Sequenzierung (RNA-Seq) auf Basis des *P. putida* GR<sub>sal</sub>/mRL durchgeführt (II.1.2; II.2.14; in LB-Medium; Induktion nach 3,5 h mit 2 mM Salicylat; vgl. **Abb. A-7**). Diese sollte zusätzliche Aufklärung zu bislang nicht bekannten Reaktionen dieses genetisch optimierten *P. putida*-Chassis auf die Produktion von RL und die Supplementation von 2 mM Salicylat (vgl. III.3.1.1) mit potenziell nachteiligen Auswirkungen für die Zelle geben. Hierdurch konnten eine Reihe unter diesen Bedingungen stark hochregulierter Gene identifiziert werden, die mögliche Angriffspunkte für weitere Optimierungen darstellen könnten (**Tab. III-5**).

**Tab. III-5: Liste ausgewählter hochregulierter Gene bei Transkriptomanalyse (RNA-Seq) von *Pseudomonas putida* GR<sub>sal</sub>mRL als Antwort auf die Exposition mit Salicylat und Rhamnolipiden.**

Der FC [log] ist ein Maß für die Transkriptänderung auf einer logarithmischen Skala und vergleicht hier *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL mit und ohne Salicylat bzw. mit/ohne RL-Produktion (vgl. **Abb. A-7**). Die hochregulierten Gene wurden auf Basis der Zugehörigkeit der kodierten Proteine zu den folgenden Kategorien ausgewählt: Kat. 1: potenzielle membranassoziierte Transporter-/Exporterproteine, die die Sekretion von RL über die Membran erleichtern könnten. Kat. 2: potenzielle Hydrolasen, die während der rekombinanten RL-Produktion überexprimiert werden und für deren Abbau verantwortlich sein könnten. Kat. 3: potenzielle Enzyme, die mit der Salicylat-Supplementierung assoziiert sind, die für die Induktion der RL-Biosynthese in den verwendeten *P. putida*-Stämmen notwendig ist. Kat. 4: potenzielle Systeme die auf membranaktive Verbindungen wie RL reagieren könnten.

Kat.	Locus	Annotation	Funktion (nach Homologie)	FC [log]
1	PP_4035	<i>transporter, NCS1 nucleoside transporter family</i>	Nukleotid-Transport und -Metabolismus	1,45
1	PP_3803	<i>cation ABC transporter, permease protein, putative</i>	Anorganischer Ionentransport und Metabolismus	2,76
1	PP_3802	<i>cation ABC transporter, ATP-binding protein, putative</i>	Anorganischer Ionentransport und Metabolismus	2,86
1	PP_3801	<i>cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative</i>	Anorganischer Ionentransport und Metabolismus	3,13
1	PP_2454	<i>monosaccharide ABC transporter substrate-binding protein, CUT2 family</i>	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	1,58
1	PP_2388	<i>transporter, LysE family</i>	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	1,25
1	PP_1273	<i>multidrug efflux MFS outer membrane protein, putative</i>	Zellwand/Membran/Hüllen-Biogenese	4,73
1	PP_1272	<i>multidrug efflux MFS membrane fusion protein, putative</i>	Abwehrmechanismen	4,30
1	PP_1123	<i>putative membrane protein</i>	Unbekannt	1,37
1	PP_1122	<i>OmpA family protein</i>	Unbekannt	1,81
1	PP_0701	<i>MFS efflux transporter, putative</i>	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	2,05
2	PP_2051	<i>acetyl-CoA acetyltransferase</i>	Lipidtransport und -stoffwechsel	1,33
2	PP_1894	<i>glutathione S-transferase family protein</i>	Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone	1,32
2	PP_1113	<i>pyridoxal-phosphate dependent enzyme family protein</i>	Aminosäuretransport und -stoffwechsel	1,13
2	PP_1274	<i>short chain dehydrogenase</i>	Lipidtransport und -stoffwechsel	4,71
2	PP_0159	<i>CAIB/BAIF family protein</i>	Lipidtransport und -stoffwechsel	2,61
3	PP_1829	<i>hydrolase, alpha/beta fold family</i>	Lipidtransport und -stoffwechsel	1,20
3	PP_3549	<i>multidrug efflux MFS membrane fusion protein</i>	Abwehrmechanismen/ Resistenz gegen Antibiotika	2,79
3	PP_3165	<i>benzoate MFS transporter BenK</i>	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	1,47
3	PP_2910	<i>L-2-hydroxyglutarate oxidase</i>	Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel	1,22
3	PP_0862	<i>putative hydroxylase</i>	Unbekannt	2,10
3, 4	PP_1270	<i>transcriptional regulator, LysR family, pvdS</i>	Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus	5,23
4	PP_3797	<i>hypothetical protein</i>	Unbekannt	4,81
4	PP_0270	<i>sensor histidine kinase</i>	Signaltransduktion	5,08
4	PP_1812	<i>hypothetical protein</i>	Unbekannt	1,46

Hierbei konnte eine starke Reaktion bei Exposition von *P. putida* KT2440 GR18 mit Salicylat beobachtet werden, (vgl. **Abb. A-7 (C)**). Insbesondere mit der Eisenhomeostase assoziierte Gene bspw. *pvdS* (FC [log] = 5,23) wurden hochreguliert, vermutlich aufgrund des Siderophor-defizienten Stammhintergrundes und der Detoxifikationsreaktion ausgelöst durch den supplementieren Aromaten Salicylat (vgl. III.3.1.1; Heim et al., 2003; Joshi et al., 2014). Diese massive Transkriptomveränderung einschließlich der Hochregulierung vieler Transkriptionsfaktoren und Transportproteine (vgl. **Tab. III-5**; Kat. 3) weist, wie bereits in III.3.1.1 beschrieben, auf einen starken Stress während der Salicylatexposition hin. Potenzielle Decarboxylasen oder Hydroxylasen, wie PP\_0862, könnten zudem ein noch unbekanntes Bindeglied zwischen Salicylat und dem voraussichtlichen Abbauprodukt, Catechol, darstellen (vgl. **Abb. 14 (A)**) und sollten zur Optimierung des Salicylat-Promotorsystems für die Expression in *P. putida* KT2440 weiter evaluiert werden. Weiterhin konnten, durch Vergleich mit dem Kontrollstamm *P. putida* KT2440 GR18 (+ Sal/RL; vgl. **Abb. A-7 (A)**), für den RL-Produzenten *P. putida* GR<sub>sal</sub>mRL einige Gene identifiziert werden, die in Zusammenhang mit der Produktion von RL stehen könnten. Insbesondere die Hochregulierung mutmaßlicher Gene für unspezifische Exportproteine (**Tab. III-5**; Kat. 1) stellt einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Studien zur Sekretion von RL und der Toleranz von *P. putida* KT2440 in

diesem Zusammenhang dar. Letztendlich wird darauf abgezielt, einen Stamm mit verbesserter RL-Sekretion zu konstruieren, da der Mechanismus der Sekretion bislang, selbst in den Ursprungsorganismen (Xavier et al., 2011), nicht aufgeklärt ist. Obwohl lange in vielen RL-Produzenten die im *rhl*-Operon assoziierten Gene als potenzielle Transportproteine für RL in Betracht gezogen wurden, die ggf. für membranständige Proteine/Transporter der MFS (*major-facilitator-superfamily*) kodieren könnten (vgl. **Abb. I-4**; grau), konnte eine essenzielle Funktion im Transport zunächst ausgeschlossen werden (Wittgens, 2013). Im Zusammenhang mit der hier durchgeführten RNA-Seq (**Abb. A-7**; **Tab. III-5**) konnten jedoch in *P. putida* KT2440 einige bislang nicht in Bezug zur Produktion von RL charakterisierte MDR- (*multi drug resistance*)-Proteine in Gegenwart von RL als stark hochreguliert identifiziert werden, bspw. kodiert durch die Gene PP\_1271, PP\_1272 und PP\_1273 (vgl. **Tab. III-5**; Kat. 1). Dieses Operon wurde während der Salicylat-induzierten RL-Produktion bis zum 26-fachen hochreguliert. Die starke Überexpression von Genen, die mit der Eisenhomeostase assoziiert sind, vermutlich erzeugt durch die Exposition mit Salicylat, erschwerte hier jedoch die eindeutige Identifizierung von RL-spezifischen Reaktionen (vgl. **Abb. A-7 (B)**). Das heißt, es ist nicht auszuschließen, dass diese Transkriptveränderung auch auf das Salicylat zurückzuführen sein könnte und somit eine recht unspezifische Stressantwort darstellt. Dies lassen auch Berichte des PP\_1271-3 Operons bei der Involvierung im *p*-Hydroxybenzoat Export aber auch der Toleranz gegenüber Propionat vermuten (Verhoef et al., 2010; Ma et al., 2020). Wie wichtig die Aufschlüsselung solcher Sekretionsphänomene sein kann, zeigte Vrljic et al., 1996 mit der Entdeckung des LysE-Transporters zur Sekretion von L-Lysin, was zu einer fünffachen Erhöhung der sekretierten L-Lysin Menge und der erfolgreichen Etablierung von *Corynebacterium glutamicum* als L-Lysin-Produzent beigetragen hat (Eggeling und Bott, 2005; Brautaset et al., 2017). Ungeachtet dessen sind zusätzlich Strategien zur Verbesserung der Toleranz gegenüber Salicylat, zur Aufschlüsselung und Verbesserung der Sekretion, die Optimierung des metabolischen Flusses sowie der genetischen Struktur der *rhlAB*-Gene und Transkripte zelluläre Ansatzpunkte zur Optimierung des Produzenten.

Ein weiterer Faktor für die Etablierung von *P. putida* KT2440 als Plattform zur Produktion von RL ist die Anpassung des heterologen Produzenten hinsichtlich der Skalierung der Produktion. In großen Bioreaktoren und im letztendlich etablierten Produktionsprozess sind besondere Herausforderungen vorhanden, die ein Produktionsstamm bewältigen muss. Diese wären u. a. für die Produktion von RL die hohe Zelldichte, die starke Schaumbildung durch die akkumulierenden Tenside sowie alternative Substrate und Medien, die aus Kostengründen eingesetzt werden (Henkel et al., 2012, 2017; Müller et al., 2012). So kann bei der Hochzelldichtekultivierung eine Ungleichverteilung von Sauerstoff und Substraten, vor allem bei gleichzeitiger Produktion unter konstitutiv aktiven starken Promotoren und somit einem potenziell höheren Bedarf, enorm werden. Ein *metabolic engineering* hinsichtlich eines optimierten Stoffwechsels und dem *knockout* energieintensiver Stoffwechselwege kann Ressourcen einsparen und sinnvoll für deren Verteilung sein (Wehrs et al., 2019; Ankenbauer et al., 2020).

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte induzierbare RL-Produktion, die zu einer Entkopplung von Biomassebildung und Produktion genutzt werden kann, könnte die RL-Produktion als Stressfaktor

zu Beginn der Kultivierung (z. B. während eines Fed-Batch Verfahrens; Vandermies und Fickers, 2019) minimieren (Delvigne et al., 2017). Weiterhin kann die starke Produktion von RL, verursacht durch hohe Zelldichten und in Kombination mit der Begasung des Mediums, zu einer starken Schaumbildung führen, welche die Prozessführung erheblich erschweren kann (Anic et al., 2018). Aus diesem Grund sind in bisherigen Produktionsprozessen oftmals hohe Mengen Antischaum benutzt worden (Beuker et al., 2016a), der jedoch neben einem immensen Kostenpunkt auch einen Effekt auf die Stressantwort und *fitness* von *P. putida* KT2440 sowie die Produktion von RL haben könnte (Tiso et al., 2017b). Wichtig im Zusammenhang mit der generellen *fitness* und Robustheit von *P. putida* KT2440, aber auch unter ökonomischer Betrachtung, ist die Verwertung des supplementierten Zuckers bzw. die Reaktion auf das bereitgestellte Medium. Um Kosten zu senken, werden oftmals alternative Substrate, bspw. landwirtschaftliche Abfälle, zur Kultivierung verwendet (Banat et al., 2014), die u. a. andere Zucker als die im Labormaßstab verwendete Glucose beinhalten können. So zeigte Bator et al., 2020, dass eine Umprogrammierung von *P. putida* KT2440 durch Integration ganzer zusätzlicher Stoffwechselwege (dort: Weimberg- und Dahms-Weg) und der Adaption des Organismus mittels *adaptive laboratory evolution* (ALE), *P. putida* KT2440 die Möglichkeit gegeben hat, Xylose zu verwerten. Xylose ist bspw. ein Bestandteil in Zuckerrohr-Bagasse, den faserigen Rückständen aus der Zuckergewinnung, und somit ein interessantes Substrat für die Produktion von RL (s. a. Le Meur et al., 2012; Dvořák und de Lorenzo, 2018). Ein wichtiger Aspekt bei der Verwertung von Zuckern ist jedoch die Betrachtung von Ausbeuten und nicht von Titern, da die Evaluierung und Optimierung hinsichtlich der Verwertung einer Kohlenstoffquelle in einem Produktionsprozess stets in Bezug zur eingesetzten Substratmenge genommen werden muss (Marchant und Banat, 2012a; Kumar und Das, 2018). Für alle in diesem Kapitel beschriebenen Prozesse ist es jedoch unabdingbar die Stresstoleranz, generelle *fitness* und den Produkttiter weiterhin im Auge zu behalten, da diese sich, wie in dieser Arbeit gezeigt (III.3.1.1), durch bestimmte vermeintliche Optimierungen verschlechtern können.

Um während der großskaligen Produktion im Bioreaktor die Produktion von RL in Echtzeit verfolgen zu können, wäre die Entdeckung von Biosensoren zur nicht-invasiven Echtzeitüberwachung der Produktbildung ein großer Vorteil. Hierbei sind vor allem Transkriptionsfaktoren interessant, die eine individuelle Antwort auf den nachzuweisenden Metaboliten auslösen (Fernandez-López et al., 2015). So konnten innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Seq (**Abb. A-7**) einige Kandidatengene ermittelt werden (**Tab. III-5**; Kat. 4), die aufgrund ihrer Hochregulierung durch die Produktion von RL Potenzial zur Konstruktion eines Sensors hätten. Dabei ließe sich aus der kodierenden regulatorischen Einheit (z. B. einem Promotor) und einem Fluoreszenzprotein-Gen ein Biosensor entwerfen, der es ermöglichen könnte, die RL-Bildung in Echtzeit zu verfolgen. Dass solche Gene generell existieren, wurde durch die Supplementation von RL in *Bacillus subtilis* gezeigt (Wecke et al., 2011). Im Rahmen der dort durchgeführten Transkriptomanalyse konnte das LiaRS-Zweikomponentensystem als Teil der Antwort auf massiven Membranstress entdeckt werden, welches großes Potenzial zur Etablierung eines solchen Biosensors haben könnte.

Schlussendlich ist ein wichtiger Aspekt bei der Optimierung eines Produktionsstammes sowohl aus prozesstechnischer als auch molekularbiologischer Sicht, die Verbesserung der Qualität der produzierten RL. Neben der Akkumulation von HAA, die eine Verunreinigung des gewünschten Produktes darstellen und den Aufreinigungsprozess (*down-stream processing*) erheblich komplexer machen (Biselli et al., 2020), können auch Abbauprodukte der RL eine Rolle für die Qualität spielen (vgl. I.2.1; Wittgens et al. 2017). In dieser Arbeit konnten die in Wittgens et al., 2017 als RL-Hydrolyseprodukte beschriebene mmRL bei heterologer Expression des *P. aeruginosa rhIAB*-Genclusters nicht beobachtet werden, was vermutlich mit dem starken Überschuss an Glucose und der relativ kurzen Kultivierungsdauer von 24 h zusammenhängt. Jedoch wurde als Quelle für mmRL ein Abbau von mRL durch bislang noch unbekannte Hydrolasen postuliert (Wittgens et al., 2017). Ob dieser Abbau von mRL durch ggf. vorhandene Enzyme auf Basis von Kohlenstoffmangel und somit der aktiven Verstoffwechslung von mRL oder einer eher geringen Enzymaktivität und somit vermutlich erst später in der Kultivierung auftretenden Phänomen beruhen, ist unbekannt. Pseudomonaden wie *P. putida* KT2440 besitzen jedoch viele beschriebene Hydrolasen (Jaeger und Rosenau, 2004), sodass ein möglicher Kandidat dabei sein könnte. Einige Kandidaten konnten in dem oben gezeigten RNA-Seq Datensatz ermittelt werden (vgl. **Tab. III-5**; Kat. 2), sodass durch die Identifikation dieser potenziellen Hydrolase(n), vor allem für andauernde Kultivierungen, z. B. in einem Fed-Batch Verfahren, diese gezielt deletiert werden können, sodass der Abbau von mRL verhindert werden könnte.

Zudem könnte die Entdeckung einer mRL-Hydrolase auch gezielt dazu genutzt werden, modifizierte RL mit neuen Eigenschaften zu kreieren, um das RL Produktportfolio zu erweitern.

#### III.4.2 Maßgeschneiderte Rhamnolipide zur Erhöhung der Produktvielfalt

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Optimierung der mRL-Produktion gesetzt, um Einblicke in die Voraussetzungen eines robusten Produktionsstammes für einen potenziellen Einsatz in einem großskaligen Bioraffinerieprozess zu generieren. Dabei zeigen verschiedene natürliche Produktionsstämme unterschiedliche BSG und daraus resultierend unterschiedliche potenzielle Enzyme zur Produktion und Modifikation von RL (vgl. I.2.1; Germer et al., 2020).

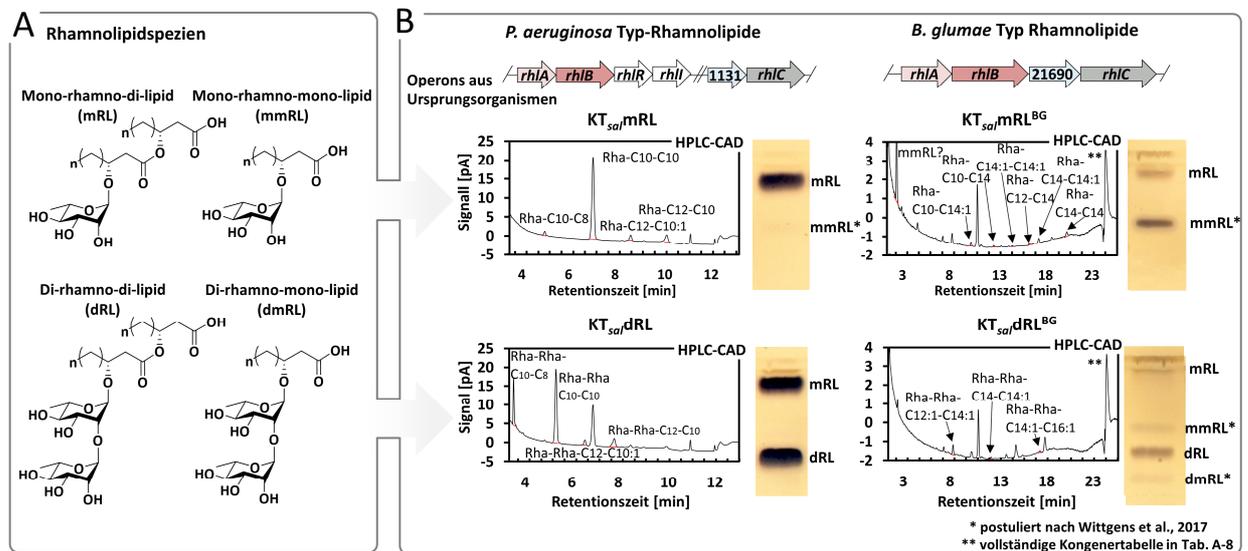
Isolierte RL aus unterschiedlichen Organismen können stark variieren und bestehen aus bis zu zwei L-Rhamnose-Einheiten (hydrophiler Teil) und ein bis zwei Hydroxyalkansäuren (HAA) mit unterschiedlicher Kettenlänge zwischen C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> (hydrophober Teil; I.2.1; Wittgens et al., 2017; Abdel-Mawgoud et al., 2010). Diese strukturelle Vielfalt von RL entsteht durch das Zusammenspiel von drei Enzymen: RhIA ist für die Varianz der Fettsäurekettenlänge und die Produktion von HAA verantwortlich, RhIB fügt den resultierenden HAA das erste L-Rhamnosemolekül hinzu und RhIC katalysiert die Verknüpfung einer zweiten L-Rhamnoseeinheit zu dRL (vgl. **Abb. I-3 (A)**; Dulcey et al., 2019; Abdel-Mawgoud et al., 2010). Zudem wurde beobachtet, dass mRL und dRL, wie bereits diskutiert, durch Abspaltung einer Fettsäure zu mmRL oder dmRL prozessiert werden können (vgl. **Abb. I-4 (A)**; Wittgens et al., 2017). Weiterhin sind aus einigen wenigen Studien O-methylierte, nichtionische RL bekannt (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Es ist zu erwarten, dass verschiedene RL-Spezies und -Kongeneren unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, wobei der Zusammenhang zwischen der Struktur und ihren physiko-chemischen Eigenschaften bislang weitestgehend unklar ist. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass das unterschiedliche Packungsverhalten sowie die Assoziation in Mizellen ausgehend von einer differenziellen sterischen Hinderung des hydrophoben und hydrophilen Teils, welche die Größe, die Ladung und die Länge dieser Komponenten beinhaltet, zu unterschiedlichen tensidischen Eigenschaften, wie z. B. der CMC, führen können, wodurch spezifische Anwendungen ermöglicht werden (Berti et al., 2011; Baccile et al., 2019; Herzog et al., 2020).

Ein potenzieller Produzent für methylierte RL konnte mit *Burkholderia lata* 383 in der assoziierten Bachelorarbeit von Lisa-Marie Kirschen untersucht werden. Dieser besitzt ein *rhl*-Operon inklusive eines putativ für eine Methyltransferase kodierenden Gens zwischen *rhlA* und *rhlB* (vgl. **Abb. I-4 (C)**; Kirschen, 2018), und könnte ein interessanter Kandidat für die Bildung von O-methylierten RL sein. Der Stamm, der bis dahin nicht als Biotensid-Produzent beschrieben wurde, konnte durch Kultivierung mit 1% Olivenöl zur Produktion eines vermutlichen Glycolipids (nachgewiesen über Orcinolfärbung; vgl. **Abb. I-2**) angeregt werden, welches sich in der chromatographischen Auftrennung von den bislang bekannten RL unterschied. Jedoch führte die Plasmid-basierte Koexpression der Methyltransferase aus diesem *rhl*-Operon in *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL nicht zu einer beobachtbaren Methylierung der produzierten mRL (Kirschen, 2018). Dies könnte aber auch an der nicht ausreichenden Expression oder den zuvor beschriebenen Effekten, die bei der Plasmid-basierten Expression von Genen auf die RL-Produktion auftreten können, liegen (III.4.1). Gleichwohl ist die Investigation potenzieller O-methylierter RL aufgrund der fehlenden Ladung und einer potenziell milderer Tensidwirkung (u. a. bei Menschen-nahen Anwendungen relevant; vgl. **Tab. I-1**; Kumar und Rajeshwarao, 2011) interessant. Neben *B. lata* zeigen weitere (u. a. opportunistisch pathogene) RL-Produzenten wie *Burkholderia ambifaria* oder *B. cenocepacia* (vgl. **Abb. I-4 (C)**; Germer et al., 2020) ebenfalls solche potenziellen Methyltransferasegene im *rhl*-Operon, die in zukünftigen Studien untersucht werden könnten.

Da diese Arbeit eindrucksvoll das Potenzial des Salicylat-induzierten Promotorsystems zur Expression der *rhl*-Gene aus *P. aeruginosa* und der heterologen mRL-Produktion zeigte, wurde ebenfalls in Kirschen, 2018 ein *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL<sup>BG</sup>-Stamm konstruiert, der die *rhlAB*-Gene aus *B. glumae* beinhaltet. Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Stamm *P. putida* KT<sub>sal</sub>dRL (s. III.1.1; **Tab. II-1-3**) generiert. Zudem wurde im Rahmen der assoziierten Masterarbeit durch Sabrina Linden (noch nicht veröffentlicht) das *rhlABC*-Operon aus *B. glumae* zur Konstruktion des Stammes *P. putida* KT<sub>sal</sub>dRL<sup>BG</sup> verwendet. Zur Betrachtung der unterschiedlichen Biotenside wurden in der Arbeit (Linden, IMET, nicht veröffentlicht) *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL, KT<sub>sal</sub>dRL, KT<sub>sal</sub>mRL<sup>BG</sup> und KT<sub>sal</sub>dRL<sup>BG</sup> kultiviert (LB-Medium + 10 g/L Glucose) und die RL-Spezies durch Extraktion der Überstände gewonnen. In einer DC (II.3.10) mit anschließender Orcinolfärbung, sowie durch den Vergleich mit Extrakten aus den produzierenden Ursprungsorganismen, konnten die Spezies analysiert und zugeordnet werden (Linden, IMET, nicht veröffentlicht). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit Isabel Bator, RWTH Aachen, die Identifikation der

*B. glumae* Typ-Kongeneren durch HPLC-Auftrennung zusammen mit MS-Analysen durchgeführt, die durch das Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Universität Münster vorgenommen wurden (**Tab. A-8**; Identifikation der verschiedenen Kongeneren basierend auf durch *rhl*-Expression in *P. putida* KT2440 erhaltenen RL). Hierdurch konnten Chromatogramme aufgezeichnet und in Zusammenarbeit sowie nach Wittgens et al., 2017 den Kongeneren und Spezies zugeordnet werden (**Abb. III-17**).



**Abb. III-17: Produktion alternativer Rhamnolipide durch Salicylat-induzierte heterologe Genexpression in *Pseudomonas putida*.**

Die verschiedenen RL-Spezies und -Kongeneren (**A**) konnten in Extrakten aus rekombinanten *P. putida*  $KT_{sa}mRL$ ,  $KT_{sa}dRL$ ,  $KT_{sa}mRL^{BG}$  und  $KT_{sa}dRL^{BG}$  mittels MS-Analysen und HPLC-CAD analysiert und zugeordnet werden (**B**; In Kooperationsarbeit durch Vergleich mit Referenzstandards; s. a. **Tab. A-8**; Extrakte aus Linden, nicht veröffentlicht). Während im *P. putida*  $KT_{sa}mRL$  nur mRL (und HAA – nicht annotiert) mit den Kongeneren Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (Hauptkongener; s. II.3.7) und Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10:1</sub> vorzufinden sind, stellt der *P. putida*  $KT_{sa}dRL$  neben einer großen Menge an mRL (vgl. DC-Ausschnitte; Vergleich mit Referenzstandards erfolgte in Linden, nicht veröffentlicht) auch dRL mit den gleichen Fettsäuren her (und mRL - nicht annotiert). Für die *B. glumae* Typ-RL fällt in der DC auf, dass zum einem eine deutlich geringere Menge Biotensid beobachtet werden kann, sowie vermehrt die RL-Spezies mmRL und dmRL gebildet werden (\*postuliert nach Wittgens et al., 2017). Die identifizierbaren (s. a. **Tab. A-8**) *B. glumae* Typ-mRL- und dRL-Kongeneren sind Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>14:1</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>, Rha-C<sub>14:1</sub>-C<sub>14:1</sub>, Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>, Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14:1</sub>, Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> für *B. glumae*-Typ mRL und Rha-Rha-C<sub>12:1</sub>-C<sub>14:1</sub>, Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14:1</sub> und Rha-Rha-C<sub>14:1</sub>-C<sub>16:1</sub>.

Hierbei konnten unterschiedliche RL-Spezies (vgl. **Abb. III-17 (A)**) durch Salicylat-induzierte heterologe Expression gewonnen werden (vgl. **Abb. III-17 (B)**). Für *P. putida*  $KT_{sa}dRL$  konnte wie im Ursprungorganismus *P. aeruginosa* auf diese Weise eine Mischung aus mRL und dRL (sowie HAA) mit einem Verhältnis von HAA:mRL:dRL von 1:4,7:4 produziert werden (Kongeneren vgl. **Tab. A-8**; Titer vgl. **Tab. A-9**). Diese Verteilung der Spezies könnte mit der in Wittgens et al., 2017 postulierten langsameren Enzymkinetik von RhlC im Vergleich zu dem Protein RhlB zusammenhängen. Die Zusammensetzung der Kongeneren variierte zwischen den *P. aeruginosa* Typ-mRL und Typ-dRL nicht, C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> stellte wie bereits beschrieben das Hauptkongener dar (Behrens et al., 2016a).

Es wird vermutet, dass das Spektrum der Fettsäure-Kongeneren abhängig von der Spezifität des RhlA-Proteins ist (Dulcey et al., 2019; Germer et al., 2020). Die hier produzierten RhlA-Enzyme aus *P. aeruginosa* und *B. glumae* besitzen dabei lediglich eine Identität von 40% (vgl. I.2.1; Wittgens, 2013). So konnten im Fall der Expression der *B. glumae* Typ-*rhlABC*-Gene die erwarteten Hauptkongeneren Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14:1</sub> und Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> (und weitere) identifiziert werden (Germer et al., 2020; vgl. **Abb. I-4**) und eine nahezu vollständige Umsetzung in dRL, welche ebenfalls im

Ursprungsorganismus *B. glumae* beobachtet werden kann (Costa et al., 2011). Dadurch dass die Verfügbarkeit von Fettsäuren im Stammhintergrund eine große Bedeutung für die resultierenden RL besitzt (Bukavaz, 2015; Dulcey et al., 2019), ist es auch möglich, dass in *P. putida* KT2440 nicht ausreichend langkettige Fettsäuren vorhanden sind (Wittgens et al., 2017; Wittgens, 2013).

Dies könnte auf eine physiologische Rolle zurückzuführen sein. So könnte die Produktion von *B. glumae* Typ-mRL und -dRL in *P. putida* KT2440 toxisch für diesen Organismus sein, dass auch die eingeschränkte Produktion von *B. glumae*-Typ mRL erklären könnte (vgl. **Abb. III-17 (B)**). Hierbei ist eine höhere Toxizität ausgehend von C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>-Kongeneren möglich, da mit zunehmender Kettenlänge die Wasserlöslichkeit sinkt (Jovanovic et al., 2019; vgl. **Tab. A-10**) und die weniger löslichen RL die Stabilität der Zellmembran beeinflussen könnten (Heipieper et al., 2010). Dies würde auch mit den Berichten eines reduzierten Wachstums von *P. putida* KT2440 bei Produktion von *B. glumae*-Typ RL übereinstimmen (Kirschen, 2018). Somit könnte es sein, dass *P. putida* KT2440 für die großskalige Produktion langkettiger RL-Varianten ungeeignet ist.

Verschiedene Strategien zur Optimierung könnten hier angewendet werden, um diese Limitierung zu adressieren. Zum einen könnte untersucht werden, ob die gezielte Deletion von Biosynthesewegen, die in Konkurrenz um die Fettsäuren stehen, zu einer Erhöhung von C<sub>14</sub> Fettsäuren führt (z. B. durch Deletion der PHA-Biosynthese; Tiso et al., 2020). Zum anderen könnte die gezielte Zufütterung von Fettsäuren, wie der bereits in Occhipinti et al., 2018 als limitierend beschriebenen Myristinsäure (C<sub>14</sub>), die als Kohlenstoffquelle die RL-Produktion in *P. putida* KT2440 anregen soll, ebenfalls einen positiven Effekt speziell auf die Produktion langkettiger RL in diesen Stämmen haben. Darüber hinaus könnte auch der Austausch der Gene, bspw. aus den beschriebenen RL-Produzenten *Halomonas* sp. oder *B. ambifaria* (vgl. **Abb. I-4 (C)**; Germer et al., 2020), durch die Bereitstellung alternativer Kongenere interessant sein. Alternative Kongenere könnten sich durch potenzielle Methylierungen oder Sättigungsgrade positiv auf die Löslichkeit auswirken (**Tab. A-10**) und somit die Toxizität der resultierenden Mizellen verringern, was wiederum einen positiven Effekt auf die Produktion langkettiger RL ausüben könnte. Die yTREX-*toolbox*, mit dem modularen Aufbau der grundlegenden Kasette (III.1.1; Kooperationsprojekt, nicht veröffentlicht), sowie der Hochdurchsatz-fähige VPBO-Assay (III.1.2; Kubicki et al., 2020) könnten ideale Werkzeuge sein, um eine solche Validierung verschiedener Biosyntheseenzyme auch in Kombinationen effizient durchzuführen. Schließlich könnte durch den einfachen Transfer über Konjugation und die Kompatibilität der *attTn7*-Integration vermittelnden yTREX-*toolbox* (III.1.1) mit anderen Produktionswirten über die in vielen Bakterien enthaltene *attTn7*-Stelle (Choi et al., 2005) auch alternativ ein beliebiger anderer Produktionswirt hinsichtlich der Produktion von solchen langkettigen RL untersucht werden.

Zudem konnte die chromatographische Auftrennung in der DC (Orcinolfärbung; Linden, nicht veröffentlicht) und die Annotation in Anlehnung an Wittgens et al., 2017 sowohl bei den Stämmen KT<sub>sal</sub>mRL<sup>BG</sup> als auch KT<sub>sal</sub>dRL<sup>BG</sup> (**Abb. III-17 (B)**) einen Hinweis für die postulierten RL-Spezies mmRL und dmRL geben. Dies und die Beobachtung, dass der Stamm KT<sub>sal</sub>mRL<sup>BG</sup> eine andere Kongenerverteilung als KT<sub>sal</sub>dRL<sup>BG</sup> (**Abb. III-17 (B)**) besitzen könnte, könnte dies darauf hinweisen,

dass das für den Abbau von RL verantwortliche Enzym in *P. putida* KT2440 eine höhere Spezifität für langkettige Fettsäuren aufweist und es sich somit um eine Lipase handelt (Wittgens, 2013). Die Identifizierung des Enzyms, welches den Abbau von bevorzugt langkettigen RL katalysiert, könnte das Ziel weiterer Untersuchungen sein und ein Instrument zur Erweiterung des Produktportfolios von RL (Designer-Rhamnolipide) darstellen. Hierzu kann der RNA-Seq Datensatzes (**Abb. A-7; Tab. III-5**; Kat. 2) beitragen, indem gezielte Deletionen potenzieller Hydrolase-Gene, die mit der RL-Produktion assoziiert sein könnten, vorgenommen werden.

Neben der Produktion spezieller RL-Kongenerer auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit könnte aber auch die gezielte Erzeugung von Mischungen oder reinen Spezies mit unterschiedlichen Eigenschaften interessant für zukünftige biotechnologische Anwendungen sein. Durch solche Studien könnten zusätzliche grundlegende Kenntnisse über das Struktur-Funktions-Zusammenspiel erlangt werden (Wittgens, 2013; Tiso et al., 2017b; Rocha et al., 2020). Beispielsweise könnte die selektive Trennung von mRL, dRL und HAA durch Expression von *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* unter anderem aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen und getrennt voneinander unter Kontrolle von verschieden-starken Promotoren bewerkstelligt werden (Du et al., 2017). So könnten ausschließlich dRL durch die Verwendung eines eher schwächeren Promotors für *rhIB* und eines deutlich stärkeren für *rhIC* (oder alternativ eines RhIC mit höherer Enzymaktivität; vgl. Wittgens, 2013), zusammen mit der Koexpression von *algC* und *rmIBDAC*, um die vollständige Umsetzung von HAA zu gewährleisten, erzeugt werden. Dieses Konstrukt könnte sequenziell in der *γ*TREX-*toolbox* Kasette aufgebaut und anschließend stabil in das Genom integriert werden. Aber auch die Änderungen von Stoffwechselflüssen, bspw. durch Deletion von ganzen Biosynthesewegen (vgl. III.3.1), kann z. B. die Konversion von HAA zu mRL fördern und somit eine alternative RL-Mischung und unterschiedliche Mizellen mit diversen interessanten physiko-chemischen Eigenschaften (Tiso et al., 2017b) erzeugen.

Schlussendlich könnten die Ergebnisse aus solchen potenziellen Untersuchungen dazu dienen, die Grundlage dafür zu legen, eine noch breitere Wissensplattform für die Entwicklung von Strategien zur Herstellung und Aufreinigung von maßgeschneiderten RL zu schaffen. Dadurch könnte die Marktdurchdringung von RL, als nachhaltige Alternative zu petrochemischen Tensiden, ermöglicht werden.

### **Zusammenfassung | Ansatzpunkte zur Verbesserung der Rhamnolipid-Plattform**

- (1) Potenzielle Herausforderungen in der zukünftigen Optimierung der *P. putida* KT2440 Rhamnolipid-Fabrik liegen zum einen in der weiterführenden Optimierung des RL-Titers, zum anderen in der Anpassung der zellulären Plattform bezüglich prozessrelevanter Eigenschaften. Auf Basis der hier durchgeführten Transkriptomanalyse des Produzenten GR<sub>sal</sub>mRL konnten potenzielle Angriffspunkte diskutiert werden.
- (2) Die Produktion alternativer Kongenere/Spezies und Mischungen durch Verwendung bspw. alternativer *rhl*-Gene, hier anhand der zusätzlichen Expression von *rhlC* gezeigt, können dazu beitragen, maßgeschneiderte Rhamnolipide zur Erhöhung des Anwendungspotenzials zu generieren.

## IV Zusammenfassung

Rhamnolipide sind mikrobielle Tenside, die aufgrund vielversprechender Eigenschaften als Alternative zu den kommerziell weit verbreiteten Erdöl-basierten Tensiden angesehen werden. Die biotechnologische Anwendbarkeit von Rhamnolipiden wird derzeit unter anderem durch die natürliche komplexe Regulation der Biosynthese, die Pathogenität oder die schwierige technologische Zugänglichkeit von Ursprungsorganismen erschwert. Als vielversprechende Alternative wurde *Pseudomonas putida* KT2440 in der Vergangenheit für die heterologe Produktion von Rhamnolipiden etabliert. Bislang wurden in entsprechenden Studien überwiegend Plasmide mit starken synthetischen Promotoren zur Expression des für die Produktion von Monorhamnolipiden (mRL) kodierenden *rhlAB*-Operons verwendet. Im Gegensatz dazu gelten im Allgemeinen genomintegrierte Expressionskassetten als besser geeignet zur Konstruktion von stabilen Produktionsstämmen. Die Ziele dieser Arbeit bestanden darin, (i) Werkzeuge zur schnellen und effizienten Konstruktion stabiler *P. putida*-Produzenten bereitzustellen, (ii) die Rhamnolipid-Produktion in verschiedenen Stämmen zu charakterisieren, (iii) anschließend den Produktionstitern zu optimieren sowie schließlich (iv) die Breite des Anwendungspotenzials der selektierten Expressionskassette zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die *attTn7*-Integration vermittelnde Transfer- und Expressions- ( $\gamma$ TREX) *toolbox* entwickelt sowie der Victoria Pure Blue BO-Assay zur Tensid-Detektion etabliert. Diese neuen Werkzeuge ermöglichten die effektive Konstruktion eines Sets an Stämmen mit neuen Expressionskassetten und die in dieser Form erstmalig durchgeführten komparativen Expressionsstudien mit verschiedenen Promotoren zur Untersuchung von deren Einfluss auf die Genexpression, Stammstabilität, Produktivität und den Rhamnolipid-Titer (i). Bemerkenswerterweise ging bei der Verwendung starker, konstitutiver Promotoren die Fähigkeit zur Bildung von Rhamnolipiden verloren, was auf einen negativen Selektionsdruck durch Rhamnolipid-Produktion hindeutete. Die Induktor-gesteuerten Expressionssysteme, hier erstmalig im Kontext der Rhamnolipid-Biosynthese angewendet, zeigten dagegen eine effiziente Zielgenexpression verbunden mit einer herausragenden Stabilität der Produktionsstämme (ii). Insgesamt führte das Salicylat-induzierbare,  $P_{nagAa}$ -vermittelte *rhlAB*-Expressionssystem zu den besten Produktionseigenschaften. Die Optimierung des Rhamnolipid-Titers und die vollständige Umsetzung der Vorstufe HAA konnte durch Verwendung eines genomreduzierten Stammhintergrunds, und auch durch heterologe Koexpression relevanter Edukt-Synthasen erreicht werden. Im (Mikro-)Batch-Maßstab zeigte der finale Produzent *P. putida* KT<sub>sa</sub>mRL+Rha+G1P einen mRL-Titer von 1,45 g/L bei einer Induktorkonzentration von 2 mM Salicylat (iii). Abschließend konnte die breitere Anwendbarkeit dieses Expressionssystems durch Produktion von unterschiedlichen Rhamnolipid-Kongeneren gezeigt werden (iv).

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine Induktor-basierte Expression von stabil in das bakterielle Genom integrierten *rhlAB*-Genen und eine damit vielversprechende Rhamnolipid-Produktion gezeigt werden. Die neu konstruierte Expressions-

*toolbox* sowie der *VPBO*-Assay tragen auch über die konkrete Anwendung in diesem Kontext hinaus zur Etablierung von mikrobiologisch produzierten Sekundärmetaboliten als ein Baustein auf dem Weg zu einer Bio-basierten Ökonomie bei.

## V Summary

Rhamnolipids are microbial surfactants considered to be an alternative for commercially widespread petroleum-based surfactants due to their promising properties. Their origin from opportunistically human pathogenic producers and the complex regulation of rhamnolipid production poses a challenge in the establishment of production processes. *Pseudomonas putida* KT2440 has emerged as an alternative heterologous production host for rhamnolipids exhibiting promising properties with respect to the rhamnolipid tolerance and yields. Most studies so far applied plasmids with strong synthetic promoters for the expression of the monorhamnolipid biosynthesis genes *rhlAB*. On the contrary, genome-integrated expression cassettes are considered more suitable for the construction of stable production strains in general. The aims of this thesis were to (i) provide tools for the rapid and efficient construction of stable *P. putida* rhamnolipid producer strains, (ii) characterize rhamnolipid production in different strain, (iii) optimize the production titers and (iv) evaluate the further application potential of the best-performing cassette.

Within the scope of this work, the attTn7 integration mediating transfer and expression- (yTREX) toolbox was developed and the Victoria Pure Blue BO- (VPBO) assay for surfactant detection was established. These new tools allowed the effective construction of a set of strains with new expression cassettes and for the first time performed comparative expression studies with different promoters to investigate their influence on *rhlAB* expression, strain stability, productivity, and product titers (i). Remarkably, expression controlled by strong constitutive promoters evoked a rapid loss of rhamnolipid formation capacity; apparently because rhamnolipid production might exert a negative selection pressure. In contrast, the tested inducer-controlled expression systems, here applied for the first time in the context of rhamnolipid biosynthesis, lead to high-level expression of target genes and improved strain stability (ii). Comparative studies revealed that the salicylate-inducible  $P_{nagAa}$ -controlled expression system resulted in highest product titers. The optimization of the rhamnolipid titer and the almost complete conversion of the precursor HAA could be achieved by using a genome-reduced strain background as well as by the genome-integrated heterologous co-expression of relevant precursor synthases. At micro-fermentation scale, the final producer strain *P. putida* KT<sub>sal</sub>mRL+Rha+G1P yielded an mRL titer of 1.45 g/L at an inducer concentration of 2 mM salicylate (iii). Finally, the broader applicability of this expression system was shown by production of different rhamnolipids in terms of chain length and rhamnose residues (iv).

In summary, the present work demonstrated for the first time an inductor-based expression of *rhlAB*-genes which were stably integrated into the bacterial genome and a promising rhamnolipid production could be achieved. The here developed expression toolbox and the VPBO-assay may also contribute to the establishment of microbiologically produced secondary metabolites as a building block on the road to a bio-based economy beyond the mere development of rhamnolipid producers.

## VI Literaturverzeichnis

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., García, F. und Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17, 1367–1371.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. und Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323–1336.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. und Déziel, E. (2014). A stereospecific pathway diverts  $\beta$ -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem. Biol.* 21, 156–164.
- Adams, T. M., Wentzel, A. und Kolmar, H. (2005). Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation. *J. Bacteriol.* 187, 522–533.
- Ademakinwa, A. N., Ayinla, Z. A. und Agboola, F. K. (2017). Strain improvement and statistical optimization as a combined strategy for improving fructosyltransferase production by *Aureobasidium pullulans* NAC8. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15, 345–358.
- Adkins, S. und Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: Applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal. Biochem.* 240, 17–23.
- Afroz, T., Biliouris, K., Boykin, K. E., Kaznessis, Y. und Beisel, C. L. (2015). Trade-offs in engineering sugar utilization pathways for titratable control. *ACS Synth. Biol.* 4, 141–149.
- Afshar, S., Lotfabad, T. B., Roostaazad, R., Najafabadi, A. R. und Noghabi, K. A. (2008). Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. *Ann. Microbiol.* 58, 555–559.
- Aguirre-Ramírez, M., Medina, G., González-Valdez, A., Grosso-Becerra, V. und Soberón-Chávez, G. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* *rmlBDAC* operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor  $\sigma^S$ . *Microbiology* 158, 908–916.
- Ahuja, K. und Singh, S. (2019). Biosurfactants market size by product (sophorolipids, rhamnolipids, alkyl polyglucosides [APG], methyl ethyl sulfonates [MES], sucrose esters, sorbitan esters, lipopeptides), by application (household detergents, personal care, industrial cleaners, food processing, oilfield chemicals, agricultural chemicals, textiles), industry outlook report, regional analysis, application potential, price trends, competitive market share & forecast, 2019 – 2025. Global Market Insights Inc. Report-ID: GMI484.
- Akkaya, Ö., Pérez-Pantoja, D. R., Calles, B., Nickel, P. I. und de Lorenzo, V. (2018). The metabolic redox regime of *Pseudomonas putida* tunes its evolvability toward novel xenobiotic substrates. *MBio* 9, 1–16.
- Akondi, K. B. und Lakshmi, V. V. (2013). Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *Omi. A J. Integr. Biol.* 17, 61–70.
- Al-Sulaimani, H., Joshi, S., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A. und Al-Bemani, A. (2011). Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. *Biotechnol. Bioinforma. Bioeng.* 1, 147–158.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. und Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3262–3268.
- Aleksic, I., Petkovic, M., Jovanovic, M., Milivojevic, D., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J. und Senerovic, L. (2017). Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front. Microbiol.* 8, 2454.
- Allard, S. T. M., Giraud, M.-F., Whitfield, C., Graninger, M., Messner, P. und Naismith, J. H. (2001). The crystal structure of dTDP-glucose 4,6-dehydratase (RmlB) from *Salmonella enterica* serovar typhimurium, the second enzyme in the dTDP-L-rhamnose pathway. *J. Mol. Biol.* 307, 283–295.
- Amani, H. und Kariminezhad, H. (2016). Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation. *Pet. Sci. Technol.* 34, 216–222.
- Amarelle, V., Sanches-Medeiros, A., Silva-Rocha, R. und Guazzaroni, M.-E. (2019). Expanding the toolbox of broad host-range transcriptional terminators for proteobacteria through metagenomics. *ACS Synth. Biol.* 8, 647–654.
- Amit, R. (2012). Towards synthetic gene circuits with enhancers: Biology's multi-input integrators, In: *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*, Ed. Wang, X., Chen, J. und Quinn, J. P., Springer Netherlands, Dordrecht, Niederlande. pp 3–20.
- Anic, I., Apolonia, I., Franco, P. und Wichmann, R. (2018). Production of rhamnolipids by integrated foam adsorption in a bioreactor system. *AMB Express* 8, 122.
- Ankenbauer, A., Schäfer, R. A., Viegas, S. C., Pobre, V., Voß, B., Arraiano, C. M. und Takors, R. (2020). *Pseudomonas putida* KT2440 is naturally endowed to withstand industrial-scale stress conditions. *Microb. Biotechnol.* 13, 1145–1161.
- Arnfinnsdottir, N. B., Bjørkøy, A. V., Lale, R. und Sletmoen, M. (2016). Heterogeneity in GFP expression in isogenic populations of *Pseudomonas putida* KT2440 investigated using flow cytometry and bacterial microarrays. *RSC Adv.* 6, 36198–36206.
- Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F. und Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1460–1466.
- Aymoz, D., Wosika, V., Durandau, E. und Pelet, S. (2016). Real-time quantification of protein expression at the single-cell level via dynamic protein synthesis translocation reporters. *Nat. Commun.* 7, 11304.
- 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. und Stevens, C. V. (2019). Asymmetrical, symmetrical, divalent, and Y-shaped (bola)amphiphiles: The relationship between the molecular structure and self-assembly in amino derivatives of sophorolipid biosurfactants. *J. Phys. Chem. B* 123, 3841–3858.

- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J. und Timmis, K.N. (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16, 237–247.
- Bailey, J. E., da Silva, N. A., Peretti, S. W., Seo, J.-H. und Srienc, F. (1986). Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 469, 194–211.
- Baltz, R. H., Miao, V. und Wrigley, S. K. (2005). Natural products to drugs: Daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 22, 717.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. und Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R. und Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Front. Microbiol.* 5, 697.
- Banat, I. M. und Thavasi, R. (2019). Microbial biosurfactants and their environmental and industrial applications. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z. und Rosenberg, E. (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier Alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2697–2702.
- Barth, P. T., Datta, N., Hedges, R. W. und Grinter, N. J. (1976). Transposition of a deoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R483 to other replicons. *J. Bacteriol.* 125, 800–810.
- Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R. und Tótola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/ bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 97, 868–875.
- Bator, I. (2020). Deep genome editing of *Pseudomonas putida* for rhamnolipid production using non-conventional substrates. Dissertation, RWTH-Aachen Universität, Aachen. (Eingereicht)
- Bator, I., Wittgens, A., Rosenau, F., Tiso, T. und Blank, L. M. (2020). Comparison of three xylose pathways in *Pseudomonas putida* KT2440 for the synthesis of valuable products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 480.
- Becker, P. D., Royo, J. L. und Guzman, C. A. (2010). Exploitation of prokaryotic expression systems based on the salicylate-dependent control circuit encompassing *nahR/P<sub>sal</sub>*. *Bioeng. Bugs* 1, 246–253.
- Behrens, B., Baune, M., Jungkeit, J., Tiso, T., Blank, L. M. und Hayen, H. (2016a). High performance liquid chromatography-charged aerosol detection applying an inverse gradient for quantification of rhamnolipid biosurfactants. *J. Chromatogr. A* 1455, 125–132.
- Behrens, B., Engelen, J., Tiso, T., Blank, L. M. und Hayen, H. (2016b). Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/ mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 2505–2514.
- Behrens, B., Helmer, P. O., Tiso, T., Blank, L. M. und Hayen, H. (2016c). Rhamnolipid biosurfactant analysis using online turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1465, 90–97.
- Belda, E., van Heck, R. G. A., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., Klenk, H.-P., Petersen, J., Morgat, A., Nikel, P. I., Vallenet, D., Rouy, Z., Sekowska, A., Martins dos Santos, V. A. P., de Lorenzo, V., Danchin, A. und Médigue, C. (2016). The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ. Microbiol.* 18, 3403–3424.
- Benndorf, D., Thiersch, M., Loffhagen, N., Kunath, C. und Harms, H. (2006). *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. *Proteomics* 6, 3319–3329.
- Bergmans, H. E., van Die, I. M. und Hoekstra, W. P. (1981). Transformation in *Escherichia coli*: Stages in the process. *J. Bacteriol.* 146, 564–70.
- Berti, D., Montis, C. und Baglioni, P. (2011). Self-assembly of designer biosurfactants. *Soft Matter* 7, 7150.
- Bettenhausen, C. (2020). Rhamnolipids rise as a green surfactant. *Chem. Eng. News* 98, 23.
- Beuker, J., Barth, T., Steier, A., Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M. und Hausmann, R. (2016a). High titer heterologous rhamnolipid production. *AMB Express* 6, 124.
- Beuker, J., Steier, A., Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M. und Hausmann, R. (2016b). Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *AMB Express* 6, 11.
- BGR (2020). BGR Energiestudie 2019 - Daten und Entwicklungen der deutschen und globalen Energieversorgung. *BGR Hannover* 23, 1–200.
- Biedendieck, R., Gamer, M., Jaensch, L., Meyer, S., Rohde, M., Deckwer, W.-D. und Jahn, D. (2007). A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* 132, 426–430.
- Binder, D. (2016). Photocaged compounds as versatile tools for light-controlled gene expression in bacteria. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Binder, D., Bier, C., Grünberger, A., Drobietz, D., Hage-Hülsmann, J., Wandrey, G., Büchs, J., Kohlheyer, D., Loeschcke, A., Wiechert, W., Jaeger, K.-E., Pietruszka, J. und Drepper, T. (2016). Photocaged arabinose: A novel optogenetic switch for rapid and gradual control of microbial gene expression. *ChemBioChem* 17, 296–299.
- Binder, D., Drepper, T., Jaeger, K.-E., Delvigne, F., Wiechert, W., Kohlheyer, D. und Grünberger, A. (2017). Homogenizing bacterial cell factories: Analysis and engineering of phenotypic heterogeneity. *Metab. Eng.* 42, 145–156.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Biselli, A., Willenbrink, A.-L., Leipnitz, M. und Jupke, A. (2020). Development, evaluation, and optimisation of downstream process concepts for rhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acids. *Sep. Purif. Technol.* 250, 117031.

- Blank, L. M., Ebert, B. E., Buehler, K. und Bühler, B. (2010). Redox biocatalysis and metabolism: Molecular mechanisms and metabolic network analysis. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 349–394.
- Blankenfeldt, W., Giraud, M.-F., Leonard, G., Rahim, R., Creuzenet, C., Lam, J. S. und Naismith, J. H. (2000). The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate-thymidyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 56, 1501–1504.
- Blesken, C. C., Bator, I., Eberlein, C., Heipieper, H. J., Tiso, T. und Blank, L. M. (2020). Genetic cell-surface modification for optimized foam fractionation operation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 572892.
- Bollinger, A., Thies, S., Knieps-Grünhagen, E., Gertzen, C., Kobus, S., Höppner, A., Ferrer, M., Gohlke, H., Smits, S. H. J. und Jaeger, K.-E. (2020). A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and functional Insights. *Front. Microbiol.* 11, 114.
- Bondi, C. A. M., Marks, J. L., Wroblewski, L. B., Raatikainen, H. S., Lenox, S. R. und Gebhardt, K. E. (2015). Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): Evidence for safe use in household cleaning products. *Lib. Acad.* 9, 27–32.
- Brandt, K., Dahl, V., Muss, A., Blaschek, S., Drljaca, Z., Volkmer, S. und Wenk, H. H. (2018). Glycolipids – a new era in natural cleansing. *sofw J.* 144, 10–18.
- Brautaset, T., Ellingsen, T. E. und Eggeling, L. (2017). Lysine industrial uses and production, In: *Comprehensive Biotechnology*, Ed. Moo-Young, M., Elsevier Inc., Amsterdam, Niederlande. pp 572–586.
- Brautaset, T., Lale, R. und Valla, S. (2009). Positively regulated bacterial expression systems. *Microb. Biotechnol.* 2, 15–30.
- Brenner, K., You, L. und Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26, 483–489.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B. und Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Res.* 2011, 787532.
- Bruckbauer, S. T., Kvitko, B. H., Karkhoff-Schweizer, R. R. und Schweizer, H. P. (2015). Tn5/7-lux: A versatile tool for the identification and capture of promoters in gram-negative bacteria. *BMC Microbiol.* 15, 1-17.
- Brückner, H. und Przybylski, M. (1984). Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of “peptaibols” and other aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin a from *Gliocladium deliquescens*. *Chromatographia* 19, 188–199.
- Bukavaz, S. (2015). The effect of rhamnolipid production on *Pseudomonas aeruginosa* physiology. Dissertation, Universität Ulm, Ulm.
- Buonocore, C., Tedesco, P., Vitale, G. A., Palma Esposito, F., Giugliano, R., Monti, M. C., D’Auria, M. V. und de Pascale, D. (2020). Characterization of a new mixture of mono-rhamnolipids produced by *Pseudomonas gessardii* isolated from Edmonson Point (Antarctica). *Mar. Drugs* 18, 269.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Browne, P. J. und Lindow, S. E. (2010). Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5363–5372.
- Burmeister, A., Hilgers, F., Langner, A., Westerwalbesloh, C., Kerkhoff, Y., Tenhaef, N., Drepper, T., Kohlheyer, D., von Lieres, E., Noack, S. und Grünberger, A. (2019). A microfluidic co-cultivation platform to investigate microbial interactions at defined microenvironments. *Lab Chip* 19, 98–110.
- Busse, C., Biechele, P., de Vries, I., Reardon, K. F., Solle, D. und Scheper, T. (2017). Sensors for disposable bioreactors. *Eng. Life Sci.* 17, 940–952.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. und Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A.-P., Olvera, C., Treviño, L. G., Déziel, E., Lépine, F., Lépine, Soberón-Chávez, G. (2006). Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 187–194.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q. und O’Toole, G. A. (2016). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 7351–7361.
- Calero, P., Jensen, S. I. und Nielsen, A. T. (2016). Broad-host-range ProUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of *p*-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440. *ACS Synth. Biol.* 5, 741–753.
- Câmara, J. M. D. A., Sousa, M. A. S. B., Barros Neto, E. L. und Oliveira, M. C. A. (2019). Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). *J. Pet. Explor. Prod. Technol.* 9, 2333–2341.
- Cameron, D. E. und Collins, J. J. (2014). Tunable protein degradation in bacteria. *Nat. Biotechnol.* 32, 1276–1281.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. und Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14613–14618.
- Cao, L., Wang, Q., Zhang, J., Li, C., Yan, X., Lou, X., Xia, Y., Hong, Q. und Li, S. (2012). Construction of a stable genetically engineered rhamnolipid-producing microorganism for remediation of pyrene-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2783–2790.
- Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J. L., García, J. L. und Díaz, E. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: A genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 71–133.

- Carpousis, A. J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71–87.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I. und Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 82–84.
- Cavallero, D. A. und Cooper, D. G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* 103, 31–41.
- Cha, M., Lee, N., Kim, M., Kim, M. und Lee, S. (2008). Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.* 99, 2192–2199.
- Chai, Y., Shan, S., Weissman, K. J., Hu, S., Zhang, Y. und Müller, R. (2012). Heterologous expression and genetic engineering of the tubulysin biosynthetic gene cluster using Red/ET recombineering and inactivation mutagenesis. *Chem. Biol.* 19, 361–371.
- Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J. und Miller, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: Effects of pH, cadmium, and octadecane. *J. Colloid Interface Sci.* 170, 569–574.
- Chandran, K. und Nibert, M. L. (1998). Protease cleavage of reovirus capsid protein  $\mu 1/\mu 1C$  is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle. *J. Virol.* 72, 467–75.
- Chandran, P. und Das, N. (2012). Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*. *Bioremediat. J.* 16, 19–30.
- Chandrasekaran, E. V. und Bemiller, J. N. (1980). Constituent analyses of glycosaminoglycans, In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ed. Whistler, R. L., Academic Press, New York, USA. pp 89–96.
- Chang, S. W. und Shaw, J. F. (2009). Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. *N. Biotechnol.* 26, 109–116.
- Chang, W.-S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X. und Halverson, L. J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 189, 8290–8299.
- Chappell, J., Takahashi, M. K. und Lucks, J. B. (2015). Creating small transcription activating RNAs. *Nat. Chem. Biol.* 11, 214–220.
- Chavali, A. K. und Rhee, S. Y. (2018). Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. *Brief. Bioinform.* 19, 1022–1034.
- Chaves, J. E., Wilton, R., Gao, Y., Munoz, N. M., Burnet, M. C., Schmitz, Z., Rowan, J., Burdick, L. H., Elmore, J., Guss, A., Close, D., Magnuson, J. K., Burnum-Johnson, K. E., Michener, J. K. (2020). Evaluation of chromosomal insertion loci in the *Pseudomonas putida* KT2440 genome for predictable biosystems design. *Metab. Eng. Commun.* 11, e00139.
- Chen, C.-Y., Baker, S. C. und Darton, R. C. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J. Microbiol. Methods* 70, 503–510.
- Chen, C. und Deutscher, M. P. (2005). Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *J. Biol. Chem.* 280, 34393–34396.
- Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H. und Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 8309–8319.
- Chen, R., Déziel, E., Groleau, M.-C., Schaefer, A. L. und Greenberg, E. P. (2019). Social cheating in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing variant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 7021–7026.
- Chen, Y., Ho, J. M. L., Shis, D. L., Gupta, C., Long, J., Wagner, D. S., Ott, William, J., Krešimir, B. und Matthew R. (2018). Tuning the dynamic range of bacterial promoters regulated by ligand-inducible transcription factors. *Nat. Commun.* 9, 64.
- Cheung, D. und Samantray, S. (2018). Molecular dynamics simulation of protein biosurfactants. *Colloids and Interfaces* 2, 39.
- Choi, K.-H. und Kim, K.-J. (2009). Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 217–228.
- Choi, K.-H., Kumar, A. und Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* 64, 391–397.
- Choi, K.-H. und Schweizer, H. P. (2006). Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: Example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* 1, 153–161.
- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. und Schweizer, H. P. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448.
- Choi, K. R., Cho, J. S., Cho, I. J., Park, D. und Lee, S. Y. (2018). Markerless gene knockout and integration to express heterologous biosynthetic gene clusters in *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 47, 463–474.
- Choi, M. H., Xu, J., Gutierrez, M., Yoo, T., Cho, Y. H. und Yoon, S. C. (2011). Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Comparative <sup>13</sup>C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J. Biotechnol.* 151, 30–42.
- Chong, H. und Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. *Microb. Cell Fact.* 16, 137.
- Chopda, V. R., Pathak, M., Batra, J., Gomes, J. und Rathore, A. S. (2017). Enabler for process analytical technology implementation in *Pichia pastoris* fermentation: Fluorescence-based soft sensors for rapid quantitation of product titer. *Eng. Life Sci.* 17, 448–457.
- Christian, R. R., Hanson, R. B. und Newell, S. Y. (1982). Comparison of methods for measurement of bacterial growth rates in mixed batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1160–1165.

- Christofi, N. und Ivshina, I. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915–929.
- Christova, N. und Stoineva, I. (2014). Trehalose Biosurfactants, In: *Biosurfactant - Research Trends and Applications*, Ed. Mulligan, C. N., Sharma, S. K. und Ackmez M., CRC Press, Boca Raton, USA. pp 197–216.
- Christova, N., Tuleva, B., Lalchev, Z., Jordanova, A. und Jordanov, B. (2004). Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 59, 70–74.
- Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł. und Czaczyk, K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 401–419.
- Coelho, A. L. S., Feuser, P. E., Carciofi, B. A. M., de Andrade, C. J. und de Oliveira, D. (2020). Mannosylerythritol lipids: Antimicrobial and biomedical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2297–2318.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in *Pseudomonads*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1637–1645.
- Corrado, G. und Karali, M. (2009). Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 27, 733–743.
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., van Delden, C., Curty, L. K. und Köhler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J. Bacteriol.* 184, 3027–3033.
- Costa, S. G. V. A. O., Déziel, E. und Lépine, F. (2011). Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 620–627.
- Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Lépine, F., Déziel, E. und Contiero, J. (2010). Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochem.* 45, 1511–1516.
- Cowan-Ellsberry, C., Belanger, S., Dorn, P., Dyer, S., McAvoy, D., Sanderson, H., Versteeg, D., Ferrer, D. und Stanton, K. (2014). Environmental safety of the use of major surfactant classes in North America. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 1893–1993.
- Craig, N. L. (1996). Transposon Tn7, In: *Transposable Elements*, Ed. Saedler, H. und Gierl, A., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 27–48.
- Dahrazma, B., Mulligan, C. N. und Nieh, M.-P. (2008). Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): A small-angle neutron scattering (SANS) study. *J. Colloid Interface Sci.* 319, 590–593.
- Damalas, S. G., Batiannis, C., Martin-Pascual, M., de Lorenzo, V. und Martins dos Santos, V. A. P. (2020). SEVA 3.1: enabling interoperability of DNA assembly among the SEVA, BioBricks and Type IIS restriction enzyme standards. 13, 1793–1806.
- Damron, F. H., McKenney, E. S., Schweizer, H. P. und Goldberg, J. B. (2013). Construction of a broad-host-range Tn7-based vector for single-copy  $P_{BAD}$ -controlled gene expression in gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 718–721.
- Dar, D. und Sorek, R. (2018). Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. *PLoS Genet.* 14, e1007354.
- Das, P., Mukherjee, S. und Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 25, 165–186.
- Davila, A. M., Marchal, R., Monin, N. und Vandecasteele, J. P. (1993). Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Chromatogr. A* 648, 139–149.
- De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. de C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M. und Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front. Microbiol.* 7, 1718.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J. und Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 21–25.
- De Gelder, L., Williams, J. J., Ponciano, J. M., Sota, M. und Top, E. M. (2008). Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics* 178, 2179–2190.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Saénchez, J. M. und Timmis, K. N. (1998). Mini-transposons in microbial ecology and environmental biotechnology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 211–224.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. und Timmis, K. N. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using  $lac^q/P_{trp-lac}$  plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* 123, 17–24.
- de O. Barsottini, M. R., de Oliveira, J. F., Adamoski, D., Teixeira, P. J. P. L., do Prado, P. F. V., Tiezzi, H. O., Sforça, M. L., Cassago, A., Portugal, R. V., de Oliveira, P. S. L., de M. Zeri, A. C., Dias, S. M. G., Pereira, G. A. G. und Ambrosio, A. L. B. (2013). Functional diversification of cerato-platanins in *Moniliophthora perniciosa* as seen by differential expression and protein function specialization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 1281–1293.
- Dekimpe, V. und Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155, 712–723.
- Del Vecchio, D. (2015). Modularity, context-dependence, and insulation in engineered biological circuits. *Trends Biotechnol.* 33, 111–119.
- Delvigne, F., Takors, R., Mudde, R., van Gulik, W. und Noorman, H. (2017). Bioprocess scale-up/down as integrative enabling technology: From fluid mechanics to systems biology and beyond. *Microb. Biotechnol.* 10, 1267–1274.
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S. und Young, K. D. (1993). Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* 175, 6890–6901.
- Desai, J. D. und Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. und Rahme, L. G. (2005). The contribution

- of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: Multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.* 55, 998–1014.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. und Villemur, R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 145–152.
- Dias, F. M. A. (2019). Physiologische Antwort von *Pseudomonas putida* auf die Zugabe von Salicylat. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Diensthuber, R. P., Ohlendorf, R., Gleichmann, T., Schubert, R. und Möglich, A. (2013). Lichtregulierte Genexpression. *BIOspektrum* 19, 149–151.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M. und Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* 50, 29–43.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D. und Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Front. Microbiol.* 8, 1–12.
- Dinkla, I. J. T., Gabor, E. M. und Janssen, D. B. (2001). Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3406–3412.
- Dinkla, I. J. T. und Janssen, D. B. (2003). Simultaneous growth on citrate reduces the effects of iron limitation during toluene degradation in *Pseudomonas*. *Microb. Ecol.* 45, 97–107.
- Dobler, L., Carvalho, B. R. De, Alves, W. D. S., Neves, B. C., Maria, D. und Almeida, R. V. (2017). Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium. *PLoS One* 12, 8.
- Domröse, A. (2016). Anwendung und Optimierung des TREX-Systems zur effektiven heterologen Sekundärmetabolit-Produktion in *Pseudomonas putida*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Domröse, A., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Weihmann, R., Kruse, L., Otto, M., Wierckx, N., Jaeger, K.-E., Drepper, T. und Loeschcke, A. (2019). *Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes. *Sci. Rep.* 9, 7028.
- Domröse, A., Klein, A. S., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Svensson, V., Classen, T., Pietruszka, J., Jaeger, K.-E., Drepper, T. und Loeschcke, A. (2015). Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. *Front. Microbiol.* 6, 972.
- Domröse, A., Weihmann, R., Thies, S., Jaeger, K.-E., Drepper, T. und Loeschcke, A. (2017). Rapid generation of recombinant *Pseudomonas putida* secondary metabolite producers using yTREX. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2, 310–319.
- Dragosits, M. und Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution - Principles and applications for biotechnology. *Microb. Cell Fact.* 12, 64.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W. und Jaeger, K.-E. (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat. Biotechnol.* 25, 443–445.
- Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A.-K., Büchs, J. und Jaeger K.-E. (2010). Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5990–5994.
- Du, J., Zhang, A., Hao, J. und Wang, J. (2017). Biosynthesis of di-rhamnolipids and variations of congeners composition in genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 39, 1041–1048.
- Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E. und Lépine, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* 9, 263.
- Dubey, S., Singh, D. und Misra, R. A. (1998). Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol). *Enzyme Microb. Technol.* 23, 432–437.
- Dulcey, C. E., López de los Santos, Y., Létourneau, M., Déziel, E. und Doucet, N. (2019). Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanooyloxy) alkanooate (HAA) synthase RhlA to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. *FEBS J.* 286, 4036–4059.
- Durante-Rodríguez, G., de Lorenzo, V. und Martínez-García, E. (2014). The Standard European Vector Architecture (SEVA) plasmid toolkit. In: *Pseudomonads Methods and Protocols*, Ed. Filloux, A. und Ramos, J.-L., Springer Verlag GmbH, New York, USA. pp 469–478.
- Dusane, D. H., Zinjarde, S. S., Venugopalan, V. P., Mclean, R. J., Weber, M. M. und Rahman, P. K. S. M. (2010). Quorum sensing: Implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 27, 159–184.
- Dvořák, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z. und Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microb. Cell Fact.* 14, 201.
- Dvořák, P. und de Lorenzo, V. (2018). Refactoring the upper sugar metabolism of *Pseudomonas putida* for co-utilization of cellobiose, xylose, and glucose. *Metab. Eng.* 48, 94–108.
- Ebert, B. E., Kurth, F., Grund, M., Blank, L. M. und Schmid, A. (2011). Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6597–6605.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.
- Eggeling, L. und Bott, M. (2005). Handbook on *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Ehrt, S. (2005). Controlling gene expression in *Mycobacteria* with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Res.* 33, 21.
- Elmqvist, T., Andersson, E., Frantzeskaki, N., McPhearson, T., Olsson, P., Gaffney, O., Takeuchi, K. und Folke, C. (2019).

- Sustainability and resilience for transformation in the urban century. *Nat. Sustain.* 2, 267–273.
- Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature* 438, 449–453.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A. und Ramos, J.-L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* 182, 2363–2369.
- EU/648 (2004). Verordnung (EG) Nr. 648/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 über Detergenzien. Europäische Union.
- Evguenieva-Hackenberg, E. und Klug, G. (2009). RNA degradation in Archaea and gram-negative bacteria different from *Escherichia coli*. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Ed. Condon, C., Elsevier Inc., Amsterdam, Niederlande. pp 275–317.
- Evonik Nutrition & Care GmbH (2018). Evonik bringt neuen, komplett natürlichen Kosmetikrohstoff zur Reinigung von Haut und Haar auf den Markt. (<https://corporate.evonik.de/de/presse/pressemitteilungen/evonik-bringt-neuen-komplett-natuerlichen-kosmetikrohstoff-zur-reinigung-von-haut-und-haar-auf-den-m-105474.html>; Stand: 3. Juni 2020).
- Faivre, V. und Rosilio, V. (2010). Interest of glycolipids in drug delivery: From physicochemical properties to drug targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 1031–1048.
- Falbe, J. (1987). Surfactants in consumer products. Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland.
- Fernandez-López, R., Ruiz, R., de la Cruz, F. und Moncalián, G. (2015). Transcription factor-based biosensors enlightened by the analyte. *Front. Microbiol.* 6, 648.
- Fernández, M., Conde, S., de la Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J.-L. und Duque, E. (2012). Mechanisms of resistance to chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1001–1009.
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: Moving towards industrial application. *Trends Food Sci. Technol.* 3, 286–293.
- Fleming, R. I., Mackenzie, C. D., Cooper, A. und Kennedy, M. W. (2009). Foam nest components of the túngara frog: A cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. *Proc. R. Soc. B* 276, 1787–1795.
- Fracchia, L., Ceresa, C., Franzetti, A., Cavallo, M., Gandolfi, I., Van Hamme, J., Gkorezis, P., Marchant, R. und Banat, I. M. (2014). Industrial applications of biosurfactants. In: *Biosurfactants: Production and utilization*, Ed. Kosaric, N. und Vardar-Sukan, F., CRC Press, Boca Raton, USA. pp 245–260.
- Frampton, E. W., Restaino, L. und Blaszkowski, N. (1988). Evaluation of the  $\beta$ -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24-hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 51, 402–404.
- Francisco, J. A., Campbell, R., Iverson, B. L. und Georgiou, G. (1993). Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10444–10448.
- Frandsen, M. A., Jayakody, L. N., Li, W.-J., Wagner, N. J., Cleveland, N. S., Michener, W. E., Hauer, B., Blank, L. M., Wierckx, N., Klebensberger, J. und Beckham, G. T. (2018). Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient ethylene glycol utilization. *Metab. Eng.* 48, 197–207.
- Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., Colla, P. La, Tamburini, E., Papacchini, M. und Bestetti, G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 75, 801–807.
- Fu, J., Wenzel, S. C., Perlova, O., Wang, J., Gross, F., Tang, Z., Yin, Y., Stewart, A. F., Müller, R. und Zhang, Y. (2008). Efficient transfer of two large secondary metabolite pathway gene clusters into heterologous hosts by transposition. *Nucleic Acids Res.* 36, e113.
- Gauthier, C., Lavoie, S., Piochon, M., Martinez, S., Milot, S. und Déziel, E. (2019). Structural determination of ananatoside A: An unprecedented 15-membered macrolactone-containing glycolipid from *Pantoea ananatis*. *Carbohydr. Res.* 471, 13–18.
- Gawin, A., Peebo, K., Hans, S., Ertesvåg, H., Irla, M., Neubauer, P. und Brautaset, T. (2019). Construction and characterization of broad-host-range reporter plasmid suitable for on-line analysis of bacterial host responses related to recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.* 18, 80.
- Geetha, S. J., Banat, I. M. und Joshi, S. J. (2018). Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 23–32.
- Gehring, C., Wessel, M., Schaffer, S. und Thum, O. (2016). The power of biocatalysis: A one-pot total synthesis of rhamnolipids from butane as the sole carbon and energy source. *ChemistryOpen* 5, 513–516.
- Gemperlein, K., Hoffmann, M., Huo, L., Pilak, P., Petzke, L., Müller, R. und Wenzel, S. C. (2017). Synthetic biology approaches to establish a heterologous production system for coronatines. *Metab. Eng.* 44, 213–222.
- Georg, J. und Hess, W. R. (2011). *cis*-antisense RNA, Another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 286–300.
- Germer, A., Tiso, T., Müller, C., Behrens, B., Vosse, C., Scholz, K., Froning, M., Hayen, H. und Blank, L. M. (2020). Exploiting the natural diversity of RhlA acyltransferases for the synthesis of the rhamnolipid precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02317-19.
- Gietz, R. D. und Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2, 31–34.
- Ginsburg, V. (1972). Complex carbohydrates (Part B). In: *Methods in Enzymology*, Ed. Colowick, S. P. und Kaplan, N. O., Academic Press, Cambridge, England. pp 3–1057.
- Gong, Z., Peng, Y. und Wang, Q. (2015). Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by *Pseudomonas aeruginosa* with plant oils. *Biotechnol. Lett.* 37, 2033–2038.
- Gopal, G. J. und Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 32, 419–425.
- Graf, N. und Altenbuchner, J. (2014). Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of

- vanillin from ferulic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 137–149.
- Grand View Research Inc. (2015a). Biosurfactants market size, share & trends analysis report by product (rhamnolipids, MES, APG, sorbitan esters, sucrose esters), by application (household detergents, personal care, industrial cleaners) and segment forecasts, 2014 - 2020. Report ID: 978-1-68038-012-5.
- Grand View Research Inc. (2015b). Surfactants market size, share & trends analysis by product (cationic, nonionic, anionic, amphoteric and others), by application (home care, personal care, industrial & institutional cleaners, food processing, and others) and segment forecasts, 2015 - 2022. Report ID: 978-1-68038-592-2.
- Graninger, M., Nidetzky, B., Heinrichs, D. E., Whitfield, C. und Messner, P. (1999). Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *J. Biol. Chem.* 274, 25069–25077.
- Groleau, M.-C., de Oliveira Pereira, T., Dekimpe, V. und Déziel, E. (2020). PqsE is essential for RhlR-dependent quorum sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* 5, e00194-20.
- Grosso-Becerra, M.-V., González-Valdez, A., Granados-Martínez, M.-J., Morales, E., Servín-González, L., Méndez, J.-L., Delgado, G. Morales-Espinosa, R., Ponce-Soto, G.-Y., Cocotl-Yañez, M. und Soberón-Chávez, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9995–10004.
- Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R. und Rodrigues, L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 667–675.
- Gulez, G., Altıntaş, A., Fazli, M., Dechesne, A., Workman, C. T., Tolker-Nielsen, T. und Smets, B. F. (2014). Colony morphology and transcriptome profiling of *Pseudomonas putida* KT2440 and its mutants deficient in alginate or all EPS synthesis under controlled matrix potentials. *Microbiologyopen* 3, 457–469.
- Gutiérrez-Gómez, U., Servín-González, L. und Soberón-Chávez, G. (2019). Role of  $\beta$ -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3753–3760.
- Gyorgy, A., Jiménez, J. I., Yazbek, J., Huang, H.-H., Chung, H., Weiss, R. und Del Vecchio, D. (2015). Isocost lines describe the cellular economy of genetic circuits. *Biophys. J.* 109, 639–646.
- Hadjeras, L., Poljak, L., Bouvier, M., Morin-Ogier, Q., Canal, I., Coccain-Bousquet, M., Girbal, L., Carpousis, A. J. (2019). Detachment of the RNA degradosome from the inner membrane of *Escherichia coli* results in a global slowdown of mRNA degradation, proteolysis of RNase E and increased turnover of ribosome-free transcripts. *Mol. Microbiol.* 111, 1715–1731.
- Hage-Hülsmann, J., Grünberger, A., Thies, S., Santiago-Schübel, B., Klein, A. S., Pietruszka, J., Binder, D., Hilgers, F. und Domröse, A. (2018). Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants. *PLoS One* 13, e0200940.
- Hall, P. J., Haverkamp, J., van Kralingen, C. G. und Schmidt, M. (1996). Laundry detergent composition containing synergistic combination of sophorose lipid and nonionic surfactant. Patent-Nr.: US 5520839 A.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G. und Tjørnelund, J. (2002). Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263–271.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hanson, K. G., Desai, J. D. und Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.* 7, 745–748.
- Haque, F., Alfatah, M., Ganesan, K. und Bhattacharyya, M. S. (2016). Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. *Sci. Rep.* 6, 23575.
- Harris, P., Navarro Poulsen, J. C., Jensen, K. F. und Larsen, S. (2000). Structural basis for the catalytic mechanism of a proficient enzyme: orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 39, 4217–4224.
- Härtig, C., Loffhagen, N. und Harms, H. (2005). Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1915–1922.
- Hausmann, R. und Syltatk, C. (2014). Types and classification of microbial surfactants, In: *Biosurfactants: Production and Utilization*, Ed. Kosaric, N. und Vardar-Sukan, F., CRC Press, Boca Raton, USA. pp 3–18.
- He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B. und Meng, Q. (2017). Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 157, 317–324.
- Heim, S., Ferrer, M., Heuer, H., Regenhardt, D., Nimtz, M. und Timmis, K. N. (2003). Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: Distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Environ. Microbiol.* 5, 1257–1269.
- Heipieper, H. J., Fischer, J. und Meinhardt, F. (2010). Cis–trans isomerase of unsaturated fatty acids: An immediate bacterial adaptive mechanism to cope with emerging membrane perturbation caused by toxic hydrocarbons, In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Ed. Timmis K. N., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 1605–1614.
- Henderson, P. J. und Maiden, M. C. (1990). Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 326, 391–410.
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F. und Hausmann, R. (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnol. J.* 12, 1600561.
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syltatk, C. und Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem.* 47, 1207–1219.

- Hernandez-Arranz, S., Perez-Gil, J., Marshall-Sabey, D. und Rodriguez-Concepcion, M. (2019). Engineering *Pseudomonas putida* for isoprenoid production by manipulating endogenous and shunt pathways supplying precursors. *Microb. Cell Fact.* 18, 152.
- Herzog, M., Tiso, T., Blank, L. M. und Winter, R. (2020). Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. *BBA - Biomembr.* 1862, 183431.
- Heuson, E., Etchegaray, A., Filipe, S. L., Beretta, D., Chevalier, M., Phalip, V. und Coutte, F. (2018). Screening of lipopeptide-producing strains of *Bacillus* sp. using a new automated and sensitive fluorescence detection method. *Biotechnol. J.* 14, 1800314.
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L. und O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* 49, 905–918.
- Hirayama, T. und Kato, I. (1982). Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 139, 81–85.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. und Schweizer, H. P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: Application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212, 77–86.
- Hodge, J. E. und Hofreiter, B. T. (1962). Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates, In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Ed. Whistler, R. L. und Wolfrom, M. L., Academic Press, New York, USA. pp 380–394.
- Hoffmann, J. und Altenbuchner, J. (2015). Functional characterization of the mannitol promoter of *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 and its application for a mannitol-inducible expression system for *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS One* 10, 133248.
- Hong, H., Jung, J. und Park, W. (2014). Plasmid-encoded tetracycline efflux pump protein alters bacterial stress responses and ecological fitness of *Acinetobacter oleivorans*. *PLoS One* 9, e107716.
- Hui, M. P., Foley, P. L. und Belasco, J. G. (2014). Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annu. Rev. Genet.* 48, 537–559.
- Huo, L., Hug, J. J., Fu, C., Bian, X., Zhang, Y. und Müller, R. (2019). Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 36, 1412–1436.
- Hüsken, L. E., Beeftink, R., de Bont, J. A. M. und Wery, J. (2001). High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 571–577.
- Hutchinson, J. A., Burholt, S. und Hamley, I. W. (2017). Peptide hormones and lipopeptides: From self-assembly to therapeutic applications. *J. Pept. Sci.* 23, 82–94.
- Huy, N. Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N. B., Hang, D. T., Ha, D. T. C., Imanaka, T., Morikawa, M. und Kanaya, S. (1999). Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 100–102.
- Irorere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S. und Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production: A critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 3941–3951.
- Ismail, W., El Nayal, A. M., Ramadan, A. R. und Abotalib, N. (2014). Sulfur source-mediated transcriptional regulation of the *rhlABC* genes involved in biosurfactants production by *Pseudomonas* sp. strain AK6U. *Front. Microbiol.* 5, 423.
- Iyer, M., Wu, L., Carey, M., Wang, Y., Smallwood, A. und Gambhir, S. S. (2001). Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14595–14600.
- Jackson, S. A., Borchert, E., O'Gara, F. und Dobson, A. D. W. (2015). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 176–182.
- Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. und Monod, J. (1960). The operon: A group of genes with the expression coordinated by an operator. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 250, 1727–1729.
- Jaeger, K.-E. und Rosenau, F. (2004). Overexpression and secretion of *Pseudomonas* lipases, In: *Pseudomonas*, Ed. Ramos J.-L., Springer US, Boston, USA. pp 491–508.
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M. und Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 275, 102061.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H. und Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 13, 271–279.
- Jeck, V., Froning, M., Tiso, T., Blank, L. M. und Hayen, H. (2020). Double bond localization in unsaturated rhamnolipid precursors 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids by liquid chromatography–mass spectrometry applying online Paternò–Büchi reaction. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 5601–5613.
- Jensen, P. R. und Hammer, K. (1998). The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 82–87.
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. und Gracida Rodríguez, J. (2010). Biosurfactant properties, applications and production: A review. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26, 65–84.
- Jin, Z.-J., Zhou, L., Sun, S., Cui, Y., Song, K., Zhang, X. und He, Y.-W. (2020). Identification of a strong quorum sensing- and thermo-regulated promoter for the biosynthesis of a new metabolite pesticide phenazine-1-carboxamide in *Pseudomonas* strain PA1201. *ACS Synth. Biol.* 9, 1802–1812.
- Johann, S., Seiler, T.-B., Tiso, T., Bluhm, K., Blank, L. M. und Hollert, H. (2016). Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Sci. Total Environ.* 548–549, 155–163.
- Johnson, C. W., Salvachúa, D., Khanna, P., Smith, H., Peterson, D. J. und Beckham, G. T. (2016). Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity. *Metab. Eng. Commun.* 3, 111–119.

- Johnson, M. K. und Boese-Marrazzo, D. (1980). Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29, 1028–33.
- Jones, K. H. und Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 77–79.
- Jones, R. M., Britt-Compton, B. und Williams, P. A. (2003). The naphthalene catabolic (nag) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator. *J. Bacteriol.* 185, 5847–5853.
- Joshi, H., Dave, R. und Venugopalan, V. P. (2014). Pumping iron to keep fit: Modulation of siderophore secretion helps efficient aromatic utilization in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiology* 160, 1393–1400.
- Jovanovic, M., Radivojevic, J., O'Connor, K., Blagojevic, S., Begovic, B., Lukic, V., Nikodinovic-Runic, J. und Savic, V. (2019). Rhamnolipid inspired lipopeptides effective in preventing adhesion and biofilm formation of *Candida albicans*. *Bioorg. Chem.* 87, 209–217.
- Jung, G. (2012). *Fluorescent proteins I: From understanding to design*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- Kallscheuer, N., Jeske, O., Sandargo, B., Boedeker, C., Wiegand, S., Bartling, P., Jogler, M., Rohde, M., Petersen, J., Medema, M. H., Surup, F. und Jogler, C. (2020). The planctomycete *Stieleria maiorica* Mal15<sup>T</sup> employs stieliaricines to alter the species composition in marine biofilms. *Commun. Biol.* 3, 303.
- Kampers, L. F. C., Volkens, R. J. M. und Martins dos Santos, V. A. P. (2019). *Pseudomonas putida* KT2440 is HV1 certified, not GRAS. *Microb. Biotechnol.* 12, 845–848.
- Kanlayavattanakul, M. und Lourith, N. (2010). Lipopeptides in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 32, 1–8.
- Kaplan, N. und Rosenberg, E. (1982). Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1335–1341.
- Karmainski, T. (2020). Characterization of recombinant *Pseudomonas putida* strains for rhamnolipid production from several substrates in different bioreactor systems. Masterarbeit, RWTH-Aachen Universität, Aachen.
- Ke, J. und Yoshikuni, Y. (2020). Multi-chassis engineering for heterologous production of microbial natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 62, 88–97.
- Kelly, J. R., Rubin, A. J., Davis, J. H., Ajo-Franklin, C. M., Cumbers, J., Czar, M. J., de Mora, K., Gliberman, A. L. und Monie, D. D. (2009). Measuring the activity of BioBrick promoters using an *in vivo* reference standard. *J. Biol. Eng.* 3, 4.
- Kennedy, J., O'Leary, N. D., Kiran, G. S., Morrissey, J. P., O'Gara, F., Selvin, J. und Dobson, A.D.W. (2011). Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J. Appl. Microbiol.* 111, 787–799.
- Khalidi, O., Guleria, S. und Koffas, M. A. G. (2016). Pathway and strain design for biofuels production, In: *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*, Ed. Eckert, C. A. und Trinh, C. T., Elsevier Inc, Amsterdam, Niederlande. pp 97–116.
- Khlebnikov, A., Keasling, J. D., Wanner, B. L., Skaug, T. und Datsenko, K. A. (2001). Homogeneous expression of the P<sub>BAD</sub> promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* 147, 3241–3247.
- Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Choung, D.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T. und Tani, Y. (1999). Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 713–721.
- Kirschen, L.-M. (2018). Heterologe Produktion von maßgeschneiderten Biotensiden. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Kiss, K., Ng, W. T. und Li, Q. (2017). Production of rhamnolipids-producing enzymes of *Pseudomonas* in *E. coli* and structural characterization. *Front. Chem. Sci. Eng.* 11, 133–138.
- Köbbing, S., Blank, L. M. und Wierckx, N. (2020). Characterization of context-dependent effects on synthetic promoters. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 551.
- Koch, A. K., Käppeli, O., Fiechter, A. und Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173, 4212–4219.
- Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., Stolzenberger, J., Selzer, M., Mehlmann, K., Schneider, R., Pleissner, D., Rinkel, J., Dickschat, J. S., Venus, J., van Duuren, J. N. J. H und Wittmann, C. (2018). From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 47, 279–293.
- Kohlstedt, M. und Wittmann, C. (2019). GC-MS-based <sup>13</sup>C metabolic flux analysis resolves the parallel and cyclic glucose metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Metab. Eng.* 54, 35–53.
- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Kakugawa, K. und Kitamoto, D. (2008). Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 37–46.
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524–530.
- Kosaric, N. und Vardar-Sukan, F. (2014). *Biosurfactants: Production and Utilization*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Kosuri, S., Goodman, D. B., Cambray, G., Mutalik, V. K., Gao, Y., Arkin, A. P., Endy, D. und Church, G. M. (2013). Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14024–14029.
- Kouprina, N., Annab, L., Graves, J., Afshari, C., Barrett, J. C., Resnick, M. A. und Larionov, V. (1998). Functional copies of a human gene can be directly isolated by transformation-associated recombination cloning with a small 3' end target sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 4469–4474.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. und Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.

- Kovačić, F., Bleffert, F., Caliskan, M., Wilhelm, S., Granzin, J., Batra-Safferling, R. und Jaeger K.-E. (2016). A membrane-bound esterase PA2949 from *Pseudomonas aeruginosa* is expressed and purified from *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio* 6, 484–493.
- Krauss, U., Jäger, V. D., Diener, M., Pohl, M. und Jaeger, K.-E. (2017). Catalytically-active inclusion bodies—Carrier-free protein immobilizates for application in biotechnology and biomedicine. *J. Biotechnol.* 258, 136–147.
- Kretschmer, A., Bock, H. und Wagner, F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 864–870.
- Kubicki, S., Bator, I., Jankowski, S., Schipper, K., Tiso, T., Feldbrügge, M., Blank, L. M., Thies, S. und Jaeger, K.-E. (2020). A straightforward assay for screening and biosurfactants in microbial culture supernatants quantification of. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 958.
- Kubicki, S., Bollinger, A., Katzke, N., Jaeger, K.-E., Loeschcke, A. und Thies, S. (2019). Marine biosurfactants: Biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Mar. Drugs* 17, 7.
- Kuepper, J., Dickler, J., Biggel, M., Behnken, S., Jäger, G., Wierckx, N. und Blank, L. M. (2015). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 to produce anthranilate from glucose. *Front. Microbiol.* 6, 1310.
- Kumar, G. P. und Rajeshwarao, P. (2011). Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharm. Sin. B* 1, 208–219.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. und Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 3713–3729.
- Kumar, R. und Das, A. J. (2018). *Rhamnolipid Biosurfactant*. Springer Nature Singapore, Singapur, Singapur.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. und Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
- Kurz, M., Eder, C., Isert, D., Li, Z., Paulus, E. F., Schiell, M., Toti, L., Vártesy, L., Wink, J. und Seibert, G. (2003). Ustilipids, Acylated  $\beta$ -D-mannopyranosyl-D-erythritols from *Ustilago maydis* and *Geotrichum candidum*. *J. Antibiot.* 56, 91–101.
- Kushwaha, M., Rostain, W., Prakash, S., Duncan, J. N. und Jaramillo, A. (2016). Using RNA as molecular code for programming cellular function. *ACS Synth. Biol.* 5, 795–809.
- Lahesaaire, A., Ainele, H., Teppo, A., Kivisaar, M., Heipieper, H. J. und Teras, R. (2016). LapF and its regulation by Fis affect the cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas putida*. *PLoS One* 11, e0166078.
- Lambertsen, L., Sternberg, C. und Molin, S. (2004). Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* 6, 726–732.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. und Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7072–7077.
- Lang, S. und Trowitzsch-Kienast, W. (2002). *Biotenside*. B. G. Teubner, Basel, Österreich.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. und Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21, 1137–1146.
- Le Meur, S., Zinn, M., Egli, T., Thöny-Meyer, L. und Ren, Q. (2012). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *BMC Biotechnol.* 12, 53.
- Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Núñez-Olea, J. und Ríos, F. (2016). Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 125, 1–8.
- Lee, M., Kim, M. K., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-H., Kang, M. S. und Lee, S.-T. (2005). *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1409–1413.
- Lenzen, C., Wynands, B., Otto, M., Bolzenius, J., Mennicken, P., Blank, L. M. und Wierckx, N. (2019). High-yield production of 4-hydroxybenzoate from glucose or glycerol by an engineered *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 130.
- Lewis, M. A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: A review and risk assessment. *Water Res.* 25, 101–113.
- Li, X. (2019). Evaluation of the yTREX-toolbox using heterologous rhamnolipid production in *Pseudomonas putida*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Liang, P., Zhang, Y., Xu, B., Zhao, Y., Liu, X., Gao, W., Ma, T., Yang, C., Wang, S. und Liu, R. (2020). Deletion of genomic islands in the *Pseudomonas putida* KT2440 genome can create an optimal chassis for synthetic biology applications. *Microb. Cell Fact.* 19, 70.
- Liang, S.-T., Bipatnath, M., Xu, Y.-C., Chen, S.-L., Dennis, P., Ehrenberg, M. und Bremer, H. (1999). Activities of constitutive promoters in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 292, 19–37.
- Lieder, S., Nikel, P. I., de Lorenzo, V. und Takors, R. (2015). Genome reduction boosts heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *Microb. Cell Fact.* 14, 23.
- Little, D., Weselake, R., Pomeroy, K., Furukawa-Stoffer, T. und Bagu, J. (1994). Solubilization and characterization of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived cultures of oilseed rape. *Biochem. J.* 304, 951–958.
- Liu, H., Yan, H., Xiao, Y., Nie, H., Huang, Q. und Chen, W. (2019). The exopolysaccharide gene cluster *pea* is transcriptionally controlled by RpoS and repressed by AmrZ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbiol. Res.* 218, 1–11.
- Loeschcke, A. (2012). Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

- Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. und Drepper, T. (2013). TRES: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. *ACS Synth. Biol.* 2, 22–33.
- Loeschcke, A. und Thies, S. (2020). Engineering of natural product biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 65, 213–224.
- Loper, J. E., Kobayashi, D. Y. und Paulsen, I. T. (2007). The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology* 97, 233–238.
- López-Lara, I. M. und Geiger, O. (2010). Formation of fatty acids, In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Ed. Timmis K., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 385–393.
- Lortie, R. (1997). Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol. Adv.* 15, 1–15.
- Lourith, N. und Kanlayavattanakul, M. (2009). Natural surfactants used in cosmetics: Glycolipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* 31, 255–261.
- Löwe, H., Sinner, P., Kremling, A. und Pflüger-Grau, K. (2020). Engineering sucrose metabolism in *Pseudomonas putida* highlights the importance of porins. *Microb. Biotechnol.* 13, 97–106.
- Luo, Y., Li, B.-Z., Liu, D., Zhang, L., Chen, Y., Jia, B., Zeng, B.-X., Zhao, H. und Yuan, Y.-J. (2015). Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5265–5290.
- Ma, C., Mu, Q., Xue, Y., Xue, Y., Yu, B. und Ma, Y. (2020). One major facilitator superfamily transporter is responsible for propionic acid tolerance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb. Biotechnol.*, 1751-7915.13597.
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J. und Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58, 201–216.
- Magalhães, L. und Nitschke, M. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control* 29, 138–142.
- Magario, I., Neumann, A., Vielhauer, O., Syltatk, C. und Hausmann, R. (2009). Evaluation of enzyme carriers as biocatalysts for the conversion of emulsified rhamnolipids. *Biocatal. Biotransformation* 27, 237–245.
- Mairhofer, J., Scharl, T., Marisch, K., Cserjan-Puschmann, M. und Striedner, G. (2013). Comparative transcription profiling and in-depth characterization of plasmid-based and plasmid-free *Escherichia coli* expression systems under production conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3802–3812.
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S. und Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1, 5.
- Malcolm, A. S., Dexter, A. F. und Middelberg, A. P. J. (2007). Peptide surfactants (Pepfactants) for switchable foams and emulsions. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.* 2, 362–367.
- Marcelino, P. R. F., Gonçalves, F., Jimenez, I. M., Carneiro, B. C., Santos, B. B. und Silva, S. S. (2020). Sustainable production of biosurfactants and their applications, In: *Lignocellulosic Biorefining Technologies*, Ed. Ingle, A. P., Chandel, A. K. und da Silva, S. S., Wiley-VCH, Berlin, Deutschland. pp 159–183.
- Marchant, R. und Banat, I. M. (2012a). Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* 34, 1597–1605.
- Marchant, R. und Banat, I. M. (2012b). Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.* 30, 558–565.
- Martínez, S., Humery, A., Groleau, M. C. und Déziel, E. (2020). Quorum sensing controls both rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production in *Burkholderia thailandensis* through ScmR regulation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1033.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S. und de Lorenzo, V. (2015). SEVA 2.0: An update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res.* 43, D1183–D1189.
- Martínez-García, E. und de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 13, 2702–2716.
- Martínez-García, E. und de Lorenzo, V. (2017). Molecular tools and emerging strategies for deep genetic/genomic refactoring of *Pseudomonas*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 47, 120–132.
- Martínez-García, E. und de Lorenzo, V. (2019). *Pseudomonas putida* in the quest of programmable chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 59, 111–121.
- Martínez-García, E., Goñi-Moreno, A., Bartley, B., McLaughlin, J., Sánchez-Sampedro, L., Pascual del Pozo, H., Prieto Hernández, C., Marletta, A. S., De Lucrezia, D., Sánchez-Fernández, G., Fraile, S. und de Lorenzo, V. (2020). SEVA 3.0: An update of the Standard European Vector Architecture for enabling portability of genetic constructs among diverse bacterial hosts. *Nucleic Acids Res.* 48, D1164–D1170.
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M. und de Lorenzo, V. (2014a). Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environ. Microbiol.* 17, 76–90.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T. und de Lorenzo, V. (2014b). *Pseudomonas* 2.0: Genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microb. Cell Fact.* 13, 1–15.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Chavarría, M. und de Lorenzo, V. (2014c). The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 16, 291–303.
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F. und Espinosa-Urgel, M. (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* 77, 549–561.
- Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S. und Yano, I. (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *Microbiology* 132, 865–875.
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. und Soberón-Chávez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR,

- encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149, 3073–3081.
- Medina, G., Juárez, K. und Soberón-Chávez, G. (2003b). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer N-butryl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 185, 377–380.
- Mercadé, M. E., Monleón, L., de Andrés, C., Rodón, I., Martínez, E., Espuny, M. J. und Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 161–166.
- Meyers, A., Furtmann, C., Gesing, K., Tozakidis, I. E. P. und Jose, J. (2019). Cell density-dependent auto-inducible promoters for expression of recombinant proteins in *Pseudomonas putida*. *Microb. Biotechnol.* 12, 1003–1013.
- Mi, J., Sydow, A., Schempp, F., Becher, D., Schewe, H., Schrader, J. und Buchhaupt, M. (2016). Investigation of plasmid-induced growth defect in *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* 231, 167–173.
- Miksch, G. und Dobrowolski, P. (1995). Growth phase-dependent induction of stationary-phase promoters of *Escherichia coli* in different gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177, 5374–5378.
- Miller, C. Q. und Wade, W. (1958). Coloring matter for ball-pen inks. Patent-Nr.: US 2950285.
- Miller, D. J., Zhang, Y.-M., Rock, C. O. und White, S. W. (2006). Structure of RhIG, an essential  $\beta$ -ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 281, 18025–18032.
- Mitchell, R. J. und Gu, M. B. (2005). Construction and evaluation of *nagR-nagAa::lux* fusion strains in biosensing for salicylic acid derivatives. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120, 183–198.
- Mnif, I. und Ghribi, D. (2015). Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104, 129–147.
- Molitor, R., Bollinger, A., Kubicki, S., Loeschcke, A., Jaeger, K. und Thies, S. (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microb. Biotechnol.* 13, 274–284.
- Mooney, R. A., Artsimovitch, I. und Landick, R. (1998). Information processing by RNA polymerase: Recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J. Bacteriol.* 180, 3265–3275.
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T. und Kitamoto, D. (2013). Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4691–4700.
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T. und Kitamoto, D. (2015). Mannosylerythritol lipids: Production and applications. *J. Oleo Sci.* 64, 133–141.
- Mujumdar, S., Joshi, P. und Karve, N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. *J. Basic Microbiol.* 59, 277–287.
- Mukherjee, S., Das, P. und Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24, 509–515.
- Müller, M. M. und Hausmann, R. (2011). Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 251–264.
- Müller, M. M., Hörmann, B., Syltatk, C. und Hausmann, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 167–174.
- Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syltatk, C. und Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids-Next generation surfactants? *J. Biotechnol.* 162, 366–380.
- Mulligan, C. N., Cooper, D. G. und Neufeld, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J. Ferment. Technol.* 62, 311–314.
- Murray, T. S. und Kazmierczak, B. I. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.* 190, 2700–2708.
- Mutalik, V. K., Guimaraes, J. C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M. J., Mai, Q.-A., Tran, A. B., Paull, M., Keasling, J. D., Arkin, A. P. und Endy, D. (2013). Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat. Methods* 10, 354–360.
- Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V. und Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J. Appl. Microbiol.* 127, 12–28.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P. Chris, Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. A., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tummeler, B. und Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799–808.
- Neto, D. C., Meira, J. A., Tiburtius, E., Zamora, P. P., Bugay, C., Mitchell, D. A. und Krieger, N. (2009). Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. *Biotechnol. J.* 4, 748–755.
- Neves, D., Vos, S., Blank, L. M. und Ebert, B. E. (2020). *Pseudomonas* mRNA 2.0: Boosting gene expression through enhanced mRNA stability and translational efficiency. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 458.
- Newbury, S. F., Smith, N. H. und Higgins, C. F. (1987). Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* 51, 1131–1143.
- Nickzad, A. und Déziel, E. (2016). Adaptive significance of quorum sensing-dependent regulation of rhamnolipids by integration of growth rate in *Burkholderia glumae*: A trade-off between survival and efficiency. *Front. Microbiol.* 7, e0128509.
- Nickzad, A., Lépine, F. und Déziel, E. (2015). Quorum sensing controls swarming motility of *Burkholderia glumae* through regulation

- of rhamnolipids. *PLoS One* 10, 0128509.
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U. und de Lorenzo, V. (2015). *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate pathways. *J. Biol. Chem.* 290, 25920–25932.
- Nikel, P. I. und de Lorenzo, V. (2013a). Engineering an anaerobic metabolic regime in *Pseudomonas putida* KT2440 for the anoxic biodegradation of 1,3-dichloroprop-1-ene. *Metab. Eng.* 15, 98–112.
- Nikel, P. I. und de Lorenzo, V. (2013b). Implantation of unmarked regulatory and metabolic modules in Gram-negative bacteria with specialised mini-transposon delivery vectors. *J. Biotechnol.* 163, 143–154.
- Nikel, P. I. und de Lorenzo, V. (2018). *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metab. Eng.* 50, 142–155.
- Nikel, P. I., Kim, J. und de Lorenzo, V. (2014a). Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 16, 239–254.
- Nikel, P. I., Martínez-García, E. und de Lorenzo, V. (2014b). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 368–379.
- Nilsson, M., Chiang, W.-C., Fazli, M., Gjermansen, M., Givskov, M. und Tolker-Nielsen, T. (2011). Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environ. Microbiol.* 13, 1357–1369.
- Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O. und Contiero, J. (2010). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2066–2074.
- Nogales, J., Mueller, J., Gudmundsson, S., Canalejo, F. J., Duque, E., Monk, J., Feist, A. M., Ramos, J. L., Niu, W. und Palsson, B. O. (2020). High-quality genome-scale metabolic modelling of *Pseudomonas putida* highlights its broad metabolic capabilities. *Environ. Microbiol.* 22, 255–269.
- Nogales, J., Palsson, B. und Thiele, I. (2008). A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Syst. Biol.* 2, 79.
- Noll, P., Treinen, C., Müller, S., Senkalla, S., Lilge, L., Hausmann, R. und Henkel, M. (2019). Evaluating temperature-induced regulation of a ROSE-like RNA-thermometer for heterologous rhamnolipid production in *Pseudomonas putida* KT2440. *AMB Express* 9, 154.
- Noordman, W. H. und Janssen, D. B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4502–4508.
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E. und Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microb. Biotechnol.* 12, 125–147.
- Nozawa, Y., Hagihara, M., Matsumura, S. und Ikawa, Y. (2018). Modular architecture of bacterial RNase P ribozymes as a structural platform for RNA nanostructure design. *Chim. Int. J. Chem.* 72, 882–887.
- Nuñez, A., Ashby, R., Foglia, T. A. und Solaiman, D. K. Y. (2001). Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia* 53, 673–677.
- Occhipinti, A., Eyassu, F., Rahman, T. J., Rahman, P. K. S. M. und Angione, C. (2018). In silico engineering of *Pseudomonas* metabolism reveals new biomarkers for increased biosurfactant production. *PeerJ* 6, 6046.
- Ochsner, U. A. (1993). Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant synthesis. Dissertation, ETH Zürich, Zürich.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. und Reiser, J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 2044–2054.
- Ochsner, U. A. und Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6424–6428.
- Ochsner, U. A., Reiser, J., Fiechter, A. und Witholt, B. (1995). Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3503–3506.
- Olasanmi, I. und Thring, R. (2018). The role of biosurfactants in the continued drive for environmental sustainability. *Sustainability* 10, 4817.
- Oldenburg, K., Vo, K. T., Michaelis, S. und Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451–452.
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sánchez, R. und Soberón-Chávez, G. (1999). The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 85–90.
- Paget, M. S. und Helmann, J. D. (2003). The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors. *Genome Biol.* 4.
- Pamp, S. J. und Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189, 2531–2539.
- Pantazaki, A. A., Dimopoulou, M. I., Simou, O. M. und Pritsa, A. A. (2010). Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 939–951.
- Papenfort, K. und Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. und Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.* 179, 1623–1629.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. und Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas*

- aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181, 1203–1210.
- Peng, M. und Liang, Z. (2020). Degeneration of industrial bacteria caused by genetic instability. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 119.
- Perfumo, A., Banat, I. M. und Marchant, R. (2018). Going green and cold: Biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends Biotechnol.* 36, 277–289.
- Perfumo, A., Rudden, M., Smyth, T. J. P., Marchant, R., Stevenson, P. S., Parry, N. J. und Banat, I. M. (2013). Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: Implications for their biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7297–7306.
- Petelska, A. D., Naumowicz, M. und Figaszewski, Z. A. (2011). The interfacial tension of the lipid membrane formed from lipid–amino acid systems. *Cell Biochem. Biophys.* 61, 289–296.
- Pfleger, B. F., Pitera, D. J., Smolke, C. D. und Keasling, J. D. (2006). Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat. Biotechnol.* 24, 1027–1032.
- Piljac, T. und Piljac, G. (2007). Use of rhamnolipids in wound healing, treating burn shock, arteriosclerosis, organ transplants, depression, schizophrenia and cosmetics. Patent-Nr.: US 7262171 B1.
- Pinzon, N. M. und Ju, L. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 975–981.
- Poon, K. K. H., Westman, E. L., Vinogradov, E., Jin, S. und Lam, J. S. (2008). Functional characterization of MigA and WapR: Putative rhamnosyltransferases involved in outer core oligosaccharide biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 1857–1865.
- Potthast, C., Brinker, S. und Maier, K. (2011). Futtermittel aus der Zuckerrübenverarbeitung – neue Daten zu Inhaltsstoffen aus einer bundesweiten Erhebung. *Sugar Ind.* 136, 639–669.
- Price, C. E., Brown, D. G., Limoli, D. H., Phelan, V. V. und O'Toole, G. A. (2019). Exogenous alginate protects *Staphylococcus aureus* from killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 202, e00559-19.
- Price, N. P. J., Ray, K. J., Vermillion, K. E., Dunlap, C. A. und Kurtzman, C. P. (2012). Structural characterization of novel sphorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydr. Res.* 348, 33–41.
- Quina, F. H. und Hinze, W. L. (1999). Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4150–4168.
- Raetz, C. R. H. und Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700.
- Rahim, R., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B. und Lam, J. S. (2000). Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146, 2803–2814.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. und Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40, 708–718.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. und Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour. Technol.* 90, 159–168.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R. und Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* 18, 1277–1281.
- Rao, G., Bambot, S. B., Kwong, S. C. W., Szmazinski, H., Sipior, J., Holavanahali, R. und Carter, G. (2002). Application of fluorescence sensing to bioreactors, In: *Topics in fluorescence spectroscopy*, ed. Lakowicz, J. R., Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. pp 417–448.
- Ray-Soni, A., Bellecourt, M. J. und Landick, R. (2016). Mechanisms of bacterial transcription termination: All good things must end. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 319–347.
- Rehm, B. H. A., Mitsky, T. A. und Steinbüchel, A. (2001). Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by Pseudomonads: Establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3102–3109.
- Rehm, H. J. und Reiff, I. (1981). Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv. Biochem. Eng.* 19, 175–215.
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G. und Freire, D. M. G. (2013). Biosurfactants: Production and Applications, In: *Biodegeneration - Life of science*, Ed. Chamy, R. und Rosenkranz, F., InTech, Rijeka, Kroatien. pp 31–62.
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C. und Freire, D. M. G. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Bioresour. Technol.* 102, 6377–6384.
- Ren, Y., Yang, S., Yuan, Q. und Sun, X. (2015). Microbial production of phenol via salicylate decarboxylation. *RSC Adv.* 5, 92685–92689.
- Resende, A. H. M., Farias, J. M., Silva, D. D. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., Stamford, T. C. M. und Sarubbo, L. A. (2019). Application of biosurfactants and chitosan in toothpaste formulation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 181, 77–84.
- Retallack, D. M., Jin, H. und Chew, L. (2012). Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system. *Protein Expr. Purif.* 81, 157–165.
- Řezanka, T., Siristova, L. und Sigler, K. (2011). Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles* 15, 697–709.

- Ribeiro, B. G., de Veras, B. O., dos Santos Aguiar, J., Medeiros Campos Guerra, J. und Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactant produced by *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in cookie formulation. *Electron. J. Biotechnol.* 46, 14–21.
- Rizzo, M. A., Davidson, M. W. und Piston, D. W. (2009). Fluorescent protein tracking and detection: Fluorescent protein structure and color variants. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4, 12.
- Robitaille, S., Groleau, M. und Déziel, E. (2020). Swarming motility growth favours the emergence of a subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutants. *Environ. Microbiol.* 22, 2892–2906.
- Rocha, V. A. L., Castilho, L. V. A., de Castro, R. P. V., Teixeira, D. B., Magalhães, A. V., Gomez, J. G. C. und Freire, D. M. G. (2020). Comparison of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on microbial enhanced oil recovery (MEOR) applications. *Biotechnol. Prog.* 36, e2981.
- Rodionova, I. A., Li, X., Thiel, V., Stolyar, S., Stanton, K., Fredrickson, J. K., Bryant, D. A., Osterman, A. L., Best, A. A. und Rodionov, D. A. (2013). Comparative genomics and functional analysis of rhamnose catabolic pathways and regulons in bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 407.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J. und Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 609–618.
- Roelants, S. L. K. W., Renterghem, L. Van, Maes, K., Everaert, B., Redant, E., Demaeseneire, S. L. und Soetaert, W. (2019). Microbial biosurfactants: From lab to market, In: *Microbial biosurfactants and their environmental and industrial applications*, Ed. Banat, I. M. und Thavasi, R., CRC Press, Boca Raton, USA. pp 341-363.
- Roosloot, R. und Schoen, P. (2011). A colorimetric assay for determination of residual detergent levels in reconstituted membrane protein preparations. *Anal. Biochem.* 413, 72–74.
- Rosenberg, E. und Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 154–162.
- Ryan, R. P., An, S., Allan, J. H., McCarthy, Y. und Dow, J. M. (2015). The DSF family of cell–cell signals: An expanding class of bacterial virulence regulators. *PLoS Pathog.* 11, 1–14.
- Ryll, R., Kumazawa, Y. und Yano, I. (2001). Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycotic acid-containing glycolipids - A review. *Microbiol. Immunol.* 45, 801–811.
- Sachdev, D. P. und Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1005–1016.
- Sadouk, Z., Hacene, H. und Tazerouti, A. (2008). Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain. *Oil Gas Sci. Technol.* 63, 747–753.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. und Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T. F. und Collado-Vides, J. (2000). Operons in *Escherichia coli*: Genomic analyses and predictions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6652–6657.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- Sánchez-Pascuala, A., Fernández-Cabezón, L., de Lorenzo, V. und Nikel, P. I. (2019). Functional implementation of a linear glycolysis for sugar catabolism in *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* 54, 200–211.
- Sánchez, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marqués, A., Manresa, Á. und Ortiz, A. (2010). Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.* 341, 240–247.
- Santala, S., Efimova, E. und Santala, V. (2018). Dynamic decoupling of biomass and wax ester biosynthesis in *Acinetobacter baylyi* by an autonomously regulated switch. *Metab. Eng. Commun.* 7, 78.
- Sar, N. und Rosenberg, E. (1983). Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Curr. Microbiol.* 9, 309–313.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M. und Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 127–144.
- Satpute, S. K., Plaza, G. A. und Banpurkar, A. G. (2017). Biosurfactants' production from renewable natural resources: Example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. *Manag. Syst. Prod. Eng.* 25, 46–54.
- Sauer, C., Syvertsson, S., Bohorquez, L. C., Cruz, R., Harwood, C. R., van Rij, T. und Hamoen, L. W. (2016). Effect of genome position on heterologous gene expression in *Bacillus subtilis*: An unbiased analysis. *ACS Synth. Biol.* 5, 942–947.
- Schaffer, S., Wessel, M., Thiessenhusen, A. und Stein, N. (2015). Cells and methods for producing rhamnolipids. Patent-Nr.: US 9005928 B2.
- Schmittgen, T. D. und Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Scholtmeijer, K., Wessels, J. G. H. und Wösten, H. A. B. (2001). Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 1–8.
- Seed, P. C., Passador, L. und Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* 177, 654–659.
- Seghal Kiran, G., Thajuddin, N., Hema, T. A., Idhayadhulla, A., Surendar Kumar, R. und Selvin, J. (2010). Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi *Aspergillus* sp. MSF1. *Desalin. Water Treat.* 24, 257–265.

- Sekhon Randhawa, K. K. und Rahman, P. K. S. M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants - past, present, and future scenario of global market. *Front. Microbiol.* 5, 454.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. und D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
- Shah, M. U. H., Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M. und Yusup, S. B. (2016). A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Procedia Eng.* 148, 494–500.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. und Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572.
- Shete, A. M., Wadhawa, G., Banat, I. M. und Chopade, B. A. (2006). Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. *J. Sci. Ind. Res.* 65, 91–115.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R. und de Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 41, D666–D675.
- Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Singh, S. S., Typas, A., Hengge, R. und Grainger, D. C. (2011). *Escherichia coli*  $\sigma^{70}$  senses sequence and conformation of the promoter spacer region. *Nucleic Acids Res.* 39, 5109–5118.
- Slager, J. und Veening, J.-W. (2016) Hard-wired control of bacterial processes by chromosomal gene location. *Trends Microbiol.* 24, 788–800.
- Smith, M. A. und Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: The importance of culture conditions and plasmid size. *Can. J. Microbiol.* 44, 351–355.
- Smith, M. L., Gandolfi, S., Coshall, P. M. und Rahman, P. K. S. M. (2020). Biosurfactants: A Covid-19 perspective. *Front. Microbiol.* 11, 1341.
- Smolke, C. D. (2009). Building outside of the box: iGEM and the BioBricks Foundation. *Nat. Biotechnol.* 27, 1099–1102.
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S. und Banat, I. M. (2010). Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Ed. Timmis K. N., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 3689–3704.
- Soares da Silva, R. de C. F., de Almeida, D. G., Brasileiro, P. P. F., Rufino, R. D., de Luna, J. M. und Sarubbo, L. A. (2019). Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation* 30, 191–201.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. und Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 718–725.
- Soberón-Chávez, G. und Maier, R. M. (2011). Biosurfactants: A general overview, In: *Biosurfactants*, Ed. Soberón-Chávez, G., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 1–12.
- Song, H., Ding, M.-Z., Jia, X.-Q., Ma, Q. und Yuan, Y.-J. (2014). Synthetic microbial consortia: From systematic analysis to construction and applications. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6954–6981.
- Song, Y., Sun, R., Zhao, K., Pan, X., Zhou, H. und Li, D. (2015). An induction current method for determining the critical micelle concentration and the polarity of surfactants. *Colloid Polym. Sci.* 293, 1525–1534.
- Specht, A., Bolze, F., Omran, Z., Nicoud, J. F. und Goeldner, M. (2009). Photochemical tools to study dynamic biological processes. *HFSP J.* 3, 255–264.
- Spiess, E., Bestvater, F., Heckel-Pompey, A., Toth, K., Hacker, M., Stobrawa, G., Feuer, T., Wotzlaw, C., Berchner-Pfannschmidt, U., Porwol, T. und Acker, H. (2005). Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP and EYFP. *J. Microsc.* 217, 200–204.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Subach, O. M., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. und Verkhusha, V. V. (2011). An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS One* 6, e28674.
- Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L. M., Siemann-Herzberg, M. und Schmid, A. (2014). The functional structure of central carbon metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5292–5303.
- Sullivan, E. R. (1998). Molecular genetics of biosurfactant production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 263–269.
- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *J. Valid. Technol.* 17, 46–49.
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. und Witte, L. (1985). Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 40, 51–60.
- Tan, Y. N. und Li, Q. (2018). Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. *Microb. Cell Fact.* 17, 89.
- Ternes, W. (2005). Lebensmittel-Lexikon. Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211–222.
- Thies, S., Rausch, S. C., Kovačić, F., Schmidt-Thaler, A., Wilhelm, S., Rosenau, F., Daniel, R., Streit, W., Pietruszka, J. und Jaeger, K.-E. (2016). Metagenomic discovery of novel enzymes and biosurfactants in a slaughterhouse biofilm microbial community. *Sci. Rep.* 6, 27035.

- Thies, S., Santiago-Schübel, B., Kovačić, F., Rosenau, F., Hausmann, R. und Jaeger, K.-E. (2014). Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 181, 27–30.
- Tiso, T. (2016). Accessing natural diversity of rhamnolipids by metabolic engineering of *Pseudomonas putida*. Dissertation, RWTH-Aachen Universität, Aachen.
- Tiso, T., Ihling, N., Kubicki, S., Biselli, A., Schonhoff, A., Drepper, T., Bator, I., Thies, S., Karmainski, T., Kruth, S., Willenbrink, A. L., Loeschcke, A., Zapp, P., Jupke, A., Jaeger, K.-E., Büchs, J. und Blank, L. (2020). Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 976.
- Tiso, T., Sabelhaus, P., Behrens, B., Wittgens, A., Rosenau, F., Hayen, H., Blank, L. M. (2016). Creating metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida* – Rhamnolipid synthesis as an example. *Metab. Eng. Commun.* 3, 234–244.
- Tiso, T., Thies, S., Müller, M., Tsvetanova, L., Carraresi, L., Bröring, S., Jaeger, K.-E. und Blank, L. M. (2017a). Rhamnolipids: Production, performance, and application, In: *Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: Production of fuels and chemicals*, Ed. Lee, S. Y., Springer International Publishing, Cham, Schweiz. pp 587-622.
- Tiso, T., Zauter, R., Tulke, H., Leuchtle, B., Li, W.-J., Behrens, B., Wittgens, A., Rosenau, F., Hayen, H. und Blank, L. M. (2017b). Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: Production and characterization. *Microb. Cell Fact.* 16, 225.
- Tmáková, L., Sekretár, S. und Schmidt, Š. (2016). Plant-derived surfactants as an alternative to synthetic surfactants: Surface and antioxidant activities. *Chem. Pap.* 70, 188–196.
- Toribio, J., Escalante, A. E. und Soberón-Chávez, G. (2010). Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 1082–1087.
- Tremblay, J., Richardson, A.-P., Lépine, F. und Déziel, E. (2007). Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9, 2622–2630.
- Tripathi, L., Twigg, M. S., Zompra, A., Salek, K., Irorere, V. U., Gutierrez, T., Spyroulias, G. A., Marchant, R. und Banat, I. M. (2019). Biosynthesis of rhamnolipid by a *Marinobacter* species expands the paradigm of biosurfactant synthesis to a new genus of the marine microflora. *Microb. Cell Fact.* 18, 164.
- Troost, K., Loeschcke, A., Hilgers, F., Özgür, A. Y., Weber, T. M., Santiago-Schübel, B., Svensson, V., Hage-Hülsmann, J., Habash, S. S., Grundler, F. M. W., Schleker, A. S. S., Jaeger, K.-E. und Drepper, T. (2019). Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a phototrophic platform organism for the synthesis of plant sesquiterpenoids. *Front. Microbiol.* 10, 1998.
- Tsay, J. T., Oh, W., Larson, T. J., Jackowski, S. und Rock, C. O. (1992). Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 267, 6807–6814.
- Umenhoffer, K., Fehér, T., Balikó, G., Ayaydin, F., Pósfai, J., Blattner, F. R. und Pósfai, G. (2010). Reduced evolvability of *Escherichia coli* MDS42, an IS-less cellular chassis for molecular and synthetic biology applications. *Microb. Cell Fact.* 9, 38.
- Uzoigwe, C., Ennis, C. J. und Rahman, P. K. S. M. (2015). Production of biosurfactants using eco-friendly microorganisms, In: *Environmental Sustainability: Role of Green Technologies*, Ed. Thangavel P. und Sridevi G., Springer India, New Delhi, Indien. pp 185–204.
- Van Bogaert, I., Fleurackers, S., Van Kerrebroeck, S., Develter, D. und Soetaert, W. (2011). Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 734–741.
- Van Bogaert, I. N. A., Buyst, D., Martins, J. C., Roelants, S. L. K. W. und Soetaert, W. K. (2016). Synthesis of bolaform biosurfactants by an engineered *Starterella bombicola* yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 2644–2651.
- van Duuren, J. N. J. H., Wijte, D., Karge, B., Martins dos Santos, V. A. P., Yang, Y., Mars, A. E. und Eggink, G. (2012). pH-stat fed-batch process to enhance the production of *cis*, *cis*-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440-JD1. *Biotechnol. Prog.* 28, 85–92.
- Van Hamme, J. D. und Urban, J. (2009). Biosurfactants in bioremediation, In: *Advances in Applied Bioremediation* Soil Biology., Ed. Singh, A., Kuhad, R. C. und Ward, O. P., Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg, Deutschland. pp 73-90.
- Vance, S. J., McDonald, R. E., Cooper, A., Smith, B. O. und Kennedy, M. W. (2013). The structure of latherin, a surfactant allergen protein from horse sweat and saliva. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130453.
- Vandenbussche, G., Clercx, A., Clercx, M., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H. und Ruyschaert, J. M. (1992). Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 31, 9169–9176.
- Vandermies, M. und Fickers, P. (2019). Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms* 7, 40.
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Bateja, S., Sharma, M. C. und Upasani, V. N. (2007). Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 3, 9205–9213.
- Varjani, S. J. und Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232, 389–397.
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F. und Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5095–5108.
- Vaux, D. J. und Cottingham, M. (2007). Method and apparatus for measuring surface configuration. Patent-Nr.: US 7224470 B2.
- Vecino, X., Barbosa-Pereira, L., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M. und Moldes, A. B. (2014). Study of the surfactant properties of aqueous stream from the corn milling industry. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5451–5457.
- Vecino, X., Cruz, J. M., Moldes, A. B. und Rodrigues, L. R. (2017). Biosurfactants in cosmetic formulations: Trends and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 911–923.

- Venturelli, O. S., Tei, M., Bauer, S., Chan, L. J. G., Petzold, C. J. und Arkin, A. P. (2017). Programming mRNA decay to modulate synthetic circuit resource allocation. *Nat. Commun.* 8, 15128.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 274–291.
- Verhoef, S., Ballerstedt, H., Volkens, R. J. M., de Winde, J. H. und Ruijsenaars, H. J. (2010). Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: Novel responses and implications for strain improvement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 679–690.
- Vickers, C. E., Blank, L. M. und Krömer, J. O. (2010). Grand challenge commentary: Chassis cells for industrial biochemical production. *Nat. Chem. Biol.* 6, 875–877.
- Victor, I. U., Kwiciencien, M., Tripathi, L., Cobice, D., McClean, S., Marchant, R. und Banat, I. M. (2019). Quorum sensing as a potential target for increased production of rhamnolipid biosurfactant in *Burkholderia thailandensis* E264. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6505–6517.
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W. und Speight, R. (2018). Effect of plasmid design and type of integration event on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02712-17.
- von Wehrden, H., Kater-Wettstädt, L. und Schneidewind, U. (2019). Fridays for Future aus nachhaltigkeitswissenschaftlicher Perspektive. *GAIA - Ecol. Perspect. Sci. Soc.* 28, 307–309.
- Vrljic, M., Sahm, H. und Eggeling, L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 22, 815–826.
- Vulliezlenormand, B. und Eisele, J. L. (1993). Determination of detergent critical Micellar concentration by solubilization of a colored dye. *Anal. Biochem.* 208, 241–243.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P. und Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 4372–4380.
- Wagnieres, G. A., Star, W. M. und Wilson, B. C. (1998). *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem. Photobiol.* 68, 603–632.
- Walter, V., Syldatk, C. und Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms, In *Biosurfactants*, Ed. Sen R., Springer Science+Business Media, Bosten, USA. pp 1–13.
- Wang, L., Dash, S., Ng, C. Y. und Maranas, C. D. (2017). A review of computational tools for design and reconstruction of metabolic pathways. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2, 243–252.
- Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., Liu, H. und Ma, L. Z. (2014a). Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6724–6732.
- Wang, W., Cai, B. und Shao, Z. (2014b). Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. *Front. Microbiol.* 5, 711.
- Wang, G., Zhao, Z., Ke, J., Engel, Y., Shi, Y. M., Robinson, D., Bingol, K., Zhang, Z., Bowen, B., Louie, K., Wang, B., Evans, R., Miyamoto, Y., Cheng, K., Kosina, S., De Raad, M., Silva, L., Luhrs, A., Lubbe, A., Hoyt, D. W., Francavilla, C., Otani, H., Deutsch, S., Washton, N. M., Rubin, E. M., Mouncey, N. J., Visel, A., Northen, T., Cheng, J.-F., Bode, H. B. und Yoshikuni, Y. (2019a). CRAGE enables rapid activation of biosynthetic gene clusters in undomesticated bacteria. *Nat. Microbiol.* 4, 2498–2510.
- Wang, Y., Horlamus, F., Henkel, M., Kovačić, F., Schläfle, S., Hausmann, R. und Rosenau, F. (2019b). Growth of engineered *Pseudomonas putida* KT2440 on glucose, xylose, and arabinose: Hemicellulose hydrolysates and their major sugars as sustainable carbon sources. *GCB Bioenergy* 11, 249–259.
- Weber, T. und Kim, H. U. (2016). The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synth. Syst. Biotechnol.* 1, 69–79.
- Wecke, T., Bauer, T., Harth, H., Mäder, U. und Mascher, T. (2011). The rhamnolipid stress response of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 323, 113–123.
- Wehrs, M., Tanjore, D., Eng, T., Lievens, J., Pray, T. R. und Mukhopadhyay, A. (2019). Engineering robust production microbes for large-scale cultivation. *Trends Microbiol.* 27, 524–537.
- Wehrs, M., de Beaumont-Felt, A., Goranov, A., Harrigan, P., de Kok, S., Lieder, S., Vallandingham, J. und Tyner, K. (2020). You get what you screen for: On the value of fermentation characterization in high-throughput strain improvements in industrial settings. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Online ahead of print.
- Weihmann, R., Domröse, A., Drepper, T., Jaeger, K. und Loeschcke, A. (2020). Protocols for yTREX/Tn5-based gene cluster expression in *Pseudomonas putida*. *Microb. Biotechnol.* 13, 250–262.
- Westers, H., Dorenbos, R., Van Dijk, J. M., Kabel, J., Flanagan, T., Devine, K. M., Jude, F., Séror, S. J., Beekman, A. C., Darmon, E., Eschevins, C., De Jong, A., Bron, S., Kuipers, O. P., Albertini, A. M., Antelmann, H., Hecker, M., Zamboni, N., Sauer, U., Bruand, C., Ehrlich, D. S., Alonso, J. C., Salas, M. und Quax, W. J. (2003). Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol. Biol. Evol.* 20, 2076–2090.
- Wigneswaran, V., Nielsen, K. F., Sternberg, C., Jensen, P. R., Folkesson, A. und Jelsbak, L. (2016). Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb. Cell Fact.* 15, 181.
- Willetts, N. und Skurray, R. (1980). The conjugation system of F-like plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 14, 41–76.
- Williams, W., Kunorozva, L., Klaiber, I., Henkel, M., Pfannstiel, J., Van Zyl, L. J., Hausmann, R., Burger, A. und Trindade, M. (2019). Novel metagenome-derived ornithine lipids identified by functional screening for biosurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 4429–4441.

- Williams, W. und Trindade, M. (2017). Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants, In: *Functional Metagenomics: Tools and Applications*, Ed. Charles, T. C., Liles, M. R. und Sessitsch, A., Springer International Publishing, Cham, Schweiz. pp 95–117.
- Willumsen, P. A. und Karlson, U. (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415–423.
- Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W. und Brinkman, F. S. L. (2011). *Pseudomonas* Genome Database: Improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 596–600.
- Wittgens, A. (2013). Konstruktion neuer Produktionsstämme für die heterologe Rhamnolipidsynthese in dem nicht-pathogenen Wirt *Pseudomonas putida* KT2440. Dissertation, Universität Ulm, Ulm.
- Wittgens, A., Kovačić, F., Müller, M. M., Gerlitzki, M., Santiago-Schübel, B., Hofmann, D., Tiso, T., Blank, L. M., Henkel, M., Hausmann, R., Sylđatk, C., Wilhelm, S. und Rosenau, F. (2017). Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2865–2878.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Sylđatk, C., Rosenau, F. und Blank, L. M. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb. Cell Fact.* 10, 80.
- Wynands, B., Lenzen, C., Otto, M., Koch, F., Blank, L. M. und Wierckx, N. (2018). Metabolic engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 with minimal genomic modifications for high-yield phenol production. *Metab. Eng.* 47, 121–133.
- Wynands, B., Otto, M., Runge, N., Preckel, S., Polen, T., Blank, L. M. und Wierckx, N. (2019). Streamlined *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 cassis strains with improved bioprocess features. *ACS Synth. Biol.* 8, 2036–2050.
- Xavier, J. B., Kim, W. und Foster, K. R. (2011). A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 79, 166–179.
- Xu, W., Klumbys, E., Ang, E. L. und Zhao, H. (2020). Emerging molecular biology tools and strategies for engineering natural product biosynthesis. *Metab. Eng. Commun.* 10, 108.
- Yang, H., Yu, H. und Shen, Z. (2015). A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 1139–1147.
- Yang, S.-T. (2007). Bioprocessing for value-added products from renewable resources. Elsevier Science & Technology Books, New York, USA.
- Ye, R. W., Zielinski, N. A. und Chakrabarty, A. M. (1994). Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 176, 4851–4857.
- Yu, S., Plan, M. R., Winter, G. und Krömer, J. O. (2016). Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for the production of *p*-hydroxy benzoic acid. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4, 90.
- Yuste, L., Hervas, A. B., Canosa, I., Tobes, R., Jimenez, J. I., Nogales, J., Perez-Perez, M. M., Santero, E., Diaz, E., Ramos, J.-L., de Lorenzo, V. und Rojo, F. (2006). Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ. Microbiol.* 8, 165–177.
- Zhang, L., Veres-Schalnat, T. A., Somogyi, A., Pemberton, J. E. und Maier, R. M. (2012). Fatty acid cosubstrates provide  $\beta$ -oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8611–8622.
- Zhang, M. M., Wang, Y., Ang, E. L. und Zhao, H. (2016). Engineering microbial hosts for production of bacterial natural products. *Nat. Prod. Rep.* 33, 963–987.
- Zhang, J. J., Tang, X., Huan, T., Ross, A. C. und Moore, B. S. (2020). Pass-back chain extension expands multimodular assembly line biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 16, 42–49.
- Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S. und Stephanopoulos, G. (2015). Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nat. Biotechnol.* 33, 377–383.
- Zielinski, N. A., Chakrabarty, A. M. und Berry, A. (1991). Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encoding phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* 266, 9754–9763.
- Ziemert, N., Alanjary, M. und Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. *Nat. Prod. Rep.* 33, 988–1005.
- Zieringer, J. und Takors, R. (2018). *In silico* prediction of large-scale microbial production performance: Constraints for getting proper data-driven models. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16, 246–256.
- Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., de Lorenzo, V., Wierckx, N. und Blank, L. M. (2015). Tn7-based device for calibrated heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth. Biol.* 4, 1341–1351.
- Zuckerkindl, E. und Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins, In: *Evolving genes and proteins*, Ed. Bryson, V. und Vogel, H. J., Academic Press, Cambridge, USA. pp 167–172.

# Anhang

## A.1 Abbildungen

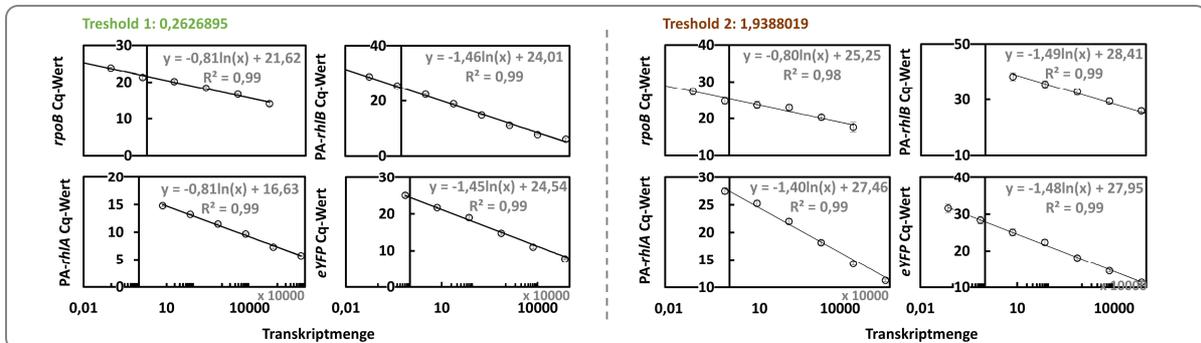


Abb. A-1: Vergleich der Kalibrierungen von *rpoB*, *rhlA*, *rhlB* und *eYFP* zur Berechnung der Transkriptmenge innerhalb der RT-qPCR mit verschiedenen Thresholds.

```

TGTGGGCGGACAAAATAGTTGGGAAGCTGGGAGGGGTGAAATGGAGTTTTTAAGGATTATTAG
GGAAGAGTGACAAAATAGATGGGAAGCTGGGTGTAGCGTCGTAAGCTAATACGAAAATAAAAATG
Tn7-L
ACAAAATAGTTTGGAACTAGATTTCACTTATCTGGTTTATCTGCAGCACTCAACAGATCTCCGTCT
NHB_v
ACTTGCGACACCTCTTAAGGTAGCTGGACCGGATTCGGGTCTAGCCTATATCGTCAATCCGTT
I-PpoI HB_P_fw
GATCTATGTGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGGCGATCGCCACAGCTTACACAGAC
PI-SceI AsiSI
CTAATCGTAGAGTTCCTAGTAATACTTAGTGGCTCGTTACCTCGTTCTCCAGGCCAGGGGCCG
CIS I
TACGCGCTCGCGAACAGTATAAGCAGATTCGACTCACTAGGGATAACAGGGTAATCTCTGGGT
ATCGACTCAATCTCGCGCTATTGTGCTATATCCGTGGACGGTTCGGTCAATTCTGTCCGAAAAT
CIS II
CAACGGATACGAACAATTACTCGGACTTCCTCAATACGTGCTGCAACGCGCGGTAACATAAC
MauBI
GGTCTAAGGTAGCGAGCTTACTTGTGCTGTTGTGTAAGGACACGCTTAACCCAGAGAATTCCA
I-CeuI HB_R_rv EcoRI
GCGACTTATTCTACGACTACGCGTCCATGGCTCGAGGAGCTCGGTACC GCCCACTACCCGATT
MC
TATCAAGATTTGGCGGAGAGTCCCGTTCGACTGGCAAACAGCTATTATGGGTATTATGGGTGTGT
HB_M_fw Sall PI-PspI
ATCCAGAACGACGGATCTTGACGCAATTTGGCGTGGCTCTCTTAAGGTAGCCCTCCGACCAATT
HB_M_rv I-PpoI
GAGGTGCGCTCTGACCGATCAGTTTAGAACAAAAGTCCAGTATGCTTTTTTACAGCATAACTGGA
NHB_h Tn7-R
CTGATTTACAGTTTACAACCTTCTGTCTAGTTAAGACTTTATTGTATAGTTTATAGTCTATTTTGT
CAGTTTAAGACTTTATTGTCCGCCACA
    
```

Abb. A-2: Gensequenz und markierte Elemente der synthetisch hergestellten L- und R-TREX-toolbox Kasette (YT\_core; s. a. Genbank Accession Nr. MT522186).

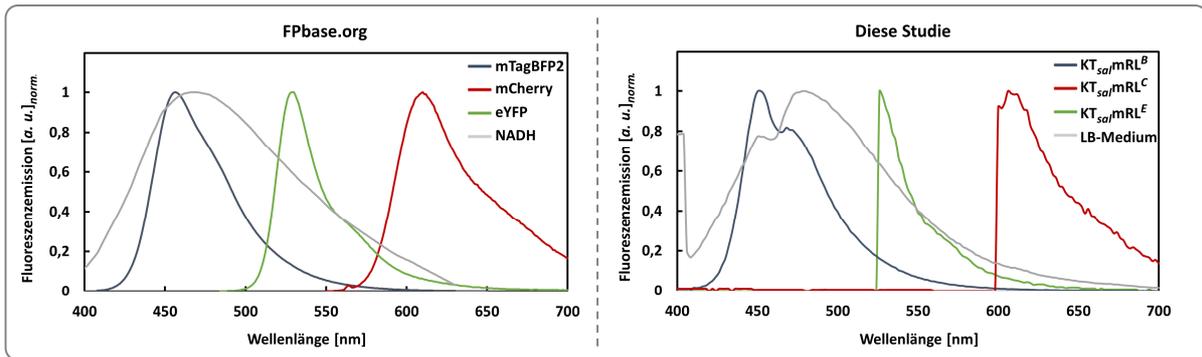


Abb. A-3: Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren der hier betrachteten Fluoreszenzproteine/ NADH auf FPBase.org mit in dieser Studie gewaschenen Zellen sowie LB-Medium.

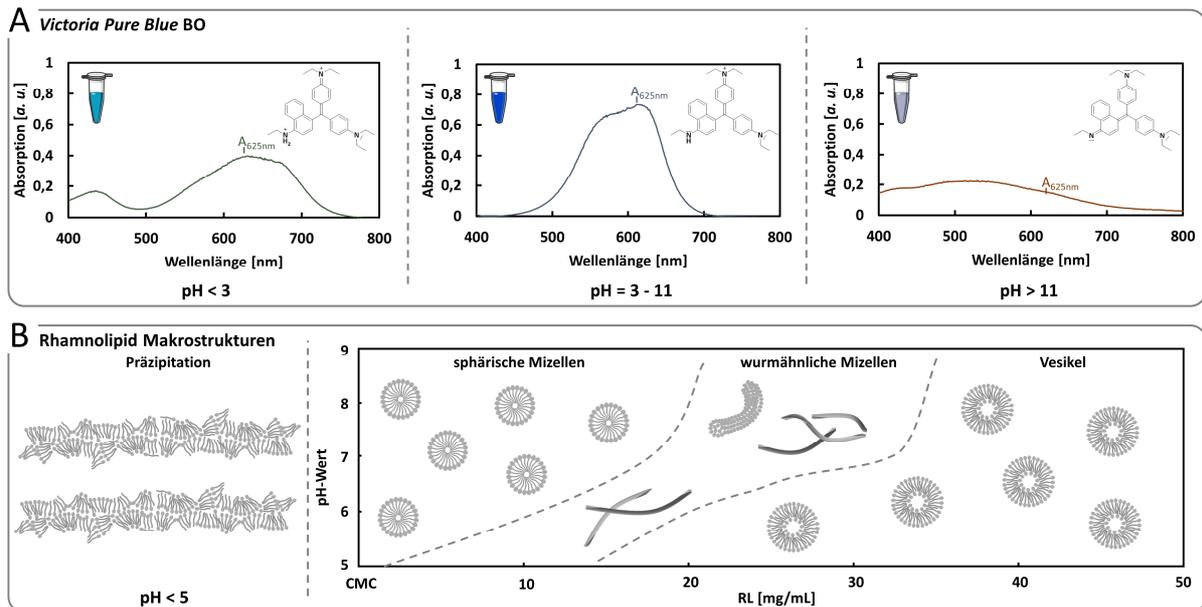


Abb. A-4: Einfluss des Protonierungsgrades auf das Absorptionsspektrum von *Victoria Pure Blue BO* und Rhamnolipid-Makrostrukturen (nach Brandt et al., 2018; Kubicki et al., 2020).

A: Die pH-Kapazität des VPBO-Farbstoffs aus dem Absorptionsverhalten in Lösungen mit unterschiedlichem pH-Werten (s. a. Kubicki et al., 2020)

B: Rhamnolipid Makrostrukturen in Anlehnung an Brandt et al., 2018 in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert.

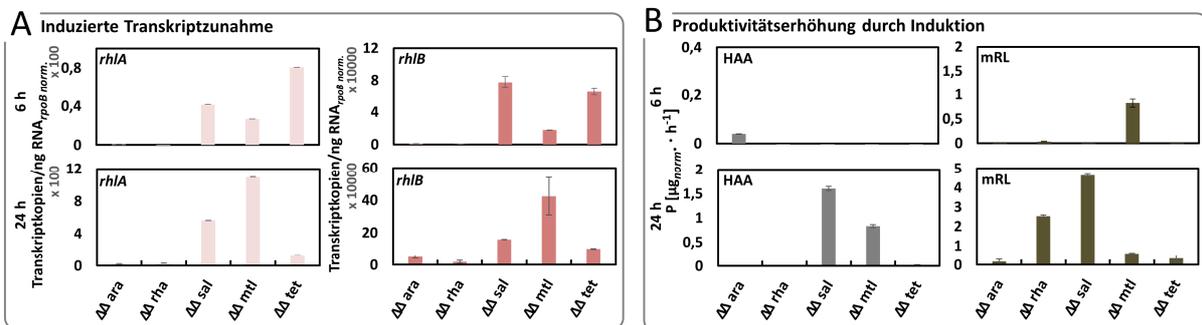
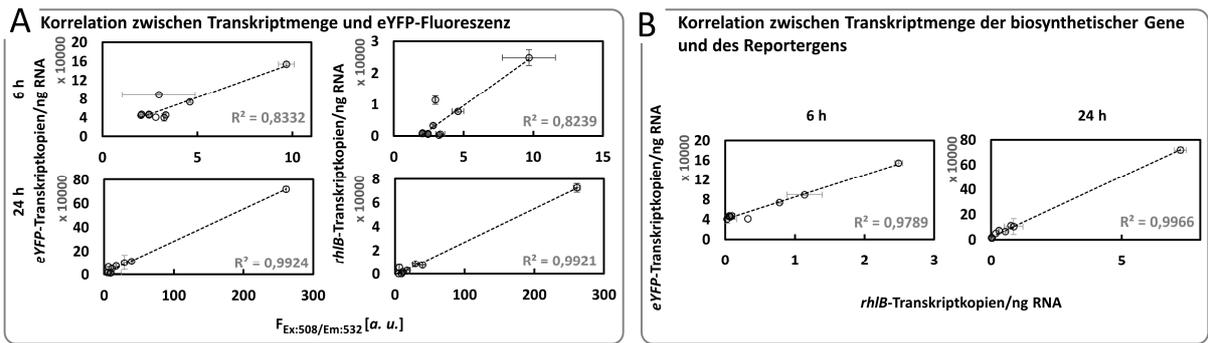
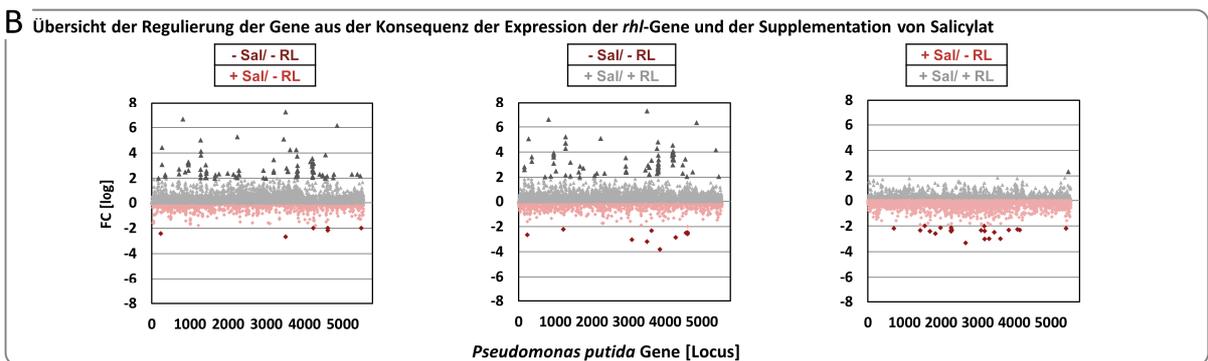
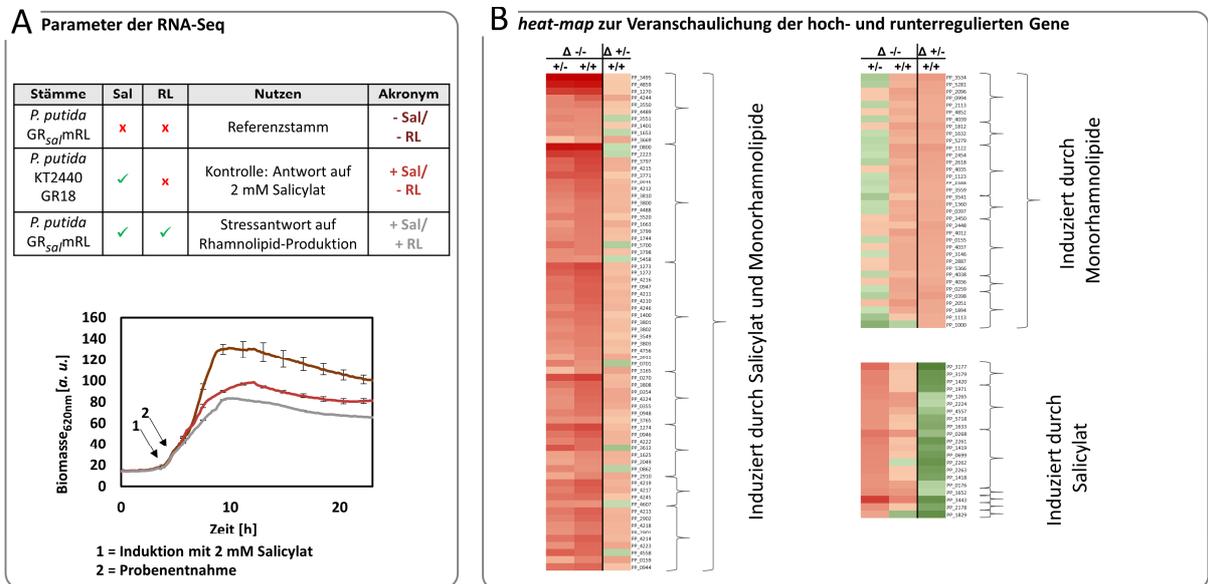


Abb. A-5: Induzierte Transkript- und Produktivitätszunahme in rekombinanten *Pseudomonas putida* KT2440 Produzenten.

Die Werte repräsentieren Mittelwerte von biologischen Triplikaten mit deren Standardabweichung als Fehlerbalken. **A:** Zur Veranschaulichung der Netto-Transkriptzunahme ( $\Delta\Delta$ ) der induzierten Stämme wurde die normierte *rhIA* und *rhIB* Transkriptmenge in der logarithmischen (6 h) und (nahen) stationären (24 h) Wachstumsphase ermittelt und mit die in den nicht induzierten Stämmen vorhandene Basalexpression abgezogen. **B:** Die Erhöhung der Produktivität durch Induktion der rekombinanten *P. putida* KT2440 Produzenten wurde analog zu (A) mit dem jeweiligen normierten HAA- und mRL-Titern ermittelt. Verwendete und modifizierte Objekte in der Abbildung von Servier Medical Art stehen unter einer Creative-Commons-Lizenz (CC BY 3.0).



**Abb. A-6: Korrelation zwischen der ausgebildeten eYFP-Fluoreszenz und der ermittelten Transkriptmenge.** Für die Stämme ara+, rha+, sal+, mtl+, tet+, 4593, rpoS, hupA, boIA und lac (vgl. III.2.1) wurden die Transkriptmengen zueinander sowie mit der eYFP-Fluoreszenz korreliert.  $R^2$  ist in den jeweiligen Diagrammen angegeben.  
**A:** Korrelation zwischen der resultierenden eYFP-Fluoreszenz und der dazugehörigen Transkriptmenge der Gene *eYFP* und *rhIB*.  
**B:** Korrelation zwischen Transkriptmenge des Gens *rhIB* und des Reportergens *eYFP*.



**Abb. A-7: Parameter und Resultate der Transkriptomanalyse zur Identifizierung potenzieller Ziele zur Optimierung der Rhamnolipid-Produktion.** Übersicht über wichtige Parameter zur Kultivierung (**A**), der resultierenden heatmap zur Darstellung der Hoch- bzw. Herabregulierung von Genen (Auswahl an vielversprechenden Kandidatengenen; s. Kategorisierung Tab. III-5) durch Vergleich der Stämme induziert durch Salicylat und/oder Monorhamnolipide (**B**); Farben kodieren den FC [log]; blass-rot bis dunkelrot = Hochregulierung; hellgrün bis dunkelgrün = Herabregulierung) und Übersicht der Anzahl regulierter Gene (**C**). Zur besseren Veranschaulichung wurde in (**A**) nur zu jedem zehnten Datenpunkt die Standardabweichung zugeordnet (biologische Triplikate).

## A.2 Tabellen

**Tab. A-1: Nomenklaturerläuterung zu yTREX-toolbox Vektoren (pYTUVX\_WXZ).**

Fluoreszenzreporter 1-5: eYFP, mTagBFP2, mCherry, GFP (Jung, 2012); FbFP (FMN-bindende Fluoreszenzproteine/ (\*) = Variante nicht definiert (Drepper et al., 2007)). Enzyme 6-8: P-EH (Bollinger et al., 2020); Lac Z (Weihmann et al., 2020); GUS (Frampton et al., 1988).

W = Reporter		X = Resistenzmarker (Grundgerüst/ Kasette)		Z = Integrationsmodus	
0	kein Reporter	x	kein Marker	5	Transposon Tn5
1	eYFP	A	Ampicillin	7	Transposon Tn7
2	mTagBFP2	T	Tetracyclin	i	Interposon
3	mCherry	C	Chloramphenicol	i1	Interposon 16S-RNA
4	GFP	K	Kanamycin		
5	FbFP*	G	Gentamicin	<b>U Kürzel des Erstellers</b>	
6	P-EH	S	Spectinomycin/Streptomycin		
7	LacZ	Y	Cycloheximid	<b>V fortlaufende Nummer</b>	
8	GUS				

**Tab. A-2: Heterogenität in der Fluoreszenz nach 24 h-Kultivierung von *Pseudomonas putida*  $KT_K^B$ ,  $KT_K^E$ ,  $KT_K^C$ ,  $KT_{sa}mRL^B$ ,  $KT_{sa}mRL^E$  und  $KT_{sa}mRL^C$ .**

Salicylat [mM]	Stamm	prozentuale Verteilung [%]		Stamm	prozentuale Verteilung [%]		Stamm	prozentuale Verteilung [%]	
		mBFP negativ	mBFP positiv		eYFP negativ	eYFP positiv		mCherry negativ	mCherry positiv
K 0	$KT_K^B$	99	1	$KT_K^E$	99	1	$KT_K^C$	98	2
K 2	$KT_K^B$	99	1	$KT_K^E$	100	0	$KT_K^C$	99	1
0	$KT_{sa}mRL^B$	94	6	$KT_{sa}mRL^E$	98	2	$KT_{sa}mRL^C$	89	11
0,001		91	9		83	17		71	29
0,1		69	31		39	61		56	44
2		<b>71</b>	<b>29</b>		<b>17</b>	<b>83</b>		<b>54</b>	<b>46</b>
5		41	59		32	68		56	44
10	47	53	69	31	58	42			

**Tab. A-3: Wachstums- und drop-collapsing-Ergebnisse der im *Victoria Pure Blue BO*-Assay eingesetzten Rhamnolipid-produzierenden Stämme.**

Akronym	Stamm	Plasmide	OD <sub>580nm</sub>		drop-collapsing	
			6 h	24 h	6 h	24 h
PP_wt	<i>P. putida</i> KT2440	-	3,17	5,89		
PP_HAA		pSB01	2,81	6,55		
PP_mRL		pPS05	2,23	5,31		
PP_dRL		pWJ02	1,85	5,15		

Tab. A-4: Kongener-Titer in Kulturüberständen von *Pseudomonas putida* KT2440 pSB01, pPS05 und pWJ02 quantifiziert über HPLC-CAD (Kubicki et al., 2020).

Kongener		Titer [g/L]					
		<i>P. putida</i> KT2440 pSB01		<i>P. putida</i> KT2440 pPS05		<i>P. putida</i> KT2440 pWJ02	
		6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
HAA	C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	0	0,02	0	0	0,01	0
	C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	0	0	0,01	0
	C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	0	0	0	0	0	0
	C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	0	0	0	0	0	0
mRL	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	-	-	0	0,02	0	0
	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	-	-	<b>0,06</b>	<b>0,24</b>	0,04	0,08
	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10:1</sub>	-	-	0,01	0,05	0,01	0,01
	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	-	-	0,01	0,06	0,01	0,01
dRL	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	-	-	-	-	0	0,01
	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	-	-	-	-	<b>0,06</b>	<b>0,3</b>
	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10:1</sub>	-	-	-	-	0,01	0,08
	Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	-	-	-	-	0,02	0,1
Σ Biotenside		<b>0,06</b>	<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	<b>0,37</b>	<b>0,17</b>	<b>0,6</b>

Tab. A-5: Übersicht über die in dieser Studie untersuchten stationär-Wuchsphase aktiven Promotoren auf Transkriptebeine (GEO DataSet Accession Nr. GSE85578).

Gen	Locus	Annotation	FC [log]	Referenz
-	PP_4593	Hypothetisches Protein	5,44	-
rpoS	PP_1623	RNA-Polymerase-Sigma-Faktor RpoS	3,78	Yuste et al., 2006
hupA	PP_5313	Histonfamilienprotein DNA-bindendes Protein	3,05	Yuste et al., 2006
bolA	PP_1757	Protein der BolA-Familie	1,32	Miksch und Dobrowolski, 1995

Tab. A-6: Übersicht über die erreichten HAA- und mRL-Titer der rekombinanten *Pseudomonas putida* KT<sub>x</sub>mRL<sup>E</sup> nach 6 und 24 h.

Die Induktion mit den in Tab. II-10 angegebenen Konzentration entsprechend des Promotorsystem (Tab. I-2) ist mit einem (+) gekennzeichnet.

<i>P. putida</i> KT <sub>x</sub> mRL <sup>E</sup>		K	ara+	rha+	sal+	mtl+	tet+	4593	rpoS	hupA	bolA	lac	ffg	syn16
6 h	Σ HAA [g/L]	-	-	-	0,00	0,09	0,00	-	-	-	-	0,00	0,11	-
	Σ mRL [g/L]	-	-	-	0,01	0,24	0,01	-	-	-	-	0,02	0,27	0,10
24 h	Σ HAA [g/L]	-	-	0,00	0,33	0,90	0,05	-	-	-	-	-	0,55	0,01
	Σ mRL [g/L]	-	0,02	0,40	0,97	1,44	0,40	-	-	-	-	0,06	1,31	0,69

Tab. A-7: Übersicht über die Reduktion des Genoms in *Pseudomonas putida* KT2440 GR18 (Bator, 2020).

Biosynthesewege	deletierte Gene [Locus]	Reduktion [bp]	Reduktion [%]
Genom		6181873	100,00
Pyoverdine	PP_4219-4221	24986	0,57
Flag1	PP_4328-4344	18988	0,44
Flag2	PP_4351-4397	43537	1,00
Alginate	PP_1277-1288	16081	0,37
Cellulose	PP_2634-2638	10217	0,23
PeA	PP_3132-3142	12068	0,28
PeB	PP_1795-1788	11733	0,27
LapA	PP_0168	26049	0,60
LapF	PP_0806	18933	0,43
nach Reduktion		5999281	95,81

**Tab. A-8: Retentionszeiten aus der HPLC-CAD Analyse für die in *Pseudomonas putida* KT2440 heterolog produzierten *P. aeruginosa*/*B. glumae*-Typ Rhamnolipide (Isabel Bator, iAMB, RWTH Aachen).**

<i>P. aeruginosa</i> -Typ RL-Kongenerere [15 min Methode]		<i>B. glumae</i> -Typ RL-Kongenerere [25 min Methode]			
Kongener	Retentionszeit [min]	Kongener	Retentionszeit [min]	Kongener	Retentionszeit [min]
Rha-Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	3,23	Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	4,30	C <sub>12:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	14,00
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	4,41	C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	5,60	C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub>	14,40
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	5,03	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	6,30	Rha-C <sub>14:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	14,70
C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	6,01	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	6,67	C <sub>12</sub> -C <sub>14:1</sub>	15,20
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	6,59	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	8,20	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14:1</sub>	15,20
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	7,07	C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	8,30	Rha-Rha-C <sub>14:1</sub> -C <sub>16:1</sub>	15,50
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	8,20	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub>	8,40	C <sub>14:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	16,00
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	9,11	Rha-Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	9,00	Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	16,30
C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	9,33	Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub>	9,40	Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14:1</sub>	17,30
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	11,07	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	9,60	C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	17,60
C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	11,55	C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	9,80	Rha-C <sub>14:1</sub> -C <sub>16:1</sub>	17,80
C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	12,43	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub>	10,60	Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	17,80
		C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	11,20	C <sub>14</sub> -C <sub>14:1</sub>	18,50
		Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	11,40	C <sub>14:1</sub> -C <sub>16:1</sub>	18,90
		Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14:1</sub>	11,40	Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	20,00
		C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub>	12,15	Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>16:1</sub>	20,50
		Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14:1</sub>	12,62	Rha-C <sub>14:1</sub> -C <sub>16</sub>	20,80
		Rha-Rha-C <sub>14:1</sub> -C <sub>14:1</sub>	12,70	C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	21,10
		Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub>	12,90	C <sub>14</sub> -C <sub>16:1</sub>	21,50
		Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14:1</sub>	13,80	C <sub>14:1</sub> -C <sub>16</sub>	21,80
		Rha-Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>	13,80		

**Tab. A-9: Vergleich der HAA-, mRL-, und dRL-Titer in *Pseudomonas putida* KT<sub>sa</sub>mRL und KT<sub>sa</sub>dRL.**

Die Biotensid-Titer wurden nach 24 h Kultivierung (s. a. II.2.1.1) nach Induktion mit 2 mM Salicylat (nach 3,5 h) ermittelt.

<i>P. putida</i> KT <sub>sa</sub> mRL			<i>P. putida</i> KT <sub>sa</sub> dRL		
∑ HAA [g/L]	∑ mRL [g/L]	∑ dRL [g/L]	∑ HAA [g/L]	∑ mRL [g/L]	∑ dRL [g/L]
0,29	0,99	-	0,13	0,62	0,53

**Tab. A-10: Vergleich von vorhergesagten logP-Werten einiger Rhamnolipid-Kongenerere.**

Die Werte wurden mit Hilfe von CAS SciFinder ermittelt (Tab. II-8). Ein niedriger logP-Wert indiziert eine höhere Affinität für die wässrige Phase (hydrophil), ein höherer logP-Wert ist assoziiert mit einer höheren Konzentration der Verbindung in der Lipidphase (hydrophob).

RL-Kongenerere	logP bei 25 °C	Löslichkeit bei pH = 7/25 °C [g/L]
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	5,3	14 (löslich)
Rha-Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	4,8	12 (löslich)
Rha-Rha-C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	8,9	0,12 (kaum löslich)

# Lebenslauf

Informationen aus datenschutzrechtlichen Gründen online nicht verfügbar.

## Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig unter Anleitung verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem wurden die Übernahme wörtlicher Zitate aus der Literatur sowie die Verwendung der Gedanken anderer Autoren unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“, an den entsprechenden Stellen innerhalb der Arbeit gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 25. August 2020

Sonja Kubicki