

DBU Abschlussbericht

Berichtszeitraum: 15.07.2010 – 31.12.2010

(Laufzeit bis 15.11.2010, plus Verlängerung)

Umweltschonende Herstellung und Aufreinigung von Biotensiden (Rhamnolipiden) mit dem nicht-pathogenen Bakterium *Pseudomonas putida* (Phase 1)

AZ 13235

Zusammenfassung

Ziel des Gesamtprojektes (Phase 1 und Phase 2) ist die Entwicklung eines nachhaltigen Produktionsverfahrens für Rhamnolipide mit Hilfe eines nicht-pathogenen Bakteriums als Katalysator und umweltschonender Produktaufarbeitung.

Dabei zielt das Projekt durch Bündelung der Expertisen beginnend bei der Stammkonstruktion, über die Optimierung von Stämmen und Verfahrenstechniken bis hin zum Scale-Up und der Entwicklung alternativer Produktaufarbeitungstechniken direkt auf einen Transfer von Technologie der akademischen Partner hin zu den Industriepartnern ab.

Durch balanzierte Expression der relevanten Biosynthese Gene/ Operons aus *P. aeruginosa* im nicht-pathogenen Stamm *P. putida*, der sich durch eine hohe Toleranz gegenüber dem Rhamnolipid als Produkt auszeichnet, soll dessen Produktivität gesteigert werden. Hierzu wurde in Kooperation mit der Firma Evocatal ein neues System zur Konstruktion und nachfolgenden Durchmusterung von Bibliotheken synthetischer Promotoren entwickelt. Dieses innovative Promoter-Trap-System basiert auf den neuartigen evoglow-Reporterproteinen und wurde bereits genutzt, um eine Promotorbank zu erzeugen, die nunmehr in Kooperation getestet wird. Hierzu wurde die Parallelkultivierung rekombinanter *P. putida* im BioLector-System erfolgreich etabliert und die Technik genutzt, um die Toleranz der Stämme gegenüber hohen Produkttitern und die Kompatibilität des verwendeten Antibiotikums zu bestätigen. Ferner wurde gezeigt, dass die Schaumbildung keine Limitierung für den Einsatz des Systems darstellt. Somit steht bereits jetzt die notwendige Hochdurchsatzmethodik zur Isolierung geeigneter Promotoren zur Verfügung. Durch Analyse des metabolischen Netzwerks konnte in einem ersten erfolgreichen Schritt das Potential des Stammes für eine metabolische Optimierung gezeigt werden. Hierbei wurde die Rhamnolipidproduktion durch Verwendung einer Mutante des um Vorläufermoleküle konkurrierenden Stoffwechselweg zur Synthese von Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) um den Faktor 3,5 gesteigert werden. Ferner wurde eine Entkopplung von Zellwachstum und

Rhamnolipidproduktion gezeigt, die eine vereinfachte Optimierung der Leistungsfähigkeit des Wirtsmetabolismus und des genetischen Konstrukts zur Rhamnolipidproduktion erlauben wird. In Up-scaling-Versuchen wurde die rekombinante Produktion von Rhamnolipiden erfolgreich im 50 Liter-Maßstab durchgeführt. Es zeigte sich, dass das gezielte Ausschäumen des Produkts eine Anreicherung um ca. den Faktor 100 erbringen kann, was eine interessante Option zur Verbesserung der Reinigung im Sinne der Umweltfreundlichkeit darstellt. Der Test von Adsorbentien verlief ebenso vielversprechend wie erste Versuche zur Reinigung von Monorhamnolipiden. Die Produktion von Rhamnolipiden war ferner unter Verwendung von Glukose in Mineralmedium möglich. Die technischen Daten für einen Vergleich des bisherigen Prozesses mit den bereits verfügbaren Parametern des hier entwickelten Prozesses unter Gesichtspunkten der Umwelteffizienz wurden bereits gesammelt und kommuniziert - sie werden in einer späteren Projektphase Grundlage einer entsprechenden Analyse in Kooperation mit dem Institut für Umweltinformatik sein.

Derzeit ist bereits ein großer Teil der Projektziele aus Phase 1 erzielt, bzw. es ist klar abzusehen, dass sie erzielt werden können. Somit sind die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bearbeitung der Phase 2 erfüllt, die dann zu dem beabsichtigten und projektierten industriellen Verfahren führen wird.

Berichtteil 1 – Berichtszeitraum 15.2.2010 – 15.07.2010 (siehe Statusbericht zur Projektverlängerung)

1. Hintergrund und Ziele

Innovativer Charakter des Projekts

Heute ist die industrielle Herstellung rekombinanter Proteine keine grundsätzliche wissenschaftliche Herausforderung mehr. Auch bei etlichen niedermolekularen Metaboliten des Primärstoffwechsels gab es durch systembiotechnologische Ansätze neue Produkte und beachtliche Produktivitätssteigerungen. Ein aktuelles Beispiel hierzu ist die fermentative Herstellung von Pharmaamino säuren. Im großen Gegensatz dazu, sind die Probleme, die bei Neuentwicklungen zur Produktion von mikrobiellen Sekundärmetaboliten bestehen, auch heute noch weitgehend ungelöst.

- Mit dem hier vorgeschlagenen Projekt würde erstmalig die rekombinante Produktion eines solchen Sekundärmetaboliten (Rhamnolipid) in ein industrielles Verfahren überführt. Hierdurch kann die Verwendung des humanpathogenen Stamms *P. aeruginosa* umgangen und stattdessen ein apathogener Organismus (S1) eingesetzt werden. Durch die heterologe Expression der *rhIA* und *rhIB*-Gene wird direkt zumindest auf Ebene des Zuckerrestes das Produktspektrum vereinheitlicht. Ebenso

wird eine Verunreinigung mit anderen von *P. aeruginosa* gebildeten Detergentien vermieden.

- Durch Entkopplung von der nativen Regulation wird die Rhamnolipidproduktion steuerbar und wird so eine im Vergleich zu dem bisher benutzten Verfahren deutlich kürzere Fermentationszeit zulassen. Dies wird zu einer erheblichen Einsparung von Medien und Energie führen, wobei eine Größenordnung von 60 % angestrebt ist.
- Die Fermentationsstrategie wird direkt nach Nachhaltigkeitsaspekten ausgelegt. Durch die Benutzung von Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle bei gleichzeitigem Verzicht auf Öle als Induktor, wird das DSP vereinfacht und um einen initialen Extraktionsschritt vermindert, was zu einer erheblichen Einsparung von Lösungsmitteln führen wird. Durch Fermentation bei Temperaturen von $> 30^{\circ}\text{C}$ wird im Vergleich zum bisher bestehenden Verfahren eine Reduktion der Kühlleistung erreicht.
- Durch die Umstellung des Downstream-Processings von einem chromatografischen auf ein Kristallisations-Verfahren wird ein deutlicher Kosten- und Lösungsmittelvorteil erwartet. Durch eine alternative Reinigung mittels Adsorption/Desorption wird im Erfolgsfall eine Einsparung von 80% an Lösungsmitteln möglich sein, was einer Menge von $4,8 \text{ m}^3$ Chloroform und $3,2 \text{ m}^3$ Methanol pro Kilogramm reinen Rhamnolipids entsprechen wird.

Beitrag zur Umweltentlastung und Maßnahmen zur Lösung des Umweltproblems

- Etablierung vollabbaubarer Biotenside im (Haushalts-) Detergenzienmarkt.
- Einsatz eines nicht-pathogenen Produktionsstamms.
- Vermeidung energieintensiver Kühlung durch Fermentation bei erhöhten Temperaturen.
- Verkürzung der Fermentationszeit, d. h. a) geringerer Energieverbrauch b) mehr Fermentationen pro Zeit, c) dadurch ist ein geringeres Reaktorvolumen notwendig, woraus sich geringere Investitionen ergeben.
- Vereinfachung des DSP durch Minimierung von nicht-Rhamnolipid-Detergentien als Nebenprodukte
- Vermeidung des Einsatzes von Ölen als Induktor und somit Einsparung der initialen Extraktion mit Lösemitteln.
- Reduktion des Lösungsmittelverbrauchs im DSP.

Modellcharakter des vorgesehenen Lösungsweges

Die Prozessentwicklung integriert Analysen metabolischer Netzwerke zur Konstruktion metabolisch optimierter Produktionsstämme, die Optimierung von Prozessparametern, das

Scale-up und die Entwicklung alternativer und umweltschonender Aufarbeitungstechniken. Diese in ihrer Konsequenz neuartige auf Nachhaltigkeitsgesichtspunkte ausgerichtete Auslegung eines Produktionsprozesses wird direkt beispielhaft sein für die Entwicklung von Prozessen zur Herstellung weiterer Biotenside und anderer Sekundämetabolite. Die Erfahrungen bei der Prozessentwicklung in Kombination mit einer Ökoeffizienzanalyse werden aber auch übertragbar sein auf die nachhaltige Auslegung anderer biotechnischer Prozesse.

2. Ergebnisse

Abbildungen und Tabellen sind in den Abschnitten, aber nicht durchlaufend nummeriert.

Partner 1 (HHU):

Dr. Frank Rosenau/ Andreas Wittgens

Ergebnisse

- ✓ Klonierungsstrategie für Bibliotheken synthetischer Promotoren entwickelt
- ✓ Promoter-Trap-Konstrukt basierend auf evoglow®-Reportergen erzeugt (in Kooperation mit Evocatal, Düsseldorf)
- ✓ Bank synthetischer Promotoren erzeugt, die derzeit in Kooperation mit m2p-labs (Partner 6) getestet werden
- ✓ Expressionsplasmid mit alternativer Resistenzmarke zur Verwendung in *P. putida*-Knock-Out-Mutanten erzeugt
- ✓ *In vivo*-Selektivität der Fettsäurekettenlänge auf das RhIA-Protein zurückgeführt

Entwicklung einer Klonierungsstrategie und Konstruktion einer Promotor-Bibliothek für die Expression der Rhamnolipid-Gene

Das erste Ziel dieses Projektes war es, für die Expression des *rhlAB*-Operons aus *P. aeruginosa* PAO1 eine Bank mit unterschiedlich starken synthetischen Promotoren zu erstellen. Ein starker Promotor muss nicht immer eine große Substratbildung zur Folge haben. Vielmehr kann es durch die Überexpression eines Proteins zu unerwünschten Nebeneffekten, wie z. B. der Bildung von *inclusion bodies* in der Zelle kommen. So ist für viele Anwendung die Nutzung eines schwächeren Promotors mit geringerer Expression besser geeignet. Des Weiteren sollten die Promotoren konstitutiv sein, da Versuche von Partner 2 (TUD01) gezeigt haben, dass während der Wachstumsphase keine Produktbildung stattfindet und der Induktionszeitpunkt der Genexpression daher nur eine untergeordnete

Rolle spielt. Auf diese Weise wird außerdem die Zugabe von IPTG vermieden, die bisher bei der Verwendung der pVLT-Vektoren erforderlich ist.

Aus Ausgangsvektor für die Konstruktion der Promotor-Bibliothek wurde pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1994) ausgewählt. Der Vektor ist gut charakterisiert, mobilisierbar, um ihn mittels Konjugation in *P. putida* zu übertragen und besitzt eine Tetracyclin-Resistenz, die sich gut zur Selektion rekombinanter *P. putida* eignet.

Für die Klonierung des *rhlAB*-Operons unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors mussten zunächst die vektoreigenen T7 und *lac*-Promotoren inklusive der *Multiple Cloning Site* (MCS) und des *lacZ*-Gens entfernt werden. Da der beschriebene Bereich nicht über geeignete Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor entfernt werden konnte, wurde der übrige Teil des Vektors mittels PCR amplifiziert (Abb. 1, A). Über die verwendeten PCR-Primer wurden die beiden Restriktionsschnittstellen *BglII* und *BspTI* in den Vektor integriert.

Im nächsten Schritt wurde ein synthetisches Konstrukt bestehend aus einem Fluoreszenz-Reportergen (*lov*, *light oxygen voltage*) flankiert von zwei starken Transkriptionsterminatoren über die integrierten Restriktionsschnittstellen in den Vektor kloniert (Abb. 1, B). Die LOV-Proteine zeichnen sich im Gegensatz zu anderen Fluoreszenzreportern wie z. B. GFP dadurch aus, dass sie auch unter anaeroben Bedingungen funktionieren, was besonders in der Wachstumsphase wo eine Sauerstofflimitierung vorliegt einen großen Vorteil darstellt. Der Partner Evocatal vertreibt Plasmide mit drei verschiedenen *lov*-Genen unter dem Produktnamen evoglow®. Zunächst wurde getestet, welches der drei *lov*-Gene für die Expression in *P. putida* am besten geeignet ist und für die Herstellung des synthetischen Konstrukts verwendet werden sollte. Hierbei zeigte sich, dass nur bei einer Variante des *lov*-Gens eine Fluoreszenz gemessen werden konnte. Die drei Plasmide, das verwendete synthetische Konstrukt sowie die eingesetzten Primer wurden durch den Partner Evocatal bereitgestellt. Der neu konstruierte *Promoter trap* Vektor erhielt die Bezeichnung pTLT und dient auch als Leervektor-Kontrolle für die weiteren Expressionsversuche.

Als nächstes wurde das aus *P. aeruginosa* PAO1 amplifizierte *rhlAB*-Operon in den Vektor kloniert (Abb. 1,C). Über den *Forward*-Primer wurde zusätzlich die Sequenz des Promotors *upstream* an *rhlAB* angehängt. Der Promotor enthält die Consensus Sequenzen der -35 und -10 Region von konstitutiven Promotoren. Der 17 bp lange *Spacer* zwischen diesen Regionen, sowie einige Nukleotide *up-* und *downstream* wurden randomisiert, so dass jedes PCR-Produkt einen Promotor mit individueller Sequenz besitzt. Da diese Bereiche einen erheblichen Einfluss auf die Stärke des Promotors haben (Jensen und Hammer, 1998), wird auf diese Weise ein breites Spektrum verschiedener Aktivitäten abgedeckt.

Die für die Klonierung gewählten Restriktionsschnittstellen sollten möglichst nicht in der zufälligen Sequenz des Promotors vorkommen. Daher wurden Restriktionsenzyme mit einer statistisch seltener vorkommenden 8 bp Erkennungssequenz gewählt. Die Restriktion mit zwei Enzymen, um eine gerichtete Klonierung zu gewährleisten, würde die Gefahr erhöhen, dass innerhalb der Promotorsequenz geschnitten wird. Daher wird das PCR Produkt nur mit einem Enzym (*SgsI*) am demjenigen Terminus, der den Promoter enthält, geschnitten. Der andere Terminus wurde hingegen *blunt end* kloniert. Auf diese Weise wurde zusätzlich eine gerichtete Klonierung des PCR-Produkts gewährleistet. Darüber hinaus sollte es so möglich sein, das *lov*-Gen später aus dem Plasmid wieder zu entfernen. Hierfür werden ebenfalls die zwei Restriktionsschnittstellen für *SgsI* verwendet, mit denen auch das PCR-Produkt geschnitten wurde. Auf diese Weise wird wieder die Gefahr einer Restriktion der Promotorsequenz verringert. Damit bei dieser Restriktion nicht das PCR Produkt wieder aus dem Plasmid geschnitten wird, enthält der Vektor für die Klonierung des PCR Produkts keine *SgsI* sondern eine *MluI* Schnittstelle. Die entstehenden kohäsiven Enden dieser beiden Schnittstellen sind komplementär zueinander, so dass eine Ligation beider Fragmente möglich ist. Da die übrige Sequenz der beiden Schnittstellen jedoch unterschiedlich ist, kann diese Stelle nach erfolgter Ligation weder durch *SgsI* noch durch *MluI* wieder restringiert werden. Wird also das *lov*-Gen ausgeschnitten erfolgt nur an dieser Stelle eine Restriktion. Somit können alle Promotor-Konstrukte kloniert werden, die keine *SgsI* Schnittstelle aufweisen, wodurch eine maximale Diversität erzielt werden konnte.

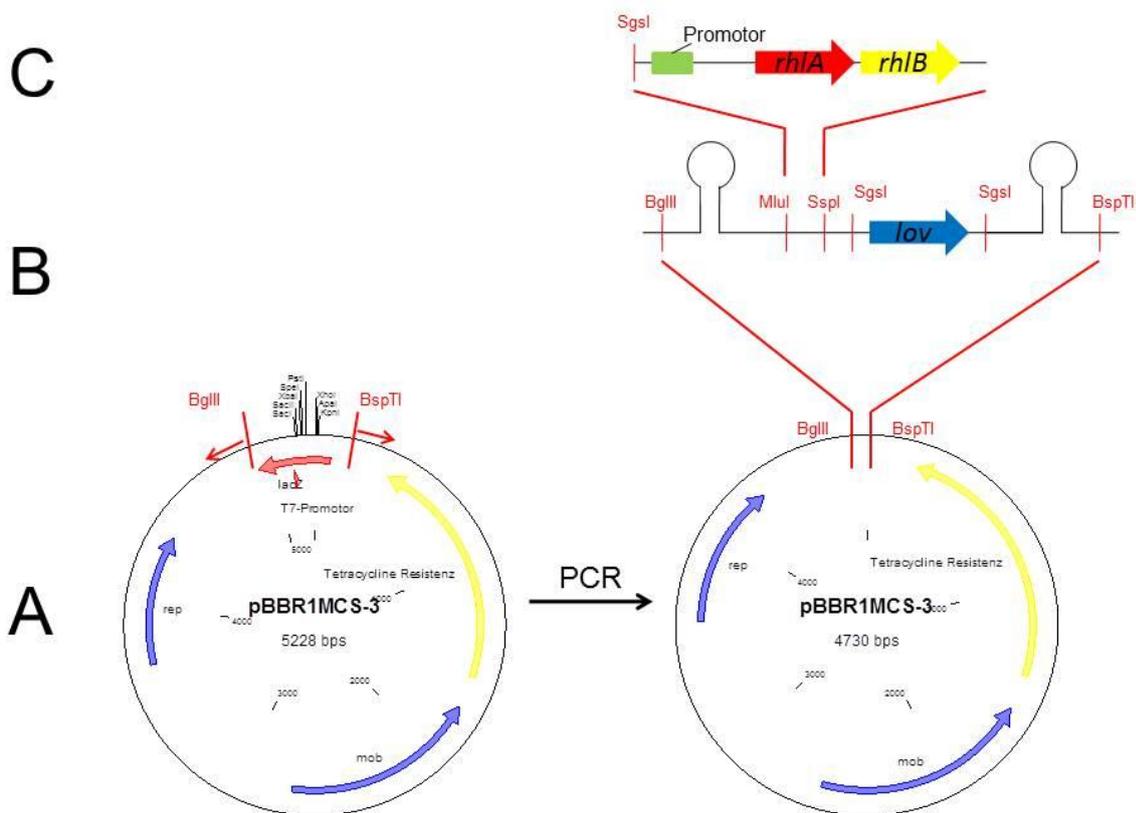


Abb. 1: Klonierungsschema für die Konstruktion einer Promotor-Bibliothek. Mittels PCR wird der pBBR1MCS-3 Vektor amplifiziert, um die vektoreigenen Promotoren, sowie MCS und lacZ zu entfernen (A). Über die integrierten Restriktionsschnittstellen wird ein Konstrukt aus einem lov-Gen flankiert von zwei Transkriptionsterminatoren in den Vektor kloniert (B). Im letzten Schritt wird das rhlAB-PCR Produkt inklusive eines konstitutiven Promotors mit zufälliger Sequenz in den Vektor kloniert (C).

Eine Transformation von *P. putida* mit den Plasmiden direkt nach dem letzten Klonierungsschritt ist nicht mit ausreichend hoher Effizienz möglich. Außerdem sollte vermieden werden, dass eine große Zahl rekombinanter Stämme entsteht, die Plasmide mit der identischer Promotorsequenz enthalten. Daher wurden zwei neue Strategien entwickelt, um eine effiziente Transformation zu gewährleisten. Zunächst wurden die fertigen Plasmide in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Nach einer Regenerationsphase von 3 h wurden zum Einen die Zellen für eine triparentale Konjugation in *P. putida* mittels eines weiteren *E. coli* Helferstamms verwendet, zum Anderen wurden die Plasmide aus dem *E. coli* DH5 α Stamm isoliert und anschließend mittels Elektroporation in *P. putida* transformiert.

Auf diese Weise konnten bereits etwa 500 rekombinante *P. putida* Stämme erstellt werden, die gemeinsam mit dem Partner m2p-Labs untersucht werden und auch Partner 2 zur

Verfügung gestellt wurden. Weitere Plasmide sind kurz vor der Fertigstellung und werden in Kürze zur Verfügung stehen.

Konstruktion von Expressionsplasmiden mit kompatibler Resistenz für die Verwendung in Deletionsmutanten von *P. putida*

Für die ersten Expressionsversuche in *P. putida* KT2440 wurden die *rhl*-Gene aus *P. aeruginosa* PA01 in den pVLT33 Vektor (de Lorenzo *et al.*, 1993) kloniert. Dieser Vektor besitzt zur Selektion eine Kanamycin-Resistenz. Um die Ausbeute der Rhamnolipidproduktion in *P. putida* weiter zu steigern, wurden von Partner 2 Versuche mit dem *phaC1*-negativen Stamm *P. putida* KT42C1 durchgeführt. Da dieser Stamm ebenfalls eine Kanamycin Resistenz besitzt, war es notwendig die bisherigen Konstrukte in den Vektor pVLT31 umzuklonieren. Dieser Vektor besitzt eine Tetracyclin-Resistenz, so dass die Selektion auch in *P. putida* KT42C1 möglich ist. Die neu erstellten Plasmide wurden dem Partner 2 zur Verfügung gestellt.

Funktionelle Charakterisierung der Rhl-Proteine

Bei der Produktion der Rhamnolipide können neben den vorherrschenden Rhamnolipiden mit 2 β -Hydroxyfettsäuren in geringen Mengen auch solche entstehen, die nur eine Fettsäurekette besitzen (Syldatk *et al.*, 1985; Déziel *et al.*, 1999). Die Vermutung war, dass RhIA auch einzelne Fettsäuren, die nicht zu einem HAA Dimer verknüpft wurden, an RhIB übertragen kann, welches diese zur Synthese von mono-Rhamnolipiden verwendet. In einem vorangegangenen Versuch wurde bereits gezeigt, dass RhIB alleine nicht in der Lage ist mono-Rhamnolipide zu produzieren (siehe auch Abb. 3). In der *Pseudomonas* Genom Datenbank (www.pseudomonas.com) sind RhIA und RhIB als Untereinheiten der Rhamnosyltransferase I beschrieben, daher wurde weiterhin vermutet, dass RhIA notwendig ist, um den Enzymkomplex zu stabilisieren und RhIB in Abwesenheit von RhIA seine native Form nicht erreicht und daher keine Rhamnolipide synthetisieren kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das *rhlAB*-Operon mit einer inaktiven Variante von RhIA konstruiert, die potentiell nicht mehr in der Lage ist, Fettsäuren zu HAAs zu dimerisieren, aber weiterhin in der nativen Konformation vorliegt um den Komplex mit RhIB zu stabilisieren.

Um das aktive Zentrum von RhIA zu identifizieren wurde die Aminosäuresequenz untersucht und mit denen von Enzymen mit bekannter Tertiärstruktur und Position des aktiven Zentrums verglichen. Die größte Übereinstimmung zeigt RhIA zu einer alpha/beta Hydrolase aus *Streptomyces lividans*, deren aktives Zentrum strukturell bekannt ist (Hofmann *et al.*, 1998). Durch Überlagerung der beiden Tertiärstrukturen konnte das aktive Zentrum von RhIA (gelb), welches eine fast identische Konformation wie das der Hydrolase (blau) hat, identifiziert werden (Abb. 2). Für die Konstruktion der inaktiven Variant wurde nun das Serin an Position 102 durch einen Alaninrest ersetzt.

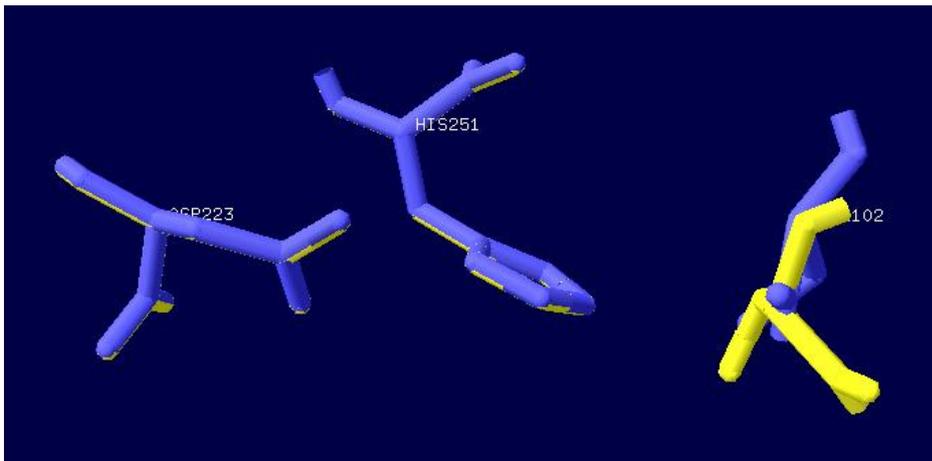


Abb. 2: Konformation des aktiven Zentrums von RhIA. Zur Identifizierung des aktiven Zentrums von RhIA (gelb) wurde die vorhergesagte tertiär Struktur mit der einer Hydrolase aus *Streptomyces lividans* (blau) übereinandergelegt.

In dem folgenden Versuch wurden neben dem *rhlAB* Operon mit inaktivem RhIA auch weitere Konstrukte von *rhlA*, *rhlB* und dem *rhlAB* Operon in *P. putida* exprimiert (Abb. 3). Die Expression von *rhlA* (Spur 2) und *rhlB* (Spur 3) alleine resultiert nicht in der Produktion von Rhamnolipiden. Bei der Expression des *rhlAB* Operons (Spur 4) hingegen ist ein deutlicher Spot der mono-Rhamnolipide zu sehen. Wird hingegen das *rhlAB* Operon mit inaktivem RhIA exprimiert, ist ebenfalls keine Produktion von Rhamnolipiden zu verzeichnen. Des Weiteren wurden in einer Mischkultur aus zwei *P. putida* Stämmen *rhlA* und *rhlB* getrennt in je einem Stamm exprimiert (Spur 6). In einer weiteren Mischkultur wurde in einem Stamm das inaktive *rhlAB*-Operon in dem anderen Stamm *rhlA* exprimiert (Spur 7). In beiden Mischkulturen wird eine geringe Menge mono-Rhamnolipid gebildet.

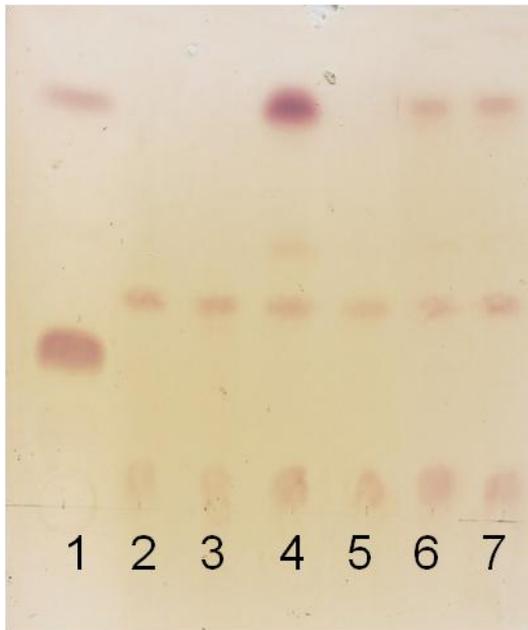


Abb. 3: Dünnschichtchromatographie der Expression von verschiedenen *rhl*-Genen in *P. putida*. In Spur 1 ist ein Rhamnolipid-Standard aus *P. aeruginosa* aufgetragen. In Spur 2 und 3 wurden *rhlA* bzw. *rhlB* exprimiert. In beiden Fällen wurden keine Rhamnolipide gebildet. In Spur 4 wurde das *rhlAB*-Operon exprimiert, hier ist eine deutlich Bande des mono-Rhamnolipids zu sehen. Wird hingegen das *rhlAB*-Operon mit inaktivem *RhIA* (Spur 5) exprimiert, werden keine Rhamnolipide gebildet. In Spur 6 wurden in einer Mischkultur *rhlA* und *rhlB* getrennt exprimiert bzw. in Spur 7 *rhlA* und das inaktive *rhlAB*-Operon. In beiden Fällen ist eine schwache Bande der mono-Rhamnolipide zu sehen.

Aus diesem Versuch lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- 1) **RhIA und RhIB sind eigenständige Enzyme und sind für ihre Funktion nicht auf eine Komplexbildung angewiesen.**
- 2) **HAAs können ins Medium sekretiert und von anderen Zellen aufgenommen werden.**

Bei der Mischkultur in Spur 6 werden beide Gene getrennt voneinander in zwei Stämmen exprimiert. Dennoch ist die Produktion von mono-Rhamnolipiden zu verzeichnen. Das ist nur dadurch erklärbar, dass der erste Stamm *rhlA* exprimiert und HAAs produziert. Diese werden dann ins Medium sekretiert und können von dem zweiten Stamm, in dem *rhlB* exprimiert wird, aufgenommen und zur Synthese von mono-Rhamnolipiden verwendet werden.

- 3) **RhIB kann nur HAAs als Substrat für die Rhamnolipid Synthese verwenden.**
Weder RhIB alleine noch das inaktive *rhlAB* Operon sind in der Lage Rhamnolipide zu produzieren. Wird in einer Mischkultur hingegen zusätzlich zum inaktiven *rhlAB* auch *rhlA* getrennt exprimiert, wird wieder mono-RL gebildet.
- 4) **Rhamnolipide mit einer Fettsäurekette entstehen somit offenbar erst nach der Synthese „normaler“ Rhamnolipide durch Abspaltung einer Fettsäurekette durch ein bisher unbekanntes Enzym.**

***In vivo*-Selektion der Fettsäurekettenlänge durch das RhIA-Protein**

Neben den von *P. aeruginosa* produzierten Rhamnolipiden, die hauptsächlich Fettsäuren mit C₁₀-Kohlenstoffketten enthalten, existieren auch Rhamnolipide die von Bakterien der Gattung *Burkholderia* produziert werden. Diese zeichnen sich durch längere Fettsäuren mit C₁₄-C₁₆-Kohlenstoffketten aus.

Bei Expression des *rhlAB* Operons aus *P. aeruginosa* in *P. putida* KT2440 entstehen Rhamnolipide, die bei der Dünnschichtchromatographie (Abb. 4, Spur 2) auf der Höhe der mono-Rhamnolipide des Standards (Spur 1) laufen, der ebenfalls aus *P. aeruginosa* stammt. Wird hingegen das *rhlAB* Operon aus *B. glumae* exprimiert (Spur 5), laufen die mono-Rhamnolipide aufgrund der längeren Fettsäureketten über denen des Standards.

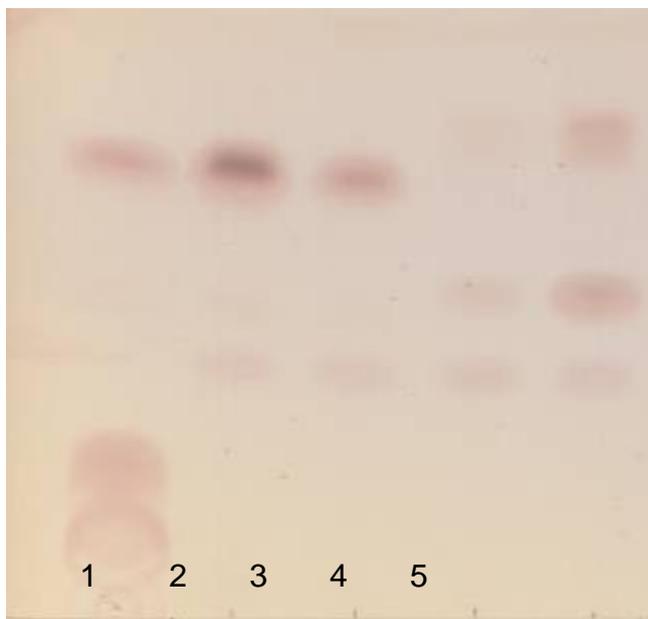


Abb. 4: Dünnschichtchromatographie der Expression des *rhlAB*-Operons aus verschiedenen Organismen. In Spur 1 ist ein Rhamnolipid Standard aus *P. aeruginosa* aufgetragen. In Spur 2 wurde das *rhlAB*-Operon aus *P. aeruginosa* und in Spur 5 aus *B. glumae* exprimiert. In Spur 3 wurde ein Hybrid mit *rhlA* aus *P. aeruginosa* und *rhlB* aus *B. glumae* bzw. in Spur 4 mit *rhlA* aus *B. glumae* und *rhlB* aus *P. aeruginosa* exprimiert. Stammt *rhlA* aus *P. aeruginosa* laufen die mono-Rhamnolipide in Höhe des Standards. Stammt es hingegen aus *B. glumae* laufen die mono-Rhamnolipide über der Bande des Standards.

Um zu untersuchen, welches der Enzyme RhlA oder RhlB selektiv für die Länge der in Rhamnolipiden verwendeten Kohlenstoffketten ist, wurden Hybridoperons aus den *rhlA* und *rhlB* Genen der Organismen *P. aeruginosa* und *B. glumae* erstellt und in *P. putida* exprimiert. Wird das Konstrukt mit *rhlA* aus *P. aeruginosa* und *rhlB* aus *B. glumae* exprimiert (Spur 3), laufen die mono-Rhamnolipide wie jene aus *P. aeruginosa*. Exprimiert man hingegen das Hybrid mit *rhlA* aus *B. glumae* und *rhlB* aus *P. aeruginosa* (Spur 4), ist das gleiche Bandenmuster zu sehen wie in Spur 5, in denen beide Gene aus *B. glumae* stammten. Dieser Versuch zeigt:

RhlA bestimmt die Länge der Fettsäureketten in den Rhamnolipiden.

Stammt RhlA aus *P. aeruginosa* werden Rhamnolipide gebildet, die hauptsächlich C₁₀-Kohlenstoffketten enthalten. Stammt RhlA hingegen aus *B. glumae*, sind die Fettsäureketten länger und enthalten hauptsächlich C₁₄ und C₁₆-Kohlenstoffketten. Diese Ergebnisse wurden außerdem durch Analyse mittels HPLC-MS verifiziert.

Literatur

de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. und Timmis K. N. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^P/Ptrp-lac* plasmid and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* 123: 17-24

Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. und Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1440: 244-252

Hofmann, B., Tölzer, S., Pelletier, I., Altenbuchner, J., van Pée, K.H. und Hecht, H.J. (1998). Structural Investigation of the Cofactor-free Chloroperoxidases. *J Mol Biol* 279: 889-900

Jensen, P. R. und Hammer, K. (1998). The Sequence of Spacer between the Consensus Sequences Modulates the Strength of Prokaryotic Promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 82-87

Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M. und Peterson, K.M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16(5): 800-2

Sydatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray V. und Witte, L. (1985). Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM2874 grown on n-alkanes. *Z Naturforsch C* 40: 51-60

Partner 2 (TUD01)

Dr. Lars M. Blank

Ergebnisse

- ✓ Metabolisches Modell erstellt und Optimierungsstrategien identifiziert
- ✓ Ausbeute um den Faktor 3,5 gesteigert
- ✓ Entkopplung von Wachstum und Rhamnolipidproduktion erreicht
- ✓ Spezifische Produktivität des neuen Ganzzellbiokatalysators ist schon jetzt vergleichbar mit den höchsten Produktivitäten berichtet für pathogene *Pseudomonas aeruginosa* Stämme

Design eines Rhamnolipidproduzierers

Unter Zuhilfenahme eines computerbasierten mathematischen Modells des metabolischen Netzwerkes von *Pseudomonas putida* KT2440 sollte der Metabolismus hinsichtlich der Anforderungen für die Rhamnolipidsynthese optimiert werden.

Mit Hilfe der Software Discovery von Insilico Biotechnology AG (Stuttgart) wurde ein *in silico* Modell des zentralen Kohlenstoffwechsels des Organismus *P. putida* KT2440 erstellt und um die enzymatischen Reaktionen für die Rhamnolipidsynthese erweitert. Dieses Modell wurde mit Hilfe der Flussbilanzanalyse (Flux Balance Analysis (FBA)) untersucht [Lee *et al.*, 2006].

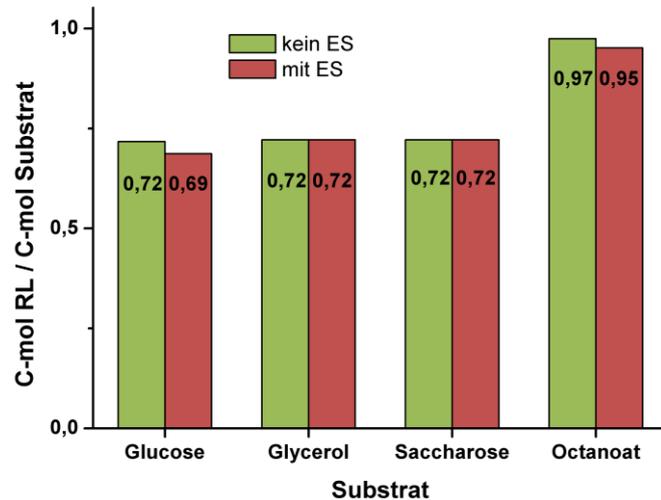


Abb. 1: Rhamnolipid (RL) Ausbeute in Cmol RL / Cmol Substrat. Zwei Szenarien werden betrachtet: Während das Zellwachstum in beiden Fällen zu Null gesetzt wird, zeigen die linken Balken die rein theoretische Kapazität ohne Erhaltungsbedarf, die rechten Balken die Kapazität unter einem Erhaltungsstoffwechsel (ES) von 20 mmol ATP / (g_{CDW} · h).

Es wurden verschiedene Szenarien erarbeitet und anschließend mit dem Modell simuliert, mit dem Ziel die Ausbeute an Rhamnolipiden (RL) zu vergrößern. Unter anderem wurden vier verschiedene Substrate

eingesetzt (Glukose, Glyzerin, Saccharose und Oktanoat), es wurden Reaktionen eingebracht, um die Substrat-Aufnahme zu verbessern und das metabolische Netzwerk zu verändern, wie auch die Stoffflussverteilung variiert. Die Wachstumsrate und der Erhaltungsstoffwechsel (ES) wurden hierbei berücksichtigt. Die Berechnungen ermöglichen so die Abschätzung der Kapazität des Metabolismus für die Produktion von Rhamnolipiden.

Abb. 1 zeigt die Ausbeute an Rhamnolipiden in Abhängigkeit der eingesetzten Substrate. Um die theoretisch mögliche Ausbeute abzuschätzen, wurde das Zellwachstum in diesen Szenarien mit null angenommen, während der Erhaltungsstoffwechsel auf 0 bzw. 20 mmol ATP / (g BM · h) gesetzt wurde. In der Literatur findet sich ein ES von ca. 10 mmol ATP / (g_{CDW} · h) [Blank *et al.* 2008]. Um den Einfluss des ES auf die erreichbare Ausbeute zu bestimmen wurde hier ein sehr hoher Wert von 20 mmol ATP / (g_{CDW} · h) gewählt. Der Vergleich zeigt den geringen Einfluss des ES auf die Rhamnolipidausbeute; dieses weist darauf hin, dass die Rhamnolipidsynthese nicht energie-, sondern hauptsächlich kohlenstofflimitiert ist. Die Verwendung von Fettsäuren als Substrat für die Rhamnolipidsynthese erlaubt theoretisch eine hohe Steigerung der Ausbeute (von 0,72 auf 0,97 CmolRL/Cmol Substrat) und sollte weiter verfolgt werden.

Ein denkbare Design eines auf Rhamnolipidproduktion optimierten Metabolismus ist eine Co-Feed-Strategie, bei der eine Zuckerart als Energiequelle und Vorläufermetabolit für die aktivierte Rhamnose dient während Oktanoat ein leicht zugängliches Vorläufermetabolit für Hydroxyalkanoylalkanoat (HAA) ist. Der Knockout des Entner-Doudoroff-Stoffwechselwegs als Hauptabbauweg für Zucker in *P. putida* könnte unerwünschte Biomasseakkumulatio

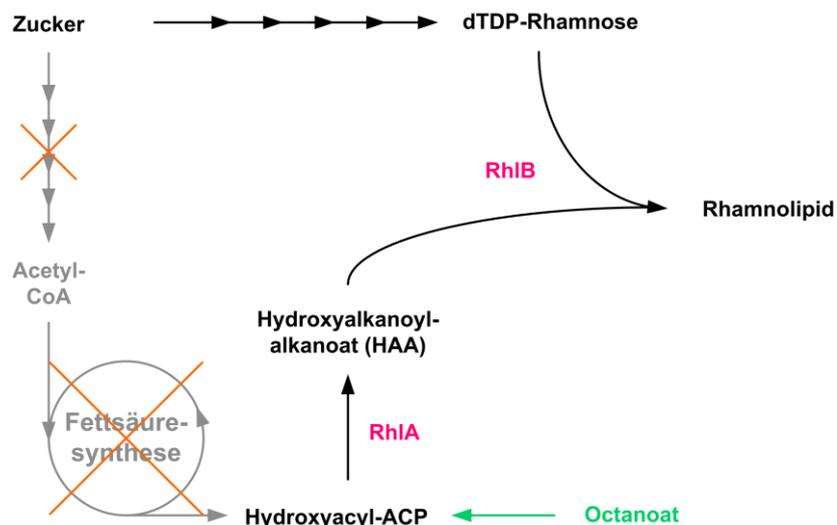
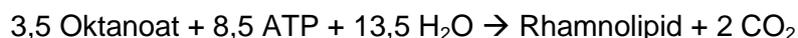
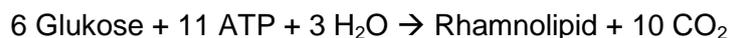


Abb. 2: Eine Co-Feeding Strategie mit Zucker und Oktanoat ermöglicht den Verzicht auf große Teile des natürlichen Kohlenstoffmetabolismus.

n verhindern. Als Zucker bietet sich Saccharose an, da die Ausbeute etwas höher ist als auf Glukose und sie als Tafelzucker in hoher Qualität und günstig erhältlich ist.

Auch an den Netto-Reaktionsgleichungen kann die energieeffektive Nutzung der Kohlenstoffquellen abgelesen werden. Die Gesamtgleichungen für die Verstoffwechslung von Glukose, Oktanoat und einem Co-Feed aus Oktanoat und Saccharose zu Rhamnolipid (normiert auf die Bildung eines L-Rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoats) ergeben sich wie folgt.



Der Einfachheit halber wurden Reduktionsäquivalente und Ortho- und Diphosphate, sowie Protonen nicht aufgeführt.

Es ist deutlich zu sehen, dass im Falle des Co-Feedes am wenigsten Kohlenstoff in Form von Kohlendioxid verloren geht. Bei der Glukose-Verstoffwechslung entsteht hingegen die sechsfache Menge an CO₂. Auch Oktanoat liefert eine deutlich verbesserte Kohlenstoff-Bilanz hinsichtlich der Rhamnolipid-Produktion. Des Weiteren wird im Co-Feed-Szenario auch nur knapp halb soviel ATP benötigt wie mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle.

Hingegen verspricht weder das Einbringen eines PTS-Systems, das eine verbesserte Glukose-Aufnahme bewirkt, noch die Etablierung des Embden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweges eine signifikante Steigerung der Ausbeute. Auch die Variation des Flusses durch die verschiedenen beteiligten Stoffwechselwege zeigte keine nennenswerte Veränderung der Ausbeute.

Metabolische Charakterisierung eines Rhamnolipidproduzierers

Ziel der metabolischen Charakterisierung ist das Finden von Ansatzpunkten zur Optimierung von Produktionsstamm und -bedingungen.

Zur Quantifikation der Rhamnolipide wurde der Orcinol-Assay in Mikrotiterplatten etabliert [Chandrasekaran & BeMiller, 1980]. Dabei wurde bei Messungen an bekannten Konzentrationen von Rhamnolipid in verschiedenen Medien eine mittlere Standardabweichung von 7% erreicht. Aufgrund des allerdings hohen Aufwands wurde zudem eine flüssigchromatographische Methode unter Verwendung eines Corona Charged Aerosol Detectors etabliert. Der Rhamnolipid-Standard für diese Analytik wurde von Partner 3 (KIT) zur Verfügung gestellt. Das Protokoll der etablierten Analytik wurde auch an Partner 4 (TuDo2) weitergegeben.

Von Partner 1 wurde das Plasmid pVLT33_rhIAB bereitgestellt. In ersten Versuchen mit dem Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 pVLT33_rhIAB wurden Wachstum und das Rhamnolipid-Konzentrationsprofil über den Verlauf von 60 Stunden in LB-Medium mit Zusatz von 10 g/L Glukose unter verschiedenen Sauerstoffeintragsszenarien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass unter den bei Partner 1 üblichen Kultivierungsbedingungen ohne Schikanen im Schüttelkolben eine Limitierung des Wachstums durch Sauerstoffmangel vorlag. Durch stärkeren Sauerstoffeintrag in Schikanekolben konnte die Kultivierungszeit bei gleicher Endkonzentration von Mono-Rhamnolipid auf 11 Stunden gekürzt werden. Die Wahl des Induktionszeitpunkts zwischen null und sechs Stunden nach der Inokulation sowie die Erhöhung der Konzentration des Induktors IPTG über 0,4 mM hinaus ergaben keine höheren Rhamnolipidausbeuten. Daher wurden in der Folge alle Kulturen schon vor dem Animpfen mit 0,4 mM IPTG versehen. Das modifizierte Protokoll wurde an Partner 1 geschickt. In LB Medium mit 10 g/L Glukose, 50 mg/L Kanamycin und 0,4 mM IPTG wurden Rhamnolipid-Endkonzentrationen bis 500 mg/L erreicht.

In der Folge wurden verschiedene Kombinationen aus Stämmen und Medien auf ihre Eignung für die Rhamnolipidsynthese untersucht. Die Stämme *P. putida* S12 pVLT33_rhIAB und *Pseudomonas spec.* strain VLB120 pVLT33_rhIAB zeigten keine Rhamnolipidproduktion. Ein Co-Feed von 15 mM Decanoat oder Oktanoat führt zu einer niedrigeren Rhamnolipidausbeute. Dies ist nach jetzigem Kenntnisstand jedoch

wahrscheinlich auf pH-Effekte zurückzuführen und wird weiter verfolgt werden. Sonnenblumenöl, das als alleinige Kohlenstoffquelle mit Wildtypstämmen von *P. aeruginosa* hohe Konzentrationen Rhamnolipid ermöglicht [Müller *et al.*, 2010], wird von *P. putida* KT2440 nicht verstoffwechselt. In M9 Minimalmedium mit 10 g/L Glukose wurde nur 40% der Rhamnolipidausbeute verglichen mit Glukose-supplementiertem LB Komplexmedium erhalten.

Wie im Unterkapitel „Metabolische Optimierung der Rhamnolipid produzierenden Mikroorganismen“ auf Seite 19 beschrieben wird konnte eine erste Stammoptimierung durch Verwendung eines Polyhydroxyalkanoat-Synthase-negativen Stammes durchgeführt werden. Die folgende Charakterisierung wurde schon mit dem Stamm *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB durchgeführt.

Um den Grund für die deutlich höhere Rhamnolipidausbeute in mit Glukose supplementierten Komplexmedien gegenüber Minimalmedien zu bestimmen wurden Wachstums- und Produktionskinetik in LB-Medium mit Glukose charakterisiert. Dazu wurden über den Verlauf von 72 Stunden Zelltrockenmasse, Glukose- und Rhamnolipidkonzentration sowie der pH-Wert aufgezeichnet. *P. putida* wächst auf LB-Medium nicht exponentiell, statt dessen lässt sich das Wachstum analog zum Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 auf Sonnenblumenöl während der Rhamnolipidproduktion [Müller *et al.*, 2010] gut mit einer logistischen Funktion der Form

$$X(t) = X_0 + \frac{X_{add}}{1 + \left(\frac{t}{t_0}\right)^b}$$

beschreiben. Hierbei ist X_0 die Startbiomassekonzentration, X_{add} die hinzugewonnene Biomasse für $t \rightarrow \infty$, t_0 ist charakterisiert durch $X(t_0) = X_0 + X_{add}/2$ und b ein Formfaktor der die S-Form der Kurve beeinflusst. Geht man von zeitinvariablen Glukoseaufnahmeraten und Rhamnolipidbildungsraten r_x aus, so lassen sich die Konzentrationsänderungen durch die Differenzialgleichungen

$$\frac{dc_{Gluc.}}{dt} = r_{Gluc.} \cdot X(t)$$

und

$$\frac{dc_{RL}}{dt} = r_{RL} \cdot X(t)$$

beschreiben. Da sich diese Differentialgleichungen nach einsetzen von $X(t)$ für fast alle Fälle von b nicht analytisch lösen lassen, wurden die Konzentrationsverläufe für

Glukose und Rhamnolipide durch ein Runge-Kutta-Verfahren 4. Ordnung (Simpson-Regel) numerisch approximiert. Nimmt man an, dass für die Biomassebildung keine Glukose benötigt wird und führt eine simultane Fehlerquadratminimierung der Verläufe von Zelltrockenmasse-, Glukose- und Rhamnolipidkonzentration durch Anpassen der genannten Variablen sowie $c_{\text{Glukose}}(t_0)$ durch, so erhält man eine Anpassung wie sie exemplarisch in beschreiben. Da sich diese Differentialgleichungen nach einsetzen von $X(t)$ für fast alle Fälle von b nicht analytisch lösen lassen, wurden die Konzentrationsverläufe für

gezeigt ist. Die Anpassung legt nahe, dass für das Wachstum der Zellen tatsächlich keine Glukose aufgewendet wird, sondern das Wachstum auf den Bestandteilen des LB-Mediums gründet. Das logistische Wachstum lässt sich mit der unterschiedlichen Verfügbarkeit der Substrate im LB-Medium erklären. Die Glukose deckt hiernach den Erhaltungsbedarf der Zellen und erlaubt die Bereitstellung von Vorläufermetaboliten für die Rhamnolipidsynthese.

Durch diese Bevorzugung der Bestandteile des LB-Mediums und der Limitierung des Wachstums ist die höhere Ausbeute der Kultivierung auf LB verglichen mit Minimalmedium erklärbar: Auf Minimalmedium wird das Substrat Glukose unlimitiert als Kohlenstoffquelle für Biomassebildung genutzt. Ein Ziel der weiteren Optimierung wird die Übertragung des Prozesses auf Minimalmedium sein, so dass die Biomassebildung durch die Menge einer

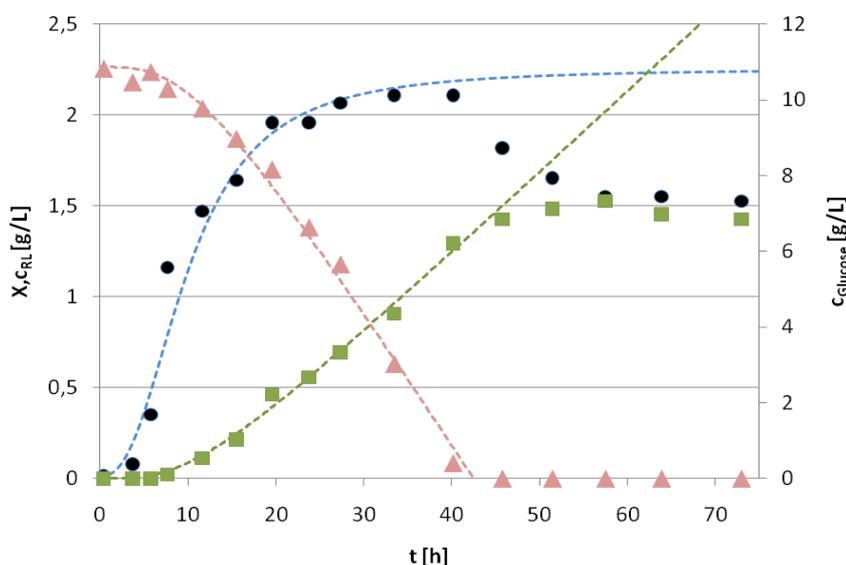


Abb. 3: Verlauf der Konzentrationen von Zelltrockenmasse, Glukose und Rhamnolipiden in einer Schüttelkolbenfermentation von *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB in LB-Medium mit 10 g/L Glukose, 20 mg/L Tetracyclin und 0,4 mM IPTG. Kreise zeigen Zelltrockenmassekonzentration X , Dreiecke zeigen Glukosekonzentration c_{Glukose} , Quadrate hamnolipid-konzentration c_{RL} . Die Ausgleichskurven ergeben sich aus einer Multiparameteranpassung unter Annahme einer logistischen Wachstumsfunktion.

Medienkomponente limitiert und gezielt gesteuert werden kann. Die Parameteranpassungen ermöglichen die Bestimmung von Kennwerten dieser

Fermentation (Siehe Tab. 1). Vergleicht man die erreichte Ausbeute (0,16 Cmol RL / Cmol Glukose) mit den theoretisch erreichbaren Werten (0,69 Cmol RL / Cmol Glukose) so wird zum einen klar, dass noch erhebliches Optimierungspotential besteht, zum anderen dass der Prozess jetzt schon einen hervorragenden Ausgangspunkt bietet.

Tab. 1: Kennwerte der Rhamnolipid-Fermentation mit *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB auf LB-Medium mit 10 g/L Glukose aus vier Fermentationen. r_x sind spezifische Aufnahme- und Syntheseraten, Y die Ausbeute, c_{max} die erreichte Maximal-Konzentration. Alle Abweichungen sind 80%-Konfidenzintervalle.

r_{RL}	0,03±0,01 g/gh
$r_{Glukose}$	0,20±0,03 g/gh
$Y_{Glukose,RL}$	0,15±0,05 g/g
	0,16±0,05 Cmol/Cmol
$C_{RL,max}$	1,7±0,3 g/L

Zum Vergleich mit einem typischen natürlichen Rhamnolipidproduzierer wird *P. aeruginosa* PAO1 herangezogen [Müller *et al.*, 2010]. In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** ist erkennbar, dass sich das Wachstumsverhalten ähnelt. Der verwendete rekombinante Stamm wächst allerdings erheblich schneller als *P. aeruginosa*. Ein wesentlicher Nachteil des pathogenen Stammes ist die komplexe Regelungskaskade die durch Quorum Sensing ausgelöst wird [Pearson, Pesci & Iglewski, 1997]. Während daher die spezifische Produktivität von *P. aeruginosa* einer Glockenkurve folgt und damit klar erkennbar unter den Kapazitäten bleibt die der Metabolismus bietet, erlaubt der verwendete rekombinante *P. putida* eine konstante Produktivität bis zum vollständigen Verbrauch der Kohlenstoff-Quelle und bietet damit einen guten Ausgangspunkt zur weiteren Optimierung.

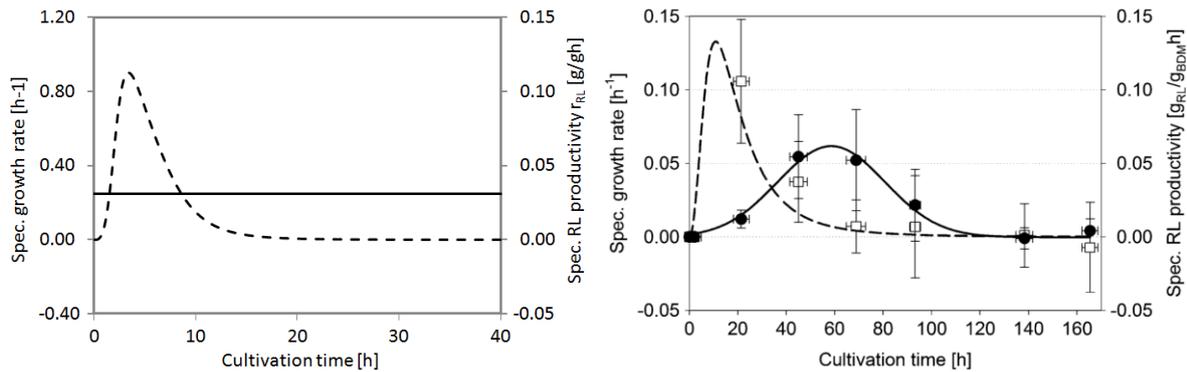


Abb. 4: Vergleich von spezifischer Wachstumsrate und spezifischer Rhamnolipidsyntheserate zwischen *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB in LB-Medium mit 10 g/L Glukose (links) und *P. aeruginosa* PAO1 in Minimalmedium mit Sonnenblumenöl (rechts) (aus Müller *et al.*, 2010). Strichlinien zeigen den Verlauf der Wachstumsrate, durchgezogene Linien den Verlauf der RL-Syntheserate. Die Abbildung links zeigt dabei durchschnittliche Parameter aus vier Kultivierungen. Es wird deutlich, dass die Rhamnolipidsynthese in *P. putida* sowohl vom Wachstum als auch von komplexen Regulationsmechanismen entkoppelt ist und in ihrer Größenordnung mit *P. aeruginosa*-Wildtypen vergleichbar ist.

Die Entkopplung von Zellwachstum und Rhamnolipidproduktion erlaubt die vereinfachte Optimierung der Leistungsfähigkeit des Wirtsmetabolismus und des genetischen Konstrukts zur Rhamnolipidproduktion.

Metabolische Optimierung der Rhamnolipid produzierenden Mikroorganismen

P. putida KT2440 ist in der Lage, während des Wachstums erhebliche Mengen des Speicherpolymers Polyhydroxyalkanoat (PHA) zu synthetisieren und intrazellulär zu speichern. [de Eugenio *et al.* 2010]. Die Vorläufermetabolite zur Synthese von PHA stammen aus der Fettsäure *de-novo* Synthese. Damit steht die Produktion von PHA in direkter Konkurrenz zur Synthese der Hydroxy-alkanoyl-Alkanoate (HAA), die wiederum Vorläufer für die Rhamnolipidsynthese sind. Als erster Schritt zur Optimierung der Rhamnolipidausbeute wurde daher ein PHA-Synthase *phaC1*-negativer Stamm *P. putida* KT42C1 verwendet (siehe Abb. 4). Da der Knockout der PHA-Synthase durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette erfolgte [de Eugenio *et al.* 2010] wurde ein anderes Plasmidsystem erforderlich. Dies wurde von Partner 1 durch Konstruktion des Plasmids pVLT31_rhIAB zur Verfügung gestellt; statt einer Kanamycinresistenz verwendet pVLT31 eine Tetracyclinresistenzkassette als Selektionsmarker. Das Produktionssystem *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB in LB-Medium mit 10 g/L Glukose ist in der Lage, 1.700 mg/L Mono-

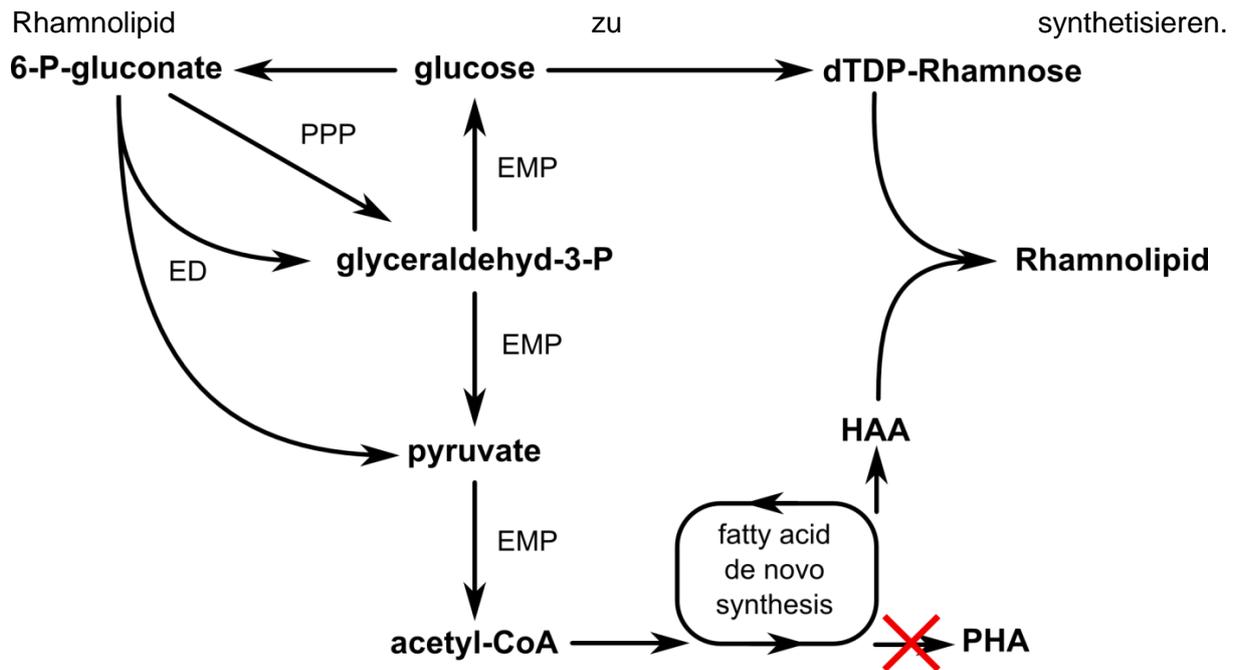


Abb. 4: Die Vorläufermetabolite des Mono-Rhamnolipids werden aus dem zentralen Kohlenstoffwechsel zum einen aus dem Glukosepool abgezweigt (dTDP-Rhamnose), zum anderen aus der Fettsäure-*de-novo* Synthese. *P. putida* KT2440 synthetisiert das Speicherpolymer Polyhydroxyalkanoat (PHA). Durch Verwendung des PHA-Synthase-negativen Stammes *P. putida* KT42C1 pVLT31_rhIAB konnte die erreichte Rhamnolipidkonzentration von 500 mg/L auf 1.700 mg/L gesteigert werden. PPP ist der Pentosephosphat-Pathway, ED der Entner-Doudoroff-Pathway und EMP der (in *P. putida* unvollständige) Embden-Meyerhof-Parnas-Pathway.

Fortschritt

Arbeitspaket 1: Metabolisches Design für die Rhamnolipidsynthese mittels *P. putida*

Das Design eines metabolischen Modells eines Rhamnolipidproduzierers ist erfolgreich abgeschlossen, einige Szenarien zur Optimierung des vorhandenen Stammes wurden bereits durchgespielt und vielversprechende Optionen identifiziert. Weitere Simulationen können nun in kurzer Zeit durchgeführt werden.

Arbeitspaket 2: Metabolische Charakterisierung der Rhamnolipid produzierenden *P. putida*

Die metabolische Charakterisierung hat bisher vielversprechende Ergebnisse gezeigt, aus denen sich die Eignung des genutzten rekombinanten Stammes für die Rhamnolipidproduktion erkennen lässt.

Arbeitspaket 3: Metabolische Optimierung der Rhamnolipid produzierenden Mikroorganismen

Die Erkenntnisse aus Paket 1 erlaubten bereits den ersten erfolgreichen Optimierungsschritt, mit dem die Rhamnolipidausbeute verdreifacht werden konnte.

Literatur

Chandrasekaran EV, BeMiller JN. Constituent Analysis of Glycosaminoglycans *In: Whistler RL (ed.) Methods in carbohydrate chemistry, volume 8, pages 89-96, Academic., New York, 1980*

de Eugenio LI, Escapa IF, Morales V, Dinjaski N, Galán B, García JL, Prieto MA. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environ Microbiol*, 12(1):207-21, 2010.

Müller MM, Hörmann B, Sylđatk C, Hausmann R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(1):167-74, 2010.

Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 179(18):5756-67, 1997.

Blank LM, Ionidis G, Ebert BE, Bühler B, Schmid A. Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS J*, 275(20):5173–5190, 2008.

Bonarius HPJ, Schmid G, Tramper J. Flux analysis of underdetermined metabolic networks: the quest for the missing constraints. *Trends Biotechnol*, 15(8):308–314, 1997.

Edwards JS, Ibarra RU, Palsson BO. In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol*, 19:125–130, 2001.

Lee JM, Gianchandani EP, Papin JA. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Brief Bioinform*, 7(2):140–150, 2006.

Partner 3:

Partner 3 (KIT)

Dr. Rudolf Hausmann

Ergebnisse

- ✓ HPLC-VWD Analytik für rekombinantes Rhamnolipid etabliert
- ✓ Dünnschichtchromatographie für rekombinantes Rhamnolipid etabliert
- ✓ Parallelf fermentationen für rekombinante *Pseudomonas putida* etabliert und durchgeführt
- ✓ Rhamnolipid auf Glukose Minimalmedium produziert

Zielsetzung

Zielsetzung der ersten Phase des Projektteils war es die erhaltenen *Pseudomonas putida*-Stämme zu inkubieren und auf ihr Rhamnolipidspektrum sowie ihre Produktivität hin zu untersuchen. Dabei sollten verschiedene Fermentationen durchgeführt und die Proben mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC auf Rhamnolipide untersucht werden. Hierfür standen mehrere HPLC-Methoden sowie Standards der häufigsten Rhamnolipidspezies zur Verfügung. Für die Fermentationen standen ein Sechsfach-Parallelbioreaktoren sowie ein 5L-Bioreaktor zur Verfügung.

Rhamnolipid-Analytik

Zunächst wurden die wässrigen Proben zentrifugiert und ein Teil des Überstandes entnommen. Der entnommene Überstand muss angesäuert werden und zweimal mit Ethylacetat extrahiert werden. Dadurch werden die Rhamnolipide in die organische Phase überführt. Um die Rhamnolipide mit Hilfe eines Variable Wavelength (VW) Detektors detektieren zu können, müssen die zuvor extrahierten und evaporisierten Proben in Acetonitril rückgelöst und mit 4-Bromophenacylbromid derivatisiert werden. Für die quantitative Bestimmung der Rhamnolipide ist es notwendig eine Kalibriergerade aufzunehmen. Hierfür wird ein Standard in verschiedenen Konzentration hergestellt und ebenso wie die Probe evaporiert und derivatisiert.

Die verwendete HPLC-Methode ist eine Gradientenchromatographie. Lösung A besteht dabei zu 95% aus gefiltertem destilliertem Wasser und zu 5% aus Methanol _{HPLCgrade}, Lösung B besteht zu 5% aus gefiltertem destilliertem Wasser und zu 95% aus Methanol _{HPLCgrade}. Es wurde ein Gradient verwendet bei dem das Verhältnis von Lösung A zu Lösung B von 20%:80% auf 0%:100% und wieder zurück verändert wird (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: HPLC-Gradient

Laufzeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	20	80
17	0	100
25	0	100
30	20	80

Die eingestellten Standardparameter der HPLC-Anlage sind in Tabelle 2 erklärt.

Tabelle 2: Parameter für die HPLC

Parameter	
Säule	Supelcosil TM LC-18 Octadecylsilyl
Säulenlänge	15 cm
Partikelgröße	5 µm
Injektionsvolumen (Standard)	10 µL
Detektor	Variable Wavelength Detector (VWD)
Wellenlänge	254nm
Flussrate	0,4mL/min

Es wurden je Messvorgang 10 µL Probe eingespritzt, die mit einer Flussrate von 0,4mL/min über die Säule laufen. Mit einem VWD-Detektor wurden die Proben bei 254 nm detektiert und in einem HPLC-Chromatogramm dargestellt. In Abbildung 2 ist beispielhaft ein Chromatogramm dargestellt.

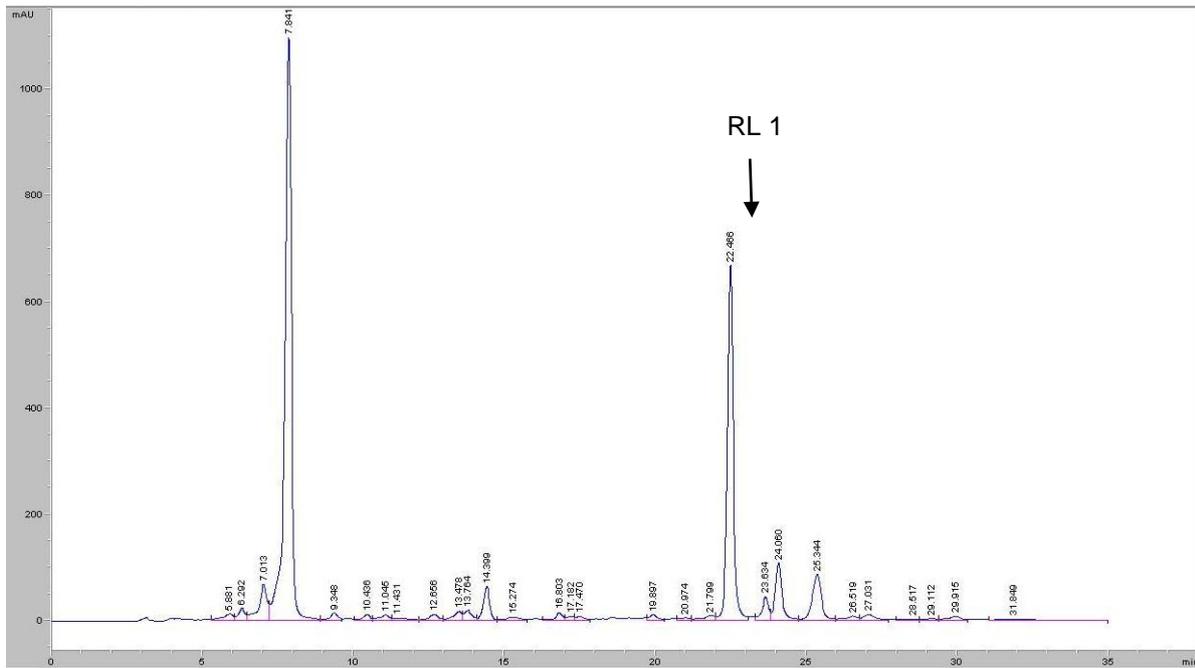


Abbildung 1: HPLC-Chromatogramm von Rhamnolipid 1

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zunächst wurden die wässrigen Proben zentrifugiert und ein Teil des Überstandes entnommen. Der entnommene Überstand muss angesäuert werden und zweimal mit Ethylacetat extrahiert werden. Dadurch werden die Rhamnolipide in die organische Phase überführt. Für die Dünnschichtchromatographie werden Kieselgelplatten verwendet, auf die mit einem Abstand von 1,5 cm zum unteren Rand die Proben aufgetragen werden. Je nach Rhamnolipidmenge werden 10-50 µL Probe aufgetragen. Wenn die Probe vollständig getrocknet ist, wird die Platte in eine mit Laufmittel gefüllte Kammer gestellt. Das Laufmittel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) läuft die Platte hoch und nimmt je nach Hydrophobizität, die gelösten Bestandteile der Probe in verschiedenen Geschwindigkeiten mit. Dadurch wird die Probe aufgetrennt und man kann nach Anfärben und Entwicklung der Platte (siehe Tabelle 4) die verschiedenen Bestandteile erkennen. In Abbildung 3 ist ein solcher DC-Scan dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des DC-Laufmittels

Komponente	Anteil
Chloroform	65
Methanol	15
Eisessig	2

Tabelle 4: Zusammensetzung der DC-Färbelösung

Komponente	Anteil
Eisessig	50
Schwefelsäure	1
Anisaldehyd	0,5

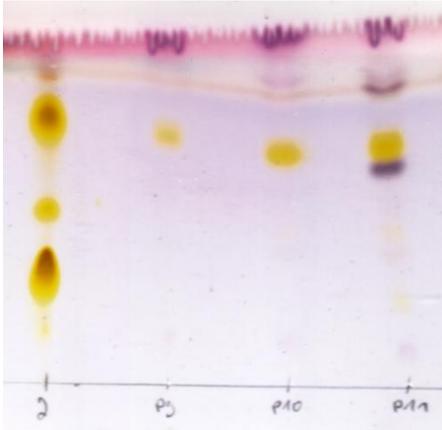


Abbildung 3: DC-Scan vom Verlauf einer Fermentation, ganz links ist ein Standard aufgetragen, von links nach rechts nimmt die Rhamnolipidkonzentration zu

Fermentation zur Evaluation der Rhamnolipidproduktivität des Stamms

Zunächst wurden, um eine Rhamnolipidproduktion zu untersuchen, mit einem Standardvollmedium (LB-Medium nach Bertani) Fermentationen im Sechsfachfermenter (Sixfors der Firma Infors, Abbildung 4) durchgeführt.



Abbildung 4: Sechsfachfermenter der Firma Infors bei der zweiten Fermentation

Später wurden weitere Fermentationen mit einem Minimalmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) und einem kontinuierlichen Zulauf durchgeführt, mit dem Ziel, die Rhamnolipidproduktion zu erhöhen. Diese Fermentationen wurden in einem 5l-Bioreaktor (Biostat B5 der Firma Sartorius/Braun, Abbildung 5) mit *Pseudomonas putida* KT2440+pVLT33-rhIAB durchgeführt.



Abbildung 5: Bioreaktor B5 während der 4. Fermentation

Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Minimalmediums

Salze

Komponente	c in g/L
KH ₂ PO ₄	8,0

K₂HPO₄	6,33
Na₂HPO₄x2H₂O	2,09
(NH₄)₂SO₄	0,8
NH₄Cl	0,1

Nachdem autoklavieren werden 20 mL 50%ige Glucoselösung, 1,5 mL 1 M MgSO₄*7H₂O-Lösung, 1,5 mL 0,1 M CaCl₂-Lösung sowie 1,5 mL Spurenelementlösung steril hinzugegeben.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung

Komponente	c in g/L
CaCl₂xH₂O	0,5
ZnSO₄x7H₂O	0,18
MnSO₄xH₂O	0,1
Na₂-EDTA	10,05
FeCl₃x5H₂O	8,35
CuSO₄x5H₂O	0,16
CoCl₂x6H₂O	0,18

Der Verlauf einer solchen Fermentation ist beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt. Alle Fermentationen wurden mit einer optisch Dichte (OD) von 0,1 im Fermenter angeimpft und bei einer OD von 0,5 mit 0,4 mM IPTG induziert. Das Volumen zu Beginn der Fermentation betrug 2 L und es wurden 580 mL Glucoselösung zugefüttert. Die Versuchsdauer betrug ca. 48 Stunden. Die höchste gebildete Rhamnolipidmenge war 0,22 g/L Rhamnolipid bei einer Biotrockenmasse von 12,25 g/L.

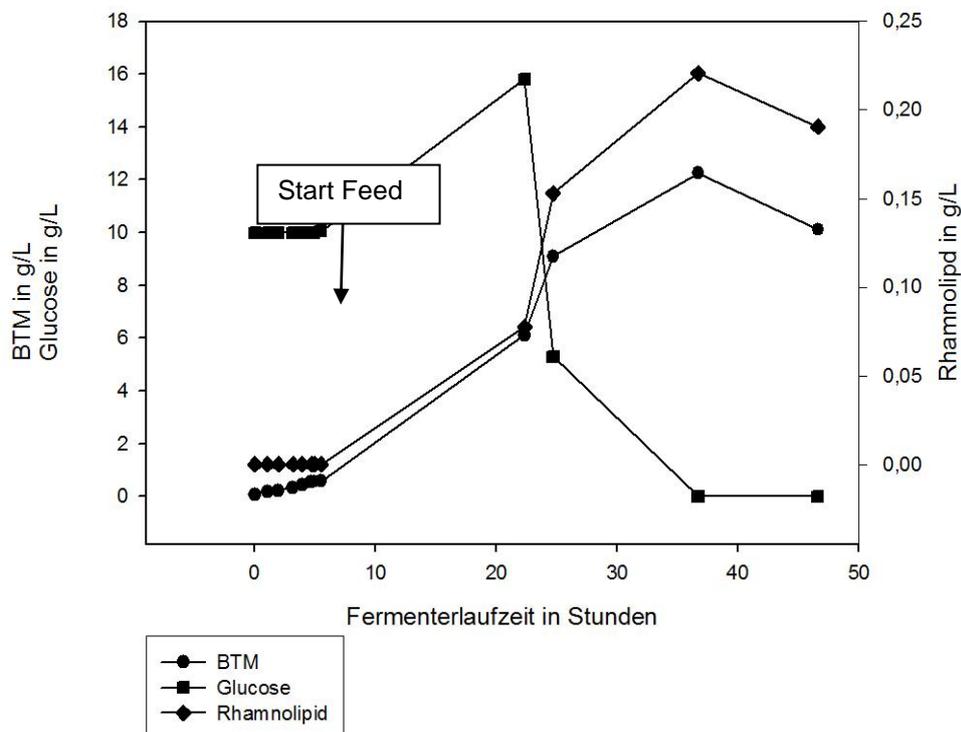


Abbildung 6: Fermentationskinetik von *P. putida* KT2440

Zusammenfassung:

Die ersten Fermentationen verliefen erfolgreich, sowohl in LB-Medium als auch im verwendeten Minimalmedium ist der Stamm gewachsen und hat nach Induktion Rhamnolipide produziert. Allerdings ist eine Optimierung der Produktbildungsrate von Rhamnolipiden erforderlich, die in weiteren Fermentationen verbessert wird. Dabei sollte vor allem die Biomassebildung im Verhältnis zur Rhamnolipidbildung minimiert werden. Diese Fermentationsoptimierung erfolgt in Absprache mit den Partner TUDo1 und TuDo2. Die Optimierung des Induktionszeitpunktes erfolgt in Absprache mit Partner 1 (HHU) und Partner 6 (m2p).

Partner 4 (TUDo 2)

Prof. Rolf Wichmann

Ergebnisse

- ✓ Fermentationen für rekombinante *Pseudomonas putida* etabliert und durchgeführt
- ✓ Gezieltes Ausschäumen von Rhamnolipiden ermöglichte ein Aufkonzentrieren um den Faktor 100
- ✓ Maßstabsvergrößerung der Rhamnolipidsynthese (50 L Kulturvolumen) war erfolgreich
- ✓ Evaluierung von Adsorptionsmaterialien war erfolgreich
- ✓ Aufreinigung von Monorhamnolipiden mittels Adsorption/Desorption war in ersten Tests vielversprechend

1. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung von mikrobiellen Rhamnolipiden, produziert vom Stamm *Pseudomonas putida* mit dem Schwerpunkt der Entwicklung und Evaluierung einer Standardprozessführung, welche es ermöglichen soll, diese Biotenside in hohen Konzentrationen aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen. Es gilt für die prozessimmanenten Schwierigkeiten bei der biotechnologischen Herstellung von Rhamnolipiden, wie z.B. der exzessiven Schaumbildung, Lösungsstrategien zu finden und umzusetzen.

2. Kultivierung und Maßstabvergrößerung

Vom Projektpartner 1 (IMET) wurde *Pseudomonas putida* KT2440 pVLT33_rhIAB bereitgestellt. In ersten Versuchen in kleinem Maßstab (Schikanekolben) wurde das Wachstum über den Verlauf von 30 Stunden in LB-Medium mit und ohne Zusatz von 10 g/L Glucose untersucht und eine optimale Kultivierungszeit für die Biomasseproduktion (ohne Induktor, d.h. ohne Biotensidproduktion) von 14 Stunden bestimmt. Die Wahl des

Induktionszeitpunkts (mit Isopropyl- β -D-thiogalacto pyranoside, IPTG) direkt oder mehrere Stunden nach der Inokulation wurde auch untersucht. An Hand der Ergebnisse wurden in der Folge alle Kultivierungen erst zur Biomasseproduktion durchgeführt (ohne Glucose und Induktor), um eine optimale hohe Zelldichte zu erreichen. Anschließend zur Produktion von Rhamnolipiden wurden 10g/L Glucose als C-Quelle zugegeben und mit 1 mM/L IPTG induziert. In allen Fällen wurde Tetracyclin für die Selektion des Plasmides verwendet (50 mg/L). Medien-Zusammensetzung und Kultivierungsparameter wurden vom Projektpartner 2 (TUDo1) übernommen. Für die Maßstabvergrößerung wird die Eigenschaft von Rhamnolipiden ausgenutzt, dass diese als sekundäre Metaboliten produziert werden. Dadurch lässt sich die Wachstumsphase der Mikroorganismen von der Produktionsphase des Produktes trennen, immer unter der Voraussetzung, dass hohe Zelldichten die Produktivität erhöhen. [Magario, I., 2008]

2.1. Scale-Up Versuch: Rhamnolipid-Produktion im 3L-Fermenter

Die Vorkultur aus *P. putida* wurde für 14 Stunden kultiviert und anschließend der Bioreaktor (Bioengineering AG, Schweiz; Arbeitsvolumen von 2 L) im Verhältnis von 10% inokuliert. Antischaum-Mittel wurde verwendet, um die Schaumbildung während der Biomasseproduktion zu vermeiden. Das Wachstum im Fermenter wurde auf Grund der niedrigen Zelldichte, die das Inokulum zeigte, für einige Stunden weiter durchgeführt. Ein OD₄₅₀-Wert von ca. 13 wurde als ausreichend betrachtet und die Induktion mit IPTG fand bei gleichzeitiger Zugabe von Glucose statt. Der pH-Wert im System blieb um 6,8 konstant, Begasung und Drehzahl wurden so eingestellt, dass die Schaumbildung nicht sehr stark wurde (Variationen waren hier notwendig). Ungefähr 4 Stunden nach Induktion mit IPTG wurde die Schaumbildung so stark, dass der Versuch beendet wurde. Es ist zu erwarten, dass die Schaumbildung bzw. die Menge an Schaum proportional zur Biotensidkonzentration ist [Peter et al., 2003; Ozdemir et al., 2004] und eine natürliche Produktabtrennung ermöglicht. Die Trennung des Schaums vom Fermentationsmedium und eine anschließende Fraktionierung sind notwendig, um unterschiedliche Methoden für die Schaumzerstörung zu untersuchen, die am Ende die Gewinnung des Bioprodukts ermöglichen.

Eine Flüssigchromatographie-Methode mit einem Corona Charged Aerosol Detector wurde bei Projektpartner 2 (TUDo1) etabliert und diente als analytische Methode zum (Mono)Rhamnolipid-Nachweis der Proben dieses Scale-Up-Fermentationsversuches (s. Abb. 1-1). Als Probe 1 wurde zur Überprüfung der Kalibrierung (Abweichung zwischen Standard und Kalibrierung kleiner als 5%) ein Standard mit 100 mg/L Mono-Rhamnolipid verwendet. In den Fermentationsproben 2 bis 4 (nach Induktion mit IPTG im Abstand von 1 Stunde entnommen) wurde keine Biotensidkonzentration nachgewiesen. Probe 5 wurde nach Beendigung des Fermentationsprozesses dem Medium entnommen, als die Schaumbildung

nicht mehr zu kontrollieren war. Die zu jenem Zeitpunkt gleichzeitig aus dem Schaum gezogene Probe 6 (der Schaum wurde als Probenvorbereitung mittels Zentrifugation kollabiert) zeigte das interessanteste und erfolgversprechende Ergebnis, nämlich einen Aufkonzentrierungseffekt fast um den Faktor 100 gegenüber dem Medium (Probe 5).

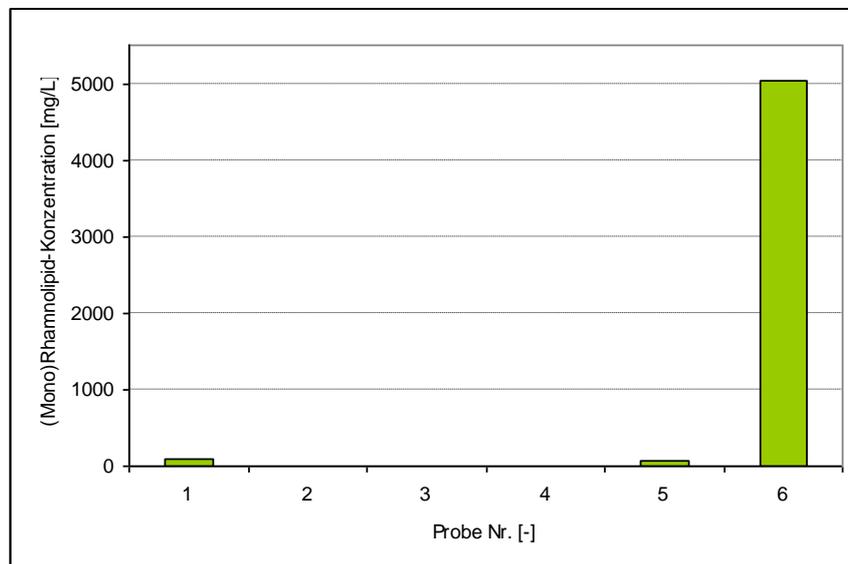


Abb. 1-1: Rhamnolipid-Konzentrationen im Verlauf der Produktion im 3 L-Fermenter (Probe 6 liefert die Konzentration im abgetrennten und kollabierten Schaum)

Das erstaunlich hohe Ergebnis in Bezug auf die Biotensidkonzentration ist die Motivation einen weiteren Versuch zur Maßstabvergrößerung des Systems durchzuführen, mit dem Ziel, mehr Kenntnisse über die Eigenschaften und das Potential der *in situ* Produktabtrennung mittels kontrollierter Schaumbildung und –Aufbereitung zu gewinnen. Auf Grund der gewonnenen Erfahrung mit der Schaumzerstörung durch Zentrifugation rückt jetzt die Idee in den Vordergrund, das Potential eines mechanischen Schaumzerstörers bei der Rhamnolipid-Produktion im großen Maßstab vorteilhaft zu nutzen [Leitermann, F., 2008].

2.2. Scale-Up Versuch: Rhamnolipid-Produktion im 300 L-Fermenter

Die Vorkultur aus *Pseudomonas putida* wurde wie beim 1. Scale-Up Versuch für 14 Stunden im Schikanekolben kultiviert und anschließend in einen 7 L-Bioreaktor (Bioengineering AG, Schweiz; Arbeitsvolumen von 3,5 L) im Verhältnis von 10% inokuliert. Ebenso wurde auch hier Antischaum zur Vermeidung der Schaumbildung während der Biomasseproduktion verwendet. Der pH-Wert im System wurde bei 7 konstant gehalten, Begasung und Drehzahl wurden so eingestellt, dass die verwendete Antischaumkonzentration ausreichend war, um die Schaumbildung unter Kontrolle zu halten.

Während der Biomasseproduktion wurden Fermentationsproben entnommen, um detaillierte Information zum Wachstum von *P. putida* auf LB-Medium zu gewinnen. Dies ist nicht exponentiell, sondern lässt sich analog zum Wachstum von *P. aeruginosa* während der

Rhamnolipid-Produktion aus Sonnenblumenöl [Müller *et al.*, 2010] mit einer Funktion der Form

$$x(t) = X_0 + \frac{X_{add}}{1 + \left(\frac{t}{t_0}\right)^b}$$

beschreiben (s. Abb. 1-2). Hierbei ist X_0 die Startbiomassekonzentration, X_{add} die hinzugewonnene Biomasse für $t \rightarrow \infty$, t_0 ist charakterisiert durch $X(t_0) = X_0 + X_{add}/2$ und b ein Anpassungsparameter.

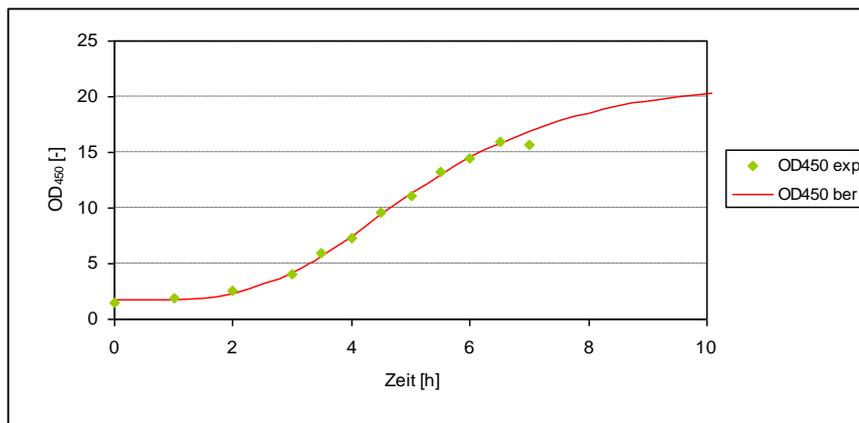


Abb. 1-2: Verlauf der Biomassekonzentration (als OD₄₅₀ gemessen) im 7 L-Fermenter und deren mathematische Beschreibung (rote Linie) nach [Müller *et al.*, 2010].

Das Wachstum im 7 L-Fermenter wurde für 7 Stunden bis zum Erreichen einer OD₄₅₀ von ca. 16 durchgeführt. Ein Teil der Biomasse wurde anschließend entnommen und als Inokulum (3,5 L, Anfang-OD₄₅₀-Wert von ca. 0,87) für die 50 L-Fermentation (im 300 L Fermenter) verwendet und dort weiter kultiviert. Bei einer OD₄₅₀ von 15,5 (nach mehreren Stunden erreicht) wurden Glucose und IPTG zugeführt und somit die Rhamnolipid-Produktion gestartet. Die Biotensidproduktion dauerte ca. 10 Stunden (s. Abb. 1-3).

Als Rhamnolipid-Nachweis der Proben des 50 L-Fermentationsversuches wurde die gleiche Flüssigchromatographie-Methode wie bei der 3 L-Fermentation angewendet. Die Fermentationsprobe 1 dient als Referenz direkt nach der Induktion mit IPTG und die folgenden Proben (2 bis 5) wurden in zeitlichen Abständen entnommen, um den Verlauf des Produktionsprozesses zu überwachen. Alle Messungen zeigten bereits die Anwesenheit von Biotensiden im Fermentationsmedium (s. Abb. 1-3). Probe 6 wurde nach Beendigung des Fermentationsprozess entnommen, als die Glucosekonzentration im Medium sehr niedrig (trotz zusätzlicher Zugabe 5 Stunden nach Induktion) und die OD₄₅₀ konstant geblieben war.

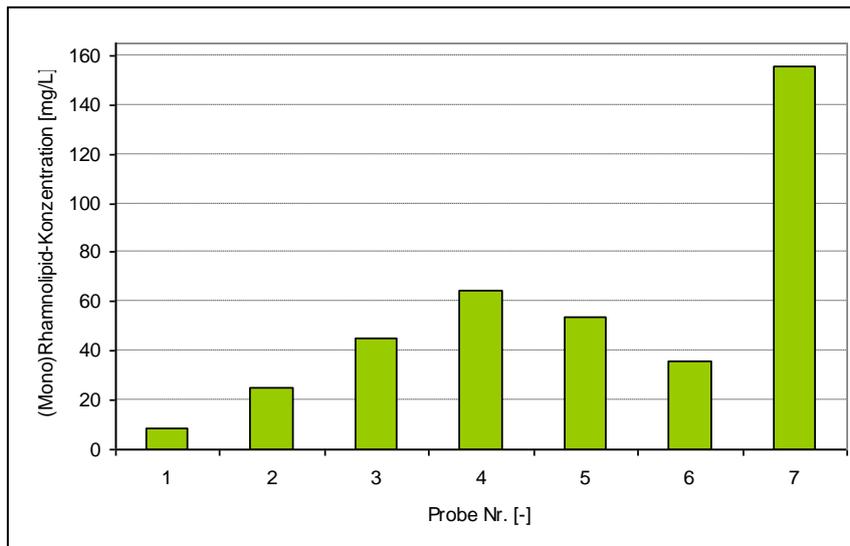


Abb. 1-3: Rhamnolipid-Konzentrationen im Verlauf der Produktion in 50 L-Fermenter (Probe 7 nach Biomasseabtrennung mittels Tellerzentrifuge)

Die ersten vier Proben zeigen eine Zunahme der Biotensidkonzentration, was sich durch die zunehmende Produktion des Biotensids (Abnahme der Glucosekonzentration) erklären lässt. Während dieser Zeit war keine nennenswerte Schaumbildung zu beobachten. Im weiteren Verlauf wurde dann zunehmend die Bildung von Schaum bewusst hervorgerufen (s. Abb. 1-4), was einen Übergang des Biotensids in die Schaumphase zufolge hatte und sich in der Abnahme der Konzentrationen in der Flüssigphase zeigte.



Abb. 1-4: Schaumbildung und –Ausbreitung auf der Mediumsoberfläche im 300 L-Fermenter (50 L Arbeitsvolumen)

Ein deutlich höherer Wert wurde in Probe 7 gemessen. Diese liefert die Biotensidkonzentration nach der Durchführung der Biomasseabtrennung (und gleichzeitiger Schaumzerstörung) mittels Tellerzentrifuge (9800 U/min, Durchfluss von 21,5 L/h). Sie enthielt neben einem Teil des Mediums auch einen größeren Schaumanteil und lag somit mit einem Wert von 155 mg/L deutlich höher als bei den Medien-Proben. Die Biotensidkonzentration jedoch lag wesentlich niedriger als bei der 3L-Fermentation, wo sie direkt im Schaum gemessen wurde, sodass dies in künftigen Fermentationen noch zu bestätigen ist. Tendenziell zeigte sich aber auch in der 50 L-Fermentation, dass der wesentliche Anteil des Biotensids im Schaum enthalten sein wird.

3. Rhamnolipid-Abtrennung

Zu Beginn des Projektes wurden insbesondere die Aspekte der analytischen Erfassung und Bestimmung von Rhamnolipiden sowie ein erstes Screening von potentiellen Adsorbentien zur Untersuchung des Potentials der Produktabtrennung aus Fermentationsmedien mittels Adsorption/Desorption [Dubey *et al.*, 2005] beleuchtet. Die verwendete Referenz-Lösung (Mono-Rhamnolipid) wurde vom Projektpartner 2 (TUDo1) zur Verfügung gestellt.

3.1. Screening von Polymer basierten Adsorbentien

Die Verwendung von Amberlite® XAD Polymer Materialien zur Adsorption und anschließender Desorption zeigt sich als erfolgversprechend [Reiling *et al.*, 1986]. Ebenso ließen sich Hinweise für den erfolgreichen Einsatz von verschiedenen Materialien für die Ionenaustausch-Chromatographie finden. Insbesondere auch weil in der Arbeitsgruppe BVT (Projektpartner 4, TUDo2) bereits ein isokratisches HPLC System auf Basis des Ionentauscher-Polymerträgers Eurokat® H (sulfoniertes Styrol/Divinylbenzol-Kopolymer) vorhanden ist, welches für die Analyse komplexer Gemische aus organischen Säuren, Zuckern und Alkoholen eingesetzt wird. Daher entstand die Idee, dieses System auf die Eignung zur analytischen Bestimmung von Rhamnolipiden zu testen. Dafür kamen zwei mögliche Alternativen in Betracht: Direkter Nachweis von Rhamnolipiden aus einer Produktmischung oder indirekter Nachweis und quantitative Bestimmung von Rhamnose aus einem Rhamnolipid-Hydrolysat.

3.1.1. Direkter Nachweis von Mono-Rhamnolipiden

Die Idee die Zuckerkomponente der Rhamnolipide zur Trennung von Rhamnolipiden bzw. deren Abtrennung aus dem Medium auszunutzen, konnte durch die durchgeführten Experimente nicht gestützt werden. Bei Verwendung von niedrig konzentrierter Schwefelsäure als mobiler Phase mit der Eurokat® H Säule konnte Rhamnose nachgewiesen werden, was darauf hindeutete, dass unter den gewählten Bedingungen für die Analyse bereits eine Teilhydrolyse des Rhamnolipids stattfand; auf eine weitere Quantifizierung des Hydrolysegrades wurde jedoch verzichtet. Die Variation des Eluenten (erhöhte Schwefelsäurekonzentration mit Aceton) war nicht zielführend; weder Rhamnose aus einer möglichen Hydrolyse des Analyten noch das Mono-Rhamnolipid selbst wurden nachgewiesen.

3.1.2. Indirekter Nachweis von Mono-Rhamnolipiden (Hydrolyse)

Die (saure) Hydrolyse des Mono-Rhamnolipids erfolgte nach [Billian, 2000]; nach Neutralisierung wurde der Rhamnosegehalt per HPLC (Säule Eurokat® H) positiv bestimmt, trotz Anwesenheit anderer Kohlenhydrate (typisch für Proben aus Fermentationen). Der

Nachweis der freigesetzten Rhamnose gelang qualitativ und als „proof of principle“; die quantitative Aussage war jedoch im Range einer Abschätzung zu sehen, da auf eine qualifizierte Kalibrierung mit Rhamnose Standard verzichtet wurde.

3.2. Screening von Kieselgel basierten Adsorbentien

Neben Polymer basierten Materialien kommen potenziell auch Materialien auf Basis von Kieselgel in Reverse-Phase-Betriebsweise in Frage. Die Auswahl der Säulen wurde, neben Hinweisen aus der Literatur und Unterschieden in den Trennmechanismen, auch durch die Verfügbarkeit bestimmt. Unter konstanten Versuchsbedingungen (mobile Phase aus 80% v/v Acetonitril) wurden folgende Ergebnisse erhalten (Tabelle 2-1):

Tabelle 2-1: Screening von Kieselgel basierten Adsorbentien im Reverse Phase Mode

Säule	Retentionszeit [min]	Verhältnis Peakfläche/ Peakhöhe ^(*)
NUCLEODUR [®] C ₁₈ Gravity; 5 µm	4,18	57,9
NUCLEOSIL [®] 100-5 C ₈ HD	4,59	32,1
Phenomenex Luna [®] C ₈ ; 5 µm	17,21	36,6
NUCLEODUR [®] C ₁₈ Isis; 5 µm	6,77	36,9
Purospher [®] Star NH ₂ ; 5 µm	0	-
LiChrospher [®] 100RP 8; 5 µm	8,18	24,4
NUCLEOSIL [®] 100-3 Protect I	8,89	49,2

^(*) Das Verhältnis Peakfläche/Peakhöhe beschreibt näherungsweise die Peakform.

Auch im Reverse Phase Mode war eine Retention über potentielle polare ionische Wechselwirkungen mit dem Zuckeranteil des Analyten nicht nachweisbar (Test mit einer für die Zuckeranalytik empfohlenen Säule „Purospher[®] Star NH₂“). Dies sollte aber dennoch verifiziert werden. Für die Säule „Phenomenex Luna[®] C₈“ (für die Analytik von Alkylpolyglycosiden empfohlen) wurde eine sehr hohe Retentionszeit beobachtet. Die Säule „NUCLEODUR[®] C₁₈ Isis“ zeigte erwartungsgemäß eine gegenüber der anderen C₁₈-Säule etwas verlängerte Retentionszeit. Die hydrophoben Wechselwirkungen wurden durch ausgeprägte sterische Effekte gleichsam unterstützt, was für die Trennung verschiedener Rhamnolipide eine sehr gute Wahl darstellt. Die C₈-Säule „LiChrospher[®] 100RP 8“ wird ebenfalls als geeignet zur Analyse von Alkylpolyglycosiden beschrieben [Waldorf et al., 1998]. Mit dieser Säule wurde eine Retentionszeit von ca. 8 Minuten beobachtet. Eine ähnliche Retentionszeit weist auch die „NUCLEOSIL[®] 100-3 Protect I“-Säule auf. Das Verhältnis von Peakfläche zu Peakhöhe deutete jedoch auf einen eher ungünstig breiten Peak hin, was durch Betrachtung des entsprechenden Chromatogramms bestätigt wurde. Zusammenfassend lässt sich für die Versuche im Reverse-Phase-Mode schlussfolgern, dass zur Analytik eine C₈-Säule mit einem Anteil an freien Silanolgruppen die geeignete Wahl ist. Des Weiteren scheinen primär hydrophobe Wechselwirkungen für die Interaktion von Mono-Rhamnolipid mit der stationären Phase verantwortlich zu sein, welche wiederum nicht zu stark ausgeprägt sein sollten.

Dieses Ergebnis erleichtert nunmehr die Auswahl eines geeigneten Adsorber-Materials für präparative Zwecke. Daher fiel hier die erste Wahl auf ein gebrochenes Kieselgel, genauer die „Octadecylphase POLYGOPREP® 60-80 C₁₈“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) ohne Endcapping mit einer Partikelgröße von 63 bis 100 µm bei einer Porenweite von 60 Å. Es wurden Adsorptions/Desorptions-Versuche durchgeführt mit Fermentationsproben aus der Biotensidproduktion im 3L-Fermenter mit einer gemessenen Rhamnolipid-Ausgangskonzentration von 0,05 g/L. Nach erfolgter Desorption des adsorbierten Biotensids wurden erhöhte Konzentrationen gemessen. So konnte in ersten Versuchen das Potential der Anwendung von Kieselgel basierten Adsorbentien im Reverse Phase Mode bestätigt werden. In weiteren Arbeiten werden diese Ergebnisse quantifiziert.

4. Fortschritte

Arbeitspaket 1: Scale-up der Produktion von Rhamnolipid mit nicht-optimiertem Stamm

Erfahrungen bei der Stammhaltung und Kultivierung im kleinen Maßstab (Schüttelkolben und 3L-Fermenter) wurden erfolgreich gesammelt, sodass eine Maßstabsvergrößerung der Produktion mit dem vorhandenen Stamm betrachtet wurde. Die Durchführung der Kultivierung im 300L-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 50L ermöglichte das Studium des Wachstums des Mikroorganismus, der Schaumbildung sowie der Herstellung einer Rhamnolipid-haltigen Produktlösung, die als Ausgangslösung zur Produktaufarbeitung diente. Einige Szenarien zur Optimierung und vorteilhaften Nutzung der Schaumbildung wurden bereits durchdacht und vielversprechende Optionen identifiziert. Weitere Fermentationen sind für die nahe Zukunft eingeplant, um das Scale-up des Prozesses vollständig zu definieren.

Arbeitspaket 2: Untersuchung der Möglichkeit einer Produktaufarbeitung mittels Adsorption/Desorption

Das Screening möglicher Adsorptionsmaterialien hat bisher vielversprechende Ergebnisse gezeigt, aus denen sich die Eignung der Methode für die Rhamnolipid-Abtrennung erkennen lässt. Weitere Studien werden sich mit der mathematischen Beschreibung (Isothermen) und Modellierung des Adsorptions-/Desorptionsprozesses beschäftigen. Parallel muss eine Optimierung des analytischen Nachweises des Biotensids durchgeführt werden, um die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Aussagen zu gewährleisten.

Arbeitspaket 3: Optimierung des Scale-up der Rhamnolipid-Produktion

Die gewonnenen Erkenntnisse und Expertisen aus Paket 1 und 2, sowie die enge Zusammenarbeit mit Projektpartnern 1 (IMET) und 2 (TU Do1) werden in unmittelbarer Zukunft die Anwendung eines optimierten Rhamnolipidproduzenten, sowie die Durchführung einer Optimierung des Produktionsprozesses in größerem Maßstab ermöglichen.

Tab. 3-1: Übersicht erreichte Ziele (grün) von Projektpartner 4 (Zeitraum Mitte Februar bis Mitte Juli).

Aufgaben	Phase 1 (Arbeiten mit nicht-optimiertem Stamm)			Phase 2 (Arbeiten mit optimiertem Stamm)				
	1-3	4-6	7-9	10-14	15-18	19-22	23-26	27-28
Scale-up der Rhamnolipid-Produktion mit nicht-optimiertem Stamm								
Optimierung der Rhamnolipid Aufarbeitung mittels Adsorption/Desorption								
Optimierung des Scale-up der Rhamnolipid-Produktion								

Billian, P., *Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglycosiden*, Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, TU Berlin, 2000.

Chandrasekaran, E.V.; BeMiller, J.N., *Constituent Analysis of Glycosaminoglycans*. In: Whistler RL (ed.) *Methods in carbohydrate chemistry*, 8, 89:96, New York: Academic, 1980.

Dubey, K.V.; Juwarkar, A.A., *Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater*. *Biotechnol Progress*, 21(3), 860:867, 2005.

Holmberg, K., *Handbook of applied surface and colloid chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2002.

Leitermann, F., *Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide auf Basis nachwachsender Rohstoffe*. Dissertation, Fakultät Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, Universität Karlsruhe (TH), 2008.

Magario, I., *Enzyme reaction engineering for the conversion of emulsified di-rhamnolipid by free and immobilized Naringinase*. Dissertation, Fakultät Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, Universität Karlsruhe (TH), 2008.

Müller, M.M.; Hörmann, B.; Syldatk, C.; Hausmann, R., *Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(1), 167:174, 2010.

Ozdemir, G.; Peker, S.; Helvacı, S.S., *Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2*. *Colloids Surfaces A*, 234 (1-3); 135:143, 2004.

Peker, S.; Helvacı, S.S.; Ozdemir, G., *Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2*. *Langmuir*, 19; 5838:5845, 2003.

Reiling, H.E.; Thanei-Wyss, U.; Guerra-Santos, L.H.; Thirt, R.; Kappeli, O.; Fiechter, A., *Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5), 985:989, 1986.

Waldorf, H.; Scherler, J.; Schmitt, M., *Analyse von Alkylpolyglycosiden*, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 49 (2), 1998.

Weaire, D.L.; Hutzler, S., *The physics of foam*, Oxford: Oxford University Press, 1999.

Partner 5 (Ecover):

Ecover beteiligte sich in dieser sehr frühen Phase bereits an der inhaltlichen Bewertung der Projektfortschritte, da der Hauptbeitrag aber im Vergleich verschiedener Aufarbeitungstechniken liegen wird, sieht Ecover den Projektschwerpunkt folgerichtig in der

späten Phase 1 des Projektes und besonders in der projektierten und positiv begutachteten Phase 2.

Partner 6 (m2p):

Dipl. Ing. Carsten Müller/ Dipl. Ing. Johannes Emmerich

Ergebnisse

- ✓ Kultivierung rekombinanter *P. putida* im BioLector-System etabliert
- ✓ Toleranz gegenüber hohen Produkttitern bestätigt
- ✓ Verwendetes Antibiotikum Kanamycin mit Fermentation kompatibel
- ✓ Schaumbildung stellt kein Problem für Untersuchungen in diesem System dar

Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die Untersuchungen beim Projektpartner m2p-labs werden mit der BioLector-Technologie durchgeführt.

Der BioLector ist ein Bench-Top-Gerät, das zum online Monitoring von Fermentationen im Kleinstmaßstab verwendet wird. Als Reaktionsgefäße werden die parallel angeordneten Kavitäten von speziellen Mikrotiterplatten (MTP) genutzt, die bei definierten Umweltbedingungen geschüttelt (Schütteldurchmesser 3 mm) inkubiert werden. Die MTP besitzen einen transparenten Boden, der es möglich macht, dass jede Kavität der MTP nicht-invasiven optischen Messungen zugänglich ist. So können Biomasse, Fluoreszenzproteine, sowie durch die Verwendung optischer Sensoren pH und pO₂ für jede Kavität ausgelesen werden. Die Erfassung der Messwerte in Intervallen von wenigen Minuten findet während des Schüttelns statt, so dass das biologische System nicht gestört wird.

Als MTP kommt in diesem Projekt die Flowerplate ® zum Einsatz, eine MTP mit 48 Kavitäten, welche eine Blümchen-förmige Geometrie aufweisen. Diese Geometrie wirkt in Analogie zu Schikanen in entsprechenden Kolben und erhöht somit den O₂-Transfer in die Flüssigphase, ähnlich hohe Stofftransferkoeffizienten (k_La-Werte) wie in üblichen Fermentern erreicht werden. Die Vergleichbarkeit der Kultivierungen im BioLector/ Flowerplate System mit denjenigen in Fermentern ist gegeben.

Bislang wurde der generierte Rhamnolipid-produzierende *P. putida* Stamm auf seine Toleranz hin untersucht, in Gegenwart von Rhamnolipiden zu hohen Zelldichten zu wachsen. Ebenfalls wurde der Einfluss des Selektionsantibiotikums Kanamycin auf das Wachstum in An- und Abwesenheit von Rhamnolipiden untersucht, sowie die Vermehrungsfähigkeit von *P. putida* im m2p FedBatch-Medium.

Der Projektpartner FZ Jülich (Herr Andreas Wittgens) stellte den Stamm *Pseudomonas putida* KT2440-pVLT33+rhlAB zur Verfügung, der Projektpartner KIT, Karlsruhe (Frau Michaela Kugel) die Rhamnolipide (Di-Rhamnolipid, Reinheit ca. 95%).

Inhibierung von Rhamnolipiden auf das Wachstum von *Pseudomonas putida*

Um die inhibierende Wirkung von Rhamnolipiden auf das Wachstum von *P. putida* zu untersuchen, wurde der Mikroorganismus in Nährmedien mit steigender Rhamnolipidkonzentration kultiviert, wobei die erreichte Biomassekonzentration in der stationären Wachstumsphase ein Indikator für die Inhibierung durch die Rhamnolipide (RL) im Nährmedium ist.

Es wurden Nährmedien mit fünf verschiedenen RL-Konzentrationen plus die Negativkontrolle ohne RL in jeweils 7 Parallelansätzen untersucht.

Als Nährmedium wurde LB-Medium bestehend aus 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 10 g/L Glucose, 50 mg/L Kanamycin, 100 mM PO₄-Puffer pH ≈ 7,4 und verschiedenen RL-Konzentrationen (0, 5, 10, 25, 50 und 90 g/L) verwendet. Die Schüttelfrequenz lag bei 1000 rpm.

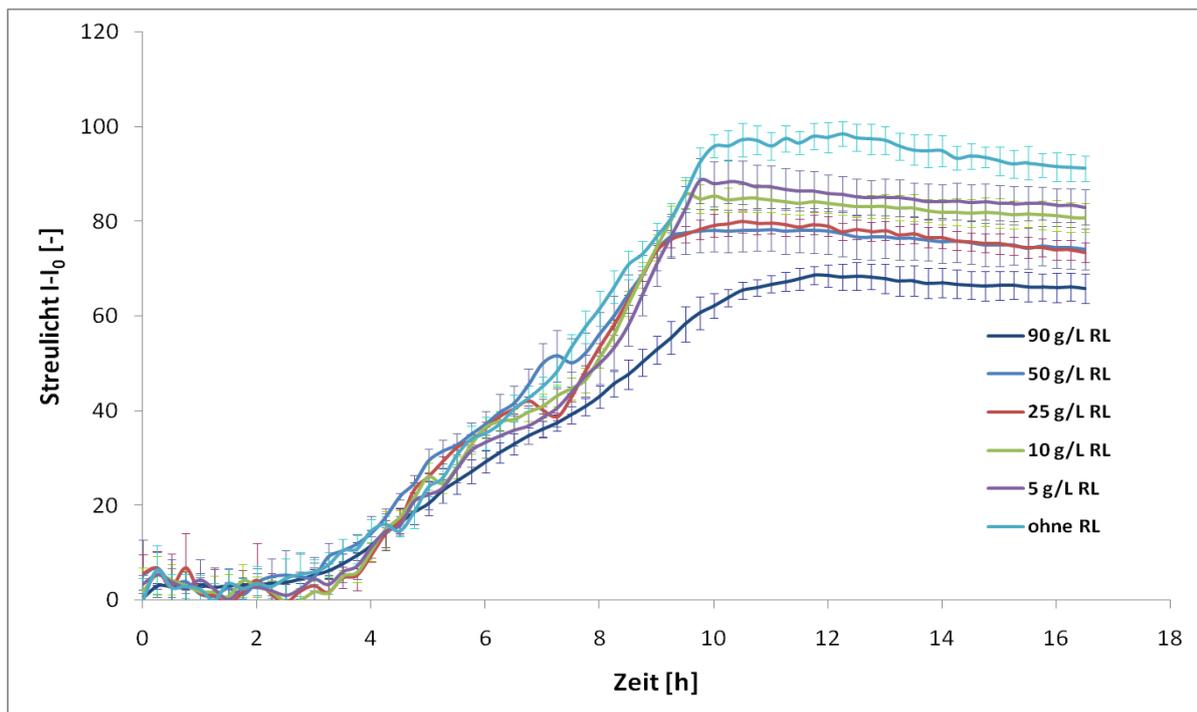


Abbildung 2: Inhibierung von Rhamnolipiden auf das Wachstum von *P. putida*. MTP: Flowerplate®, 500 µL pro Well, 1000 rpm, 30 °C

Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Mit steigender Rhamnolipid-Konzentration sinkt die erreichte Biomasse (eine OD₆₀₀-Messung des Wellinhaltes am Ende der Kultivierung wurde nicht vorgenommen). Auch unter diesen Kultivierungsbedingungen war für *P. putida* ein befriedigendes Wachstum bis zur höchsten getesteten Rhamnolipidkonzentration von 90 g/L zu verzeichnen, was sich mit den in Vorversuchen, die unter leicht unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt wurden, deckt und somit die hohe Toleranz gegenüber dem Produkt bestätigt. *P. putida* kann also auch unter

den Prozess-nahen Bedingungen mit wesentlich höheren Zelldichten als in den von Partner 1 durchgeführten Versuchen ebenfalls als optimal geeigneter Stamm zur Produktion von Rhamnolipiden angesehen werden.

Einfluss des Selektionsantibiotikums Kanamycin auf das Wachstum von *P. putida* bei gleichzeitigem Vorhandensein von RL im Nährmedium

Um den Einfluss des Selektionsantibiotikums Kanamycin als metabolische Bürde beim Wachstum von *P. putida* zu untersuchen, wurde das Wachstum des rekombinanten Stammes in Medien mit und ohne Kanamycin verglichen. Ebenfalls wurden noch einmal zwei Rhamnolipidkonzentrationen (plus Negativ-Kontrolle) in LB-Medium eingestzt (Rezeptur wie oben genannt, jedoch ohne 100 mM PO₄-Puffer).

Um zusätzlich zur Biomasse den pH- und pO₂-Verlauf der Kulturen aufzuzeichnen, wurde in einer Flowerplate ® mit pH- und pO₂-Optoden kultiviert.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2 bis 4 dargestellt.

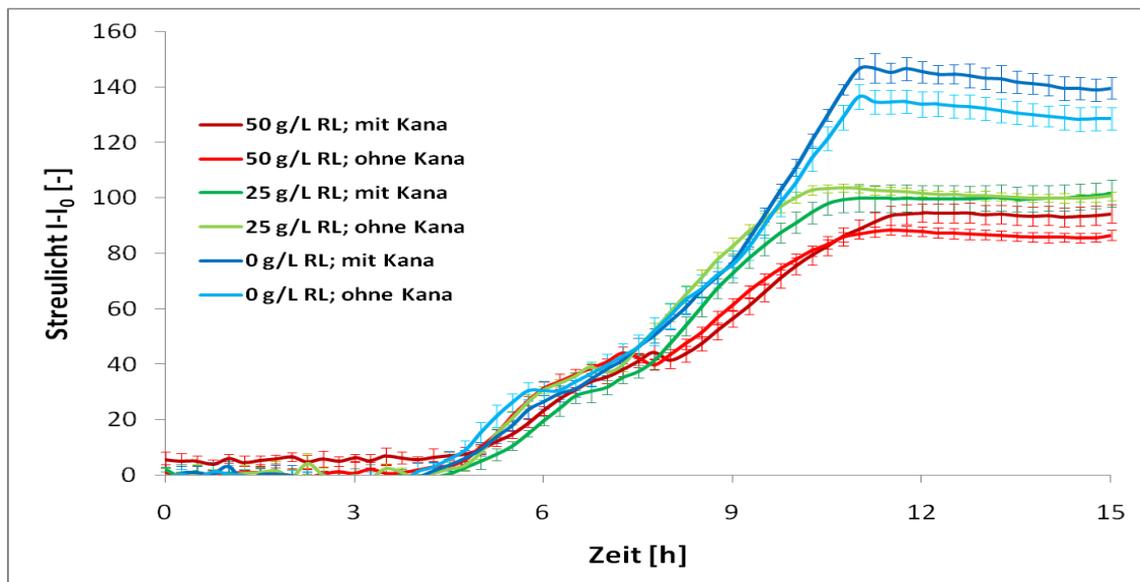


Abbildung 3: Vergleich des Wachstums mit und ohne Kanamycin, Biomasse-Entwicklung, MTP-Flowerplate mit Optoden, 510 µL pro Well, 1000 rpm, 30°C

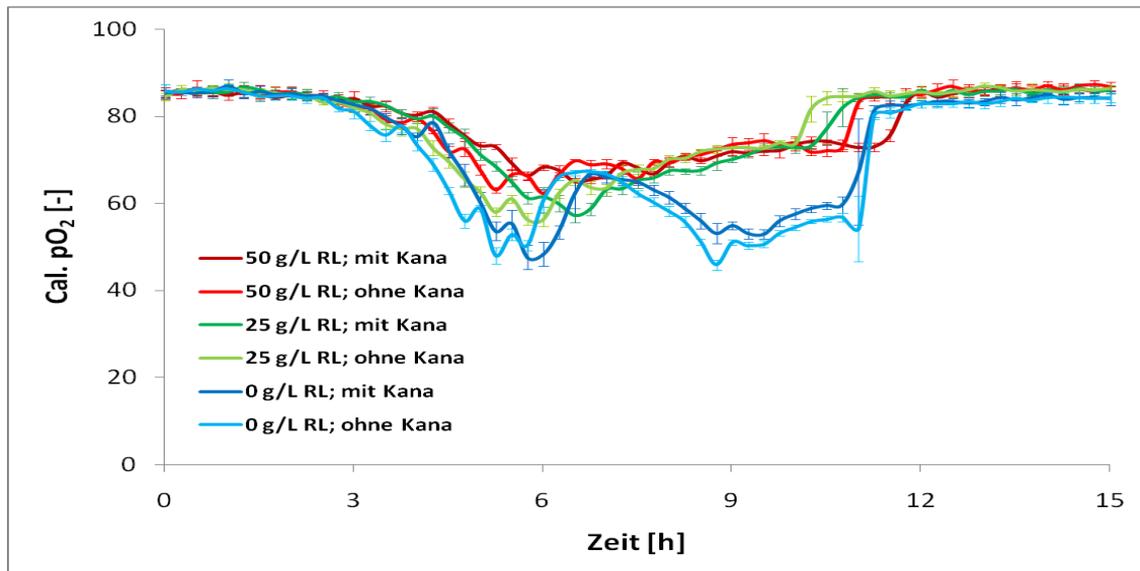


Abbildung 4: Vergleich des Wachstums mit und ohne Kanamycin, pO₂-Entwicklung, MTP- Flowerplate mit Optoden, 510 µL pro Well, 1000 rpm, 30°C

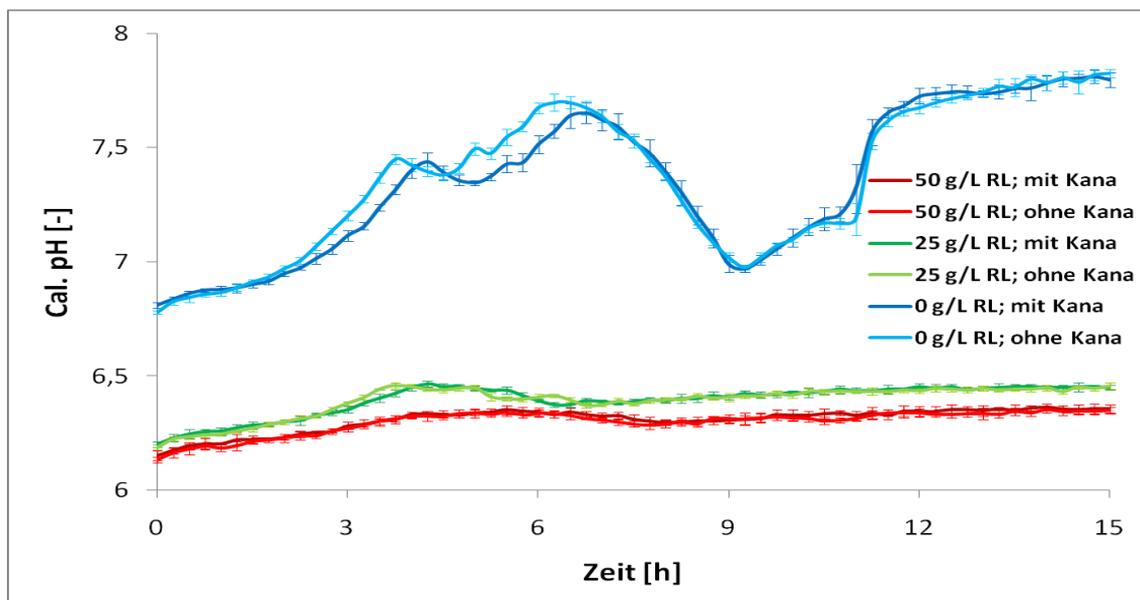


Abbildung 5: Entwicklung des Wachstums mit und ohne Kanamycin, pH-Verlauf, MTP- Flowerplate mit Optoden, 510 µL pro Well, 1000 rpm, 30°C

Wiederum zeigte sich, dass mit steigender RL-Konzentration die erreichte Biomasse in der stationären Phase sinkt. Um den Vergleich mit den Ergebnissen des Projektpartners FZ Jülich zu ermöglichen, wurden exemplarisch je RL-Konzentration die OD₆₀₀ offline bestimmt (s. Tabelle 1):

Tabelle 6: Erreichte Biomassen aus Versuch 2

Im Medium eingestellte RL-Konzentration [g/L]	Gemittelte, erreichte OD ₆₀₀ [-]
0	13,8
25	12,6
50	10,1

Da hier ohne O₂-Limitierung Biomassen von deutlich über 6 OD₆₀₀ erreicht werden, legt das die Vermutung nahe, dass die Kultivierungen der Vorversuche zumindest teilweise unter O₂-Limitierung verliefen. Dies stellt die Notwendigkeit von O₂-unlimitierten Kultivierungen heraus bei der Suche nach geeigneten Produktionsstämmen, zumal die RL-Produktion selber stark O₂ zehrend ist.

Interessant ist, dass der pH-Wert im Medium ohne RL Schwankungen unterliegt, wie sie für Kultivierungen in Medien mit komplexen Inhaltsstoffen typisch sind. In den Medien mit RL ist der pH-Wert generell stabiler, aber auch um ca. 0,5 Einheiten niedriger. Zu untersuchen wäre, ob die Inhibierung des Wachstums darauf zurückzuführen ist und ob RL eine Pufferkapazität besitzen.

Am Verlauf des pO₂-Signals ist ein diauxisches Wachstum ab ca. 7 h zu erkennen beim Ansatz ohne RL zu erkennen im Gegensatz zu den Kultivierungen mit RL. Die Frage ist, ob das Trypton im LB-Medium mit RL nicht vollständig für den Mikroorganismus verfügbar ist.

Untersuchungen zum Schaumverhalten in Nährmedien durch RL

Eine weitere Problematik wurde zu Beginn das starke Schäumen von RL-haltigen wässrigen Lösungen gesehen. Die Vorarbeiten am KIT in Karlsruhe zeigten, dass beinahe der gesamte Gasraum im Fermenter bei den Kultivierungen von RL-produzierenden *P. putida* und *P. aeruginosa* Stämmen voller Schaum war. Entgegen den Befürchtungen zeigte sich in keinem Versuch in den Wells der Flowerplate® Schaum nach Versuchsende, obwohl die Blümchengeometrie der Flowerplate-Wells wie Schikanen wirken. Anscheinend sind hier oberflächenbegaste, geschüttelte Systeme den submers begasten und gerührten Fermentertypen gegenüber im Vorteil. Eine mögliche Schaumphase hätte sich wahrscheinlich mindernd auf den Sauerstofftransfer in die Flüssigphase ausgewirkt.

Einfluss einer Glucose-limitierten FedBatch-Kultivierung bei gleichzeitiger Zweitsubstratlimitierung

Die Erkenntnisse des Projektpartners TU Dortmund zeigen, dass der Induktionszeitpunkt einen geringen Einfluss auf die RL-Bildung bei *P. putida* hat. Anscheinend beginnt der Großteil der RL-Produktion erst in der stationären Wachstumsphase, was darauf hindeutet, dass eine Haupt- und/oder Zweitsubstratlimitierung sich möglicherweise positiv auf die RL-Produktion auswirkt.

Um ein Glucose-limitiertes Wachstum im Mikrolitermaßstab durchführen zu können, soll das m2p FedBatch-Medium eingesetzt werden. Durch enzymatische Hydrolyse eines im Nährmedium gelösten Glucosepolymers wird dies ermöglicht. Da das Medium für das Wachstum von *E. coli* optimiert wurde, sollte ein Vorversuch zeigen, ob *P. putida* ebenfalls mit dem FedBatch-Medium im Glucose-limitierten Wachstum kultivierbar ist.

Als weitere Variation wurden die N-Quelle und die P-Quelle im m2p FedBatch-Medium auf 10% und 1% bezogen auf die Rezeptur reduziert und verschiedene Kombinationen der Menge an verfügbarer N-Quelle und P-Quelle im Nährmedium eingestellt.

Die Wachstumskurven sind in Abbildung 5 gezeigt.

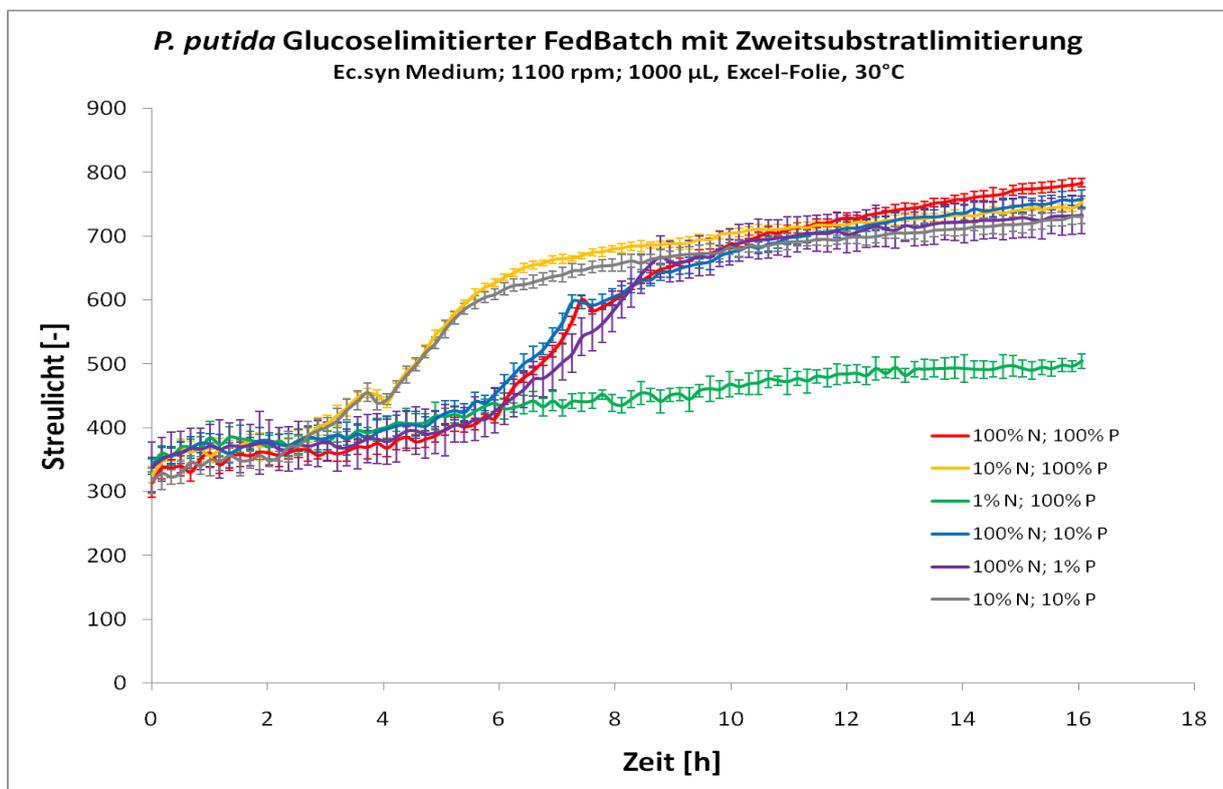


Abbildung 5: Biomasseentwicklung des Glucoselimitierten Wachstums, n=6

Der Versuch zeigt, dass *P. putida* im FedBatch-Modus mit dem m2p FedBatch-Medium kultiviert werden kann. Die Ansätze mit 100% N-Quelle zeigen eine ca. 2 h längere lag-Zeit,

dies ist auf osmotische Effekte gegenüber den Ansätzen mit 10% N-Quelle zurückzuführen. Kaum nennenswertes Wachstum wird dagegen mit nur 1% N-Quelle erreicht. Um eine Nährstofflimitierung beurteilen zu können, ist eine längere Kultivierungsdauer notwendig und um den Einfluss auf die RL-Produktion abschätzen zu können, ist natürlich die Induktion und eine Extraktion der Fermentationsbrühen mit anschließender Produktanalytik nötig.

Partner 7 (Henkel):Die Beteiligung kann hauptsächlich in späteren Projektphasen erfolgen.

Partner 8 (Cognis):

In dieser frühen Projektphasen steht Cognis umfassend als technischer Berater zur Konzeptionierung der einzelnen Verfahrensschritte unter Nachhaltigkeitsgesichtspunkten und technischer und ökonomischer Machbarkeit zur Verfügung. Alle Aspekte der Entwicklung werden zum frühestmöglichen Zeitpunkt beurteilt, so dass ein Verfahren entsprechend technisch auslegt werden kann. Hierbei ist insbesondere die Integration von Fermentation, Isolierung und Aufreinigung des Rhamnolipids von Bedeutung. Zusätzlich wird Cognis auch die Erstellung von Life Cycle Analysen unterstützen.

3. Kooperationen innerhalb des Projekts:

- rekombinante *P. putida*-Stämme wurden von Partner 1 (HHU) an alle Partner übergeben.
- in direkter Absprache zwischen Partner 1 (HHU), Partner 2 (TuDo1), Partner 4 (TuDo2) und der Firma Evocatal wurde die Strategie zur Herstellung von Reporterfusionen und Bibliotheken synthetischer Promotoren entwickelt.
- Promoter-Trap-Konstrukt zur Klonierung der Promotoren wurde von Evocatal synthetisiert und an Partner 1 (HHU) übergeben.
- In direkter Absprache mit Partner 2 (TuDo1) wurde die PHA-defiziente Mutante von *P. putida* definiert und die Konstruktion von nutzbaren Expressionplasmiden mit alternativer Resistenzmarke gestartet.
- dieses Plasmid wurde von Partner 1 (HHU) an Partner 2 (TuDo1) übergeben.
- Protokolle zur Rhamnolipidanalytik wurden zwischen allen Partnern ausgetauscht
- die erste Version der Bibliothek synthetischer Promotoren wurde von Partner 1 (HHU) an Partner 2 (TuDo1) übergeben und wird gemeinsam getestet werden.
- technische Daten bezüglich der Fermentation wurden zwischen allen Partnern kommuniziert.
- Die relevanten Daten des auf dem pathogenen Stamm *P. aeruginosa* basierenden Referenzprozesses wurden von Partner 3 (KIT) kommuniziert und werden Grundlage für die

Umweltelevaluierung durch das Institut für Umweltinformatik in Kooperation mit allen Partnern sein.

Es wurde bisher ein gemeinsames Projekttreffen aller Partner durchgeführt (Kick-Off-Treffen am 04.02.2010). Daneben gab es ständige Arbeitsbesprechungen einzelner Partner. Hierbei erwies sich die geographische Nähe von Dortmund, Jülich und Aachen als äusserst vorteilhaft.

Publikationen:

Andreas Wittgens, Torsten Tobias Arndt, Till Tiso, Johannes Emmerich, Carsten Mueller, Frank Rosenau and Lars Mathias Blank, Uncoupling rhamnolipid synthesis from growth using *Pseudomonas putida* as a host, in Vorbereitung

4. Diskussion

Das Projekt "Umweltschonende Herstellung und Aufreinigung von Biotensiden (Rhamnolipiden) mit dem nicht-pathogenen Bakterium *Pseudomonas putida*" wurde inhaltlich als Ganzes positiv vorbegutachtet. Aus organisatorischen Gründen wurde seitens der DBU nachträglich eine Unterteilung des Projektes in zwei Phasen vorgeschlagen. Der Bericht bezieht sich auf die ersten 4,5 Monate der Phase 1 (zunächst geförderte Dauer = 9 Monate), an die unmittelbar Phase 2 anschließen soll, um einen abschließenden Erfolg des Projekts zu gewährleisten. Während dieser ersten Phase von „Phase 1“ haben die Projektpartner bereits entscheidende Resultate erzielt. Diese sind begründet in intensiven Kooperationen innerhalb des Konsortiums und sind durch den exzellent funktionierenden Transfer von Methodik, Materialien und Informationen bedingt. Der Status des Projekts zeigt, dass die in beabsichtigten Projektziele aus Phase 1 erzielt, bzw. es ist abzusehen, dass sie erzielt werden können. Somit sind die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bearbeitung der Phase 2 erfüllt, die dann zu dem beabsichtigten und projektierten industriellen Verfahren führen wird.

Partner	Aufgaben	Phase 1			Phase 2				
		1-3	4-6	7-9	10-15	16-20	21-25	26-30	31-36
I HHU	Konstruktion und Charakterisierung von RL-Produktionsstämmen	■	■	■	■	■			
	Konstruktion von „Design“-RL-Produzieren		■	■	■				
	Optimierung eines RL-Produziers			■	■	■	■	■	
II TUDo1	Design eines Rhamnolipidproduziers	■	■	■					
	Metabolische Charakterisierung eines Rhamnolipidproduziers		■	■	■	■	■		
	Optimierung eines Rhamnolipidproduziers				■	■	■	■	■
III UniKa (KIT)	Screening der Rhamnolipidproduzierer	■	■	■	■	■			
	Fermentationsauslegung unter Umweltaspekten		■	■	■	■			
	Downstream Processing				■	■	■	■	■
IV TUDo2	Scale-up der Produktion von Rhamnolipid mit nicht-optimiertem Stamm	■	■	■					
	Optimierung der Rhamnolipid-Aufarbeitung mit Adsorption/Desorption			■	■	■			
	Optimierung des Scale-up der Rhamnolipid-Produktion				■	■	■	■	■
V. Ecover	Vergleich von Reinigungsstrategien	■	■	■	■	■			
	Scale-Up der				■	■	■	■	■

	Rahmnolipidproduktion				
VI. M2P	Stammscreening				
	Rahmnolipidtoleranzstudie				
	Induktionsstudien				
	Medienoptimierung				
	Prozessübergabe				
VII. Henkel	Beratung				
VIII. Cognis	Technische Beratung				
	Prozessentwicklung				
Evocatal GmbH	Fluoreszenzreporter und Begleitung der Induktionsstudien				
	Konstruktion genetisch stabiler Stämme				

Meilensteine

Partner	Meilensteine	Zeitpunkt (Monat)	erreicht
1	verschiedene Rhamnolipidproduzierende Stämme erzeugt	4	✘
2	Design für einen optimalen Rhamnolipidproduzierer wird an Partner 1 gegeben	8	(✘)
1	„Designvorschläge“ experimentell getestet und Effekte charakterisiert	9	✘
Evocat al	Evoglow-Reporterfusionen erstellt und getestet	3	(✘)
3 + 4 + 6	Kultivierungsbedingungen charakterisiert, Induktionsbedingungen evaluiert, Bedingungen optimiert	9	(✘)
2	Optimierungsstrategien sind erarbeitet und bilden die Grundlage für die Synthese eines effizienten Rhamnolipidproduzenten	14	
1+2	Rhamnolipid Produzent optimiert	28	
Alle	Zwischenbegutachtung, Statusbericht	14	
3+4+5	Reinigungsstrategien evaluiert und optimiert	20	
3+4	Ergebnis- bzw. Technologietransfer	20	
6	Pilotproduktion von Rahnolipiden erfolgt	28	
Firma IFU	Ökoeffizienzanalyse der Rhamnolipidsynthese	28	
Alle	Abschlussbericht	28	

Berichtsteil 2: Berichtszeitraum 15.07.2009 – 31.12.2009 (Ende Projektphase 1)

Wesentlicher Teil der gemeinsamen Arbeiten aller Projektpartner war die Vorbereitung der Publikation „Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, Wichmann R, Küpper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Sylatk C, Rosenau F and Blank LM. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440“, die in der Zeitschrift *Microbial Cell Factories* eingereicht werden sollte. Darüber hinaus wurde nach der Verlängerung des Projektes durch die DBU die zur Erreichung der in Phase 2 projektierten Ergebnisse notwendigen Versuche angegangen. Ebenso wurden auch neue, u. a. auf Hinweisen der Gutachter basierende Versuche und Projektergänzungen angegangen. Ein Beispiel hierfür ist, dass auch Di-Rhamnolipide produziert werden sollten, um das Produktportfolio frühzeitig zu vergrößern und besonders auch um zu demonstrieren, dass *P. putida* KT2440 als Produktionsstamm für verschiedene Biotensidarten geeignet ist.

Nachfolgend sind für die einzelnen akademischen Partner die im Berichtszeitraum durchgeführten Tätigkeiten zusammengefasst, die weiteren Details, die Ergebnisse und deren Diskussion und Würdigung im Kontext des Projektes sind im nachfolgenden Statusbericht zu Projektphase 2 nachzulesen.

Partner 1 (UUI): Dr. Frank Rosenau/ Andreas Wittgens

- ✓ Vorversuche zur Etablierung der heterologen Produktion auch von di-Rhamnolipiden
- ✓ Erste Versuche zur Optimierung der Rhamnolipid Produktion durch höhere Kultivierungstemperaturen
- ✓ Durchmusterung einer Promotor-Bibliothek zur Optimierung der Rhamnolipid-Produktion

Partner 2 (TUD01/ RWTH): Prof. Dr. Lars M. Blank

- ✓ Weitere Versuche zur Erhöhung des Titer unter Zuhilfenahme von MetabolicControl Analysis

- ✓ Weitere Versuche zur Fermentation bei höheren Temperaturen und Beginn des Designs eines Versuchsaufbaus für Temperaturscreenings für die Rhamnolipid-Produktion
- ✓ Weitere Versuche zur Bildung des Nebenproduktes PHA und dessen Umgehung durch neue Mutante

Partner 3 (KIT): Dr. Rudolf Hausmann

- ✓ Experimente zur Etablierung einer HPLC-VWD Analytik für rekombinantes Rhamnolipid
- ✓ Etablierung der Fermentationen für rekombinante *Pseudomonas putida* etabliert
- ✓ Erste Versuche zur Entwicklung eines Minimalmediums zur Produktion von Rhamnolipid mit Glucose als Kohlenstoffquelle

Partner 4 (TUDo2): Prof. Rolf Wichmann

- ✓ Versuche zur Testung eines Verfahrens zur Herstellung von RL-Lyophilisat bis zu einer Reinheit von angestrebt 60 % im Gramm- Bereich
- ✓ Nach der Identifikation von Materialien folgen Untersuchungen zur Adsorption/Desorption sowie geeigneter Lösungsmittel
- ✓ Optimierung der Fermentationsbedingungen
- ✓ Optimierung des Ausschäumens und weitere Evaluierung als Reinigungsschritt