

Herstellung mikrobieller Rhamnolipide mit nicht-pathogenen Stämmen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biol. (t. o.) Barbara Hörmann
aus Stuttgart

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Obst

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2012

„Lernen ist wie Rudern gegen den Strom. Hört man damit auf, treibt man zurück.“
(Laotse, chinesischer Philosoph, 6. Jhd. v. Chr.)

Danksagung

Ich möchte gerne folgenden Personen, die mich während meiner Promotion begleitet haben, danken:

Herrn Prof. Dr. Sylatk danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Lehrstuhl für Technische Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchführen zu können und für seine Unterstützung und sein Engagement.

Frau Prof. Dr. Ursula Obst vom Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG) danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr.-Ing. Rudolf Hausmann für seine gewissenhafte und intensive Betreuung meiner Arbeit, für seine fachlichen Ratschläge und ein allzeit offenes Ohr.

Herzlicher Dank gilt Sandra Baumann für die Hilfe und Organisation im Labor und Michaela Zwick für die Unterstützung im Technikum.

Ich danke meinem Kollegen Anke Neumann, Berna Gerçe, Birgit Brucher, Frank Leitermann, Ina Hein, Ines Schulze, Jacob Hilger, Jens Rudat, Johannes Kügler, Kathrin Brzonkalik, Mareike Perzborn, Marius Henkel, Markus Andre, Markus Müller, Martin Pöhnlein, Melanie Gerlitzki, Ulrike Engel und Vanessa Walter für das freundliche Arbeitsklima und ihre Unterstützung.

Bei Siegfried Almstedt bedanke ich mich für die vielen unermüdlichen Reparaturen meines Fahrrades, bei Werner Mandel und Harald Gotzmann für Ihre Unterstützung und vielen Gespräche.

Den Studenten Tobias Müller und Benedikt Ketterer danke ich für ihren Beitrag zu meiner Arbeit und ihren Einsatz und Fleiß.

Großer Dank geht an Prof. Dr. Bräse und Dr. Thierry Muller vom Institut für Organische Chemie (IOC), für die Durchführung der Kernspinresonanzspektroskopie.

Ebenso danke ich Dr. Gerald Brenner-Weiß und Dipl.-Ing. Michael Nusser vom Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) für die Durchführung der Tandem-Massenspektrometrie.

Zusammenfassung

Rhamnolipide werden bisher hauptsächlich mit dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa* hergestellt. Für eine industrielle Herstellung ist dies auf Dauer allerdings nicht optimal, da es sich bei *P. aeruginosa* um einen opportunistisch humanpathogenen Keim der Sicherheitsstufe L2 handelt. Dies hat zwei große Nachteile: Erstens müssen bei dem Herstellungsprozess der Rhamnolipide aufwendige Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden, was den Prozess zusätzlich verteuert. Zweitens wäre die Akzeptanz des Endverbrauchers gering. Daher wird intensiv daran gearbeitet alternative, nicht-pathogene Rhamnolipid-Produzenten für die Herstellung von Rhamnolipiden zu etablieren. Durch die Etablierung könnte ein neues Produktspektrum zugänglich werden, welches den Markt für Biotenside vergrößern könnte.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit grundlegenden Untersuchungen der Rhamnolipid-Produktion des alternativen, nicht-pathogenen Rhamnolipid-Produzenten *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T. Hierfür wurde zunächst eine Rhamnolipid-Referenz-Substanz hergestellt, mit der eine quantitative Analytik für die Rhamnolipide von *B. plantarii* DSM 9509^T entwickelt wurde. Es wurde die Reinheit und Zusammensetzung, sowie die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) und der Schmelzpunkt der Referenz-Substanz untersucht. Des Weiteren wurde die Rhamnolipid-Bildung des Stammes auf dem Vollmedium Nutrient Broth sowie auf einem ausgelegten Minimalmedium charakterisiert.

Um die Referenz-Substanz zu erhalten, wurden drei chromatographische Methoden etabliert. Eine Strukturaufklärung der Referenz-Substanz mittels NMR-Spektroskopie und MS/MS zeigte, dass zu mindestens 95% das Kongener Rha₂-C₁₄-C₁₄ vorlag. Daneben wurden kleine Mengen der Isomere Rha₂-C₁₂-C₁₄ und Rha₂-C₁₄-C₁₂ gefunden. Mit der Referenz-Substanz konnte eine quantitative Analytik mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) etabliert werden. Außerdem konnten die CMC und der Schmelzpunkt der Referenz-Substanz bestimmt werden. Die CMC lag zwischen 15 und 20 mg/L; der Schmelzpunkt zwischen 150 und 155°C. In dem ausgelegten Minimalmedium produzierte *B. plantarii* DSM 9509^T am meisten Rhamnolipide, wenn ein Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis von 0,8 eingestellt worden war. Es wurden ca. 60 mg/L Rhamnolipide gebildet. Wurde das Medium mit

der zehnfachen Menge an Eisen supplementiert, bildete *B. plantarii* DSM 9509^T vorzugsweise vermutlich ein anderes Rhamnolipid. Statt dem üblicherweise vorherrschenden Rha₂-C₁₄-C₁₄ wurde hauptsächlich vermutlich das Kongener Rha₂-C₁₄ gebildet. Des Weiteren wurden geringe Mengen eines dritten Kongeners, vermutlich Rha-C₁₄, nachgewiesen.

Ein weiterer Teil der Arbeit umfasste die Herstellung von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten und die Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen Screening-Assays, mit dem mögliche Rhamnolipid-Überproduzenten unter den UV-Mutanten detektiert werden können.

Zum Screenen von möglichen Rhamnolipid-Überproduzenten wurde erfolgreich ein kolorimetrischer Assay etabliert, der auf einer Komplex-Bildung zwischen Rhamnolipid und dem Farbstoff Methylenblau basiert.

Die Bestrahlung von *B. plantarii* DSM 9509^T führte nicht zu einer Mutante mit deutlich höherer Produktivität. Eine Mutante zeigte eine hohe Absorption beim Methylenblau-Screening. Wie sich aber bei einer Kultivierung im Bioreaktor herausstellte, war die Produktivität nicht höher, sondern etwas niedriger als die des Wildtyps. Bei einer anderen Mutante handelte es sich um eine schnellwachsende Variante, die von der Agarplatte gepickt wurde. Auch ihre Produktivität war nicht höher als die des Wildtyps *B. plantarii* DSM 9509^T.

Abstract

Rhamnolipids are usually produced with the strain *Pseudomonas aeruginosa*. This strain, however, is an opportunistic human pathogen. For a large scale industrial production of rhamnolipids, there would be great disadvantages: using a pathogenic strain would mean that additional safety measures would have to be applied, making the process more expensive. Furthermore, the production of rhamnolipids with an L2 organism would probably strongly decrease end consumer acceptance.

Therefore, extensive research is being conducted for the establishment of alternative, non-pathogenic rhamnolipid production strains. The establishment of alternative strains could result in a wider product range and expand the biosurfactant market.

In this work, basic investigations concerning the rhamnolipid production of the non-pathogenic rhamnolipid producing strain *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T were carried out. First, a rhamnolipid reference-substance was created. With this substance, a method for the quantitative detection of the rhamnolipids was developed. The purity, the composition plus the critical micelle concentration (CMC) and the melting temperature of the reference-substance were determined. Furthermore, the rhamnolipid-production of *B. plantarii* DSM 9509^T was characterized in the rich medium Nutrient Broth and in a designed minimal medium.

To create the rhamnolipid reference-substance, three successive chromatographic methods were established. Structure elucidation of the reference-substance by NMR-spectroscopy and MS/MS revealed that the reference-substance consisted up to 95% of the rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄. Next to this predominant congener, trace amounts of the two isomers Rha₂-C₁₂-C₁₄ and Rha₂-C₁₄-C₁₂ were also found. With the reference-substance, a quantitative analysis method using high-performance liquid chromatography (HPLC) could be established.

Furthermore, the CMC and the melting point of the reference-substance could be determined. The CMC was found to be between 15 and 20 mg/L, while the melting point was between 150 and 155 °C.

When cultivated in a rich medium, *B. plantarii* DSM 9509^T was able to produce rhamnolipids at up to 46 mg/L. The cultivation also revealed that *B. plantarii* DSM 9509^T produces polyhydroxybutyric acid as a by-product. *B. plantarii* DSM 9509^T

produced the most rhamnolipids in the designed minimal medium, when the nitrogen-to-carbon ratio was adjusted to 0.8. In this case, *B. plantarii* DSM 9509^T produced rhamnolipids at up to 60 mg/L.

When the minimal medium was supplemented with a tenfold increased iron concentration, *B. plantarii* DSM 9509^T produced presumably another rhamnolipid. Instead of the usually predominant rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄, another congener, probably Rha₂-C₁₄, could be predominantly found. There were also trace amounts of a third congener, probably Rha-C₁₄.

Another part of this work deals with the production of *B. plantarii* DSM 9509^T UV-mutants and the development of a high-throughput screening assay for the detection of putative rhamnolipid overproducing strains.

For the screening of putative rhamnolipid overproducing strains, a colorimetric assay, based upon a complex formation between rhamnolipid and the dye methylene blue, was established.

The UV-radiation of *B. plantarii* DSM 9509^T did not lead to a mutant with an increased productivity. One mutant showed a high adsorption in the methylene blue assay, but a subsequent cultivation in the bioreactor showed that the clones' productivity was less than the productivity of the wild type.

Another mutant was selected due to its fast growth on an agar plate. Here the cultivation in a bioreactor also showed that the productivity of this mutant was not higher as the productivity of the wild type.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	III
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Tenside.....	2
1.1.1 Tenside aus fossilen Rohstoffen	6
1.1.2 Biotenside.....	7
1.2 Rhamnolipide	10
1.2.1 Funktionen der Rhamnolipide.....	12
1.2.2 Synthese der Rhamnolipide	12
1.2.3 Regelung der Rhamnolipid-Produktion.....	13
1.2.4 Wirtschaftlichkeit der Rhamnolipide.....	15
1.3 Alternative Rhamnolipid-Produzenten	16
1.3.1 Die Gattung <i>Burkholderia</i>	19
1.3.2 Rhamnolipid-Produzenten aus der Gattung <i>Burkholderia</i>	23
1.4 Ziele der Arbeit	26
2. Material	29
2.1 Chemikalien.....	29
2.2 Lösungen.....	29
2.2.1 Allgemeine Lösungen	29
2.2.2 Lösungen für analytische Zwecke	30
2.3 Medien.....	32
2.4 Software	34
3. Methoden	35
3.1 Allgemeine Methoden.....	35
3.2 Herstellung und Charakterisierung einer Referenz-Substanz.....	38
3.2.1 Herstellung der Referenz-Substanz	38
3.2.2 Charakterisierung der Referenz-Substanz	41
3.2.3 Entwicklung einer Methode zur Derivatisierung der Rhamnolipide.....	43

3.3	Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von <i>B. plantarii</i> DSM 9509 ^T	44
3.3.1	Charakterisierung bei Wachstum auf Vollmedium	44
3.3.2	Charakterisierung bei Wachstum auf Minimalmedium	49
3.3	Herstellung und Screening von <i>B. plantarii</i> DSM 9509 ^T UV-Mutanten.....	51
4.	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Herstellung und Charakterisierung einer Referenz-Substanz	57
4.1.1	Herstellung der Referenz-Substanz	57
4.1.2	Charakterisierung der Referenz-Substanz	61
4.1.3	Entwicklung einer Methode zur Derivatisierung der Rhamnolipide	68
4.2	Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von <i>B. plantarii</i> DSM 9509 ^T	72
4.2.1	Charakterisierung bei Wachstum auf Vollmedium	72
4.2.2	Charakterisierung bei Wachstum auf Minimalmedium	80
4.3	Herstellung und Screening von <i>B. plantarii</i> DSM 9509 ^T UV-Mutanten.....	85
5.	Schlussfolgerungen und Ausblick	95
6.	Literaturverzeichnis	99
7.	Anhang	119
7.1	Abkürzungen und Symbole	119
7.2	Chemikalien	121
7.3	Geräte	123
7.4	Belegung der Mikrotiterplatten beim Sekundärscreening.....	125
	Lebenslauf	127

1. Einleitung

Tenside besitzen vielseitige Anwendungsmöglichkeiten und sind daher ein unverzichtbarer Bestandteil unseres Lebens. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit, sich in einem Dispersionsmedium (meist Wasser) spontan zu Aggregaten, den sogenannten Mizellen, zusammenzulagern und unterscheiden sich darin von allen andern organischen Stoffen (Fabry, 1991).

Tenside setzen die Grenzflächenspannung herab und machen somit eine Durchmischung von ansonsten nicht miteinander mischbaren Systemen möglich. Tenside werden vor allem in modernen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln eingesetzt (Mulligan und Gibbs, 1993).

Da die Ressourcen an fossilen Rohstoffen, aus denen die synthetischen Tenside überwiegend hergestellt werden, endlich sind, besteht seitens der Industrie ein großes Interesse daran Tenside auch aus nachwachsenden Rohstoffen wie pflanzlichem und tierischem Öl oder Zuckersubstraten herzustellen (Fabry, 1991).

Biotenside sind Tenside, die von Mikroorganismen aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können. Zu den Biotensiden zählen auch die Rhamnolipide. Rhamnolipide sind oberflächenaktive Biotenside, die hauptsächlich von *Pseudomonas aeruginosa* produziert werden (Abdel-Mawgoud et al., 2011). Sie setzen sich aus ein (Mono-Rhamnolipide) bis zwei (Di-Rhamnolipide) Rhamnose-Einheiten und ein bis drei β -Hydroxyfettsäuren zusammen.

Für eine industrielle Produktion von Rhamnolipiden ist *P. aeruginosa* kein optimaler Produzent, da diese Art potentiell human-pathogen ist (Bodey et al., 1983) und zur Risikogruppe 2 gehört. Von Vorteil wäre ein alternativer, nicht-pathogener Stamm. Dieser würde vermutlich nicht nur die bei Verwendung eines human-pathogenen Stammes höheren Produktionskosten senken, sondern auch die Akzeptanz der Endverbraucher steigern.

1.1 Tenside

Der Begriff Tenside, der sich vom lateinischen Wort *tensio* (=Spannung) ableitet, wurde erstmals im Jahr 1964 von dem Ingenieur Götte verwendet (Götte, 1964).

Die Geschichte der Tenside reicht bis in das Jahr 2500 v. Chr. zurück (Fabry, 1991; Kosswig und Stache, 1993). Damals stellten die Sumerer eine seifenähnliche Masse durch Verkochen von Olivenöl mit Holzasche her. Auch in Ägypten, Gallien und Germanien war die Verseifung bekannt. In der Renaissance bestand das Problem an knapp werdenden Rohstoffen von Bäumen und Pflanzen, die für die Herstellung von Seife benötigt wurden. Daher entwickelte Nicolas Leblanc (1742-1806) im Jahr 1775 ein Verfahren zur synthetischen Herstellung von Seife aus Kochsalz, Schwefelsäure, Kalk und Kohle (Fabry, 1991).

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Seife zum Waschen und Reinigen von Textilien in Mehrkomponentensystemen eingesetzt (Kosswig und Stache, 1993). Nach dem zweiten Weltkrieg wurde das Tetrapropylenbenzolsulfonat (TPS) als neues, leistungsfähigeres Tensid auf petrochemischer Basis entwickelt. Durch seine schlechte biologische Abbaubarkeit wegen seines verzweigten Alkylrestes bildeten sich allerdings riesige Schaumberge an Flussläufen (Kosswig und Stache, 1993). Daher wurde das TPS durch das lineare Alkylbenzolsulfonat (LAS) ersetzt, welches eine gute biologische Abbaubarkeit besaß (Fabry, 1991).

Seitdem sind Tenside entwickelt worden, die noch leistungsfähiger sind als das LAS. Durch Verknappung fossiler Rohstoffe und steigendem Umweltbewusstsein liegt der Schwerpunkt in der heutigen Zeit auf der Herstellung von Tensiden aus nachwachsenden Rohstoffen (Fabry, 1991).

Klassifizierung der Tenside

Tenside (engl. *surfactants*, surface active agents, Christofi und Ivshina, 2002) sind im Allgemeinen niedermolekulare Verbindungen, die sich aus einem hydrophilen (polaren) und einem hydrophoben (unpolaren) Teil zusammensetzen. Sie sind somit *amphiphil* (altgr. beides liebend). Dieser besondere Aufbau verleiht den Molekülen die Eigenschaft der Grenzflächenaktivität (Kosswig und Stache, 1993). Tenside lassen sich sowohl nach ihren hydrophilen als auch nach ihren hydrophoben Gruppen einteilen (s. Tab. 1.1 und 1.2).

Tab. 1.1: Klassifizierung der Tenside (Kosswig und Stache, 1993) nach hydrophilen Gruppen.

Klasse	Merkmal	Beispiel
Anionische Tenside	R= hydrophobe Gruppe, X ⁺ = Gegenion	Carboxylate: R-COO ⁻ X ⁺ Sulfonate: R-SO ₃ ⁻ X ⁺ Sulfate: R- SO ₄ ⁻ X ⁺ Ethersulfate: R-O-(CH ₂ -CH ₂ -O) _n -SO ₃ ⁻ X ⁺ Arylsulfonate: R-(C ₆ H ₄)-SO ₃ ⁻ X ⁺ Thiosulfate: R-S-SO ₃ ⁻ X ⁺
Kationische Tenside	R= hydrophobe Gruppe, X ⁻ = Gegenion	Primäre Ammoniumsalze: R-NH ₃ ⁺ X ⁻ Sekundäre Ammoniumsalze: R ₂ -NH ₂ ⁺ X ⁻ Tertiäre Ammoniumsalze: R ₃ -NH ⁺ X ⁻ Quarternäre Ammoniumsalze: R ₄ -N ⁺ X ⁻ Sulfoniumsalze: R ₃ -S ⁺ X ⁻ Tropyliumsalze: R-(C ₇ H ₆) ⁺ X ⁻
Zwitterionische Tenside		Aminoxide: R ₃ -N ⁺ -O ⁻ Betaine: R ₃ -N ⁺ -(CH ₂) _n -COO ⁻ Sulfobetaine: R ₃ -N ⁺ -(CH ₂) _n -SO ₃ ⁻ Lecithine (Phospholipide)
Nichtionische Tenside		Polyglykoether Polyglykolamide Polyalkohole Zuckertenside (z. B. Alkylpolyglucoside)
Tenside mit mehreren hydrophilen Gruppen		Dicarboxylate Sulfobernsteinsäureester Bolaformtenside

Tab. 1.2: Klassifizierung der Tenside (Kosswig und Stache, 1993) nach hydrophoben Gruppen. X=hydrophile Gruppe. D: Dimethylsiloxangruppen (-Si(CH₃)₂-O-), M: Trimethylsiloxangruppen ((CH₃)₃-Si-O-).

Klasse	Beispiel
Kohlenwasserstofftenside	z. B. Alkyltenside: CH ₃ -(CH ₂) _n -X
Perfluortenside	z. B. Perfluoralkyltenside: CF ₃ -(CF ₂) _n -X
Silicontenside	Trisiloxane M-D(R-X)-M Kammpolymere: M-D _n -D _m (R-X)-M
Block-Copolymere	Polyoxyethylen-Polyoxypropylen-Polyoxyethylen-Copolymere N-Acetyl-imino-N-acyl-imino-Diblockcopolymer N-Acetyl-imino-N-acyl-imino-N-Acetyl-imino-Triblockcopolymer N-Acyl-imino-N-acetyl-imino-N-acyl-imino-Triblockcopolymer

Eigenschaften der Tenside

Löst man ein Tensid in Wasser, lagert es sich aufgrund seines amphiphilen Charakters an der Oberfläche (bzw. Grenzfläche) an, wobei die Oberfläche einen Sonderfall der Grenzfläche darstellt (Fabry, 1991). Durch die Anlagerung wird ein energetisch günstigerer Zustand hergestellt, da der Kontakt zwischen den Kohlenwasserstoffketten des Tensides und den Wassermolekülen verringert wird (Rehage, 2005). Gleichzeitig wird die Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung drastisch verringert. Adsorbierte und gelöste Tensidmoleküle stehen in einem dynamischen Gleichgewicht, s. Abb. 1.1A (Rehage, 2005).

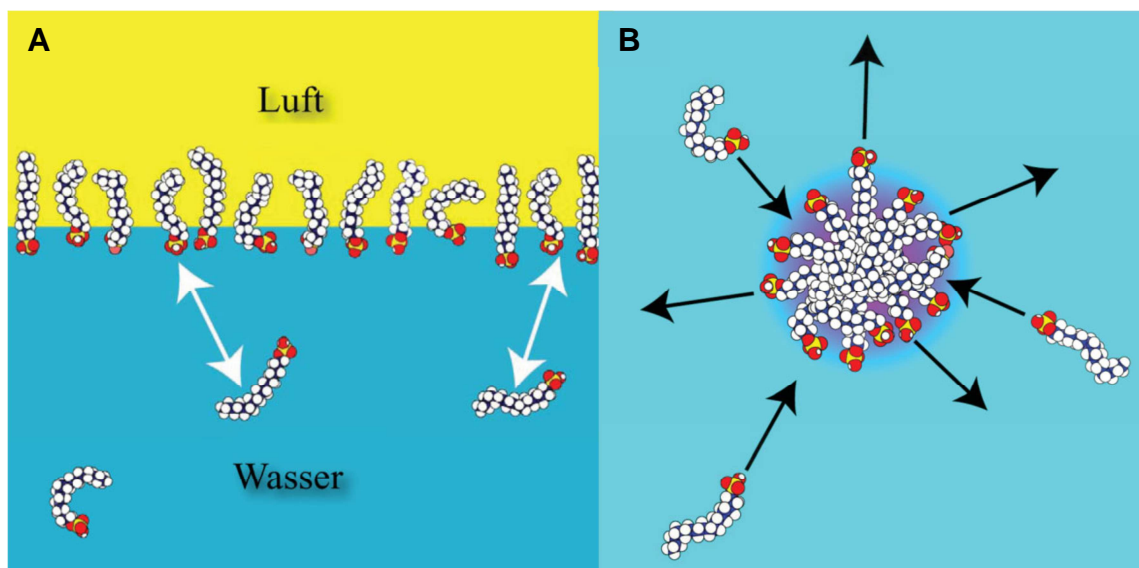


Abb. 1.1A: Tensidmoleküle an einer Phasengrenzfläche zwischen Luft und Wasser. Adsorbierte und gelöste Tensidmoleküle stehen in einem dynamischen Gleichgewicht. In einem bestimmten Zeitraum adsorbieren Tensidmoleküle an der Phasengrenzfläche, aber genauso viele verlassen diese und gehen wieder in Lösung. 1.1B: Kugelmizelle in einer Lösung. Die Kugelmizelle steht ebenso mit den Tensidmonomeren im dynamischen Gleichgewicht (Rehage, 2005).

Wird die Tensidkonzentration erhöht, lagern sich immer mehr Moleküle an der Oberfläche an, bis diese voll besetzt ist. Von diesem Zeitpunkt an werden, bei weiterer Tensidzugabe, Mizellen gebildet. Auch die Mizellen stehen im dynamischen Gleichgewicht mit Tensidmonomeren, s. Abb. 1.1B (Rehage, 2005).

Die Konzentration, ab der Mizellen gebildet werden, wird als kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration, CMC*) bezeichnet

(Kosswig und Stache, 1993). Bilden sich Kugelmizellen, handelt es sich hierbei um sphärische Aggregate, bei denen die hydrophilen Anteile des Tensides in das Wasser hineinragen, während die hydrophoben Anteile nach innen gerichtet sind (Abb. 1.2B). Bei sogenannten *inversen Mizellen* zeigen die hydrophoben Gruppen nach außen (Lang und Trowitzsch-Kienast, 2002).

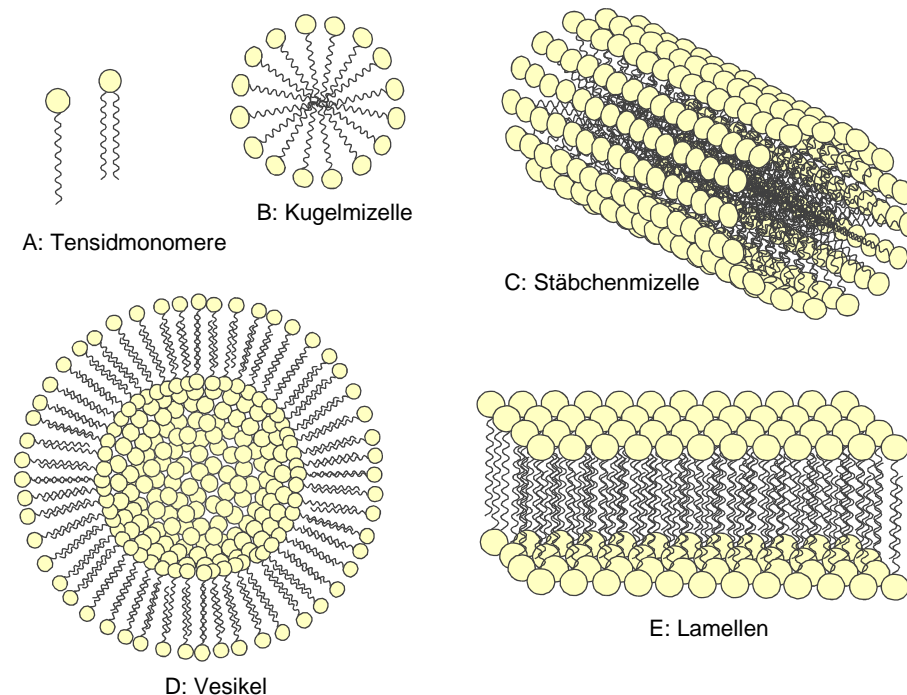


Abb. 1.2: Aggregatbildung von Tensidmolekülen in wässriger Lösung (in Anlehnung an Magario, 2009). A: Tensidmonomere, B: Kugelmizelle (sphärisch), C: Stäbchenmizelle (zylindrisch), D: Vesikel (sphärisch), E: Lamelle (planar).

Wird die Konzentration an Tensid noch weiter erhöht, lagern sich die Mizellen zu stäbchen- oder scheinchenförmigen Aggregaten zusammen (s. Abb. 1.2C). Diese Konzentration wird auch als 2. kritische Mizellkonzentration bezeichnet (Stache, 1990). Bei noch höheren Tensidkonzentrationen können räumlich übergreifende, geordnete Strukturen, sogenannte Mesophasen gebildet werden. Aus Kugelmizellen entstehen in der Regel kubische Phasen, aus Stäbchenmizellen hexagonale Phasen und aus Scheibchenmizellen lamellare Phasen (Stache, 1990). In der Natur lassen sich solche Lamellen (s. Abb. 1.2E) als Bestandteil von Biomembranen finden. Diese bestehen meist aus zwitterionischen Phospholipiden (s. Tab. 1.1). Wirken Strömungskräfte auf die lamellaren Strukturen ein, können diese sich zurückfalten und Vesikel bilden (s. Abb. 1.2D), (Rehage, 2005).

Anwendung von Tensiden

Tenside sind aufgrund ihrer vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ein unverzichtbarer Bestandteil des Lebens. Ihre Fähigkeit Mizellen zu bilden unterscheidet sie von allen anderen organischen Stoffen (Fabry, 1991). Durch das Herabsetzen der Grenzflächenspannung machen Tenside eine Durchmischung von ansonsten nicht mischbaren Systemen möglich. Dies ist z. B. der Fall bei den Systemen Öl/Wasser in kosmetischen Cremes oder Salatsaucen (Venzmer, 2008). Tenside werden vor allem in modernen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln eingesetzt, aber auch in Industriereinigern, in der Körperpflege, in kosmetischen Reinigungs- und Pflegemitteln, in der Lebensmitteltechnik und der Landwirtschaft, in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, in der pharmazeutischen Industrie (Mulligan und Gibbs, 1993), in Desinfektionsmitteln, bei der Herstellung synthetischer Fasern in der Textilindustrie, in der Kunststoffindustrie, in der chemischen Industrie, in der Biotechnologie, in Lacken, Pigmenten und Druckfarben, in der Zellstoff- und Papierindustrie, in Klebstoffen, in der Lederindustrie, in der Fotoindustrie, in der metallverarbeitenden Industrie, in der Galvanotechnik und der Korrosionsinhibierung, in Polituren und Schutzschichten, in der Mineralölindustrie, im Straßenbau und in Baustoffen, im Bergbau und der Flotation und in der Förderung und Verarbeitung von Erdöl (Kosswig und Stache, 1993).

1.1.1 Tenside aus fossilen Rohstoffen

Steinkohle, Braunkohle, Erdöl, Erdgas und Torf werden als fossile Rohstoffe bezeichnet. Sie entstanden im Verlaufe der Geschichte unseres Planeten aus Pflanzenmaterial. Fossile Rohstoffe sind nicht erneuerbar und daher als Energiereserven nicht dauerhaft verfügbar. Etwa 90% der fossilen Rohstoffe werden zur Energieerzeugung verwendet; nur etwa 10% werden einer technischen Nutzung, wie der Herstellung von Tensiden, zugeführt (Fabry, 1991).

Wegen zunehmender Verknappung der fossilen Rohstoffe besteht seitens der Industrie ein großes Interesse daran Tenside überwiegend aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen (Fabry, 1991). Als Ausgangsmaterial eignet sich vor allem pflanzliches und tierisches Öl sowie Zuckersubstrate. Tenside, die mit Hilfe von Mikroorganismen daraus hergestellt werden, heißen Biotenside.

1.1.2 Biotenside

Biotenside sind oberflächenaktive Substanzen, die von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen produziert werden (Pacwa-Plociniczak et al., 2011; Christofi und Ivshina, 2002). Ein Beispiel für Tenside, die vom Menschen produziert werden, sind die Gallensäuren. Diese werden vom menschlichen Körper bei dem Abbau von Fetten aus der Nahrungsaufnahme eingesetzt, wo sie als erste Stufe die Emulgierung der Fette ermöglichen (Fabry, 1991). Ein Beispiel für ein mikrobielles Tensid sind die Rhamnolipide, die zur Gruppe der Glykolipide gehören. Zur Zeit sind etwa 60 Rhamnolipid-Kongener bekannt, welche von verschiedenen Pseudomonaden, aber auch von Bakterien, die zu andern Familien, Klassen oder Stämmen gehören, produziert werden (Müller und Hausmann, 2011; Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Klassifizierung der Biotenside

Im Gegensatz zu den chemisch synthetisierten Tensiden, die nach ihren hydrophilen oder hydrophoben Gruppen klassifiziert werden, werden die Biotenside nach ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrem Molekulargewicht (hoch- oder niedermolekular) eingeteilt. Einen Überblick über die Klassifizierung liefert die Tabelle 1.3.

Tab.1.3: Klassifizierung der Biotenside (Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

<i>Gruppe</i>	<i>Klasse/Beispiel</i>	<i>Mikroorganismus</i>
Glykolipide (niedermolekular)	Rhamnolipide	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. sp.</i>
	Trehaloselipide	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i>
	Sophoroselipide	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. petrophilum</i>
Fettsäuren, Phospholipide und neutrale Lipide (niedermolekular)	Corynomycolsäure	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Spiculisporsäure	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	Phosphatidylethanolamin	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptide (niedermolekular)	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
	Lichenysin	<i>B. lichenformis</i>
Polymere (hochmolekular)	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Alasan	<i>A. radioresistens</i> KA-53
	Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i> A2
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Mannoprotein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Biotenside besitzen gegenüber chemisch synthetisierten Tensiden viele Vorteile: Sie können aus nachwachsenden Rohstoffen produziert werden, besitzen eine hohe Strukturdiversität, sind umweltfreundlich, biologisch abbaubar (sogenannte *green chemicals*, Abdel-Mawgoud et al., 2011) und weisen nur eine geringe Wasser-toxizität auf (Poremba et al., 1991). Sie können sowohl bei extremen Temperaturen und pH-Werten, als auch bei hoher Salinität eingesetzt werden (Pacwa-Plociniczak et al., 2011; Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sind mit denen der chemisch synthetisierten Tenside vergleichbar: Biotenside können die Oberflächenspannung von Wasser von 72 auf ca. 27 mN/m und die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und *n*-Hexadekan von 40 auf 1 mN/m absenken (Desai und Banat, 1997; Soberón-Chávez und Maier, 2011; Christofi und Ivshina, 2002), s. Tab. 1.4. Tenside mit einem niedrigen HLB-Wert (hydrophilic-lipophilic-balance) stabilisieren Wasser-in-Öl Emulsionen; Tenside mit einem hohen HLB Wert stabilisieren Öl-in-Wasser Emulsionen (Desai und Banat, 1997; Christofi und Ivshina, 2002).

Tab. 1.4: Werte für die Ober- und Grenzflächenspannung sowie für die CMC von Biotensiden und chemisch synthetisierten Tensiden (Christofi und Ivshina, 2002).

<i>Tensid</i>	<i>Oberflächen- spannung [mN m⁻¹]</i>	<i>Grenzflächen- spannung [mN m⁻¹]</i>	<i>CMC [mg l⁻¹]</i>
Trehalose-tetraester von <i>Rhodococcus erythropolis</i>	26	<1	15
Rhamnolipide von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	0,25	50-200
Sophoroselipide von <i>Torulopsis bombicola</i>	33	1,8	82
Surfactin von <i>Bacillus subtilis</i>	27	1,0	23
Natriumlaurylsulfat (SDS)	37	0,02	2120
Cetyltrimethylammonium-bromid (CTAB)	30	5,0	1300
lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS)	47	<1,0	590

Wirtschaftlichkeit der Biotenside

Biotenside können in vielen Bereichen eingesetzt werden, z. B. in der Landwirtschaft, in Reinigungsmitteln, in der biologischen Bodensanierung, in der Lebensmittel-

industrie, in der Chemie und in der Kosmetik- und Pharmaindustrie (Deleu und Paquot, 2004; Pacwa-Plociniczak et al., 2011). Trotzdem hält sich die Vermarktung der Biotenside wegen ihrer Produktionskosten in Grenzen (Banat et al., 2010). Ihre Produktionskosten, abhängig von der Art des Biotensides und dessen Reinheit, sind etwa 50 Mal höher als die der synthetischen Tenside (Deleu und Paquot, 2004). Um die Herstellungskosten der Biotenside zu senken wurden bereits folgende verschiedene Strategien vorgeschlagen (Banat et al., 2010):

- die Entwicklung von effektiveren Bioprozessen, die die Optimierung der Medienzusammensetzung und des Downstream Processings beinhalten
- die Verwendung von Abfallstoffen und nachwachsenden Rohstoffen als Substrate sowie
- die Entwicklung von rekombinanten Überproduzenten oder Mutanten.

Optimierung der Medienzusammensetzung und des Downstream Processings

Die Optimierung der Medienzusammensetzung kann durch experimentelles Design realisiert werden. Durch Anwendung der Surface Response Methode konnte die Produktion von Biotensiden durch *Rhodococcus* spp. von 3,2 auf 10,9 g/L erhöht werden (Mutalik et al., 2008). Abalos et al. (2002) steigerten mit derselben Methode die Rhamnolipid-Produktion von *P. aeruginosa* von 3,6 g/L auf 16,5 g/L.

Das Downstream Processing kann einen Großteil der Herstellungskosten eines biotechnologischen Produktes ausmachen (Mukherjee et al., 2006). Biotenside werden in der Regel erst ausgefällt, dann mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und schließlich chromatographisch aufgereinigt (Banat et al., 2010). Rhamnolipide werden normalerweise durch Ansäuern präzipitiert und mit Ethylacetat extrahiert; für Sophoroselipide wird *n*-Hexan und für Trehaloselipide eine Mischung aus Chloroform und Methanol zur Extraktion verwendet.

Diese Methodik ist im Labormaßstab gut etabliert; lässt sich aber aufgrund der Kosten nicht im industriellen Maßstab durchführen (Banat et al., 2010). Daher wird nun nach alternativen, kostengünstigeren Aufreinigungsmethoden gesucht, um die Verwendung der gefährlichen und teuren organischen Lösungsmittel zu umgehen.

Verwendung von Abfallstoffen und nachwachsenden Rohstoffen als Substrate

Es wurden bereits einige Arbeiten veröffentlicht, in denen industrielle Abfallprodukte als Substrate zur Herstellung von Biotensiden verwendet wurden. Makkar und Cameotra (2002) berichteten über die Verwendung von Abfallprodukten aus der Agrarindustrie als Substrate für Bakterien und Hefen. Sobrinho et al. (2008) verwendeten Erdnussöl-Raffinerierückstände und Maisquellwasser als Substrate zur Herstellung von anionischen Glykolipiden mit *Candida spherical*. Zur Herstellung von Glykolipiden mit *P. aeruginosa* benutzten Rocha et al. (2007) Kaschuapfelsaft; Raza et al. (2007) setzten Raffinerierückstände von Gemüseölen ein. Glycerol kann auch als Substrat eingesetzt werden. Es entwickelt sich immer mehr zu einem wichtigen Rohstoff, da es in großen Mengen als Abfallprodukt in der Biodieselindustrie anfällt (Zheng et al., 2008).

Entwicklung von rekombinanten Überproduzenten oder Mutanten

Da die Rhamnolipid-Produktion in *P. aeruginosa* einem komplexen *Quorum Sensing*-abhängigen regulatorischen Netzwerk unterliegt (Müller und Hausmann, 2011), ist es schwierig Überproduzenten dieses Stammes zu entwickeln. Dies wird weiterhin erschwert durch die Tatsache, dass Rhamnolipide immer als ein Mix aus verschiedenen Kongenern hergestellt werden.

Cabrera-Valladares et al. (2006) versuchten nur Mono-Rhamnolipide herzustellen, indem sie das *P. aeruginosa rhlABRI*-Operon in *Escherichia coli* klonierten. Die Autoren fanden, dass die Verfügbarkeit von dTDP-L-Rhamnose in *E. coli* limitiert war und dies die Produktion der Mono-Rhamnolipide drosselte. Des Weiteren konnte der rekombinante *E. coli* Stamm mit *P. aeruginosa* bezüglich der Rhamnolipid-Produktion nicht konkurrieren (Cabrera-Valladares et al., 2006).

Wang et al. (2007) klonierten ebenfalls die *rhl*-Gene in *E. coli*. Dieser rekombinante Stamm produzierte bis zu 185 mg/L Rhamnolipide. Diese Konzentration ist aber im Vergleich zu den mit *P. aeruginosa* erreichbaren Konzentrationen sehr gering (Wang et al., 2007).

1.2 Rhamnolipide

Rhamnolipide sind Biotenside, die zur Gruppe der Glykolipide gehören und hauptsächlich von *Pseudomonas aeruginosa* produziert werden (Abdel-Mawgoud et

al., 2011). Sie setzen sich aus ein (Mono-Rhamnolipide) bis zwei (Di-Rhamnolipide) Rhamnose-Einheiten und ein bis drei β -Hydroxyfettsäuren zusammen. Die β -Hydroxyfettsäuren können gesättigt oder ungesättigt sein und eine Kettenlänge von 8 bis 16 Kohlenstoffatomen aufweisen (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Erstmals beschrieben wurden Rhamnolipide 1949 von Jarvis und Johnson (Jarvis und Johnson, 1949). Sie isolierten aus *P. aeruginosa* ein kristallines, saures Glykolipid, das sich aus zwei Rhamnoseresten und zwei β -Hydroxydekansäuren zusammensetzte.

Itoh et al. (1971) fanden bei Wachstum von *P. aeruginosa* auf *n*-Paraffin ein Rhamnolipid Kongener, das aus einem Rhamnosereist und zwei β -Hydroxydekansäuren bestand. Zwei weitere Rhamnolipide wurden von Syldatk et al. (1985) entdeckt: Ruhende Zellen von *P. aeruginosa* DSM 2874 produzierten mit *n*-Alkanen als Substrat ein Kongener, bei dem eine Rhamnose mit nur einer β -Hydroxydekansäure verknüpft war. Bei dem zweiten Kongener war eine β -Hydroxydekansäure mit zwei Rhamnosereisten verknüpft.

Diese vier Rhamnolipide werden oft als Rhamnolipide 1-4 von *P. aeruginosa* bezeichnet. Ihre Struktur ist in Abb. 1.3 dargestellt.

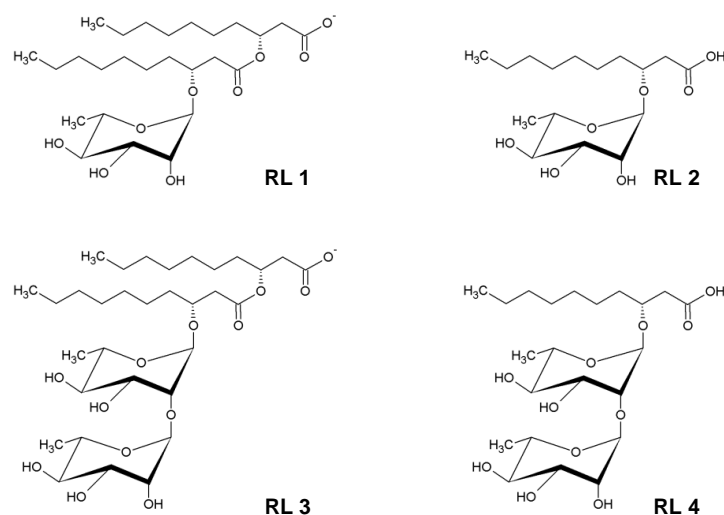


Abb. 1.3: Die vier Rhamnolipide (RL) von *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipide 1 und 2: Mono-Rhamnolipide; Rhamnolipide 3 und 4: Di-Rhamnolipide.

Rhamnolipide werden in Flüssigkulturen immer als Mischung verschiedener Kongener gebildet; wobei im Allgemeinen die Rhamnolipide 1 und 3 häufiger vorkommen als die Rhamnolipide 2 und 4 (Déziel et al., 2000).

1.2.1 Funktionen der Rhamnolipide

Obwohl schon viele Untersuchungen durchgeführt wurden, ist die genaue physiologische Funktion der Rhamnolipide für die produzierenden Bakterien immer noch unklar (Déziel et al., 2003). Oft werden daher mögliche Funktionen von den Tenseigenschaften der Rhamnolipide abgeleitet (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Mögliche Funktionen der Rhamnolipide sind die Aufnahme und der Abbau schlecht wasserlöslicher Substrate (Noordman und Janssen, 2002; Hommel, 1994) sowie das Auftreten als Immunmodulatoren und Virulenzfaktoren (Andrä et al., 2006; Van Delden und Iglewski, 1998; Kownatzki et al., 1987). Rhamnolipide zeigen eine antimikrobielle Wirkung (Sotirova et al., 2008) und setzen die starke Oberflächenspannung des umgebenden Wassers beim Schwärmen herab (Caiazza et al., 2005). Des Weiteren spielen Rhamnolipide eine Rolle bei der Biofilmbildung (Pamp und Tolker-Nielsen, 2007).

1.2.2 Synthese der Rhamnolipide

In *Pseudomonas aeruginosa* werden die Rhamnolipide aus Vorläufermolekülen, die aus dem zentralen Stoffwechsel stammen, mit Hilfe der Rhamnosyltransferasen 1 und 2 synthetisiert. Bei den Vorläufermolekülen handelt es sich zum einen um den aktivierten Zucker dTDP-L-Rhamnose, der sich von der Glukose ableitet, und zum anderen um 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAAs), die aus der Fettsäuresynthese stammen.

Die Rhamnosyltransferase 1 wird vom *rhlAB*-Operon codiert und besteht aus den zwei Untereinheiten RhIA und RhIB. RhIA katalysiert die Kondensationsreaktion von zwei β -Hydroxyfettsäuren zu einem HAA. RhIB verknüpft die dTDP-L-Rhamnose durch eine beta-glykosidische Bindung mit dem HAA, wobei die Mono-Rhamnolipide entstehen (Soberón-Chávez et al., 2005). Die Mono-Rhamnolipide können zusammen mit einer weiteren dTDP-L-Rhamnose von der Rhamnosyltransferase 2 (RhIC) zu Di-Rhamnolipiden umgesetzt werden (Rahim et al., 2001; Soberón-Chávez et al., 2005), s. Abb. 1.4.

Einige Intermediate des Biosyntheseweges der Rhamnolipide werden auch für andere Biosynthesewege genutzt, z. B. für die Biosynthese von Lipopolysacchariden (LPS), Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) und 4-hydroxy-2-alkylquinolinen (HAQs) (Soberón-Chávez et al., 2005).

rhIA und *rhIB* sind zusammen mit den Genen *rhIR* und *rhII* in einem gemeinsamen Operon arrangiert. Letztere codieren für Proteine, die in der transkriptionellen Regulation von *rhIA* und *rhIB* durch das *Quorum Sensing* beteiligt sind. *RhIC* ist nicht mit den anderen *rhl*-Genen verbunden, sondern liegt zusammen mit einem Gen, dessen Funktion bislang unbekannt ist, in einem anderen Operon. Dieses Operon wird auf transkriptioneller Ebene ähnlich reguliert wie *rhIAB* (Rahim et al., 2001; Soberón-Chávez et al., 2005).

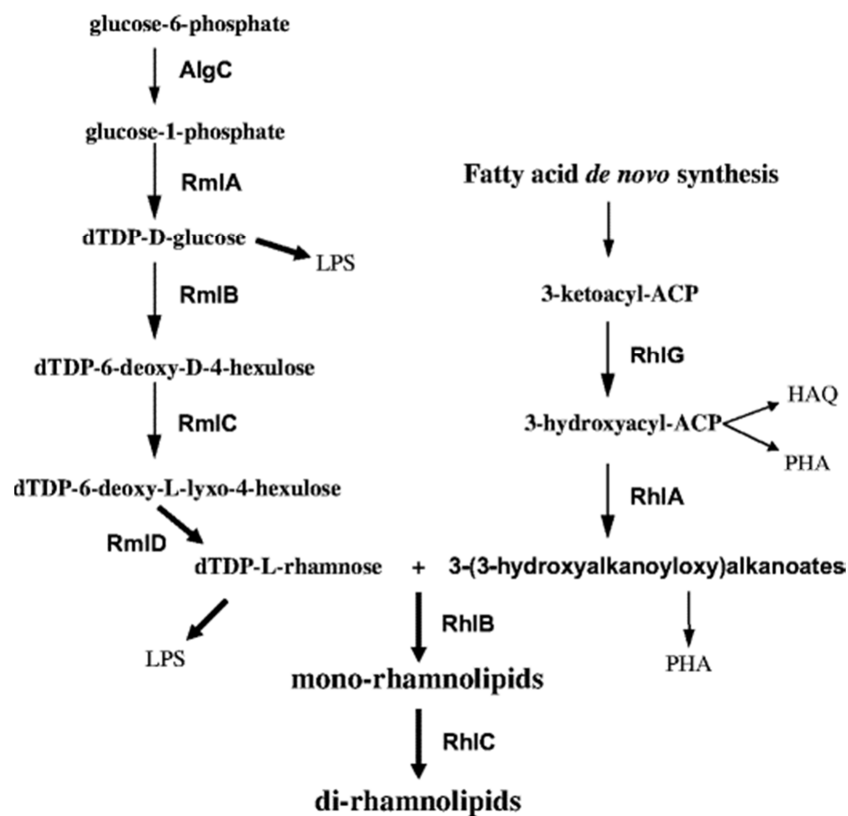


Abb. 1.4: Biosyntheseweg von Mono- und Di-Rhamnolipiden in *P. aeruginosa* (Soberón-Chávez et al., 2005). Aus einigen Intermediaten werden Lipopolysaccharide (LPS), Polyhydroxyalkanoate (PHAs) und 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HAQs) gebildet. RhIA: Rhamnosyltransferase 1, Untereinheit A; rhIB: Rhamnosyltransferase 1, Untereinheit B; rhIC: Rhamnosyltransferase 2.

1.2.3 Regelung der Rhamnolipid-Produktion

Quorum Sensing (QS) ist ein allgemeines Phänomen, welches bereits für viele gram-negative und gram-positive Bakterien beschrieben wurde (Greenberg, 1997; Kleerebezem et al., 1997). In *Pseudomonas aeruginosa* regelt das QS auf

transkriptioneller Ebene die Produktion einiger Virulenzfaktoren; auch die der Rhamnolipide (Van Delden und Iglewski, 1998).

Das QS von *P. aeruginosa* besteht aus dem *las*-System und dem *rhl*-System, wobei das *rhl*-System vom *las*-System kontrolliert wird. Das *las*-System besteht aus dem Autoinducer *N*-[3-oxododecanoyl]-L-homoserinlacton (3-oxo-C₁₂-HSL) der von *lasI* codiert wird, und einem transkriptionellen Aktivator-Protein, welches das Produkt von *lasR* ist. Der Komplex aus 3-oxo-C₁₂-HSL und transkriptionellem Aktivator-Protein aktiviert die Transkription von *rhlR*. Bei *RhlR* handelt es sich um ein transkriptionelles Aktivator-Protein, das zusammen mit dem Autoinducer *N*-butyrylhomoserinlacton (C₄-HSL), der von *rhlI* codiert wird, die Expression von *rhlAB* und *rhlC* fördert (Van Delden und Iglewski, 1998; Soberón-Chávez et al., 2005), s. Abb. 1.5.

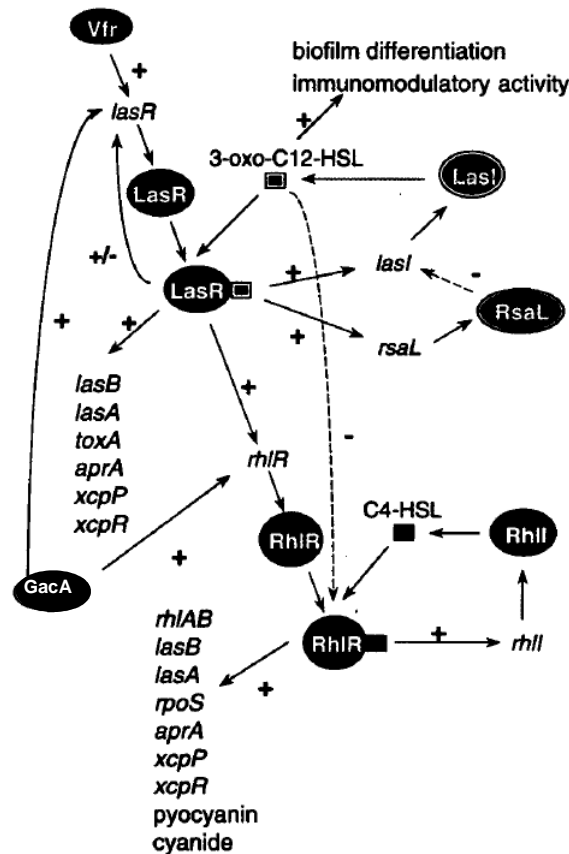


Abb. 1.5: Das Quorum Sensing-System in *P. aeruginosa*. *LasB*: LasB Elastase, *lasA*: LasA Elastase, *toxA*: Exotoxin A, *aprA*: alkalische Protease, *xcpP* und *xcpR*: Gene des xcp sekretorischen Stoffwechselweges, *rhlAB*: Rhamnosyltransferase 1, *rpoS*: Sigma-Faktor der stationären Phase (in Anlehnung an Van Delden und Iglewski, 1998).

Die Regulation des *rhlAB*-Promotors auf transkriptioneller Ebene hängt nicht nur von *rhlR* und C₄-HSL ab. Dieses Operon wird in der exponentiellen Wachstumsphase von *P. aeruginosa* in Vollmedium nicht exprimiert, selbst wenn Autoinducer und Aktivator-Protein in der Zelle vorliegen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Transkription des *rhlAB*-Operons teilweise vom RpoS (Sigmafaktor der stationären Phase; σ_s) abhängt (Medina et al., 2003). Des Weiteren aktiviert *rhlR* die Transkription von *rhlAB*, wenn es an C₄-HSL gebunden ist, und reprimiert sie, wenn es nicht an C₄-HSL gebunden ist (Medina et al., 2003).

Zusätzlich beeinflusst der transkriptionelle Regulator MvfR, der die Synthese der HAQs kontrolliert, die Expression vieler *rhlR*-abhängiger Gene; auch die von *rhlAB* (Déziel et al., 2005).

1.2.4 Wirtschaftlichkeit der Rhamnolipide

Obwohl Rhamnolipide exzellente Tensideigenschaften aufweisen, können sie nicht flächendeckend eingesetzt werden, da ihre Produktionskosten die der synthetischen Tenside übersteigen (Costa et al., 2011). Zurzeit liegen die Preise von Rhamnolipiden zwischen 200 US-\$/kg für eine 20%-ige Lösung (Jeneil JBR425) und 6000 US-\$/kg für ein >99% reines Gemisch aus Rhamnolipid 1 und 3 (Leitermann, 2008). Zum Vergleich belaufen sich die Kosten für synthetische Bulk-Produkte wie Alkylpolyglukoside auf 1-3 US-\$/kg (Müller und Hausmann, 2011). Ein weiterer Nachteil ist, dass der meist eingesetzte und am besten beschriebene Rhamnolipid-Produzent *P. aeruginosa* ein opportunistischer human-pathogener Keim ist.

Um die Kosten für die Herstellung von Rhamnolipiden zu senken, werden im Prinzip die gleichen Strategien wie bei den Biotensiden verfolgt (s. Abschnitt 1.1.2). Es wird versucht den Bioprozess zu optimieren; z. B. durch die Optimierung der Medienzusammensetzung (Abalos et al., 2002; Mutalik et al., 2008). Es werden preiswerte Substrate wie Abfallprodukte aus der Agrar- oder Dieselindustrie eingesetzt (Makkar und Cameotra, 2002; Banat et al., 2010). Es werden natürliche, nicht-pathogene Wildtypstämme gescreent und rekombinante Überproduzenten und Mutanten erzeugt (Cabrera-Valladares et al., 2006; Wang et al., 2007).

1.3 Alternative Rhamnolipid-Produzenten

Die größte Begrenzung, der die kommerzielle Nutzung von Biotensiden unterliegt, stellen ihre hohen Produktionskosten dar, die eine industrielle Produktion im großen Rahmen wirtschaftlich nicht tragbar machen (s. Abschnitt 1.2.4).

Ein weiteres Problem ist, dass bei der Herstellung von Rhamnolipiden *P. aeruginosa* verwendet wird, der ein opportunistisch human-pathogener Keim ist (Bodey et al., 1983). Daher wird intensiv nach nicht-pathogenen Stämmen gesucht, die eine mögliche Alternative zu *P. aeruginosa* darstellen. In der Literatur wurden bereits einige alternative Rhamnolipid-Produzenten beschrieben (s. Tab. 1.5). Bei den meisten handelt es sich um Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, wie z. B. *Pseudomonas cepacia*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* und *P. putida* (Onbasli und Aslim, 2009; Palleroni und Holmes, 1981; Gunther et al., 2005; Abouseoud et al., 2008; Martínez-Toledo et al., 2006; Tuleva et al., 2002).

Allerdings werden auch zunehmend andere Rhamnolipid-Produzenten mit variierender Distanz in ihrer taxonomischen Klassifizierung entdeckt, wie z. B. *Pseudoxanthomonas* sp., der zwar auch wie *P. aeruginosa* zu den Gamma-Proteobakterien gehört, aber zur Ordnung der Xanthomonadales. Weitere Beispiele sind *Enterobacter* sp. und *Pantoea* sp., die zur Ordnung der Enterobacteriales gehören. Die Burkholderiales sind taxonomisch noch weiter entfernt; sie gehören zur Klasse der Beta-Proteobakterien. Innerhalb dieser Gattung wurde eine Rhamnolipid-Produktion bei *B. glumae*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei* und *B. thailandensis* beobachtet (Häussler et al., 1998; Andrä et al., 2006; Dubeau et al., 2009; Costa et al., 2011).

Erstaunlicherweise gibt es sogar Rhamnolipid-Produzenten, die zu einem ganz anderen Phylum als *P. aeruginosa* gehören, z. B. *Renibacterium salmoninarum* (Christova et al., 2004) und *Nocardioides* sp. (Vasileva-Tonkova und Gesheva, 2005); sie gehören zum Phylum der Actinobakterien.

Allerdings wurde bei vielen beschriebenen Produzenten die Struktur der Rhamnolipide noch nicht aufgeklärt. Des Weiteren gehören einige zur Risikogruppe 2, was in Bezug auf eine Produktion der Rhamnolipide für kommerzielle Zwecke von großem Nachteil ist (s. Tab. 1.5).

Außerdem liegen die erreichten Rhamnolipid-Endkonzentrationen der alternativen Stämme weit unter den von *P. aeruginosa* erreichten. Giani et al. (1997) beschreiben

in ihrem Patent Batch und Fed-Batch-Verfahren, bei denen *P. aeruginosa* bis zu 112 g/L Rhamnolipide produzierte.

Rooney et al. (2009) fanden, dass die Mikroorganismen *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea stewartii*, *Enterobacter asburiae* und *E. hormaechei* bis zu 2,4 g/L Rhamnolipide bildeten. Bei den Burkholderien wurden Rhamnolipid-Endkonzentrationen von bis zu 1,5 g/L gefunden (Dubeau et al., 2009). Rezanka et al. (2011) machten nur relative Angaben über die Zusammensetzung der Rhamnolipid-Kongener bei der Kultivierung von *Meiothermus ruber*, *Thermus* sp. und *T. aquaticus*. Aber Oliveira et al. (2009) zeigten, dass *P. alcaligenes* bis zu 2,3 g/L Rhamnolipide produzierte. Gunther et al. (2005) erhielten mit *P. chlororaphis* etwa 1 g/L Rhamnolipide. Nayak et al. (2009) produzierten mit *Pseudoxanthomonas* bis zu 280 mg/L Rhamnolipide und Pantazaki et al. (2010) erhielten mit *Thermus thermophilus* bis zu 300 mg/L.

Die erreichten Rhamnolipidkonzentrationen sind bei allen alternativen Stämmen um den Faktor 50-400 kleiner als die von Giani et al. (1997) beschriebene Konzentration von 112 g/L. Dies zeigt, dass noch viel Entwicklungs- und Optimierungsarbeit notwendig ist, um die alternativen Produzenten zu *P. aeruginosa* konkurrenzfähig zu machen.

Tab. 1.5: Derzeit beschriebene Rhamnolipid-Produzenten. $C_{RL,End}$: Rhamnolipid-Endkonzentration, HU: hämolytische Einheit, k. A.: keine Angabe, RE: Rhamnose-Äquivalente, RG: Risikogruppe.

Stamm	RG	Rhamnolipid-Kongener	$C_{RL,End}$	Referenz
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	S2	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	2,2 g/L	Rooney et al., 2009
<i>Burkholderia glumae</i> AU6208	S1	Vorwiegend Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄	Ca. 1,0 g/L	Costa et al., 2011
<i>B. plantarii</i> DSM 6535	S1	Rha ₂ -C ₁₄ , Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄ , Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄ -C ₁₄	30 mg Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄ / 10 g Biomasse	Andrä et al., 2006
<i>B. pseudomallei</i> NCTC 10274	S2	Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄	Angabe in HU; nicht vergleichbar	Häussler et al., 1998
<i>B. pseudomallei</i> 1026b	S2	Vorwiegend Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄	Ca. 30 mg/L	Dubeau et al., 2009
<i>B. thailandensis</i> E264	S1	Vorwiegend Rha ₂ -C ₁₄ -C ₁₄	Ca. 1,5 g/L	Dubeau et al., 2009
<i>Enterobacter asburiae</i> und <i>E. hormaechei</i>	S2	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	2,0-2,4 g/L	Rooney et al., 2009
<i>Meiothermus ruber</i> , <i>Thermus</i> sp. und <i>T. aquaticus</i>	S1	Mischung aus Mono- und Di-Rhamnolipiden mit Kettenlängen bis C ₂₄	Nur relative Angaben	Rezanka et al., 2011
<i>Nocardioides</i> sp. A-8	S1	Nicht identifiziert	Ca. 1,1 g/L RE	Vasileva-Tonkova et al., 2005
<i>Pantoea stewartii</i>	S1	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	2,2 g/L	Rooney et al., 2009
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PCL	S2	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	2,3 g/L	Oliveira et al., 2009
<i>P. cepacia</i>	S2	Nicht identifiziert	Ca. 0,31 g/L RE	Onbasli und Aslim, 2009
<i>P. chlororaphis</i> NRRL B-30761.	S1	Vorwiegend Rha-C ₁₂ -C ₁₀ und Rha-C _{12:1} -C ₁₀	Ca. 1,0 g/L	Gunther et al., 2005
<i>P. clemancea</i>	k. A.	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Nicht bekannt	Rahman et al., 2009
<i>P. collierea</i>	k. A.	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Nicht bekannt	Rahman et al., 2009
<i>P. fluorescens</i> HW-6	S1	Nicht identifiziert	1,4 g/L RE	Vasileva-Tonkova et al., 2006
<i>P. luteola</i>	S1	Nicht identifiziert	0,38 g/L RE	Onbasli und Aslim, 2009
<i>P. fluorescens</i> Migula 1895	S1	Nicht identifiziert	2,0 g/L RE	Abouseoud et al., 2008
<i>P. putida</i> -CB100	S2	Nicht identifiziert	0,062 g/L; Einheit unbekannt	Martínez-Toledo et al., 2006
<i>P. putida</i> 21BN	S2	Nicht identifiziert	1,2 g/L RE	Tuleva et al., 2002
<i>P. stutzeri</i> G11	S1	Nicht identifiziert	Ca. 0,5 g/L RE	Celik et al., 2008
<i>P. teessidea</i>	k. A.	Vorwiegend Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	Nicht bekannt	Rahman et al., 2009
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	S1	Vorwiegend Rha ₂ -C ₁₂ -C ₁₂ , Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀ , Rha ₂ -C ₈ -C ₈ , Rha-C ₁₀ -C ₁₀ , Rha-C ₈ -C ₈	0,28 g/L	Nayak et al., 2009
<i>Renibacterium salmoninarum</i> 27BN	S1	Vermutlich Rha-C ₁₀ -C ₁₀ und Rha ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	0,92 g/L RE	Christova et al., 2004
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	S1	Mischung aus Mono- und Di-Rhamnolipiden mit Kettenlängen von C ₈ bis C ₁₄	0,30 g/L	Pantazaki et al., 2010

1.3.1 Die Gattung *Burkholderia*

Tab. 1.5 zeigt, dass die meisten alternativen Rhamnolipid-Produzenten zur Gattung *Pseudomonas* gehören. Allerdings wurden im Laufe der vergangenen Jahre immer mehr Rhamnolipid-Bildner aus der Gattung *Burkholderia* beschrieben (Häussler et al., 1998; Andrä et al., 2006; Dubeau et al., 2009; Costa et al., 2011).

Diese Gattung wurde nach dem amerikanischen Bakteriologen W. H. Burkholder benannt (Yabuuchi et al., 1992). Dieser beschrieb 1942 *Phytomonas caryophylli*, später bekannt als *Pseudomonas caryophylli*, als einen der ersten *Burkholderia* sp. (Burkholder, 1942). 1950 beschrieb Burkholder des Weiteren ein pflanzenpathogenes Bakterium, welches die Zwiebfäule auslöst und gab ihm den Namen *cepacia* (lat. *cepa*=Zwiebel) (Burkholder, 1950). Später wurde dieses Bakterium unter dem Namen *Pseudomonas cepacia* bekannt.

Die Gattung *Burkholderia* war für lange Zeit Bestandteil der Gattung *Pseudomonas*. Dies lag vor allem an ihrer breiten, ungenauen phänotypischen Charakterisierung (Compant et al., 2008). Die in den siebziger Jahren aufkommenden rRNA-DNA-Hybridisierungstechniken brachten dann aber eine beträchtliche genetische Diversität unter den Pseudomonaden zum Vorschein, so dass die Gattung in fünf sogenannte Homologie-Gruppen unterteilt wurde (Palleroni et al., 1973).

Folgende genotypische Analysen haben daraufhin gezeigt, dass diese fünf Gruppen nur entfernt miteinander verwandt sind. Daher verwarfen De Vos et al. (1985) die bestehende Klassifizierung. Ihrer Meinung nach gehörten die authentischen Pseudomonaden zur Homologie-Gruppe I (*Pseudomonas fluorescens* rRNA Zweig), die auch den Typstamm *P. aeruginosa* enthielt.

Yabuuchi et al. (1992) untersuchten Mitglieder der RNA-Homologie-Gruppe II mittels 16S rRNA-Sequenzierung, DNA-DNA-Homologie, Charakterisierung des zellulären Lipid- und Fettsäureprofils und phänotypischer Charakterisierung. Aufgrund der Ergebnisse schlugen sie vor, sieben Stämme dieser Gruppe einer neuen Gattung namens *Burkholderia* mit dem Typstamm *B. cepacia* zuzuordnen (Yabuuchi et al., 1992). Zu den ursprünglich sieben Stämmen *B. cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. caryophylli*, *B. gladioli*, *B. pickettii* und *B. solanacearum* kamen im Laufe der vergangenen 20 Jahre noch viele weitere hinzu (Coenye und Vandamme, 2003).

Zurzeit besteht die Gattung *Burkholderia* aus über 60 Spezies. Burkholderien gehören zu den β -Proteobakterien und besetzen diverse ökologische Nischen (Vial

et al., 2007). Diese Gattung enthält Spezies, die pathogen für Menschen, Tiere und Pflanzen sind. Sie enthält aber auch Spezies, die das Wachstum von Pflanzen unterstützen und Schadstoffe abbauen können (Vial et al., 2007).

B. pseudomallei und *B. mallei* werden von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) in den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) in die Risikogruppe 3 eingeteilt (s. Tab. 1.6), da sie höchst pathogen für Mensch und Tier sind. *B. pseudomallei* ist der Erreger der Melioidose (auch Pseudo-Rotz genannt), einer Infektionskrankheit mit hoher Letalität (Cheng und Currie, 2005).

Der Rotz, welcher hauptsächlich eine Krankheit der Pferde ist, wird von *B. mallei* verursacht. Die Letalität beträgt 95%, wenn die Infektion nicht behandelt wird und 50%, wenn Antibiotika eingesetzt werden (Whitlock et al., 2007).

B. phytofirmans und *B. phymatum* können nützlich für Pflanzen sein. *B. phymatum* ist ein hocheffizienter, Stickstoff-fixierender Symbiont der Mimosen (Elliott et al., 2007). Für *B. phytofirmans* wurde gezeigt, dass diese Art das Wachstum von Weinstöcken und deren Kälteresistenz erhöht (Barka et al., 2006). Tab. 1.6 liefert einen Überblick über die bisher bekannten Vertreter der Burkholderien.

Tab. 1.6: Übersicht über die derzeit bekannten *Burkholderia*-Spezies. RG: Risikogruppe, k. A.: keine Angabe.

Stamm	RG	Habitat	Synonym	Referenz
<i>B. acidipaludis</i>	k. A.	Wasserkastanie <i>Eleocharis dulcis</i>		Aizawa et al., 2010
<i>B. ambifaria</i>	S2	Menschen mit Zystischer Fibrose, Erdboden, Rhizosphäre		Coenye et al., 2001
<i>B. andropogonis</i>	S1	Pflanzen	<i>P. andropogonis</i> , <i>P. woodsii</i>	Gillis et al., 1995
<i>B. anthina</i>	S1	Menschen mit Zystischer Fibrose, Erdboden, Rhizosphäre, Tiere, Wasser		Vandamme et al., 2002
<i>B. aboris</i>	S2	Menschen, Erdboden, Wasser, Rhizosphäre		Vanlaere et al., 2008
<i>B. bannensis</i>	k. A.	Gras <i>Panicum repens</i>		Aizawa et al., 2011
<i>B. bryophila</i>	S1	Moos, Ackerboden, Graslandschaft		Vandamme et al., 2007
<i>B. caledonica</i>	S1	Rhizosphäre		Coenye et al., 2001
<i>B. caribensis</i>	S1	Erdreich, Wurzelknöllchen		Achouak et al., 1999
<i>B. caryophylli</i>	S1	Pflanzen	<i>P. caryopyilli</i>	Yabuuchi et al., 1992
<i>B. cenocepacia</i>	S2	Menschen, Tiere, Erdboden, Rhizosphäre, Pflanzen		Vandamme et al., 1997
<i>B. cepacia</i>	S2	Menschen, Tiere, Erdboden, Rhizosphäre, Pflanzen	<i>P. cepacia</i>	Yabuuchi et al., 1992
<i>B. contaminans</i>	S1	Menschen mit Zystischer Fibrose, Schafe mit Mastitis		Vanlaere et al., 2009
<i>B. diffusa</i>	S2	Menschen, Boden, Umwelt		Vanlaere et al., 2008
<i>B. dolosa</i>	S2	Menschen mit Zystischer Fibrose, Rhizosphäre		Vermis et al., 2004
<i>B. endofungorum</i>	S1	Pilz <i>Rhizopus microsporus</i>		Partida-Martinez et al., 2007
<i>B. ferrariae</i>	S1	Minen		Valverde et al., 2006
<i>B. fungorum</i>	S1	Menschen, Tiere, Pilze, Erdreich, Pflanzen, Wasser		Coenye et al., 2001
<i>B. ginsengisoli</i>	S1	Erdboden		Kim et al., 2006
<i>B. gladioli</i>	S2	Menschen, Pflanzen	<i>B. cocovenenans</i> , <i>P. antimicrobica</i> , <i>P. gladioli</i>	Yabuuchi et al., 1992
<i>B. glathei</i>	S1	Pflanzen, Rhizosphäre	<i>P. glathei</i>	Vandamme et al., 1997
<i>B. glumae</i>	S1	Menschen, Pflanzen	<i>P. glumae</i>	Urakami et al., 1994
<i>B. graminis</i>	S1	Pflanzen, Erdreich, Rhizosphäre		Viallard et al., 1998
<i>B. heleia</i>	k. A.	Wasserkastanie <i>Eleocharis dulcis</i>		Aizawa et al., 2010
<i>B. hospita</i>	S1	Erdreich		Goris et al., 2002
<i>B. kururiensis</i>	S1	Wasser, industrielle Verunreinigungen		Zhang et al., 2000
<i>B. lata</i>	S1	Waldboden, Menschen mit Zystischer Fibrose, Flusswasser		Vanlaere et al., 2009
<i>B. latens</i>	S2	Menschen mit Zystischer Fibrose		Vanlaere et al., 2008
<i>B. mallei</i>	S3	Pferde, Maultiere, Esel, Menschen	<i>P. mallei</i>	Yabuuchi et al., 1992

<i>B. megapolitana</i>	S1	Moos		Vandamme et al., 2007
<i>B. metallica</i>	S2	Menschen mit Zystischer Fibrose		Vanlaere et al., 2008
<i>B. mimosarum</i>	S1	Wurzelknöllchen		Chen et al., 2006
<i>B. multivorans</i>	S2	Menschen, Erdreich, Krankenhaus		Vandamme et al., 1997
<i>B. nodosa</i>	S1	Wurzelknöllchen		Chen et al., 2007
<i>B. oklahomensis</i>	S2	Mensch	Oklahoma strain of <i>P. pseudomallei</i>	Glass et al., 2006
<i>B. oxyphila</i>	S1	(saurer) Waldboden		Otsuka et al., 2011
<i>B. phenazinium</i>	S1	Pflanzen, Boden	<i>P. phenazinium</i>	Viallard et al., 1998
<i>B. phenoliruptrix</i>	S1	Erdreich		Coenye et al., 2004
<i>B. phymatum</i>	S1	Wurzelknöllchen		Vandamme et al., 2002
<i>B. phytofirmans</i>	S1	Rhizosphäre, Erdboden		Sessitsch et al., 2005
<i>B. plantarii</i>	S1	Pflanzen	<i>B. vandii</i> , <i>P. plantarii</i>	Urakami et al., 1994
<i>B. pseudomallei</i>	S3	Menschen, Tiere, Boden, Wasser	<i>P. pseudomallei</i>	Yabuuchi et al., 1992
<i>B. pyrrocinia</i>	S1	Menschen, Boden, Rhizosphäre, Pflanzen	<i>P. pyrrocinia</i>	Vandamme et al., 2002
<i>B. rhizoxinica</i>	S1	Pilz <i>Rhizopus microsporus</i>		Partida-Martinez et al., 2007
<i>B. sabiae</i>	S1	Wurzelknollen von <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>		Chen et al., 2008
<i>B. sacchari</i>	S1	Boden		Brämer et al., 2001
<i>B. sartisoli</i>	S1	Kohlenwasserstoff-verseuchter Boden		Vanlaere et al., 2008
<i>B. sediminicola</i>	S1	Süßwassersediment		Lim et al., 2008
<i>B. seminalis</i>	S2	Menschen mit Zystischer Fibrose, Umwelt, Rohrzucker Reiskeimlinge		Vanlaere et al., 2008
<i>B. silvatlantica</i>	S1	Rhizosphäre, Pflanzen		Perin et al., 2006
<i>B. soli</i>	S1	Erdboden		Yoo et al., 2007
<i>B. sordidicola</i>	S1	Pilze		Lim et al., 2003
<i>B. stabilis</i>	S1	Menschen		Vandamme et al., 2000
<i>B. terrae</i>	S1	Erdboden		Yang et al., 2006
<i>B. terricola</i>	S1	Erdboden		Goris et al., 2002
<i>B. thailandensis</i>	S1	Erdboden	<i>B. pseudomallei</i> -like species	Brett et al., 1998
<i>B. tropica</i>	S1	Pflanzen, Rhizosphäre		Reis et al., 2004
<i>B. tuberculum</i>	S1	Wurzelknöllchen		Vandamme et al., 2002
<i>B. ubonensis</i>	S1	Menschen		corrige. Yabuuchi et al., 2000
<i>B. unamae</i>	S1	Pflanzen, Rhizosphäre		Caballero-Mellado et al., 2004
<i>B. vietnamiensis</i>	S2	Menschen, Tiere, Boden, Rhizosphäre		Gillis et al., 1995
<i>B. xenovorans</i>	S1	Menschen, Erdboden, Rhizosphäre		Goris et al., 2004

1.3.2 Rhamnolipid-Produzenten aus der Gattung *Burkholderia*

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind vier Rhamnolipid-Bildner aus der Gattung *Burkholderia* bekannt: *B. glumae* (Costa et al., 2011), *B. plantarii* (Andrä et al., 2006), *B. pseudomallei* (Häussler et al., 1998; Dubeau et al., 2009) und *B. thailandensis* (Dubeau et al., 2009).

Costa et al. (2011) kultivierten den Stamm *Burkholderia glumae* AU6208 in einem Mineralsalzmedium, einmal mit Glycerol (2%, w/v) und einmal mit Rapsöl (2%, w/v) als C-Quelle. Als Stickstoffquelle verwendeten sie Harnstoff, NaNO_3 und NH_4Cl . Des Weiteren verwendeten die Autoren noch unterschiedliche Kultivierungstemperaturen. Sie fanden, dass das Wachstum bei allen Stickstoffquellen ähnlich war, sich aber die erreichten Rhamnolipidkonzentrationen erheblich voneinander unterschieden. Mit Harnstoff wurde eine Endkonzentration der Rhamnolipide von 555,9 mg/L gemessen. Bei Verwendung von NaNO_3 als Stickstoffquelle wurden 259,5 mg/L und mit NH_4Cl 140,7 mg/L erreicht. Maximales Wachstum erhielten die Autoren bei einer Temperatur von 37°C, aber die stärkste Rhamnolipid-Produktion fand bei 34°C statt. Das Wachstum und die Rhamnolipid-Produktion variierten auch erheblich mit dem Einsatz von verschiedenen Kohlenstoffquellen. Wurde Glycerol als C-Quelle benutzt, wurden 555,9 mg/L Rhamnolipide gebildet, während mit Rapsöl 1000,7 mg/L nach sechs Tagen Inkubation gebildet worden waren. Costa et al. (2011) fanden hauptsächlich das Rhamnolipid $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$ (s. Tab. 1.5), daneben aber auch die Kongener $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12}$ und $\text{Rha}_2\text{-C}_{16}\text{-C}_{16}$ bei einer Kultivierung mit Harnstoff als N- und Glycerol als C-Quelle. Bei einer Kultivierung mit Rapsöl als C- und Harnstoff als N-Quelle beobachteten sie zusätzlich das Auftreten von Kongenern mit ungesättigten β -Hydroxyfettsäureresten.

Häussler et al. (1998) kultivierten den Stamm *B. pseudomallei* NCTC 10274 in einem Medium, welches Zitronensäure und Glukonsäure als C-Quellen und $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ als N-Quelle enthielt, sowie in einer NaCl-Lösung mit Glycerol bei jeweils 37°C. Die Autoren bestimmten die hämolytische Aktivität der Rhamnolipide. Hierfür verwendeten sie unter anderem eine Lösung von menschlichen Erythrozyten und versetzten diese mit Rhamnolipiden. Der Grad der Hämolyse wurde bestimmt, indem freies Hämoglobin bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen wurde. Bei einer Kultivierung in NaCl-Lösung mit Glycerol wurden nach sechs Tagen Inkubation bis zu 65 hämolytische Einheiten (HU) gemessen, wobei ca. 250 μg Rhamnolipid einer HU

entsprachen. Eine Strukturanalyse mit ESI/MS ergab, dass es sich bei dem Rhamnolipid um das Kongener $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$ handelte.

Dubeau et al. (2009) testeten den Stamm *B. thailandensis* E264 (ATCC) auf Rhamnolipid-Produktion. Sie kultivierten den Stamm in Mineralsalz- und Vollmedium. Als C-Quelle verwendeten sie einerseits Kohlenwasserstoffe wie Mannitol, Dextrose, Saccharose, Glycerol und Fruktose, andererseits Pflanzenöle wie Raps-, Oliven-, Palm- und Sonnenblumenöl. Die Autoren fanden, dass unter ihren Bedingungen Glycerol und Rapsöl die geeignetsten C-Quellen bezüglich der Rhamnolipid-Bildung waren. Mit Glycerol wurden 419,1 mg/L nach 13 Tagen Kultivierung erhalten; mit Rapsöl 1473,72 mg/L. Auch hier war das Kongener $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$ das vorherrschende Rhamnolipid. Dubeau et al. (2009) fanden daneben auch weitere Kongener, unter denen $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}$, $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}\text{-C}_{14}$ und $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{16}$ den größten Anteil bildeten.

Andrä et al. (2006) kultivierten den Stamm *B. plantarii* DSM 6535. *Burkholderia plantarii* (lat. *plantarium*=Saatbeet) wurde aus befallenen Reiskeimlingen in Japan isoliert und erstmals als *Pseudomonas plantarii* von Azegami et al. (1987) beschrieben (s. Abb. 1.6A). *B. plantarii* ist ein aerobes, gram-negatives Stäbchen, das polar begeißelt ist und einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten vorkommen kann.

B. plantarii befällt Reiskeimlinge und verursacht deren Fäule (s. Abb. 1.6B). Im frühen Stadium, also kurz nach dem Befall mit *B. plantarii*, setzen das Welken und eine Chlorose (Gelbfärbung) der Blätter der Reiskeimlinge ein. Die Keimlinge werden dann nach und nach rotbraun und dörren aus, ohne eine Nassfäule zu zeigen. Wenn die Keimlinge stark befallen sind, wird das Wachstum der Wurzeln derart beeinträchtigt, dass die Keimlinge umkippen (Azegami et al., 1987).

B. plantarii bildet unter bestimmten Bedingungen den Speicherstoff Polyhydroxybutyrat (PHB) und Tropolon, ein Aromat mit antibakterieller Wirkung, der das Wachstum von Wurzeln inhibieren kann. Des Weiteren ist Tropolon wahrscheinlich für die Symptome der Reisfäule (Chlorose und Welken der Keimlingsblätter) verantwortlich (Azegami et al., 1988).

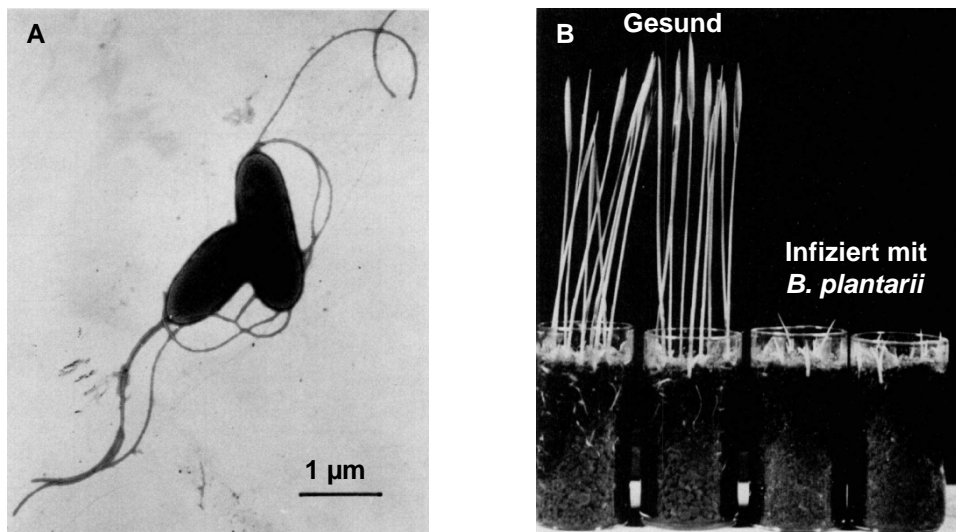


Abb. 1.6A: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Burkholderia plantarii*. Bei *B. plantarii* handelt es sich um polar begeißelte Stäbchen, die einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten vorkommen können. 1.6B: Gesunde und mit *B. plantarii* infizierte Reiskeimlinge. Die infizierten Keimlinge werden braun und nicht länger als 1 cm (Azegami et al., 1987).

Urakami T et al. (1994) schlugen unter anderem aufgrund der Untersuchung des Fettsäureprofils und DNA-DNA-Hybridisierungen vor, *P. plantarii* und *P. glumae* aus der RNA-Homologie-Gruppe II (Palleroni et al., 1973) der Gattung *Burkholderia* (Yabuuchi et al., 1992) zuzuordnen.

Andrä et al. beschrieben 2006 erstmalig die Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii*. Sie kultivierten den Stamm *B. plantarii* DSM 6535 in einem halbsynthetischen Medium mit Sojabohnenöl als C-Quelle (Zähringer et al., 1997). Sie extrahierten 10 g Biomasse und erhielten ca. 3 mg eines Rhamnolipids, bestehend aus zwei Rhamnoseresten und einer β -Hydroxytetradekansäure ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}$), das eine strukturelle Ähnlichkeit zu Rhamnolipid 1 von *P. aeruginosa* aufwies (s. Abb. 1.3). Sie erhielten außerdem ca. 2,9 mg eines weiteren Rhamnolipids, bestehend aus zwei Rhamnoseresten und drei β -Hydroxytetradekansäuren ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$) und schließlich ein drittes Rhamnolipid, das sich aus zwei Rhamnoseresten und zwei β -Hydroxytetradekansäuren zusammensetzte ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$). Dieses Rhamnolipid wurde bereits von Häussler et al. (1998) beschrieben und weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Rhamnolipid 3 von *P. aeruginosa* auf (s. Abb. 1.7).

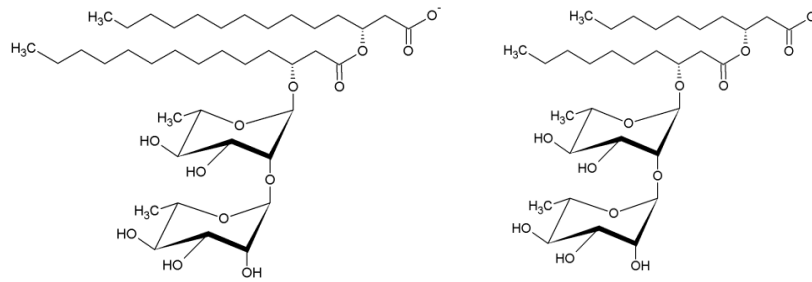


Abb. 1.7 links: Das von *Burkholderia plantarii* hauptsächlich gebildete Rhamnolipid-Kongener 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- α (R)-3-hydroxytetradecanoyl-(R)-3-hydroxydecanoat (Rha₂-C₁₄-C₁₄). Rechts: Rhamnolipid 3 (Rha₂-C₁₀-C₁₀) von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Struktur beider Rhamnolipide ist einander sehr ähnlich.

Andrä et al. (2006) untersuchten das Kongener Rha₂-C₁₄-C₁₄ bezüglich seiner pathophysiologischen Aktivitäten und fanden, dass Rha₂-C₁₄-C₁₄ bei einer Konzentration von bis zu 256 μ g/mL alleine keine antimikrobielle Wirkung gegen das Wachstum von *Escherichia coli* ATCC 23716 und *Staphylococcus aureus* zeigt, aber sehr stark menschliche Immunzellen stimuliert, wie es auch Lipopolysaccharide (LPS) tun. Des Weiteren ist Rha₂-C₁₄-C₁₄ in der Lage, in biologische Membranen, wie die von Makrophagen, zu interkalieren. In wässrigen Lösungen kann es lamellare bis kubische Aggregate bilden, wobei die Bildung von kubischen Aggregaten unter fast physiologischen Bedingungen eine Voraussetzung für biologisch aktive Endotoxine ist (Andrä et al., 2006).

Andrä et al. (2006) haben gezeigt, dass *B. plantarii* DSM 6535 Rhamnolipide bildet. Allerdings beschrieben Andrä et al. (2006) weder den Verlauf der Rhamnolipid-Bildung während der Kultivierung noch die Ausbeuten. Dies wäre aber sehr wichtig bezüglich einer Optimierung der Rhamnolipid-Produktion in *B. plantarii*.

1.4 Ziele der Arbeit

Bisher werden Rhamnolipide hauptsächlich mit dem Stamm *Pseudomonas aeruginosa* produziert (Abdel-Mawgoud et al., 2011). Dies ist von industrieller Seite aus nicht wünschenswert, da es sich hierbei um einen human-pathogenen Keim handelt (Bodey et al., 1983). Nicht-pathogene Stämme bieten die Möglichkeit das Produktspektrum zu erweitern und die Akzeptanz beim Endverbraucher zu steigern. Im Rahmen einer Dissertation (Walter, 2009) wurden bereits elf nicht-pathogene Stämme auf eine Rhamnolipid-Produktion untersucht.

Als vielversprechende Kandidaten erwiesen sich die beiden Stämme *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T und DSM 6535. Mit beiden Stämmen wurde eine Ausbeute von 0,3 bis 0,4 g/L RE im Parallelbioreaktor erreicht (Walter, 2009). Beide Stämme synthetisieren Rhamnolipide, welche längere β -Hydroxyfettsäuren besitzen als die Rhamnolipide von *P. aeruginosa*. Durch die längeren Fettsäuren würden sich diese Rhamnolipide wahrscheinlich sehr gut für den Einsatz in Reinigungsmitteln eignen.

Der Stamm *B. plantarii* DSM 9509^T war von besonderem Interesse, da er bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Rhamnolipid-Bildner beschrieben worden war. Daher wurde mit diesem Stamm in der vorliegenden Arbeit gearbeitet.

Das erste Ziel dieser Arbeit war, eine Rhamnolipid-Referenz-Substanz herzustellen und mit dieser eine quantitative Methode zur Bestimmung der Rhamnolipidkonzentration in der Kulturbrühe von *B. plantarii* DSM 9509^T zu etablieren. Des Weiteren sollten die Reinheit und Zusammensetzung, die kritische Mizellbildungskonzentration sowie der Schmelzpunkt der Referenz-Substanz analysiert werden.

Ein weiteres Ziel war die grundlegende Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung des Stammes in Vollmedium. Hierfür sollten die Rhamnolipide in der Kulturbrühe mit der zuvor erhaltenen Referenz-Substanz quantitativ bestimmt werden. Des Weiteren sollten wichtige Wachstumsparameter wie die Produkt- und Substrat-Ausbeute, sowie spezifische Wachstums- und Produktbildungsrate ermittelt werden.

Da mit *P. aeruginosa* hohe Rhamnolipidkonzentrationen in Minimalmedium erreicht werden, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T in einem Minimalmedium. Da kein geeignetes Minimalmedium für *B. plantarii* DSM 9509^T existierte, sollte eine Elementaranalyse des Stammes durchgeführt werden, um anhand der Ergebnisse ein Minimalmedium auslegen zu können. Durch Änderungen des Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisses und Supplementierung des Minimalmediums in verschiedenen Ansätzen sollte die Rhamnolipid-Bildung in diesem Minimalmedium charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten, die eine höhere Produktivität als der Wildtyp aufweisen sollten. Um entsprechende UV-Mutanten innerhalb der erstellten Mutantenbank lokalisieren zu können sollte eine Methode entwickelt werden, mit der die UV-Mutanten im Hochdurchsatz auf Rhamnolipid-Produktion gescreent werden können.

2. Material

2.1 Chemikalien

Eine Liste mit den verwendeten Chemikalien ist im Anhang zu finden.

2.2 Lösungen

2.2.1 Allgemeine Lösungen

Saline

Saline wurde hergestellt, indem 9 g NaCl in 1000 mL VE-H₂O gelöst wurden.

Pufferlösungen

Es wurden vier Pufferstammlösungen mit einer Konzentration von je 1 M hergestellt (s. Tab. 2.1). Aus diesen Stammlösungen wurden bei Bedarf durch Verdünnung weitere niederkonzentriertere Puffer hergestellt.

Tab. 2.1: Herstellung der 1 M Pufferstammlösungen.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Komponente</i>	<i>Einwaage [g/L]</i>
Stammlösung 1	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156,01
Stammlösung 2	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	178,01
Stammlösung 3	(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	115,03
Stammlösung 4	(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,06

0,5 N Natriumhydroxid

0,5 N Natriumhydroxid wurde gemäß Tab. 2.2 hergestellt.

Tab. 2.2: Herstellung von 0,5 N NaOH.

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration [g/L]</i>
NaOH	20 g
	ad 1000 mL

1 N Salzsäure

Zur Herstellung einer 1 N Salzsäure-Lösung wurden 902 mL VE-H₂O vorgelegt und 98 mL einer 32%-igen Salzsäure-Lösung zugegeben.

4 M Phosphorsäure

Zur Herstellung einer 4 M Phosphorsäure-Lösung wurden 729 mL VE-H₂O vorgelegt und 271 mL einer 85%-igen ortho-Phosphorsäure-Lösung zugegeben.

2.2.2 Lösungen für analytische Zwecke

Jeneil JBR425

Laut Hersteller (Jeneil Biosurfactants Company, Saukville, USA) handelt es sich bei Jeneil JBR425 um eine 25%-ige wässrige Lösung des Produktes JBR480. JBR480 enthält in über 80%-iger Reinheit die Rhamnolipide 1 und 3 von *Pseudomonas aeruginosa*.

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

Das Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie bestand aus 65 Teilen Chloroform, 15 Teilen Methanol und 2 Teilen Essigsäure.

Färbung der Zuckerreste

Zum Färben der Zuckerreste der Rhamnolipide wurde eine Färbelösung verwendet. Sie bestand aus 50 Teilen Essigsäure, 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure und 0,5 Teilen Anisaldehyd.

Färbung der β -Hydroxyfettsäuren

Es wurde eine Ceriumsulfat-/Ammoniummolybdat-Lösung zum Färben der β -Hydroxyfettsäuren der Rhamnolipide verwendet (s. Tab. 2.3)

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Ceriumsulfat-/Ammoniummolybdat-Lösung.

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage/Volumen</i>
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	1,14 g
Ce(SO ₄) ₄ ·4 H ₂ O	0,50 g
H ₂ SO ₄ (konz.)	15,50 mL
VE-H ₂ O	250 mL

Methylenblau-Lösung

Die Methylenblau-Stammlösung wurde mit einer Konzentration von 0,5 g/L mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

Derivatisierungslösungen

In dieser Arbeit wurden folgende Lösungen verwendet, um die Rhamnolipide zu derivatisieren (s. Tab 2.4):

Tab. 2.4: Lösungen zum Derivatisieren der Rhamnolipide

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage/Volumen</i>	<i>Konzentration [mM]</i>
2,4'-Dibromoacetophenon	111,18 mg in 10 mL Methanol	40
2,4'-Dibromoacetophenon	55,59 mg in 10 mL Methanol	20
2,4'-Dibromoacetophenon	111,18 mg in 10 mL Acetonitril	40
2,4'-Dibromoacetophenon	55,59 mg in 10 mL Acetonitril	20
2-Bromo-2'-acetonaphthon	99,64 mg in 10 mL Dimethylformamid	40
2-Bromo-2'-acetonaphthon	49,82 mg in 10 mL Dimethylformamid	20
2,4'-Dibromoacetophenon	111,18 mg in 10 mL Dimethylformamid	40
2,4'-Dibromoacetophenon	55,59 mg in 10 mL Dimethylformamid	20
Triethylamin	27,88 µL in 10 mL Methanol	20
Triethylamin	55,75 µL in 10 mL Methanol	40
Triethylamin	27,88 µL in 10 mL Acetonitril	20
Triethylamin	55,75 µL in 10 mL Acetonitril	40
Diisopropylethylamin	34,84 µL in 10 mL Dimethylformamid	20
Diisopropylethylamin	69,67 µL in 10 mL Dimethylformamid	40

HPLC-Laufmittel

Laufmittel A bestand aus 5% Methanol und 95% bidestilliertem Wasser. Laufmittel B bestand aus 95% Methanol und 5% bidestilliertem Wasser.

Laufmittel für die Mitteldruckchromatographie-Anlage

Für die Chromatographie nach Andrä et al. (2006) wurden Chloroform und Methanol verwendet. Für die Chromatographie nach Bauer et al. (2006) wurden 30 Teile Chloroform, 3 Teile Methanol und 1 Teil Essigsäure eingesetzt. Für die *reversed phase* Chromatographie wurden dieselben Laufmittel wie für die HPLC eingesetzt. Laufmittel A bestand aus 5% Methanol und 95% bidestilliertem Wasser; Laufmittel B bestand aus 95% Methanol und 5% bidestilliertem Wasser.

2.3 Medien

Nutrient Agar und Nutrient Broth

Nutrient Broth (NB) wurde zur Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T und zur Kultivierung der UV-Mutanten verwendet (s. Tab. 2.5). Des Weiteren diente es als Konservierungsmedium für die Glyzerolstocks.

Tab. 2.5: Zusammensetzung von Nutrient Broth.

Lösung 1

Komponente	Konzentration [g/L]
Proteose-Pepton	5
Fleischextrakt	3
ad 800 mL, pH 7	

Lösung 2

Komponente	Konzentration [g/L]
Glukose	10
ad 200 mL	

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und danach vereinigt. Um Nutrient Agar (NA) herzustellen, wurden zur Lösung 1 zusätzlich 15 g/L Agar gegeben. Für die Konservierung in 384er Mikrotiterplatten wurde das NB-Medium mit zusätzlich 30 g/L Glyzerol versetzt.

Minimalmedium für Burkholderia plantarii DSM 9509^T

Anhand einer Elementaranalyse von *B. plantarii* DSM 9509^T wurde ein Minimalmedium ausgelegt (s. Tab. 2.6). Das Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis betrug 0,8. Um die Rhamnolipid-Produktion in diesem Medium zu charakterisieren, wurde dieses Medium auch mit Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnissen von 0,075 sowie 0,29 und 1,25 hergestellt. Des Weiteren wurde das Medium für die Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung unterschiedlich supplementiert. Im ersten Ansatz wurde das Minimalmedium wie es ausgelegt wurde als Referenz verwendet. Im zweiten Ansatz wurde die Eisenkonzentration um den Faktor 10 erhöht, im dritten Ansatz wurde die Konzentration an Spurenelementen um den Faktor 10 erhöht, im vierten Ansatz wurden Vitamine zugegeben (s. Tab. 2.7) und im fünften Ansatz 50 mg Proteose-Pepton und 30 mg Fleischextrakt.

Tab. 2.6: Zusammensetzung des ausgelegten Minimalmediums.

Lösung 1 - Glukose

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage [g]</i>
Glukose	10
ad 100 mL, getrennt autoklavieren	

Lösung 2 – Phosphatpuffer

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [mL]</i>
1 M (NH ₄)H ₂ PO ₄	38,7
1 M (NH ₄) ₂ PO ₄	61,3
ad 800 mL, pH 7, getrennt autoklavieren	

Lösung 3 - Salze

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage [g]</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,404
K ₂ SO ₄	0,072
MgSO ₄	0,097
NaCl	0,238
ad 100 mL, getrennt autoklavieren	

Lösung 4 – 100x SEL

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage [mg]</i>
FeCl ₂ · 4H ₂ O	36,43
ad 100 mL, sterilfiltrieren, 10 mL zu 1L Medium	

Lösung 5 – 1000x SEL

<i>Komponente</i>	<i>Einwaage [mg]</i>
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	562,61
CaCl ₂ · 2H ₂ O	172,06
CuCl ₂ · 2H ₂ O	68,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	21,51
CoCl ₂ · 6H ₂ O	17,22
MnCl ₂ · 4H ₂ O	15,36
C ₆ H ₈ O ₇	4242,50
ad 500 mL, sterilfiltrieren, 1 mL zu 1L Medium	

Die Lösungen 1, 2 und 3 wurden getrennt autoklaviert und dann vereinigt. Die Lösungen 4 und 5 wurden sterilfiltriert. Von Lösung 4 wurden nach dem Sterilfiltrieren 10 mL zu 1 L Medium gegeben. Von Lösung 5 wurde 1 mL zugegeben.

Tab. 2.7: Vitamine, die zur Supplementierung des Minimalmediums eingesetzt wurden.

<i>Komponente</i>	<i>Synonym</i>	<i>Stoffmenge im Medium [μM]</i>
4-Aminobenzoessäure	Baustein von B9 (Folsäure)	0,146
D(+)-Biotin	Vitamin B7	0,016
Cyanocobalamin	Vitamin B12	0,030
Nicotinsäure	Vitamin B3	0,325
Calcium-D(+)-pantothenat	Vitamin B5	0,042
Pyridoxal-5'phosphat-monohydrat	Vitamin B6	0,377
Thiaminchlorid-hydrochlorid	Vitamin B1	0,059

2.4 Software

Das Prozessleitsystem für die Fermentationen mit dem Sixfors Parallelbioreaktor war *Iris NT Version 5.01.507.0000*.

Zum Bearbeiten und Exportieren der Daten wurde das Programm *Iris History Viewer Version 5.01 Build 0411* verwendet.

Das Kontrollprogramm für die Büchi Mitteldruckchromatographie-Anlage war *SepacoreControl 1.0.3000.1 Standard Edition*.

Das Kontrollprogramm für die HPLC-Anlage war *ChemStation for LC 3D Rev.A.10.02 [1757]* von Agilent Technologies.

3. Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Stamm und Stammhaltung

Der Stamm *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben. Der Stamm wurde bis zur weiteren Verwendung als Glycerolstock eingefroren. Die Herstellung der Glycerolstocks wurde wie folgt durchgeführt:

Die Ampulle, die von der DSMZ erhalten worden war und welche das lyophilisierte Pellet von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T enthielt, wurde gemäß den Angaben der DSMZ geöffnet und das Pellet in 500 µL Nutrient Broth für 30 min bei Raumtemperatur rehydriert. Zur Reinheitskontrolle wurden 100 µL der Suspension auf eine Agarplatte ausgestrichen. Der Rest wurde in 20 mL Flüssigmedium überführt. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei der von der DSMZ empfohlenen Temperatur (30°C) inkubiert und mit 130 rpm geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden 500 µL der Übernachtskultur in 20 mL frisches Medium gegeben und die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm (OD_{580}) verfolgt. Sobald eine OD_{580} von ca. 1 erreicht worden war, wurden 850 µL der Kultur in ein Stammhaltungsröhrchen überführt und zur Konservierung 150 µL Glycerin zugegeben. Die Glycerolstocks wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Probenbehandlung und Herstellung des Rohextraktes

Proben, die entweder aus einem Schüttelkolben oder dem Bioreaktor gezogen worden waren, wurden, wenn nicht anders vermerkt, als erstes für 30 min bei 4618 g und 4°C zentrifugiert. Um die Rhamnolipide auszufällen wurde der Überstand mit 0,01 Vol. Phosphorsäure (85%-ig) angesäuert.

Für die Extraktionen wurden 1,25 Vol. Ethylacetat zugegeben und 1 min gevortext. Um die wässrige und die organische Phase zu trennen wurden die Proben 10 min zentrifugiert (4618 g, 4°C). Anschließend wurde die benötigte Menge Ethylacetat-Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde wiederholt und der Rohextrakt bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für eine quantitative Bestimmung der Rhamnolipide mittels HPLC wurden die Proben unter einen Abzug gestellt und das Ethylacetat vollständig evaporiert.

Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte der Bakterienkulturen wurde mit einem Photometer (Amersham Biosciences Ultrospec™ 1100 pro, GE Healthcare) bestimmt. Hierfür wurde die Kultur in eine Plastikkuvette gefüllt und diese in die Messzelle des vorher gegen Luft genullten Photometers gestellt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 580 nm (OD_{580}) gemessen. Bei einer $OD_{580} > 0,5$ wurde die Probe geeignet verdünnt. Als Leerwert wurde Saline oder das entsprechende Medium verwendet.

Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Proben wurden als erstes zentrifugiert (4618 g, 30 min, 4°C). Bevor das Pellet dekantiert wurde, wurde etwas Überstand zur Bestimmung der Glukose-Konzentration im Medium entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Danach wurde das Pellet dekantiert und mit 1 Vol. Saline gewaschen. Die Probe wurde ein zweites Mal zentrifugiert, das Pellet dekantiert und über Nacht bei 100°C im Wärmeschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben in einen Exsikkator gegeben. Nach dem Abkühlen wurde die Biotrockenmasse gravimetrisch bestimmt.

Bestimmung der Glukose-Konzentration

Die Glukose-Konzentration im Überstand wurde enzymatisch (D-Glukose Assay, Roche) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bestimmung der Stickstoff-Konzentration

Die Messung der Stickstoff-Konzentration im Überstand erfolgte photometrisch (Spectroquant Ammonium-Test, Merck) gemäß den Angaben des Herstellers bei einer Wellenlänge von 690 nm.

Herstellung des Jeneil-Standards für die Dünnschichtchromatographie

Als Standard für die Dünnschichtchromatographie wurde Jeneil JBR425 verwendet (s. 2.2.2). Bei Jeneil JBR425 handelte es sich um eine wässrige Lösung. Bei

wässrigen Lösungen verdampft das Wasser nach dem Auftragen auf die DC-Platte allerdings nur sehr langsam. Des Weiteren kann es zu Artefakten im Laufverhalten kommen, wenn Proben in wässriger und organischer Phase gemeinsam auf eine Platte aufgetragen werden. Da von allen Proben die Rohextrakte auf die DC-Platten aufgetragen wurden, wurde auch von Jeneil JBR ein solcher hergestellt. Hierfür wurden 100 µL von Jeneil JBR425 in 1000 µL eines 0,1 M Natrium-Phosphatpuffers (pH 7) gegeben und gemischt. Dann wurden 10 µL konzentrierte Phosphorsäure (85%-ig) zugegeben und zweimal mit 1,25 mL Ethylacetat extrahiert. Die obere organische Phase, welche die Rhamnolipide enthielt, wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Dünnschichtchromatographie

Um die Rhamnolipide qualitativ zu bestimmen wurden Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Für die Dünnschichtchromatographie wurde eine Trogkammer (CAMAG oder Duran) mit frischem Laufmittel gefüllt. Das Laufmittel bestand aus 65 Teilen Chloroform, 15 Teilen Methanol und 2 Teilen Essigsäure. Es wurde ca. 30 min gewartet, bis der Dampfraum in der Kammer mit Laufmittel gesättigt war. Auf die Kieselgelplatten (Alugram SIL G, Machery Nagel) wurden der Jeneil-Standard (organischer Extrakt von Jeneil JBR425) und die Rohextrakte der entsprechenden Proben pipettiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 50 µL Probe und 2,5 µL Jeneil-Standard aufgetragen.

Die Platte wurde dann in die gesättigte Kammer gestellt. Sobald die Laufmittelfront ca. 1 cm unter dem oberen Rand der Platte angekommen war, wurde die Platte herausgenommen und trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurde die Platte kurz in die entsprechende Färbelösung getaucht und wiederum trocknen gelassen. Die Zuckerreste der Rhamnolipide wurden mit Anisaldehyd angefärbt; die Fettsäuren mit einer Ceriumsulfat-/Ammoniummolybdat-Lösung (s. 2.2.2). Schließlich wurde die Platte mit einem Heißluftfön (HL 2010 E, Steinel) bei 100-150°C entwickelt und danach zur graphischen Dokumentation eingescannt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der Rhamnolipide erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Agilent 1100 System, Agilent Technologies, Santa

Clara, USA) mit einer *reversed phase* Säule (SUPELCOSIL™ LC-18). Die Anlage war mit zwei Pumpen, einem Autosampler und einem variablen Wellenlängendetektor ausgestattet. Das Programm war wie folgt:

0 – 4 min:	70 % Laufmittel B
4 – 14 min:	von 70 % auf 100 % Laufmittel B
14 – 28 min:	100 % Laufmittel B
28 – 33 min:	von 100 % Laufmittel B auf 70 % Laufmittel B
33 – 38 min:	70 % Laufmittel B

Die Chromatographie wurde bei 25°C Säulentemperatur und mit einer Flussrate von 0,8 mL/min durchgeführt. Detektiert wurde bei 254 nm.

3.2 Herstellung und Charakterisierung einer Referenz-Substanz

Es sollte eine Rhamnolipid-Referenz-Substanz hergestellt werden, mit der eine Analytik zur quantitativen Bestimmung der Rhamnolipide von *B. plantarii* DSM 9509^T etabliert werden konnte. Des Weiteren sollte die Zusammensetzung und Reinheit der Referenz-Substanz sowie die kritische Mizellbildungskonzentration und der Schmelzpunkt bestimmt werden.

3.2.1 Herstellung der Referenz-Substanz

Die Referenz-Substanz wurde durch Aufreinigen eines Rohextraktes von *B. plantarii* DSM 9509^T hergestellt. Dieser Rohextrakt wurde aus einer Fermentation von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T unter nicht optimierten Bedingungen erhalten (Walter V, 2009). Der Rohextrakt wurde mit drei aufeinanderfolgenden chromatographischen Schritten an einer Mitteldruckchromatographie-Anlage aufgereinigt. Die Anlage war mit zwei Pumpen, einem Fraktionssammler, einem UV-Monitor und einem Differential-Refraktometer ausgestattet.

Chromatographie nach Andrä

Bei der Chromatographie in Anlehnung an Andrä et al. (2006) wurde eine *normal phase* Kieselgelsäule (Länge 150 mm, Durchmesser 40 mm) verwendet (s. Abb. 3.1). Es wurde eine Flussrate von 45 mL/min eingestellt. Als Laufmittel wurden Chloroform

und Methanol verwendet. Die Anlage mischte die beiden Lösungsmittel für die sieben Stufen der Elution wie folgt zusammen (Chloroform:Methanol): 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 60:40, 50:50 und 0:100. Das Säulenvolumen betrug 377 mL. Pro Stufe wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen, also 1508 mL, eluiert. Ein Lauf dauerte in etwa 4 h und die Elution auf einer Stufe ca. 33,5 min. Der Efflux der ersten 80 min (Stufe 1, Stufe 2, teilweise Stufe 3) wurde als Vorlauf verworfen. Danach wurden insgesamt 120 Fraktionen mit einem Volumen von je 60 mL gesammelt.



Abb. 3.1: Fotografien der präoperativen Säule während der Durchführung der Chromatographie in Anlehnung an Andrä. Es wurden 5 g Rohextrakt auf die Säule gegeben. Die einzelnen Bilder wurden in zeitlichen Abständen von etwa 30 min aufgenommen.

Das Chromatographie-Verfahren nach Andrä et al. (2006) wurde mehrmals durchgeführt. Laut Hersteller kann eine große Kieselgelsäule (Länge 150 mm, Durchmesser 40 mm) mit maximal 5 g Probe beladen werden. Daher wurde die Säule einmal mit 2,5 g Probe (Stufenchromatographie A) und einmal mit 5 g Probe (Stufenchromatographie B) beladen. Als Vorbereitung wurde eine Lösung von Rohextrakt in Chloroform mit der Konzentration $c_{\text{Rohextrakt}}: 250 \text{ g/L}$ angesetzt. Bei maximaler Menge an Produkt wurden 20 mL (entsprachen 5 g Rohextrakt) dieser Lösung über eine Spritze in das System injiziert.

Bei der halbmaximalen Menge wurde die Ausgangslösung mit Chloroform auf eine Konzentration von $c_{\text{Rohextrakt}}: 125 \text{ g/L}$ verdünnt und anschließend ebenfalls 20 mL (entsprachen 2,5 g Rohextrakt) injiziert.

Zur Auswertung wurden 15 μL jeder zweiten Fraktion auf eine DC-Platte aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd (s. 2.2.2) angefärbt. Alle Fraktionen, bei denen gelbe Rhamnolipid-Flecken auf der Platte zu sehen waren, wurden vereinigt und die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer evaporiert.

Chromatographie nach Bauer

Bei der Chromatographie nach Bauer et al. (2006) handelt es sich um eine isokratische Chromatographie. Als Laufmittel wurden 30 Teile Chloroform, 3 Teile Methanol und 1 Teil Essigsäure eingesetzt. Die Flussrate wurde auf 45 mL/min eingestellt. Es wurden ohne Vorlauf insgesamt 120 Fraktionen mit einem Volumen von je 30 mL gesammelt. Ein Lauf dauerte ca. 80 min.

Es wurden 0,76 g aufgereinigter Rohextrakt aus der Stufenchromatographie A nach Andrä in 15 mL des filtrierten Laufmittels über eine Spritze in das System injiziert. Zur Auswertung wurden 15 µL jeder zweiten Fraktion auf eine DC-Platte aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd (s. 2.2.2) angefärbt.

Das Abdampfen der Lösungsmittel stellte aufgrund der im Laufmittel der isokratischen Chromatographie eingesetzten Essigsäure ein Problem dar. Da Essigsäure erst bei relativ hohen Temperaturen verdampft (Siedepunkt: 118°C), bestand durch die Aufkonzentrierung der Essigsäure in Verbindung mit der eingesetzten Wärme im Rotationsverdampfer die Gefahr der hydrolytischen Spaltung der Rhamnolipide. Dieses Problem wurde durch mehrmalige Zugabe des ebenfalls erst bei hohen Temperaturen (Siedepunkt: 111°C) verdampfenden Lösungsmittels Toluol beim Eindampfen des aufgereinigten Extraktes gelöst. Durch die Toluolzugabe konnte eine zu hohe Konzentration an Essigsäure vermieden und das Toluol-Essigsäuregemisch vollständig abgedampft werden.

Die Zugabe von Toluol erfolgte fünf Mal bei einem jeweiligen Restvolumen des Rhamnolipid-Extraktes von 50 mL. Es wurden jeweils 100 mL Toluol zugegeben, bevor das Gemisch komplett evaporiert wurde.

Reversed phase Chromatographie

Die *reversed phase* Chromatographie erfolgte in Anlehnung an die HPLC Methode. Es wurde eine *reversed phase* Säule (RP18 endcapped) verwendet. Diese Säule konnte laut Hersteller mit maximal 400 mg Probe beladen werden. 280 mg aufgereinigter Extrakt aus einer Chromatographie nach Bauer wurden in 15 mL Methanol gelöst und injiziert. Lösungsmittel A bestand aus 5% Methanol und 95% Wasser. Laufmittel B setzte sich aus 95% Methanol und 5% Wasser zusammen. Die Flussrate wurde auf 10 mL/min eingestellt.

Das Programm war wie folgt:

- 0 – 15 min: 70 % Laufmittel B
- 15 – 26 min: von 70 % auf 100 % Laufmittel B
- 26 – 46 min: 100 % Laufmittel B
- 46 – 52 min: von 100 % Laufmittel B auf 70 % Laufmittel B
- 52 – 58 min: 70 % Laufmittel B

Zur Auswertung wurden 10 μL jeder Fraktion auf eine DC-Platte aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd (s. 2.2.2) angefärbt. Die Fraktionen, bei denen gelbe Rhamnolipid-Flecken auf der Platte zu sehen waren, wurden vereinigt und die Lösungsmittel im Rotationsverdampfer evaporiert. Die Reinheit und Struktur der erhaltenen Referenz-Substanz wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie bzw. Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

3.2.2 Charakterisierung der Referenz-Substanz

Die Reinheit der Referenz-Substanz wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestimmt. Die Strukturaufklärung der Rhamnolipid-Kongener erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) wurde mit der Plattenmethode nach Wilhelmy bestimmt.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die ^1H -NMR-Spektren wurden auf einem NMR-Spektrometer (AC 250 (250 MHz), Bruker Optics, Ettlingen, Deutschland) bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden Chloroform- d_1 , und DMSO- d_6 (Eurisotop, Saint-Aubin, Frankreich) verwendet. Chemische Verschiebungen δ wurden in parts per million (ppm) angegeben; dabei diene als Referenz für die ^1H -NMR-Spektroskopie das jeweilige Lösungsmittel: Chloroform (^1H : $\delta=7,26$ ppm), DMSO (^1H : $\delta=2,50$ ppm).

Charakterisierung der Signalaufspaltung: s=Singulett, s d=Singulett+Dublett durch Kopplung mit ^{195}Pt , d d=Dublett+Dublett (von Dubletts) durch Kopplung mit ^{195}Pt , d=Dublett, t=Triplett, q=Quartett, quin=Quintett, sext=Sextett, bs=breites Singulett, m=Multiplett, dd=Dublett vom Dublett, dt=Dublett vom Triplett, td=Triplett vom

Dublett. dq=Dublett von Quartett. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Sämtliche Kopplungskonstanten wurden als Betrag in Hertz (Hz) angegeben. Abkürzungen für Zuordnungen der Signale: $C_{Ar}H$ =aromatisch, C_{Ar} =aromatisch, $C_{Pyr}H$ =Pyran, C_{Pyr} =Pyran, C_{CO} =Cyclooctadien.

Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen stand ein Tandem-Massenspektrometer (API 4000, Applied Biosystems, Foster City, USA) mit einem *Turbo Ion Spray-Interface* für die Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Applied Biosystems MDS SCIEX, Toronto, Kanada) zur Verfügung. Die jeweiligen Geräteeinstellungen des Massenspektrometers (Spannungen, Temperaturen, Gasflüsse usw.) wurden mit Hilfe von Infusionsexperimenten unter Verwendung einer Spritzenpumpe der Firma Harvard Apparatus Inc. (South Natick, USA) optimiert. Als Schutz-, Zerstäuber-, Hilfs- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet.

Für die Infusionsexperimente wurde die Referenz-Substanz in Methanol/10 mM Ammoniumacetat (1:1, v/v) gelöst. Bei ESI wurde die Referenz-Substanz direkt über die Spritzenpumpe bei einem Fluss von 10 μ L/min in das interface infundiert. Die Ionisierung erfolgte im negativen Modus bei einer Spannung von -4500 Volt.

Die Referenz-Substanz wurde sowohl unter einfachen MS-Bedingungen (Q1-Scan) zur Auswahl und Überprüfung geeigneter Target-Ionen, als auch zur strukturellen Identifizierung mit Hilfe von MS/MS-Experimenten (Product Ion Scan, PIC) analysiert.

Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)

Um die CMC der Referenz-Substanz zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von 200 mg/L hergestellt. Ca. 5 mL jeder Verdünnungsstufe wurden in ein Probengefäß überführt und die Oberflächenspannung mit einem digitalen Tensiometer (K10 T, Krüss, Deutschland) gemessen. Es wurde die Wilhelmy-Plattenmethode angewandt. Die Messtemperatur lag in Anlehnung an Abalos et al. (2011) bei 25°C.

Bestimmung des Schmelzpunktes

Die Referenz-Substanz wurde in ein Probenröhrchen gegeben und dieses in einen Apparat zur Schmelzpunktbestimmung (Electrothermal Melting Point Apparatus,

Electrothermal Engineering Limited, Rochford, England) eingesetzt. Die grobe Temperaturregelung wurde auf einen Temperaturbereich von 105-145°C eingestellt und mit einer Feineinstellung entsprechend nachreguliert. Der Schmelzpunkt wurde als erreicht definiert, wenn eines der folgenden Anzeichen zu beobachten war: erste Zeichen von Veränderung der Substanz, erste Anzeichen von Flüssigkeitsbildung, Bildung eines Meniskus oder Bildung einer völlig klaren Flüssigkeit.

3.2.3 Entwicklung einer Methode zur Derivatisierung der Rhamnolipide

Für die Derivatisierung der Rhamnolipide von *P. aeruginosa* wird üblicherweise die Methode von Schenk et al. (1995) angewandt. Hierfür wird Acetonitril als Lösungsmittel, Triethylamin zur Neutralisierung der möglicherweise entstehenden Bromwasserstoffsäure und 2,4'-Dibromoacetophenon als Kopplungsreagenz verwendet (Schenk et al., 1995). Die Referenz-Substanz, welche aus dem Rohextrakt von *B. plantarii* DSM 9509^T erhalten wurde, löste sich allerdings nur schlecht in Acetonitril.

Um die Derivatisierung zu optimieren wurde neben der Methode nach Schenk zusätzlich die Fettsäurederivatisierung nach Cooper und Anders (1974) angewandt. Bei der Fettsäurederivatisierung nach Cooper wird Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet, in welchem die Referenz-Substanz sehr gut löslich war. In weiteren Versuchen wurden Methanol und Formamid als Lösungsmittel eingesetzt. Mit allen Lösungsmitteln wurde jeweils eine 1 mM Lösung der Referenz-Substanz hergestellt (s. Tab. 3.1). Als Kopplungsreagenz wurde entweder 2,4'-Dibromoacetophenon (Schenk et al., 1995) oder 2-Bromo-2'acetonaphthon (Cooper und Anders, 1974) verwendet (s. Tab. 3.1).

Zur Neutralisierung der möglicherweise entstehenden Bromwasserstoffsäure wurde entweder das tertiäre Amin Triethylamin (Schenk et al., 1995) oder tertiäre Amin Diisopropylethylamin (Cooper und Anders, 1974) eingesetzt. Das Verhältnis von Kopplungsreagenz zu tertiärem Amin war 2:1 (Schenk et al., 1995) oder 1:2 (Cooper und Anders, 1974), (s. Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Übersicht über die eingesetzten Reagenzien bei der Derivatisierung der Referenz-Substanz. ACN: Acetonitril, DIPEA: Diisopropylethylamin, DMF: Dimethylformamid, F: Formamid, MeOH: Methanol, Naphthon: 2-Bromo-2'acetonaphthon, Phenon: 2,4'-Dibromoacetophenon, RS: Referenz-Substanz, $C_K:C_A$: molares Verhältnis von Kopplungsreagenz zu tertiärem Amin.

Versuch	RS in Lösemittel	Kopplungsreagenz	Tertiäres Amin	$C_K:C_A$
1	1 mM RS in MeOH	40 mM Phenon in MeOH	20 mM TEA in MeOH	2:1
2	1 mM RS in MeOH	20 mM Phenon in MeOH	40 mM TEA in MeOH	1:2
3	1 mM RS in F	40 mM Phenon in ACN	20 mM TEA in ACN	2:1
4	1 mM RS in F	20 mM Phenon in ACN	40 mM TEA in ACN	1:2
5	1 mM RS in DMF	40 mM Naphthon in DMF	20 mM DIPEA in DMF	2:1
6	1 mM RS in DMF	20 mM Naphthon in DMF	40 mM DIPEA in DMF	1:2
7	1 mM RS in DMF	40 mM Phenon in DMF	20 mM DIPEA in DMF	2:1
8	1 mM RS in DMF	20 mM Phenon in DMF	40 mM DIPEA in DMF	1:2

Für die Derivatisierung wurde die 1 mM Lösung der Referenz-Substanz mit 0,1 Vol. einer frisch hergestellten Kopplungsreagenz-Lösung und 0,1 Vol. einer ebenfalls frisch hergestellten Lösung eines tertiärenamins versetzt. Anschließend wurden die Ansätze für 90 min in einem Thermomixer bei 60°C und 1000 rpm inkubiert und danach in HPLC-Vials überführt. Die Ansätze mit dem 2,4'-Dibromoacetophenon wurden bei 265 nm vermessen. Die Ansätze mit dem 2-Bromo-2'acetonaphthon bei 254 nm (s. 3.1).

Für die Optimierung der Derivatisierungszeit wurde eine Konzentrationsreihe der Referenz-Substanz von 0 bis 0,125 g/L hergestellt. Die Ansätze wurden 90, 120 und 150 min mit den aus dem vorherigen Versuch ermittelten, am besten geeigneten Reagenzien derivatisiert.

3.3 Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T

In diesem Teil der Arbeit wurde die Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Vollmedium und auf Minimalmedium charakterisiert.

3.3.1 Charakterisierung bei Wachstum auf Vollmedium

Um die Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Vollmedium grundlegend zu charakterisieren wurden Kultivierungen des Stammes in einem Parallelbioreaktor (Sixfors, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt.

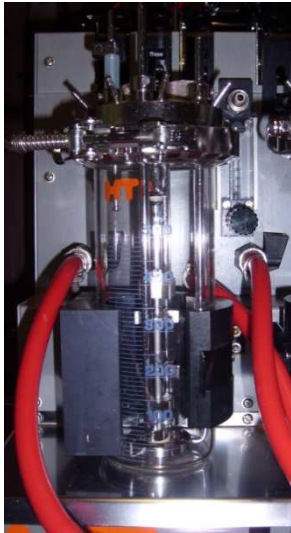
Genereller Aufbau des Parallelbioreaktors

Der Parallelbioreaktor bestand aus sechs voneinander unabhängig betreibbaren Kulturkesseln (Reaktorvolumen je 650 mL), die über eine gemeinsame Kontrolleinheit gesteuert werden konnten (s. Abb. 3.2, I-II). Die Kulturkessel standen auf einer stabilen Metallplatte (Abb. 3.2, III T) und wurden zusätzlich festgeklemmt (Abb. 3.2, III S). Auf der oberen Abdeckung des Gerätes war eine Ablage (Abb. 3.2, III U) für Vorlagenflaschen (Säure, Base, Antischaum) angebracht. Die Kulturkessel (Abb. 3.2, III 3) waren mit einem flachen Boden ausgestattet.

Der Rührerschaft (Abb. 3.2, III Z) wurde mit einer speziellen Vorrichtung (Abb. 3.2, III Y) unterhalb der Deckelplatte (Abb. 3.2, III 1) befestigt und war mit zwei Rushton-Turbinen (Abb. 3.2, III 4, $d=2,6$ cm) bestückt. Zusätzlich war ein Schaumzerstörer (Blatt Geometrie 1:1) oberhalb der Rushton-Turbinen angebracht. Die Turbinen wurden mit einem Magnetrührer (Abb. 3.2, III F und V) angetrieben. Beheizt wurden die Reaktoren über Heizblöcke (Abb. 3.2, III Q). Über eine Ringbrause (sparger, Abb. 3.2, III 5) wurde die Zuluft in das Medium eingeleitet. Mit einem Rotameter (Abb. 3.2, III N) konnte der Gasvolumenstrom eingestellt werden. Der Rührerschaft wurde mit einer Teflonplatte, die am sparger angebracht war (Abb. 3.2, III Y), stabilisiert. Die Deckelplatte (Abb. 3.2, III 1) wurde mit einer Klammer (Abb. 3.2, III X) gesichert und war mit diversen ports (Abb. 3.2, III W, zum Anschluss von Elektroden, Abluftkühler, etc.) ausgestattet.

Die Basis war mit Anschlüssen für pH-, Gelöstsauerstoff- und Antischaum-Elektroden (Abb. 3.2, III H-J), mit Temperaturfühlern (Abb. 3.2, III G), mit Wasserschläuchen und Ventilen für den Abluftkühler (Abb. 3.2, III O und P) und mit peristaltische Pumpen (Abb. 3.2, E) ausgestattet. Des Weiteren verfügte die Basis über eine *memory card* (Abb. 3.2, III D) zum Speichern von Daten, über einen RS232 Port (Abb. 3.2, III C) und einen Verstärker (Abb. 3.2, M). Mittels Display (Abb. 3.2, III A) und Tastatur (Abb. 3.2, III B) konnten über die Software die Fermentationen gestartet und gesteuert werden. Zur Steuerung und Aufzeichnung der Fermentationen wurde das Prozessleitsystem IRIS verwendet.

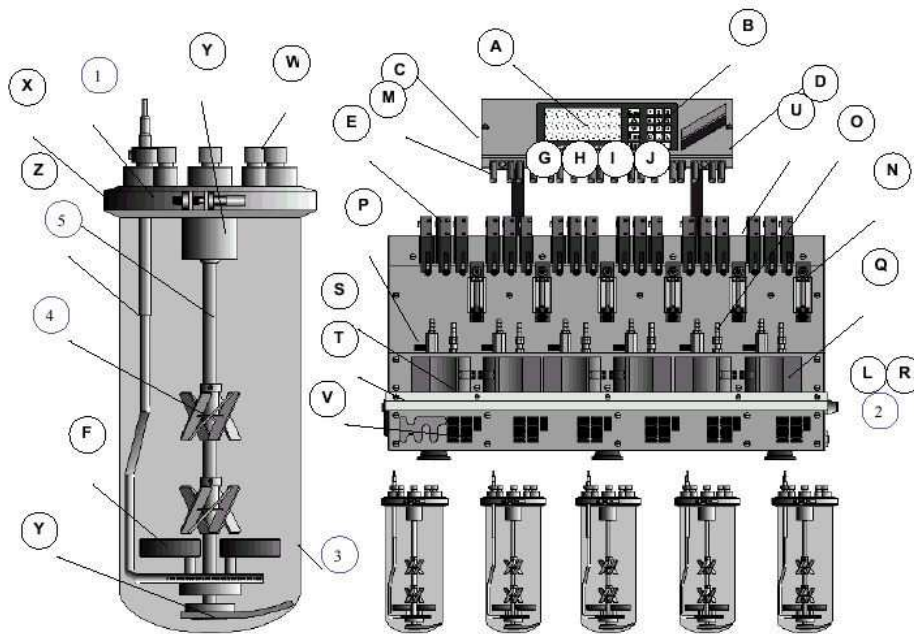
I



II



III



- | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| A= Display | L= Air Inlet | V= Magnetic Stirrer |
| B= Keypad | M= Operational Amplifier | W= Port Fittings |
| C= RS232 Port | N= Rotameter | X= Top Plate Clamp |
| D= Memory Card Slot | O= Water Pipe for Gas Cooler | Y= Support for drive shaft |
| E= Peristaltic Pumps | P= Water Valve for Gas Cooler | Z= Drive Shaft |
| F= Magnets in vessel | Q= Base unit - Heater Block | 1=Top Plate |
| G= Pt-100 Electrode Cable | R= Water Inlet | 2= Overflow Pipe to Drain |
| H= pH Electrode Cable | S= Spring to retain vessel | 3= Vessel Glass |
| I= Oxygen Electrode Cable | T= Vessel Support shelf | 4= Impellers |
| J= Antifoam Probe Cable | U= S. Steel Tray for Bottles | 5= Sparger |
| K=Baffles (not shown, optional) | | |

Abb. 3.2 I: Einzel Bioreaktor des Parallelbioreaktors. II: Das Parallelbioreaktor-System, wie es für die Kultivierungen eingesetzt wurde. III: Schematische Darstellung des Parallelbioreaktor-Systems (InforsHT Sixfors Operating Manual & User Guide, V 3.01). III 4: Der hier dargestellte Rührertyp wurde nicht verwendet. Es wurden Rushton-Turbinen eingesetzt. III 3: Anstelle des gezeigten runden Bodens wurden Kulturkessel mit flachen Böden verwendet.

Der Parallelbioreaktor verfügte auf der rechten Seite über ein Gaseinlassventil (Abb. 3.2, III L), über das Druckluft mit maximal 1 bar eingelassen werden konnte. Die Abluft verließ den Reaktor durch einen angebrachten Abluftkühler mit Filtersystem. Ebenfalls auf der rechten Seite befanden sich Anschlüsse für einen Kühlwasserein- und Kühlwasserauslass (Abb. 3.2, III R und Abb. 3.2, III 2).

Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T

Für die erste Vorkultur wurden 25 mL Nutrient Broth (NB) mit 100 µL eines Glycerolstocks von *B. plantarii* DSM 9509^T in einem 100 mL Schikanekolben inokuliert. Die Kulturen wurden für 18-22 h bei 30°C und 130 rpm inkubiert. Für eine zweite Vorkultur wurden 30 mL NB mit 3,0-3,2 mL aus den ersten Vorkulturen inokuliert. Die zweiten Vorkulturen wurden bei 30°C und 120 rpm bis zu einer OD₅₈₀ von 2,0-2,3 wachsen gelassen. Die Hauptkulturen wurden mit 8,6-8,8 mL aus den zweiten Vorkulturen angeimpft.

Für die Hauptkulturen wurden je 300 mL NB in einen Kulturkessel vorgelegt. Es wurde bei 30°C und pH 7 fermentiert. Die Rührergeschwindigkeit betrug 1100 rpm. Temperatur, pH und Rührergeschwindigkeit wurden während der Fermentation konstant gehalten. Als Korrekturmittel dienten 4 M Phosphorsäure, 25%-iges Ammoniakwasser und das Antischaummittel Contraspum A 4050. Die Zuluft wurde zu Beginn der Fermentation auf 20 L/h eingestellt. Bei starkem Schäumen der Kultur wurde die Zuluft bei allen Reaktoren auf 6 L/h reduziert.

Während der Fermentation wurde stündlich eine Probe zur Bestimmung der Glukose-, der Biotrockenmasse- und der Rhamnolipidkonzentration genommen. Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Glukose-, der Biotrockenmasse- und der Rhamnolipidkonzentration erfolgten wie unter 3.1 beschrieben. Für einen qualitativen Nachweis der Rhamnolipide in der Fermentationsbrühe wurden Dünnschichtchromatographien durchgeführt.

Bestimmung der Polyhydroxybutyrat-Konzentration

Um die Polyhydroxybutyrat-Konzentration in den Zellen zu bestimmen, wurde während der Kultivierung von *B. plantarii* DSM 9509^T im Parallelbioreaktor stündlich 1 mL Probe genommen und zentrifugiert (15 min, 13200 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL Saline gewaschen. Für den Zellaufschluss wurde

die Probe dann in 1 mL Saline resuspendiert und die OD_{580} bestimmt. Bei einer $OD_{580} > 10$ wurde die Probe so verdünnt, dass die OD_{580} maximal 10 war. Die Zellen wurden mit einem Ultraschall-Homogenisator in drei Aufschlusszyklen und mit 40% Amplitude aufgeschlossen. Danach wurde die Probe zentrifugiert (15 min, 13200 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 mL Milipore Wasser gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL Ethanol (vergällt, 96%) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet über Nacht bei 60°C getrocknet. Für die alkalische Polyhydroxybutyrat-Depolymerisierung wurden zu 1 mg getrocknetem Pellet 30 μ L 0,5 N NaOH gegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 85°C und 300 rpm inkubiert. Sobald die Lösung abgekühlt und klar war, wurden pro mg Probe 10 μ L 1N HCL zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die Bestimmung der entstandenen Hydroxybuttersäure erfolgte enzymatisch (D-3-Hydroxybuttersäure-Test, Roche) gemäß den Angaben des Herstellers.

Anpassung der Wachstumskurve

Um die Wachstumsphasen und Produktbildungsraten besser darstellen und entsprechende Raten aus den Daten extrahieren zu können, wurde ein logistisches Modell an die Messdaten angepasst. Die verwendete Gleichung lautete:

$$BTM(t) = BTM_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{t}{t_0}\right)^b}$$

BTM_0 stand für die Biomasse zu Beginn der Fermentation (nach der Inokulation), a stand für die maximale Biomasse ($BTM_{max, add}$), die zusätzlich zu BTM_0 produziert wurde ($BTM_{max} = a + BTM_0$), t_0 gab die Prozesszeit an, bei der die Hälfte der maximal zusätzlich produzierten Biomasse $BTM_{max, add}$ erreicht worden war. Bei dem vierten Parameter b handelte es sich um einen sogenannten Formparameter, der in biologischer Hinsicht schwer zu beschreiben ist (Zwietering et al., 1990). Die Ableitung des Modells wurde zur Bestimmung der spezifischen (μ_{spez}) und maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) durchgeführt. Analog wurde verfahren um die spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate ($q_{RL, spez}$) und die maximale spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate ($q_{RL, spez, max}$) zu erhalten.

3.3.2 Charakterisierung bei Wachstum auf Minimalmedium

Um die Rhamnolipid-Produktion von *B. plantarii* DSM 9509^T auf Minimalmedium charakterisieren zu können, wurde eine Elementaranalyse durchgeführt. Anhand der Ergebnisse konnte ein Minimalmedium ausgelegt werden. Es wurde der Einfluss verschiedener Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisse im Minimalmedium sowie der Einfluss verschiedener Supplementierungen des Minimalmediums auf die Rhamnolipid-Bildung untersucht.

Elementaranalyse

Um eine Elementaranalyse durchführen lassen zu können, wurde der Stamm *B. plantarii* DSM 9509^T in Nutrient Broth fermentiert (s. Abschnitt *Kultivierung von Burkholderia plantarii* DSM 9509^T). Die Zellen wurden nach ca. 7 h Prozesszeit geerntet, da hier die spezifische Wachstumsrate am höchsten war. Die Zellen wurden zentrifugiert (15 min, 4°C, 4618 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Saline resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Biomasse über Nacht bei 100°C im Wärmeschrank getrocknet.

Das Pellet wurde mit einem Mörser zu einem feinen Pulver zerstoßen und eine Elementaranalyse durchgeführt (Currenta, GmbH & Co. OHG, Leverkusen, Deutschland).

Auslegung des Minimalmediums

Die Zusammensetzung der Biotrockenmasse von *B. plantarii* DSM 9509^T wurde in Gewichtsprozent angegeben. Zur Auslegung des Mediums wurde die Menge an Kohlenstoff (in Form von Glukose mit 10 g/L) festgelegt. Um zu wissen wie viel von den anderen Elementen zugegeben werden musste wurde jeweils das Verhältnis des jeweiligen Elementes zu Kohlenstoff berechnet und daraus dann die Salzmenge bzw. die Menge der benötigten Komponente für das Minimalmedium.

Es wurde ein Minimalmedium ausgelegt, welches sich aus fünf Lösungen zusammensetzte (s. 2.3).

Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis

Um den Einfluss des Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisses auf die Rhamnolipid-Produktion von *B. plantarii* DSM 9509^T zu untersuchen wurden Schüttelkolben-Experimente mit verschiedenen Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnissen im Minimalmedium durchgeführt. Es wurden folgende Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisse eingestellt: 0,075; 0,29; 0,80 und 1,25.

Die Vorkulturen (25 mL Nutrient Brot) wurden jeweils mit 350 µL eines Glycerolstocks von *B. plantarii* DSM 9509^T inokuliert und bei 30°C und 130 rpm inkubiert. Sobald eine OD₅₈₀ von ca. 1 erreicht worden war, wurden die Hauptkulturen (50 mL Minimalmedium) mit 100 µL Vorkultur angeimpft und bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Während des Versuchs wurden aus den Schüttelkolben Proben zur Bestimmung der Stickstoff- und der Rhamnolipidkonzentration genommen. Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Stickstoff- und der Rhamnolipidkonzentration erfolgten wie unter 3.1 beschrieben.

Supplementierung des Minimalmediums

Da das Wachstum von *B. plantarii* DSM 9509^T in dem ausgelegten Minimalmedium nicht optimal war, wurde das Minimalmedium in vier Ansätzen mit verschiedenen Substanzen supplementiert (s. 2.3).

In einem Schüttelkolbenexperiment wurde *B. plantarii* DSM 9509^T in jedem Ansatz kultiviert (Doppelbestimmung) und der Einfluss der Supplementierung auf die Biomasse- und die Rhamnolipid-Bildung untersucht.

Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T

Für die erste Vorkultur wurden 25 mL Nutrient Broth mit 100 µL Glycerolstock von *B. plantarii* DSM 9509^T angeimpft. Die Vorkulturen wurden bei 30°C und 130 rpm inkubiert. Für die zweite Vorkultur wurden 50 mL des supplementierten Minimalmediums verwendet. Die Kulturen wurden bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Sobald eine OD₅₈₀ von ca. 2 erreicht worden war, wurden die Hauptkulturen (100 mL Minimalmedium) mit 200 µL aus der zweiten Vorkultur angeimpft und ebenfalls bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Als Referenz diente eine Kultivierung von *B. plantarii* DSM 9509^T in Minimalmedium ohne Supplementierung.

Während des Versuchs wurden aus den Schüttelkolben Proben zur Bestimmung der Biotrockenmasse- und der Rhamnolipidkonzentration entnommen. Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Biotrockenmasse- und der Rhamnolipidkonzentration sind unter 3.1 beschrieben.

3.3 Herstellung und Screening von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten

Die Herstellung und das Screening von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der Firma BRAIN (Biotechnology Research And Information Network) in Zwingenberg, Deutschland. Ziel dieser Arbeit war es, die Produktivität von *B. plantarii* DSM 9509^T durch Generierung von UV-Mutanten zu erhöhen.

Stamm und Stammhaltung

Für die Herstellung der UV-Mutanten wurde der Stamm *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland erworben. Der Stamm wurde in Form von Glycerolstocks gelagert. Für die Herstellung der Glycerolstocks wurden Kulturen von *B. plantarii* DSM 9509^T in Nutrient Broth angelegt. Sobald die Kulturen eine OD₆₀₀ von 1-2 erreicht hatten, wurden 700 µL Kultur entnommen und in ein Stammhaltungsröhrchen überführt. Zur Konservierung wurden 300 µL einer 50%-igen (v/v) Glycerol-Lösung gegeben. Die Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert.

Für eine Lagerung der Zellen in 384er Mikrotiterplatten (MTPs) wurde NB mit 30 g/L Glycerol verwendet.

Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T

Die Schüttelkolbenkulturen wurden bei 30°C und 130 rpm kultiviert. Die Zellen in den 384er oder 96er Mikrotiterplatten wurden bei 30°C in einem TITRAMAX 100 (mit Haube) bei Stufe 9 inkubiert und mit QIAGEN-AirPore tape und einem Deckel verschlossen. MTP 96er wells mit einem Volumen von 2 mL pro quadratischem well wurden wie die MTPs inkubiert; allerdings ohne Deckel auf dem AirPore tape. Alternativ wurden Mikrotiterplatten mit deep wells bei 220 rpm in einem Schüttler inkubiert.

Messung der Optischen Dichte und Bestimmung der Zellzahl

Die Optische Dichte einer Zellsuspension wurde mit einem Photometer (CO 8000 BIOWAVE, Biochrom, England) bei einer Wellenlänge von 600 nm (Bandbreite 40 nm) gemessen.

Für die Mikrotiterplatten wurde ein Spektramax 190 Plus (Bandbreite 2 nm) verwendet. Die Absorption der Chloroformphase wurde bei 650 nm bestimmt. Die Zellzahl wurde durch Ausstreichen geeigneter Verdünnungsstufen der betreffenden Zellsuspension ermittelt.

Herstellung der *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten

Zur Herstellung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten wurde 1 mL einer Kultur, die in Nutrient Broth eine OD₆₀₀ von 2-3 erreicht hatte, abzentrifugiert (3000 g, 5 min) und in phosphat-gepufferter Saline resuspendiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Die Stufen 10⁻⁵ und 10⁻⁶ wurden auf Nutrient Agar (NA) ausplattiert.

Die NA-Platten wurden unter eine Clean Bench gestellt und unterschiedlich lange direkt mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wurde die Raumbeleuchtung möglichst gering gehalten. Nach der Inkubation im Dunkeln wurde die Überlebensrate durch Auszählen der gewachsenen Kolonien in den Verdünnungsstufen und durch den Vergleich mit einer unbestrahlten Kultur bestimmt.

Methylenblau-Assay

Mit Hilfe von Methylenblau ist es möglich, anionische Tenside nachzuweisen. Hierbei bildet das anionische Tensid mit dem Farbstoff Methylenblau ein Ionenpaar, welches mit organischem Lösungsmittel extrahiert werden kann (s. Abb. 3.3). Anhand der dadurch entstehenden Blaufärbung der organischen Phase können anionische Tenside quantitativ bestimmt werden (Jurado et al., 2006).

Da Rhamnolipide eine freie Carboxylgruppe besitzen und somit ein anionisches Tensid darstellen, kann ihre Konzentration mit diesem Verfahren bestimmt werden (Pinzon und Ju, 2009).

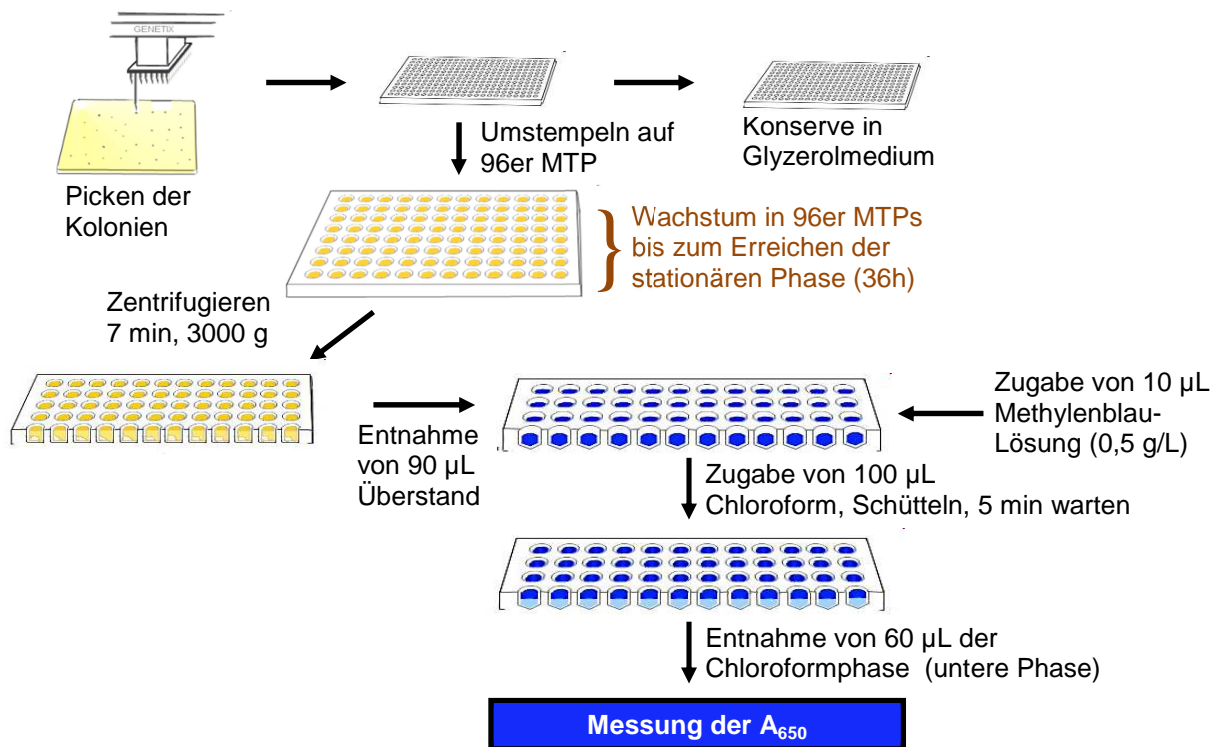


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Methyleneblau-Assays im Hochdurchsatz-Format zum Screening der *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten in Mikrotiterplatten. MTP: Mikrotiterplatten. A_{650} : Absorption bei 650 nm.

Folgeuntersuchungen ausgewählter UV-Mutanten und Vergleich mit dem Wildtyp

Mit Hilfe des Methyleneblau-Assays im Hochdurchsatz-Format wurde eine interessante *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutante entdeckt. Dabei handelte es sich um die Mutante LO4. Eine weitere UV-Mutante fiel dadurch auf, dass ihre Kolonie auf einer Agarplatte nach 36 h Inkubationszeit deutlich größer war als die Kolonien der anderen UV-Mutanten. Diese UV-Mutante wurde daher als schnellwachsende Mutante bezeichnet. Von beiden UV-Mutanten wurden Glyzerolstocks angelegt.

Um sie hinsichtlich ihrer Produktivität zu charakterisieren wurden beide UV-Mutanten im Parallelbioreaktorsystem kultiviert. Zusätzlich wurde der Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T kultiviert um einen direkten Vergleich der Produktivität der UV-Mutanten mit der des Wildtyps zu ermöglichen. Es wurden jeweils drei Vorkulturen für jede der beiden UV-Mutanten und für den Wildtyp angelegt.

Die erste Vorkultur (25 mL Nutrient Broth) wurde morgens mit 100 µL Glycerolstock der jeweiligen UV-Mutante bzw. mit 100 µL Glycerolstock von *B. plantarii* DSM 9509^T angeimpft. Diese Vorkultur wurde bis zum Abend bei 30°C und 130 rpm geschüttelt, bis eine OD₅₈₀ von ca. 1 erreicht worden war. Dann wurden 100 µL in eine zweite Vorkultur (50 mL NB) überimpft. Die zweite Vorkultur wurde über Nacht bei 30°C und 130 rpm bis zum nächsten Tag wachsen gelassen, bis eine OD₅₈₀ von ca. 2,5 erreicht worden war. Dann wurden 200 µL in eine dritte Vorkultur (50 mL NB) überimpft. Nachdem die dritte Vorkultur die gewünschte OD₅₈₀ von ca. 2 erreicht hatte, wurde die Hauptkultur (300 mL NB) im Parallelbioreaktor mit 120 mg Biofeuchtmasse aus der dritten Vorkultur angeimpft.

Die UV-Mutanten und der Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T wurden bei 30°C und pH 7 fermentiert. Die Rührergeschwindigkeit betrug 1100 rpm. Temperatur, pH, und Rührergeschwindigkeit wurden während der Fermentation konstant gehalten. Als Korrekturmittel wurden 4 M Phosphorsäure, 25%-iges Ammoniakwasser und das Antischaummittel Contraspum A 4050 verwendet. Die Zuluft wurde zu Beginn der Fermentation auf 20 L/h eingestellt. Des Weiteren wurden ca. sechs Tropfen Antischaummittel in jeden Fermentertopf vorgelegt. Bei der UV-Mutante LO4 und bei dem Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei der schnellwachsenden UV-Mutante wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Fermentationsdauer betrug ca. 36 h.

Während der Fermentation wurden Proben zur Bestimmung der Glukose-, Biotrockenmasse- und Rhamnolipidkonzentration genommen. Die Aufarbeitung der Proben und die Bestimmung der Glukose-, Biotrockenmasse- und Rhamnolipidkonzentration erfolgten wie unter 3.1 beschrieben.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung einer Referenz-Substanz

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Herstellung einer Rhamnolipid-Referenz-Substanz um mit dieser eine Methode zur quantitativen Bestimmung der *Burkholderia*-Rhamnolipide mittels HPLC zu entwickeln. Eine quantitative Methode zur Bestimmung der *Burkholderia*-Rhamnolipide gab es bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht. Sie war aber Voraussetzung für grundlegende Untersuchungen der Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T auf Vollmedium und Minimalmedium.

Des Weiteren sollte die Zusammensetzung und die Reinheit der Referenz-Substanz mittels Kernspinresonanzspektroskopie und Tandem-Massenspektrometrie untersucht werden. Außerdem wurden die Absenkung der Oberflächenspannung, die kritische Mizellbildungskonzentration sowie der Schmelzpunkt der Referenzsubstanz bestimmt.

4.1.1 Herstellung der Referenz-Substanz

Die Referenz-Substanz wurde aus einem Rohextrakt von *B. plantarii* DSM 9509^T hergestellt, der aus einer Fermentation unter nicht optimierten Bedingungen gewonnen wurde (Walter, 2009). Der Rohextrakt wurde mit drei aufeinanderfolgenden Chromatographie-Schritten an einer Mitteldruckchromatographie-Anlage aufgereinigt und so die Referenz-Substanz erhalten.

Chromatographie nach André

Bei der Stufenchromatographie nach André et al. (2006) wurden als Laufmittel Chloroform und Methanol verwendet. Es wurde in 7 Stufen eluiert. Zur Auswertung wurden 15 µL jeder zweiten Fraktion auf eine DC-Platte aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd angefärbt.

Bei Chromatogramm A waren bei den Fraktionen 23-58 gelbe Flecken auf der DC-Platte zu sehen. Die Fraktionen 23-58 wurden vereinigt und einrotiert. Bei der mit maximaler Säulenbeladung durchgeführten Chromatographie B wurde das Rhamnolipid schon nach sechs Fraktionen von der Säule eluiert. Die Fraktionen 47, 49 und 52 enthielten Verunreinigungen. Daher wurden die Fraktionen 46-52

verworfen. Die Fraktionen 7-45 und 53-57 wurden vereinigt und einrotiert. Tab. 4.1 zeigt die gewonnenen Produktmengen und die prozentualen Ausbeuten der beiden Läufe A und B.

Tab. 4.1: Übersicht über die erhaltenen Produktmengen und Ausbeuten der beiden Chromatographien nach Andrä et al. (2006).

	<i>Chromatographie A</i>	<i>Chromatographie B</i>
Probenmenge	2,5 g	5,0 g
Vereinigte Fraktionen	23-58	7-45 und 53-57
Produktmenge	0,76 g	1,20 g
Ausbeute	30,4%	24,0%

Chromatographie nach Bauer

Bei der Chromatographie nach Bauer et al. (2006) handelt es sich um eine isokratische Chromatographie mit Chloroform, Methanol und Essigsäure als Laufmittel. Zur Auswertung wurden 15 µL jeder zweiten Fraktion auf eine DC-Platte aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd angefärbt. Bei den Fraktionen 55-77 waren gelbe Flecken auf der Platte zu sehen. Diese Fraktionen wurden vereinigt und einrotiert.

Um die Spaltung der Rhamnolipide in den vereinigten Fraktionen durch sich aufkonzentrierende Essigsäure beim Verdampfen der Lösungsmittel zu vermeiden wurde Toluol zugegeben (s. 3.2.1). Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel blieben amorphe Kristalle zurück. Ihre Farbe war von sehr hellem Braun. Vermutlich waren noch Toluol-Einschlüsse vorhanden, die beim Ausbilden der Kristalle entstanden waren. Aus den 0,76 g Produkt der Chromatographie A nach Andrä konnten nach isokratischer Elution und Eindampfen 0,48 g Produkt gewonnen werden. Dies entsprach einer Ausbeute von 63 %.

Um die beiden Chromatographien hinsichtlich der Aufreinigungseffizienz zu vergleichen, wurden der unbehandelte Rohextrakt, das Produkt der Chromatographie nach Andrä und das Produkt der Chromatographie nach Bauer auf eine DC-Platte aufgetragen. Es wurden zwei Dünnschichtchromatogramme (s. Abb. 4.1) erstellt um einmal die Zuckerreste der Rhamnolipide und einmal die Fettsäurereste der Rhamnolipide anzufärben. Von jeder Probe wurden 0,25 mg in 10 µL Ethylacetat gelöst und auf die DC-Platte aufgetragen.

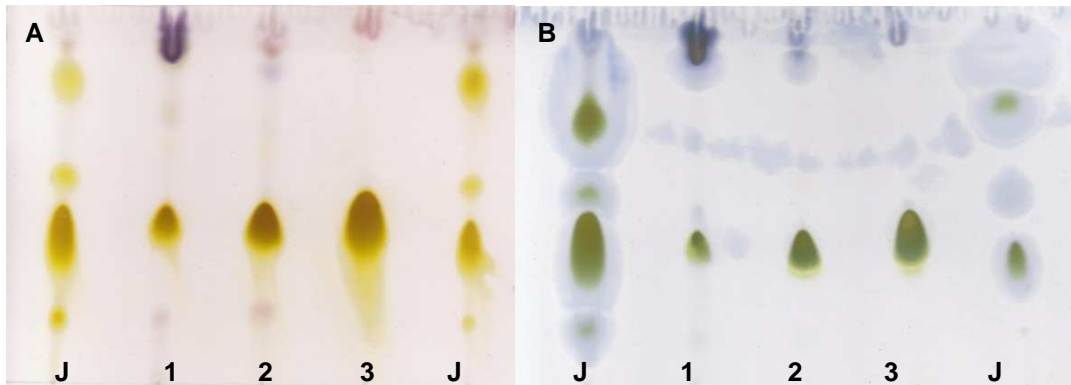


Abb. 4.1: Dünnschichtchromatogramme zum Vergleich der Aufreinigungseffizienz der durchgeführten Chromatographien. A: Anisaldehydfärbung der Zucker. B: Anfärbung der Fettsäuren mit einer Ceriumsulfat-/Ammoniummolybdat-Lösung. 1: unbehandelter Rohextrakt; 2: Produkt der Chromatographie nach Andrä; 3: Produkt der Chromatographie nach Bauer; J: Jeneil Standard.

Anhand der Dünnschichtchromatogramme wurde die Aufreinigungseffizienz der durchgeführten Chromatographien sichtbar. Während bei dem unbehandelten Rohextrakt noch starke hydrophobe Verunreinigungen am oberen Rand der DC-Platte zu sehen waren, waren diese nach der Chromatographie nach Andrä deutlich reduziert und nach der Chromatographie nach Bauer fast ganz verschwunden (s. Abb. 4.1)..

Reversed phase Chromatographie

Die *reversed phase* Chromatographie erfolgte in Anlehnung an die HPLC Methode. (s. 3.1). Es wurden 10 μL der gesammelten Fraktionen auf DC-Platten aufgetragen und die Zuckerreste mit Anisaldehyd angefärbt (s. Abb. 4.2).

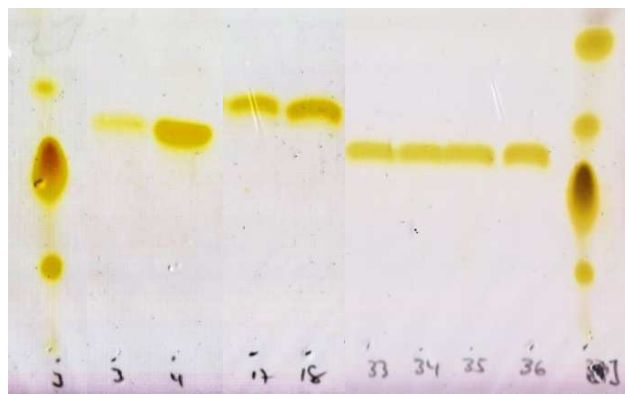


Abb. 4.2: Dünnschichtchromatogramm mit ausgewählten Fraktionen der *reversed phase* Chromatographie. Von jeder Fraktion wurde 10 μL aufgetragen. Die Zuckerreste wurden mit Anisaldehyd angefärbt. Die Fraktionen 3 und 4 sowie 12-18 wurden vereinigt und einrotiert. J: Jeneil Standard.

Bei den Fraktionen 3 und 4 sowie 12-48 waren gelbe Flecken zu sehen (s. Abb. 4.2). Die Fraktionen 12 bis 48 wurden vereinigt und einrotiert. Die Reinheit und Struktur der erhaltenen Referenz-Substanz wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie bzw. Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

Mit den sequenziell durchgeführten Chromatographie-Schritten an der Mitteldruckchromatographie-Anlage konnten ausreichende Mengen an Referenz-Substanz (im Milligramm-Bereich) für eine Strukturaufklärung hergestellt werden.

Für eine Aufreinigung im industriellen Maßstab eignet sich diese Methode allerdings nicht, da die Ausbeuten niedrig sind und sehr viel Lösungsmittel eingesetzt werden muss. Bei der Chromatographie nach André wurden pro Lauf ca. 7,2 L Chloroform und 3,4 L Methanol verbraucht. Die Ausbeute betrug etwa 24%. Diese niedrige Ausbeute kann dadurch erklärt werden, dass bei dieser Chromatographie eine große Menge an Verunreinigungen abgetrennt worden war. Bei der Chromatographie nach Bauer wurden für einen Lauf ca. 3,2 L Chloroform, 0,3 L Methanol und 0,1 L Essigsäure benötigt. Die Ausbeute betrug etwa 63%.

Um die Ausbeuten zu erhöhen und den Lösungsmittelverbrauch zu senken, müssten die Chromatographien optimiert werden. Es könnte z. B. das Elutionsvolumen pro Stufe, die Zusammensetzung des Laufmittels oder die Länge und Steilheit der gefahrenen Gradienten variiert werden.

Um der Industrie eine ausreichende Menge an Referenz-Substanz für Anwendungstests zur Verfügung stellen zu können wäre es sinnvoll größere Säulen für die Trennungen einzusetzen. Mit größeren Säulen könnte vermutlich schneller die benötigte Menge Referenz-Substanz (im Gramm-Bereich) hergestellt werden.

Für eine Aufreinigung im industriellen Maßstab eignet sich die Aufreinigung mit der Mitteldruckchromatographie-Anlage wie bereits erwähnt nicht, da unter nicht optimierten Bedingungen die Ausbeuten zu niedrig sind und eine zu große Menge an Lösungsmitteln im Verhältnis zur erhaltenen Produktmenge eingesetzt werden muss. Für eine zukünftige Herstellung der *Burkholderia*-Rhamnolipide im industriellen Maßstab wären kostengünstigere und effektivere Aufreinigungsmethoden wünschenswert.

Eine Methode wäre die selektive Kristallisation (Abdel-Mawgoud et al., 2011), die nach der Herstellung des Rohextraktes (Säurefällung und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln) durchgeführt wird. Um die Rhamnolipide aus dem Rohextrakt

auszukristallisieren, wird Hexan zugegeben und die Temperatur reduziert. Angewendet wurde diese Methode schon für das Rhamnolipid 3 von *Pseudomonas aeruginosa* (Manso Pajarron et al., 1993). Damit die Kristallisation funktioniert, muss eine ausreichende Menge an Rhamnolipiden im Rohextrakt vorliegen. Da mit *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T aber nur Rhamnolipidkonzentrationen im mg/L-Bereich erreicht wurden (s. 4.2.1 und 4.2.2), reicht die Menge der Rhamnolipide im Rohextrakt für eine Kristallisation vermutlich nicht aus.

Des Weiteren ist das Rhamnolipid von *B. plantarii* DSM 9509^T mit seinen Hydroxytetradekansäuren hydrophober als das Rhamnolipid 3 von *P. aeruginosa* und lässt sich vermutlich nicht so gut aus Hexan auskristallisieren.

4.1.2 Charakterisierung der Referenz-Substanz

Die Reinheit der Referenz-Substanz wurde mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestimmt. Die Strukturaufklärung der Rhamnolipid-Kongener erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Des Weiteren wurden die Absenkung der Oberflächenspannung, die CMC und der Schmelzpunkt bestimmt.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Daten des ¹H-Spektrums waren in Übereinstimmung mit den Literaturwerten für das Rhamnolipid L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxytetradekanoyl-β-hydroxytetradekanoat (Rha₂-C₁₄-C₁₄) (Bauer et al., 2006):

¹H-NMR (250 MHz, CD₃CO₂D): δ = 0.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 6 H, CH₃), 1.22–1.48 (m, 46 H, CH₂), 2.50–2.76 (m, 4 H, α-CH₂, α'-CH₂), 3.50–3.72 (m, 2 H, H4^A, H4^B), 3.75–4.03 (m, 5 H, H5^B, H5^A, H3^A, H3^B, H2^A), 4.20 (m, 2 H, H2^B, CH^{3'}-Rha), 5.08 (d, 1 H, H1^B), 5.11 (bs, 1 H, H1^A), 5.40 ppm (m, 1 H, CH₃-O).

Die Referenz-Substanz bestand zu über 95% aus dem Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄.

Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Ein voller Quadrupol 1 Scan lieferte ein Pseudomolekülion mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (*m/z*) von 761,6 [M-H]⁻ (s. Abb. 4.3). Dieses Ion wurde fragmentiert und es wurden zwei Sekundärionen mit einem *m/z* von 535,4 und 225,0

erhalten (s. Abb. 4.4). Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 535,4 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxytetradekansäure (C_{14} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 225,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxytetradekansäure.

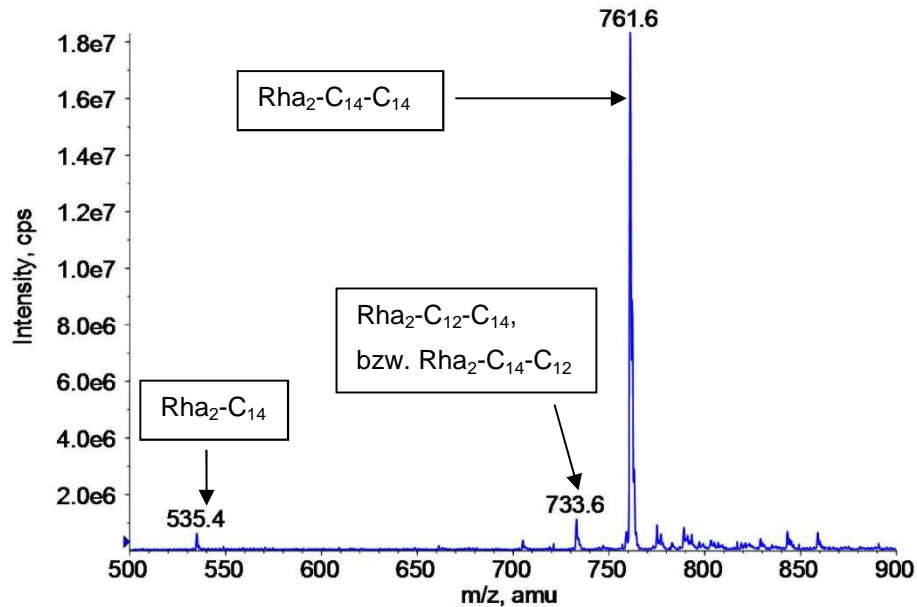


Abb. 4.3: Massenspektrum des Quadrupol 1 Scans. Es wurden Pseudomolekülonen mit einem m/z von 761,6 und 733,6 erhalten. Bei dem Pseudomolekülion mit einem m/z von 761,6 handelte es sich um ein L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradekanoyl- β -hydroxytetradekanoat ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$). Bei dem zweiten Pseudomolekülion mit einem m/z von 733,6 handelte es sich um eine Mischung aus L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradekanoyl- β -hydroxydodekanoat und L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydodekanoyl- β -hydroxytetradekanoat ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{12}$ und $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}\text{-C}_{14}$).

Bei dem von *B. plantarii* DSM 9509^T hauptsächlich produziertem Rhamnolipid handelte es sich um das Kongener L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradekanoyl- β -hydroxytetradekanoat ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$), welches eine große strukturelle Ähnlichkeit mit dem L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydekanoyl- β -hydroxydekanooat ($\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{10}$, Rhamnolipid 3) von *P. aeruginosa* hat (s. Abb. 4.6).

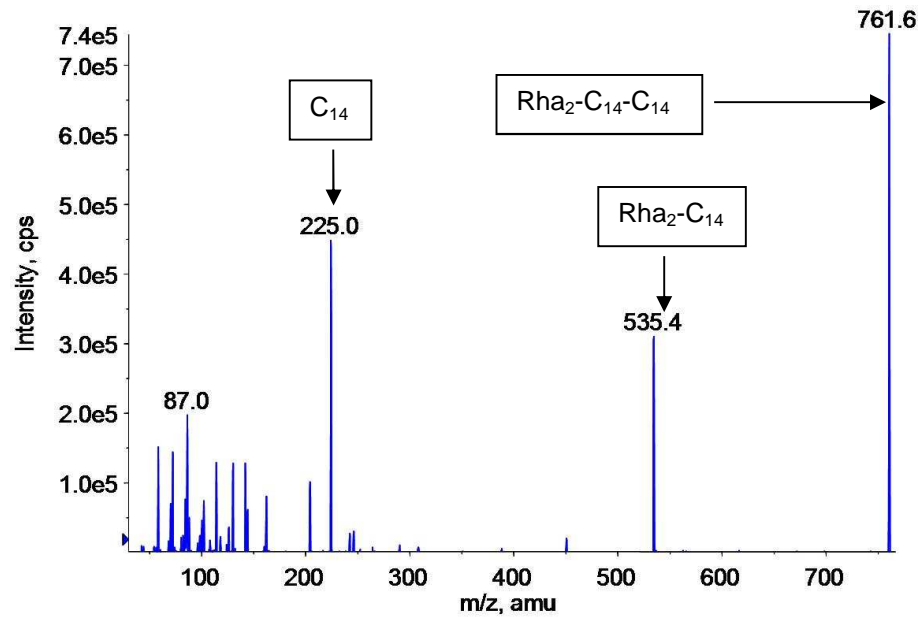


Abb. 4.4: Erhaltene Sekundärionen nach der Fragmentierung des Pseudomolekülon mit einem m/z von 761,6. Es wurden zwei Sekundärionen mit einem m/z von 535,4 und 225,0 erhalten. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 535,4 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxytetradekansäure (C_{14} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 225,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxytetradekansäure.

Zusätzlich wurde durch den Quadrupol 1 Scan ein weiteres Pseudomolekülon mit einem m/z von 733,6 erhalten. Dieses wurde ebenfalls fragmentiert und vier Sekundärionen erhalten (s. Abb. 4.5). Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 535,4 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxytetradekansäure (C_{14} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren.

Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 225,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxytetradekansäure. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 507,2 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxydodekansäure (C_{12} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren.

Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 197,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxydodekansäure. Diese Sekundärionen ließen vermuten, dass es sich bei dem zweiten Pseudomolekülon um ein L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradekanoyl- β -hydroxydodekanoat (Rha_2 - C_{14} - C_{12}) oder um ein L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydodekanoyl- β -hydroxytetradekanoat (Rha_2 - C_{12} - C_{14}) handelte (s. Abb. 4.6).

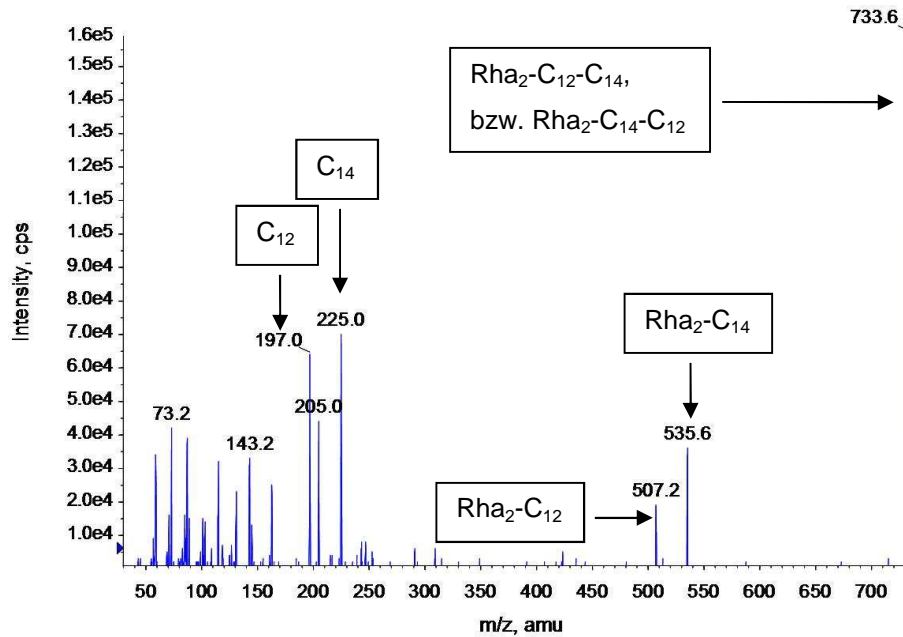


Abb. 4.5: Erhaltene Sekundärionen nach der Fragmentierung des Pseudomoleküliens mit einem m/z von 733,6. Es wurden vier Sekundärionen erhalten. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 535,4 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxytetradekansäure (C_{14} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 225,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxytetradekansäure. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 507,2 handelte es sich um zwei Rhamnose-Reste (Rha_2), welche mit einer β -Hydroxydodekansäure (C_{12} -Hydroxyfettsäure) verbunden waren. Bei dem Sekundärion mit einem m/z von 197,0 handelte es sich um eine abgespaltene β -Hydroxydodekansäure.

Das Pseudomolekülion mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 761 $[M-H]^-$, wurde ebenfalls von Häussler et al. (1998) gefunden, die *Burkholderia pseudomallei* kultivierten und eine ESI/MS durchführten. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass es sich bei dem Rhamnolipid von *B. pseudomallei* um ein Rhamnolipid, bestehend aus zwei Rhamnoseresten und zwei β -Hydroxytetradekansäuren, handeln müsse (Häussler et al., 1998). Manso Pajarron et al. (1993) beschrieben die Rhamnolipid-Kongener $Rha_2-C_{14}-C_{12}$ (L-rhamno-pyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxytetra-decanoyl- β -hydroxydodekanoat) und $Rha_2-C_{12}-C_{14}$ (L-rhamnopyranosyl-L-rhamno-pyranosyl- β -hydroxyl-dodekanoyl- β -hydroxytetradekanoat).

Sie isolierten die Rhamnolipide aus der Kulturbrühe von *B. glumae* und fanden mittels MS/MS ein Pseudomolekülion mit einem m/z von 733 $[M-H]^-$, bei dem es sich um $Rha_2-C_{14}-C_{12}$ bzw. $Rha_2-C_{12}-C_{14}$ handelte (Manso Pajarron et al., 1993).

Dubeau et al. (2009) kultivierten *B. thailandensis* und fanden ebenfalls das Pseudomolekülion mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 761 $[M-H]^-$, bei dem es sich um Rha₂-C₁₄-C₁₄ handelte. Des Weiteren fanden die Autoren mittels LC/MS auch die charakteristischen Fragmente der Kongener Rha₂-C₁₄-C₁₂ bzw. Rha₂-C₁₂-C₁₄, nämlich die abgespaltene β -Hydroxytetradekansäure mit einem m/z von 225 und die abgespaltene β -Hydroxydodekansäure mit einem m/z von 197 (Dubeau et al., 2009). Damit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit sehr gut mit den Ergebnissen der eben genannten Autoren überein.

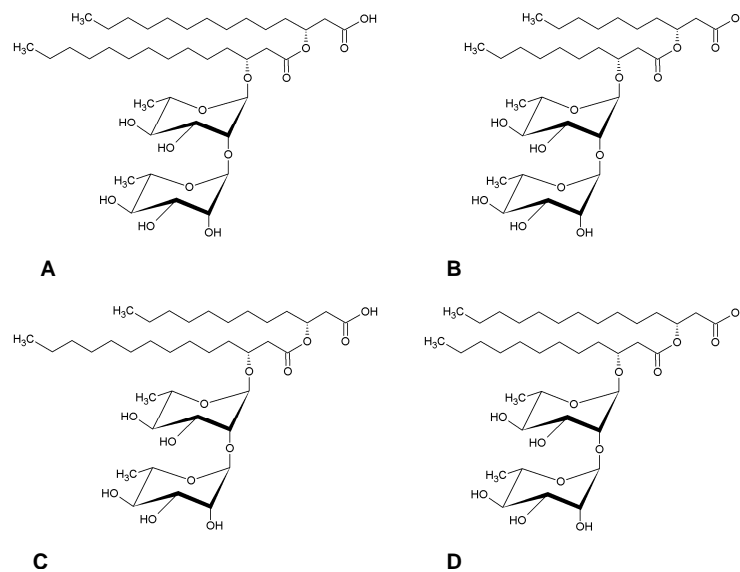


Abb. 4.6: Strukturen von Rhamnolipiden. A: Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄ von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T. B: Rhamnolipid Rha₂-C₁₀-C₁₀ von *Pseudomonas aeruginosa*. C: Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₂ von *B. plantarii* DSM 9509^T. D: Rhamnolipid Rha₂-C₁₂-C₁₄ von *B. plantarii* DSM 9509^T.

Neben Rha₂-C₁₄-C₁₄ und Rha₂-C₁₄-C₁₂ bzw. Rha₂-C₁₂-C₁₄ bildet *B. plantarii* DSM 9509^T vermutlich auch andere Kongener, die in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden. Dubeau et al. (2009) fanden bei der Kultivierung von *B. thailandensis* neben bereits erwähnten Kongenern auch Mono- und Di-Rhamnolipide, deren β -Hydroxyfettsäuren eine Länge von 10 bis 16 Kohlenstoffatomen aufwiesen. Allerdings war auch hier Rha₂-C₁₄-C₁₄ das vorherrschende Rhamnolipid.

Eines der zukünftigen Ziele wird es sein, die verschiedenen Kongener voneinander zu trennen und somit homogene Produkte zu erhalten. Dies könnte durch eine optimierte Aufarbeitungsstrategie erreicht werden. Um spezifische Kongener in einer reinen Form zu erhalten, sind normalerweise chromatographische Methoden die beste Lösung (Abdel-Mawgoud et al., 2011).

Ebenfalls denkbar wäre es, genetisch in die Rhamnolipid-Biosynthese einzugreifen und z. B. die Substratspezifität der Untereinheit A der Rhamnosyltransferase 1 zu ändern, so dass diese nur β -Hydroxyfettsäuren mit einer spezifische Kettenlänge als Substrat akzeptiert.

Costa et al. (2011) haben im Rahmen der von ihnen durchgeführten Kultivierung von *B. glumae* eine große Anzahl Rhamnolipid-Kongener entdeckt, darunter zwei, die bisher noch nicht von anderen Autoren gefunden worden waren und die ungesättigte β -Hydroxyfettsäuren besitzen: Rha₂-C₁₂-C_{14:1} und Rha₂-C₁₄-C_{14:1}. Die Autoren vermuteten, dass ihr *B. glumae* Stamm unter ihren Bedingungen mehr Rhamnolipid-Kongener produziert als andere *Burkholderia* Spezies. Grund hierfür könnte ihrer Meinung nach eine reduzierte Spezifität der Rhamnosyltransferase 1 (*rhlA*) sein.

Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)

Die Referenz-Substanz reduzierte die Oberflächenspannung von ca. 72,8 mN/m (nur destilliertes Wasser) auf unter 30 mN/m. Es wurde eine minimale Oberflächenspannung von 29,4 mN/m bei einer Temperatur von 25°C gemessen. Die CMC lag zwischen 15 und 20 mg/L (s. Abb. 4.7).

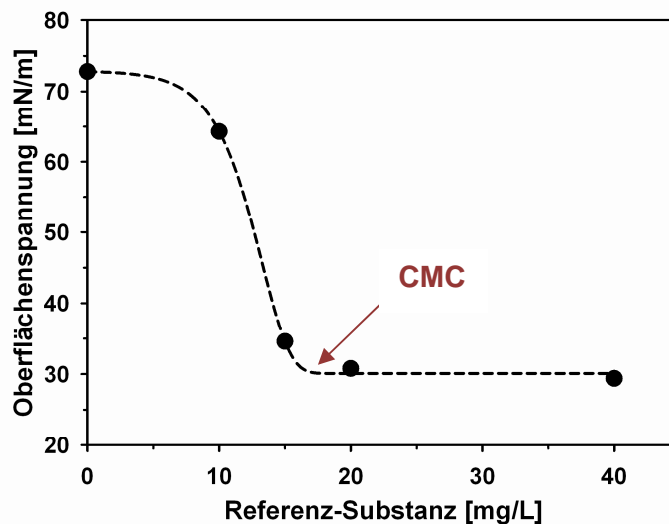


Abb. 4.7: Oberflächenspannungen von Wasser (0 mg/L) und verschiedenen Konzentrationen der Referenz-Substanz. Die Messtemperatur lag bei 25°C. 20 mg/L der Referenz-Substanz reichten aus, um die Oberflächenspannung des reinen Wassers von 72,8 mN/m auf unter 30 mN/m zu senken. Die CMC lag zwischen 15 und 20 mg/L.

Die CMC-Werte verschiedener Rhamnolipide bzw. Rhamnolipidmischungen von *Pseudomonas aeruginosa* liegen zwischen 53 und 230 mg/L (Sánchez et al., 2007). Für das Rhamnolipid 3 (Rha₂-C₁₀-C₁₀) von *P. aeruginosa*, das strukturell dem Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄ von *B. plantarii* DSM 9509^T sehr ähnlich ist, wurden CMC-Werte von 75,1 mg/L (Sánchez et al., 2007) und 106 mg/L (Abalos et al., 2001) gefunden.

Allerdings wird vermutet, dass die CMC von Rha₂-C₁₄-C₁₄ kleiner ist als von Rha₂-C₁₀-C₁₀, da längere Fettsäureketten die Hydrophobizität des Moleküls erhöhen und somit die Mizellbildung erleichtern (Zhang et al., 2004).

Dubeau et al. (2009) kultivierten den Stamm *B. thailandensis*, der wie *B. plantarii* DSM 9509^T das Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄ produziert. Es wurde eine CMC von 225 mg/L gemessen. Allerdings verwendeten die Autoren eine Mischung aus Rhamnolipiden und HAAs (Dubeau et al., 2009). Sie vermuteten, dass die HAA-Fraktion für den hohen CMC-Wert verantwortlich sei. Andrä et al. (2006) vermuteten, dass die CMC von Rha₂-C₁₄-C₁₄ um eine bis zwei Größenordnungen kleiner ist als 100 mg/L. Costa et al. (2011) bestimmten eine CMC von 25-27 mg/L für Rha₂-C₁₄-C₁₄ aus *B. glumae*. Die CMC für Rha₂-C₁₄-C₁₄ aus *B. glumae* stimmt mit der in dieser Arbeit ermittelten CMC für Rha₂-C₁₄-C₁₄ von *B. plantarii* DSM 9509^T gut überein.

Die niedrige CMC längererkettiger Rhamnolipide wie Rha₂-C₁₄-C₁₄ lässt auch auf bessere Tenseideigenschaften schließen. Dies wäre vermutlich vor allem für die Waschmittelindustrie interessant, da die Dosierung eines Tensides in einem Waschmittel auch von der CMC abhängt.

Bestimmung des Schmelzpunktes

Bei der Bestimmung der Schmelztemperatur war bis zu einer Temperatur von 140°C keine Veränderung der Referenz-Substanz zu beobachten. Ab einer Temperatur von 141°C wurden die Kristalle der Substanz klarer. Bei einer Temperatur von 150°C war die Probe völlig klar. Ab 155°C konnte ein Meniskus beobachtet werden. Der Schmelzpunkt der Referenz-Substanz liegt daher vermutlich zwischen 150 und 155°C. Diese Ungenauigkeit kommt daher, dass die Referenz-Substanz nur zu 95% rein war.

4.1.3 Entwicklung einer Methode zur Derivatisierung der Rhamnolipide

Da sich die Referenz-Substanz nicht in Acetonitril löste, konnte die Derivatisierung nach Schenk et al. (1995) nicht angewendet werden. Daher war ein Ziel der Arbeit, mit der durch die sequentiellen Chromatographien erhaltenen Referenz-Substanz eine Methode zur Derivatisierung der *Burkholderia*-Rhamnolipide zu entwickeln. Es wurden acht verschiedene Ansätze durchgeführt um Lösungsmittel, Kopplungsreagenz und tertiäres Amin zu optimieren.

Die für die derivatisierte Referenz-Substanz erhaltene Peakfläche war am größten, wenn als Lösungsmittel Dimethylformamid verwendet wurde und das molare Verhältnis des Kopplungsreagenz 2-Bromo-2'acetonaphthon und des tertiären Amins Diisopropylethylamin 2:1 war (s. Abb. 4.8, Versuch 5).

Generell wurde eine größere Peakfläche erhalten, wenn das molare Verhältnis von Kopplungsreagenz zu tertiärem Amin 2:1 war (Abb. 4.8, Versuche 1,3,5 und 7). Das Lösungsmittel hatte aber den stärksten Einfluss. So wurden mit Dimethylformamid als Lösungsmittel die größten Peaks erhalten (Abb. 4.8, Versuche 5-8, untere Abbildung). Methanol und Formamid erwiesen sich als Lösungsmittel weniger geeignet (Abb. 4.8, Versuche 1-4, obere Abbildung).

Für die Optimierung der Derivatisierungszeit wurde eine Kalibriergerade der Referenz-Substanz von 0 bis 0,125 g/L hergestellt. Vorversuche, bei denen wie bei der Methode nach Schenk nur bis zu 60 min derivatisiert wurde (Schenk et al., 1995), zeigten, dass 60 min für eine vollständige Derivatisierung nicht ausreichten. Daher wurde in diesem Versuch 90, 120 und 150 min derivatisiert. Es wurden 2-Bromo-2'acetonaphthon als Kopplungsreagenz und Diisopropylethylamin als tertiäres Amin im Verhältnis 2:1 verwendet, sowie als Lösungsmittel Dimethylformamid, da dieser Ansatz im vorherigen Versuch die besten Ergebnisse lieferte. Abb. 4.9 zeigt den Verlauf der jeweiligen Kalibriergeraden bei den Derivatisierungszeiten von 90, 120 und 150 min.

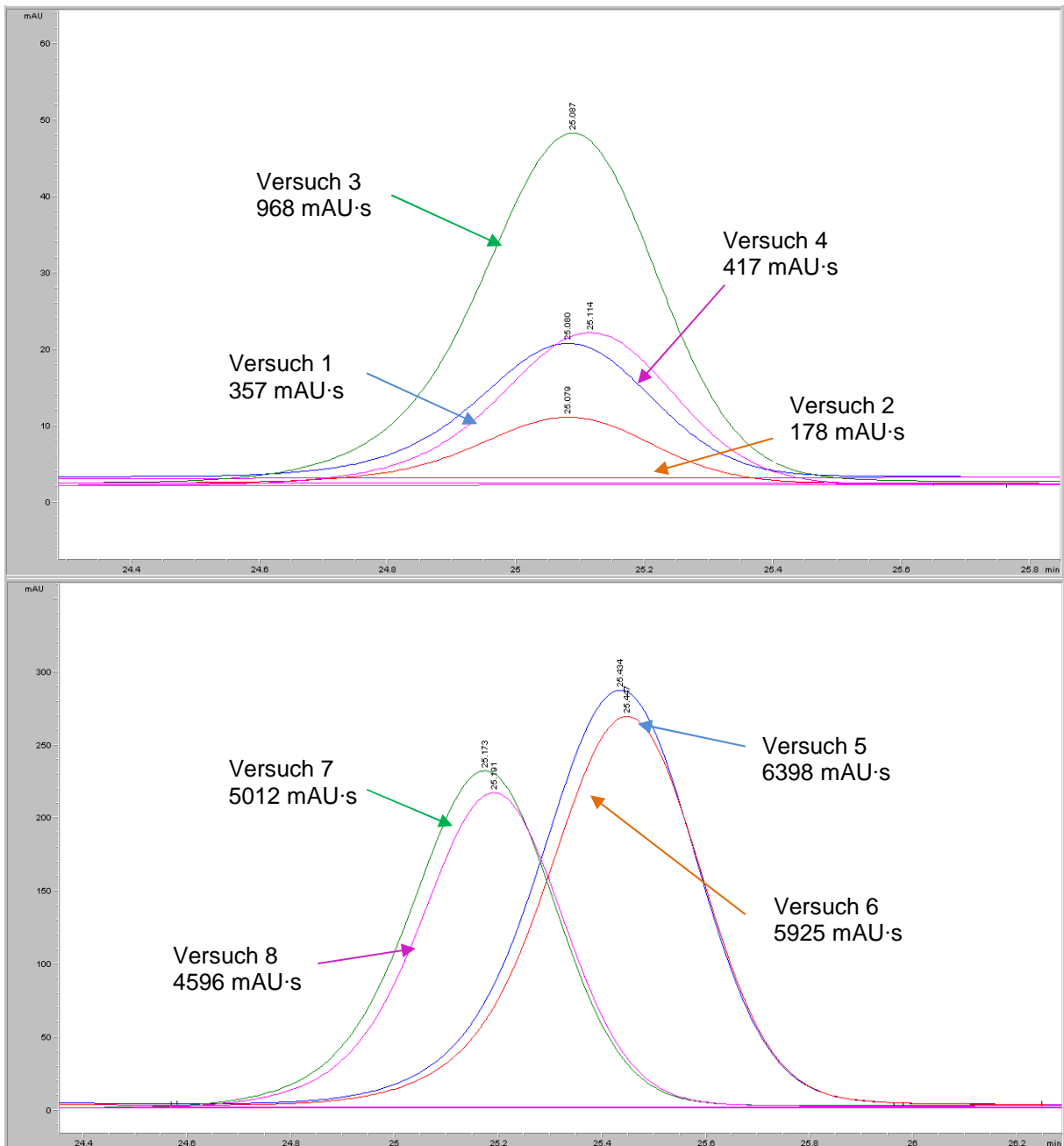


Abb. 4.8: Zeitlicher Verlauf des UV-Signals nach der Derivatisierung der Referenz-Substanz. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Y-Achse (Signalstärke). Oben: Versuche 1-4. Unten: Versuche 5-8.

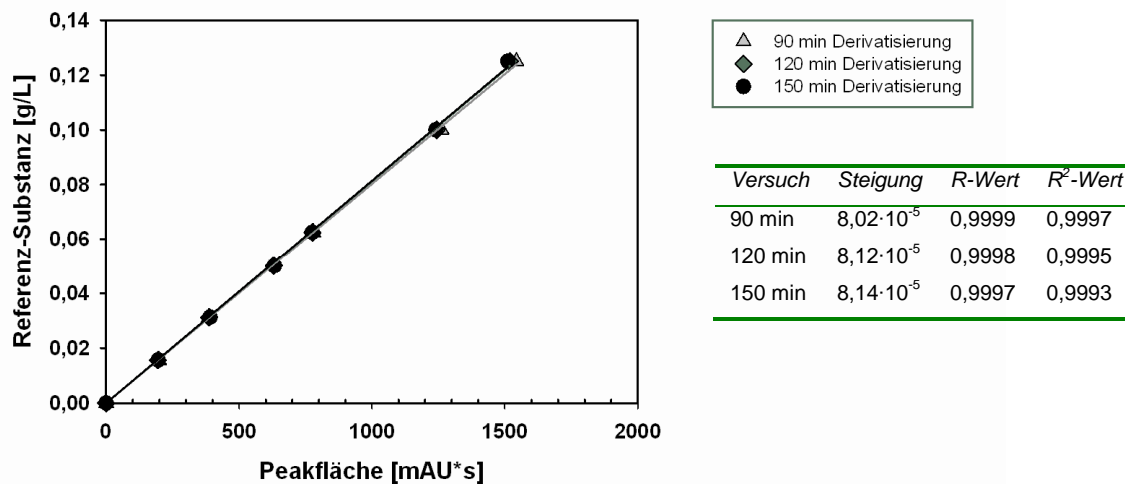


Abb. 4.9: Verlauf der Kalibriergeraden bei Derivatisierungszeiten von 90, 120 und 150 min. Es wurden 0-0,125 g/L Referenz-Substanz eingesetzt. Der R^2 -Wert der linearen Regression durch den Ursprung war jedes Mal größer als 0,9990. Der Verlauf der Regressionsgeraden war nahezu identisch. Die Steigung der Regressionsgerade für 90 min Derivatisierungszeit war nur minimal kleiner als die Steigung der anderen Regressionsgeraden.

Der R^2 -Wert der linearen Regression durch den Ursprung war jedes Mal größer als 0,9990. Die Kalibriergeraden hatten einen nahezu identischen Verlauf. Die Steigung der Regressionsgerade für 90 min Derivatisierungszeit war nur minimal kleiner als die Steigung der anderen Regressionsgeraden. Die Ergebnisse zeigten, dass 90 min für eine vollständige Derivatisierung ausreichten.

In der Literatur sind viele Methoden beschrieben, um Rhamnolipide zu quantifizieren. Einen guten Überblick liefert das Review von Abdel-Mawgoud et al. (2011). Zum einen gibt es indirekte Methoden, wie die Messung der Oberflächenspannung und die Messung der hämolytischen Aktivität sowie kolorimetrische Methoden wie der CTAB-Agar und der Orcinol-Assay (Abdel-Mawgoud et al., 2011).

Diese Methoden weisen Rhamnolipide aber nur indirekt nach und eignen sich daher eher für ein erstes Screening nach Biotensid-Bildnern. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, eine quantitative Messmethode zu etablieren.

Neben der in dieser Arbeit etablierten Methode wäre es auch möglich, Rhamnolipide mittels Gaschromatographie zu detektieren. Aufgrund ihrer Größe müssen sie allerdings vor der Analyse hydrolysiert werden. Dadurch ist es nicht möglich, Aussagen über die strukturelle Zusammensetzung der Rhamnolipide zu treffen (Abdel-Mawgoud et al., 2011).

Mittels HPLC ist es dagegen nicht nur möglich verschiedene Rhamnolipid-Kongener aufzutrennen sondern auch zu quantifizieren. Dies kann z. B. durch Kopplung der HPLC mit einem Detektor, wie mit einem Massenspektrometer oder einem UV-Detektor erfolgen. Während in der Dünnschichtchromatographie vorzugsweise *normal-phase* Säulen verwendet werden, werden für die HPLC *reversed phase* Säulen mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser verwendet (Abdel-Mawgoud et al., 2011).

Die Proben sollten für die Detektion allerdings vorgereinigt werden, da Unreinheiten die Messung beeinflussen können. Dies ist von Nachteil, da man sowohl bei der Vorreinigung der Proben als auch bei der Derivatisierung Analyt verliert (Heyd et al., 2008). Für Proben, in denen der Analyt bereits vor der Vorreinigung nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist, könnte dies dazu führen, dass der Analyt nach der Vorreinigung nicht mehr nachweisbar ist.

Dennoch ist die HPLC-MS die genaueste Methode zur Rhamnolipid-Identifizierung und -Quantifizierung. Durch ihre hohe Sensitivität ist es möglich, Rhamnolipide selbst in sehr geringen Mengen nachzuweisen. Ein weitere Vorteil ist der hohe Probendurchsatz (Heyd et al., 2008).

Obwohl es mit der in dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methode möglich ist, Rhamnolipide erfolgreich zu quantifizieren, können einige Schritte optimiert werden. Wie bereits von Heyd et al. (2008) berichtet, wird während der Aufreinigung der Rhamnolipide Produkt verloren. Daher würde es Sinn machen, die Rhamnolipide direkt im Kulturüberstand zu derivatisieren und zu messen. Da der Überstand aber eine wässrige Phase ist und die Derivatisierung in einem organischen Lösungsmittel stattfindet, müsste die Probe stark verdünnt werden, damit die Derivatisierung dennoch abläuft. Diese Methode würde im Falle von *B. plantarii* DSM 9509^T wahrscheinlich nicht funktionieren, da die Konzentration der Rhamnolipide bereits im Medium sehr niedrig ist. Nach dem Verdünnen würde die Konzentration der Rhamnolipide vermutlich unter der Nachweisgrenze der HPLC liegen.

Eine andere Möglichkeit wäre, die Rhamnolipide direkt aus der Kulturbrühe auszukristallisieren. Aber hierfür sind die Rhamnolipidkonzentrationen in der Kulturbrühe, die mit *B. plantarii* DSM 9509^T in der vorliegenden Arbeit erreicht wurden, vermutlich zu gering.

4.2 Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T

In diesem Teil der Arbeit wurde die Rhamnolipid-Bildung von *B. plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Vollmedium und auf Minimalmedium charakterisiert. Bei der Charakterisierung auf Vollmedium sollten Kultivierungsparameter wie die Substrat- und die Produkt-Ausbeute, sowie die spezifische Wachstums- und Produkt-Bildungsrate ermittelt werden.

Bei Wachstum auf Minimalmedium wurde die Rhamnolipid-Bildung in Abhängigkeit des eingestellten Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisses untersucht. Des Weiteren wurde das Minimalmedium in verschiedenen Ansätzen supplementiert.

4.2.1 Charakterisierung bei Wachstum auf Vollmedium

Um die Rhamnolipid-Bildung in *B. plantarii* DSM 9509^T grundlegend charakterisieren zu können, wurde der Stamm DSM 9509^T in Nutrient Broth (NB) kultiviert. Abb. 4.10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Biomasse-, der Glukose und der Rhamnolipidkonzentration der Batch-Kultivierung.

Von Prozessstunde 3 bis 7 konnte eine Beschleunigung des Wachstums beobachtet werden. Nach 7 h wurde die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} erreicht. Nach 7 h sank die spezifische Wachstumsrate wieder, aber die Zellen wuchsen bis Prozessstunde 25 weiter. Nach 25 h Prozesszeit wurde eine maximale Biotrockenmassekonzentration von 5,78 g/L erreicht (s. Abb. 4.10).

Nach ca. 10 h Prozesszeit begann *B. plantarii* DSM 9509^T Rhamnolipide in nachweisbaren Mengen zu produzieren. Von Prozessstunde 10 bis 25 war eine Steigerung der Rhamnolipidkonzentration zu beobachten. Nach 25 h wurde eine maximale Rhamnolipidkonzentration von 45,74 mg/L erreicht, welche bis zu Prozessstunde 30 in etwa konstant blieb (s. Abb. 4.10). Die Glukose-Konzentration nahm während des Wachstums kontinuierlich ab bis die Glukose nach ca. 24 h vollständig verbraucht worden war.

Nach 25 h konnte weder für die Biotrockenmasse- noch für die Rhamnolipidkonzentration eine weitere Steigerung beobachtet werden.

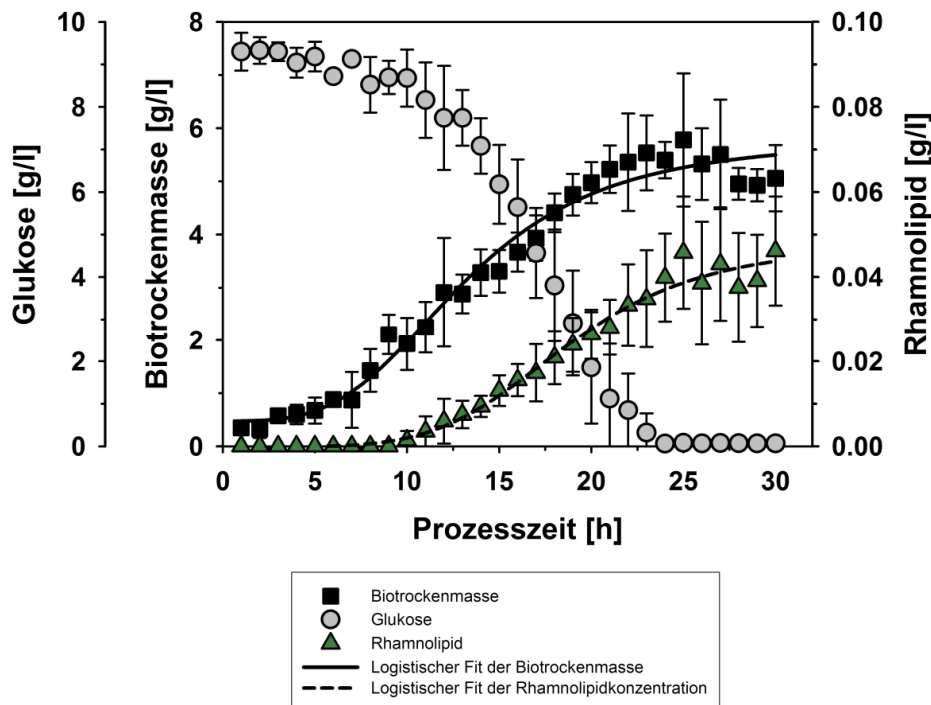


Abb. 4.10: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmasse-, Glukose- und Rhamnolipidkonzentration während einer 300 mL Batch-Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T in Nutrient Broth (Hörmann et al., 2010). Der pH wurde auf 7, die Temperatur auf 30°C und die Rührergeschwindigkeit auf 1100 rpm eingestellt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus drei Fermentationen berechnet. Die logistischen fits der Biotrockenmasse- und Rhamnolipidkonzentration wurden anhand der Gleichung unter 3.3.1 durchgeführt.

Die Raten und Ausbeutekoeffizienten wurden auf eine Prozesszeit von 25 h bezogen. Die durchschnittliche volumetrische Rhamnolipid-Produktionsrate (q_p) war 1,83 mg/L·h und die spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate 0,32 mg/gBTM·h. Die durchschnittliche Glukose-Aufnahmerate (q_s) war 0,40 g/L·h und die spezifische Glukose-Aufnahmerate 0,07 g/gBTM·h.

Die durchschnittliche BTM-Produktionsrate (q_x) war 0,23 g/L·h. Der substratbezogene Produkt-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,s}$ (mg produziertes Rhamnolipid pro g verbrauchte Glukose) war 4,57 mg/g. Der biomassebezogene Produkt-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ (mg produziertes Rhamnolipid pro g gebildeter Biotrockenmasse) war 7,91 mg/g. Der substratbezogene Biomasse-Ausbeutekoeffizient $Y_{x,s}$ (g gebildete Biotrockenmasse aus Glukose, Proteose-Pepton und Fleischextrakt pro g verbrauchte Glukose) war 0,58 g/g.

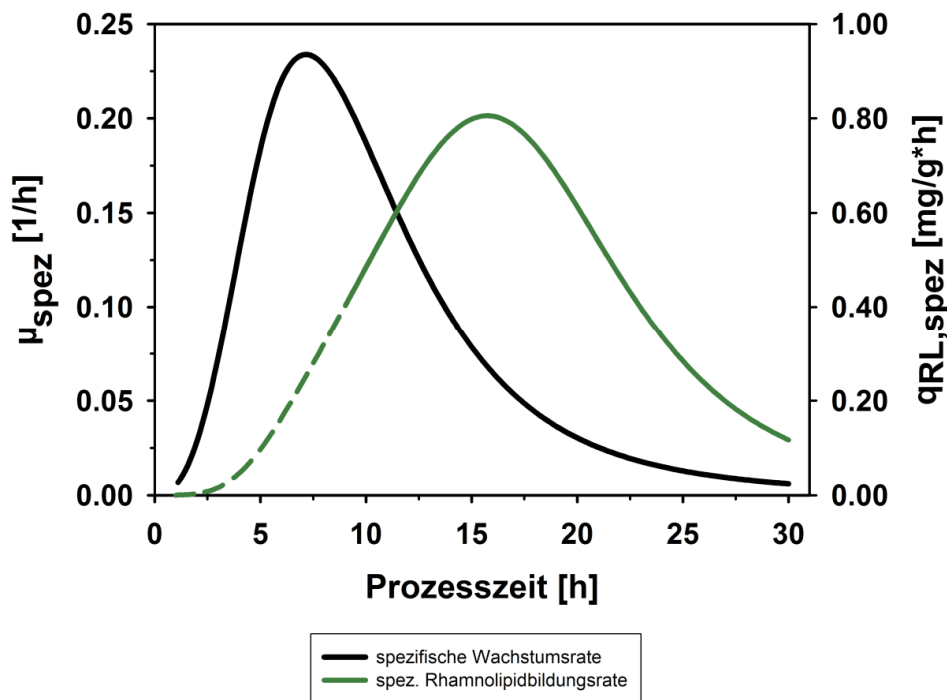


Abb. 4.11: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Wachstumsrate (μ_{spez}) und der spezifischen Rhamnolipid-Bildungsrate ($q_{RL, spez}$), die durch Ableitung des logistischen Fittings aus Abb. 4.10 erhalten wurden (Hörmann et al., 2010).

Abb. 4.11 zeigt den Verlauf der spezifischen Wachstumsrate (μ) und der spezifischen Rhamnolipid-Bildungsrate ($q_{RL, spez}$). Die Rhamnolipid-Produktion startete bei abnehmender Wachstumsrate. Gemäß Abb. 4.11 wurde die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} nach ungefähr 7 h Prozesszeit erreicht. Die maximale spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate ($q_{RL, spez, max}$) wurde nach etwa 15 h erreicht.

Für das logistische Modell wurden folgende Parameter erhalten:

$BTM_0 = 0,48 \text{ g/L} \pm 0,15$; $a = 5,33 \text{ g/L} \pm 0,34$; $BTM_{max} = 5,81 \text{ g/L}$, t_0 ($\frac{1}{2} BTM_{max, add}$) = $13,21 \text{ h} \pm 0,56$. Der Formfaktor b war $-3,40$. Die Ableitung des Biomasse-Fits ergab eine maximale spezifische Wachstumsrate von $0,234 \text{ h}^{-1}$ nach 7 h Prozesszeit. Dies ergab eine minimale Verdopplungszeit (t_d) von 2,96 h.

Andrä et al. (2006) kultivierten ebenfalls den Stamm *B. plantarii*, allerdings handelte es sich hierbei um den Stamm DSM 6535. Es ist schwierig, die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Andrä J et al. zu vergleichen. Andrä et al. (2006) erhielten 3 mg Rha₂-C₁₄, 30 mg Rha₂-C₁₄-C₁₄, und 2,9 mg Rha₂-C₁₄-C₁₄-C₁₄ bei der Elution der Glykolipide mittels HPLC. Hierfür kultivierten sie den Stamm *B. plantarii*

DSM 6535 wie Zähringer et al. (1997). Zähringer et al. (1997) verwendeten ein halbsynthetisches Medium, welches neben Phosphat- und Sulfatsalzen auch Hefeextrakt enthielt. Des Weiteren verwendeten Zähringer et al. (1997) Sojabohnenöl, welches kontinuierlich während der Fermentation zugefüttert wurde. Zähringer et al. (1997) kultivierten so lange, bis sie 35-40 g/L Biotrockenmasse erhielten.

Andrä et al. (2006) erwähnten nicht, wie viel Biotrockenmasse sie bei der Kultivierung produziert hatten. Die Autoren schreiben nur, dass sie 10 g Biomasse in 450 mL Wasser resuspendierten und daraus die Glykolipide extrahierten. Der biomassebezogene Produkt-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ (mg produziertes Rhamnolipid pro g gebildeter Biomasse) wäre bei André et al. (2006) mit diesen Angaben ca. 3,59 mg/g, und somit kleiner als der $Y_{p,x}$ von 7,91 mg/g, der in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde. Aber diese Werte können nicht genau miteinander verglichen werden, da André et al. (2006) lediglich 10 g Biomasse extrahierten. Es ist nicht beschrieben, ob es sich dabei um Biofeucht- oder Biotrockenmasse handelte. Außerdem müssten zu einem genauen Vergleich von André et al. (2006) die maximal erreichten Biotrockenmasse- und Rhamnolipidkonzentrationen nach einer bestimmten Prozesszeit bekannt sein.

Des Weiteren untersuchten André et al. (2006) das Rhamnolipid von *B. plantarii* DSM 6535 nicht wie in dieser Arbeit unter biotechnologischen Aspekten, sondern bezüglich seiner pathophysiologischen Aktivitäten.

Häussler et al. (1998) kultivierten den Stamm *B. pseudomallei* NCTC 10274 in einem Medium, welches Zitronensäure und Glukonsäure als C-Quellen und $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ als N-Quelle enthielt, sowie in einer NaCl-Lösung mit Glycerol bei jeweils 37°C. Bei einer Kultivierung in NaCl-Lösung mit Glycerol wurden nach sechs Tagen Inkubation bis zu 65 hämolytische Einheiten gemessen, wobei ca. 250 µg Rhamnolipid einer hämolytischen Einheit entsprachen. Leider bestimmten die Autoren nicht die Biotrockenmasse von *B. pseudomallei* NCTC 10274, die zu diesem Zeitpunkt erreicht worden war. Sie bestimmten lediglich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, die bei ca. 10^{11} /mL lag. Es wurden also ca. 16 mg Rhamnolipide von 10^{11} CFU/mL nach sechs Tagen gebildet. Diese Angaben können mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht verglichen werden, da die Biotrockenmasse nicht bekannt ist. Häussler et al. (1998) schreiben des Weiteren, dass signifikante Mengen

hämolytischer Aktivität im erhitzten Überstand des verwendeten modifizierten Vogel-Bonner-Mediums nur gefunden wurden, wenn *B. pseudomallei* zuvor die stationäre Phase erreicht hatte (Häussler et al., 1998). Allerdings bestimmten die Autoren das Rhamnolipid nicht direkt, sondern über die hämolytische Aktivität. Die Menge von Rhamnolipiden, die benötigt wird um eine messbare hämolytische Aktivität hervorzurufen, ist möglicherweise viel höher als die Menge an Rhamnolipid, die mittels HPLC am Detektionslimit noch erfasst werden kann. Dies könnte erklären, warum Häussler et al. (1998) signifikante Mengen von Rhamnolipiden bzw. hämolytischer Aktivität nicht schon in einer früheren Wachstumsphase detektieren konnten.

Dubeau et al. (2009) kultivierten den Stamm *B. thailandensis* E264 (ATCC) in Mineralsalz- und Vollmedium. Als C-Quelle verwendeten sie einerseits Kohlenwasserstoffe wie Mannitol, Dextrose, Saccharose, Glycerol und Fruktose, andererseits Pflanzenöle wie Raps-, Oliven-, Palm- und Sonnenblumenöl. Mit Glycerol wurden 419,1 mg/L nach 13 Tagen Kultivierung erhalten, mit Rapsöl 1473,72 mg/L. Dubeau et al. (2009) bestimmten aber nicht die Biotrockenmasse, so dass diese Ergebnisse bezüglich der Produktivität von *B. thailandensis* nicht mit dieser Arbeit verglichen werden können. Allerdings lässt sich festhalten, dass Dubeau et al. (2009) höhere Rhamnolipid-Endkonzentrationen erreicht haben. Dies könnte daran liegen, dass die Autoren 4% Glycerol und Rapsöl als C-Quelle verwendeten. In dieser eingesetzten Menge ist in Glycerol und Rapsöl mehr Kohlenstoff enthalten als in 10 g/L Glukose.

Costa et al. (2011) kultivierten den Stamm *Burkholderia glumae* AU6208 in einem Mineralsalzmedium. Dieses enthielt einmal Glycerol und einmal Rapsöl als C-Quelle. Mit Harnstoff als Stickstoffquelle erhielten die Autoren eine Rhamnolipid-Endkonzentration von 555,9 mg/L, bei Verwendung von NaNO₃ als Stickstoffquelle 259,5 mg/L und mit NH₄Cl 140,7 mg/L. Die Rhamnolipid-Produktion variierte auch bei dem Einsatz von verschiedenen Kohlenstoffquellen. Wurde Glycerol als C-Quelle benutzt wurden 555,9 mg/L Rhamnolipide gebildet, während es mit Rapsöl 1000,7 mg/L nach sechs Tagen Inkubation waren. Costa et al. (2011) bestimmten aber nicht die Biomasse, sondern nur die Optische Dichte, die am Ende der Kultivierung zwischen 0,4 und 0,8 lag. Diese Ergebnisse können daher auch nicht direkt mit der vorliegenden Arbeit bezüglich Ausbeuten und Raten verglichen werden.

Des Weiteren schreiben die Autoren, dass die Rhamnolipid-Bildung hauptsächlich nach dem Erreichen der stationären Phase stattfand. Dies wurde wie bereits erwähnt auch von Häussler et al. (1998) festgestellt. In der vorliegenden Arbeit startete die Produktion der Rhamnolipide bei abnehmender Wachstumsrate. Alle Ergebnisse zeigen, dass die Rhamnolipide, die von Burkholderien produziert werden, zeitversetzt zum Wachstum gebildet werden.

Welche Limitierungen zur Produktion von Rhamnolipiden in *B. plantarii* DSM 9509^T, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* und *B. glumae* führen, ist aber noch unklar. Müller et al. (2011) zeigten, dass unter ihren Bedingungen wahrscheinlich mehrere Limitierungen die Rhamnolipid-Produktion in *P. aeruginosa* mit induzieren. Sie zeigten des Weiteren, dass Rhamnolipide produziert wurden, obwohl Stickstoff in der Form von Nitrat im Überschuss vorlag. Dies widerspricht der Ansicht, dass die Produktion der Rhamnolipide erst startet, wenn die Stickstoffmenge limitierend wird (Venkata Ramana und Karanth, 1989; Robert et al., 1989; Manresa et al., 1991).

Es ist unwahrscheinlich, dass eine Stickstoff-Limitierung zur Rhamnolipid-Bildung in *B. plantarii* DSM 9509^T geführt hat, da ein Vollmedium mit Stickstoff in der Form von Proteose-Pepton und Fleischextrakt verwendet wurde. Allerdings wurde beobachtet, dass während der Kultivierung eine immer größere Menge an Glukose pro Gramm aufzubauenden Biomasse benötigt wurde, was auf die Produktion anderer extrazellulärer Produkte hindeutet, bei denen es sich nicht um Rhamnolipide handelt.

Polyhydroxybutyrat-Bildung

Die Hydroxybutyrat-Konzentration wurde nach dem Aufschließen der Zellen und der Depolymerisierung der Polyhydroxybuttersäure enzymatisch bestimmt. Während der Kultivierung wurden mehr als 0,5 g/L Hydroxybutyrat gebildet, was ungefähr einem Zehntel der gebildeten Biotrockenmasse entsprach (s. Abb. 4.12).

Zu beobachten war, dass die Polyhydroxybutyrat-Produktion etwa nach 10 h Prozesszeit begann. Zu dieser Zeit startete auch die Rhamnolipid-Produktion.

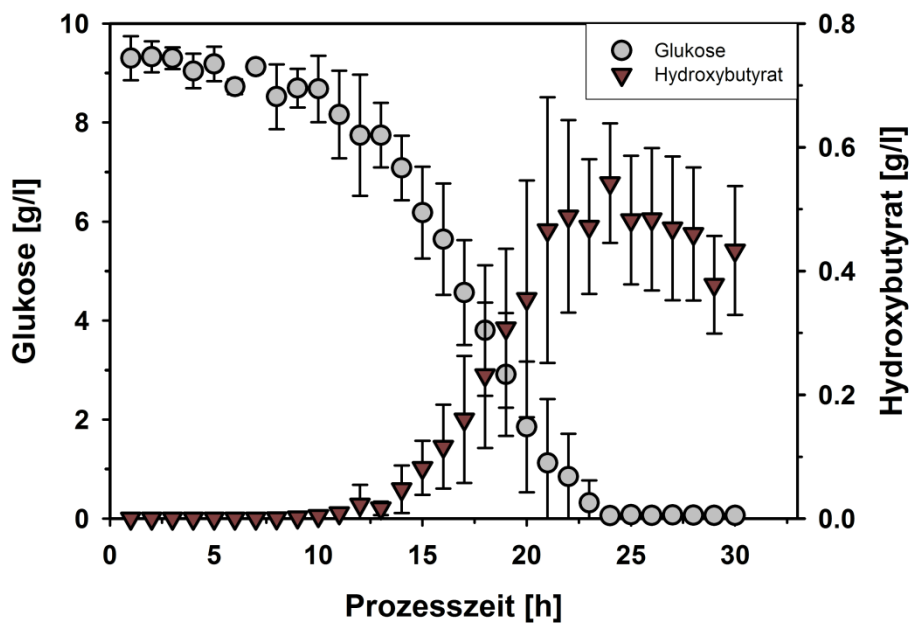


Abb. 4.12: Zeitlicher Verlauf der Glukose- und Hydroxybutyrat-Konzentration während einer 300 mL Batch Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T in NB (mit 10 g/L Glukose). Der pH wurde auf 7, die Temperatur auf 30°C und die Rührergeschwindigkeit auf 1100 rpm eingestellt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus drei Fermentationen berechnet

Beobachtet wurde eine simultane Produktion von Rhamnolipiden und Polyhydroxybuttersäure schon bei einigen Pseudomonaden (Nitschke et al., 2011). Grund hierfür ist, dass sich bei *Pseudomonas aeruginosa* die β -Hydroxyfettsäuren der Rhamnolipide und das PHB bzw. Polyhydroxyalkanoate (PHAs) aus der Fettsäuresynthese ableiten (Soberón-Chavéz et al., 2005; Nitschke et al., 2011). Für *P. aeruginosa* wurde allerdings gefunden, dass PHAs nur während der Wachstumsphase gebildet wurden, während die Rhamnolipid-Produktion zu Beginn der stationären Phase startete (Chayabutra und Ju, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Produktion von PHB und Rhamnolipiden zwar bei abnehmender Wachstumsrate, aber noch in der Wachstumsphase startete (s. Abb. 4.11 und 4.12).

Um die Produktionskosten beider Stoffe zu senken wird zwar eine simultane Produktion von Rhamnolipiden und PHAs im Falle *P. aeruginosa* angestrebt (Hori et al., 2002), im Falle von *B. plantarii* DSM 9509^T wäre das aber nicht sinnvoll.

Während der Kultivierung bildete *B. plantarii* DSM 9509^T mit ca. 0,5 g/L PHB etwa zehn Mal mehr Buttersäure als Rhamnolipid, was vermutlich daran lag, dass

Vorläufermoleküle für die Synthese der Rhamnolipide auch für die Synthese von PHB verwendet werden. Wie bereits erwähnt, greifen bei *P. aeruginosa* die Rhamnolipid- und die PHA-Biosynthese ineinander. Aufgrund der engen taxonomischen Verwandtschaft wird das vermutlich auch bei *B. plantarii* DSM 9509^T der Fall sein.

Das im Zuge der Fettsäure *de novo* Synthese gebildete Intermediat β -Hydroxyacyl-ACP kann von dem Enzymen β -hydroxyacyl-CoA-ACP-Transferase (PhaG), β -hydroxy-acyl-ACP-Dehydratase (FabA) und der Untereinheit A der Rhamnosyltransferase 1 (RhlA) umgesetzt werden (s. Abb. 4.13). PhaG setzt das β -Hydroxyacyl-ACP zu β -Hydroxyacyl-CoA um, welches dann von der PHA-Synthase zu PHA polymerisiert wird. FabA sorgt dafür, dass das β -Hydroxyacyl-ACP im Fettsäurestoffwechsel verbleibt. RhlA kann das β -Hydroxyacyl-ACP für die Synthese von Rhamnolipiden abziehen. Alle drei Enzyme konkurrieren also um dieses Substrat.

Um die Ausbeute an Rhamnolipid zu erhöhen würde es daher wahrscheinlich Sinn machen, mit gentechnischen Methoden in den Biosyntheseweg der Polyhydroxybuttersäure einzugreifen und z. B. PhaG zu deletieren. Somit könnte der metabolische Fluss in Richtung Rhamnolipid-Synthese verstärkt werden.

De Andrade Rodrigues et al. (2000) deletierten die PHA-Synthetase (PhaC) in dem Stamm *B. cepacia* IPT64. Sie fanden, dass die Mutante *phaC1::Cm* nur noch etwa 1% PHA (bezogen auf die Biotrockenmasse) akkumulierte. Der Wildtyp hingegen akkumulierte bis zu ca. 49 % (de Andrade Rodrigues et al., 2000). Da die Mutante *phaC1::Cm* immer noch, wenn auch nur wenig, PHA akkumulierte, vermuteten die Autoren, dass *B. cepacia* IPT64 mindestens zwei PHA-Synthase-Gene besitzt. Die Rhamnolipid-Produktion wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

Nicht nur *B. cepacia* besitzt das *phaC*-Gen, sondern auch *B. pseudomallei* 1017b (Dubeau et al., 2009; UniProt (www.uniprot.org), *Burkholderia* Genome Database (www.burkholderia.com)). Daher wäre es wahrscheinlich möglich, mit Hilfe der bereits sequenzierten *phaC*-Gene aus den verschiedenen Burkholderien die PHA-Synthase in *B. plantarii* DSM 9509^T zu finden und zu deletieren, und somit möglicherweise die Rhamnolipid-Ausbeute zu steigern.

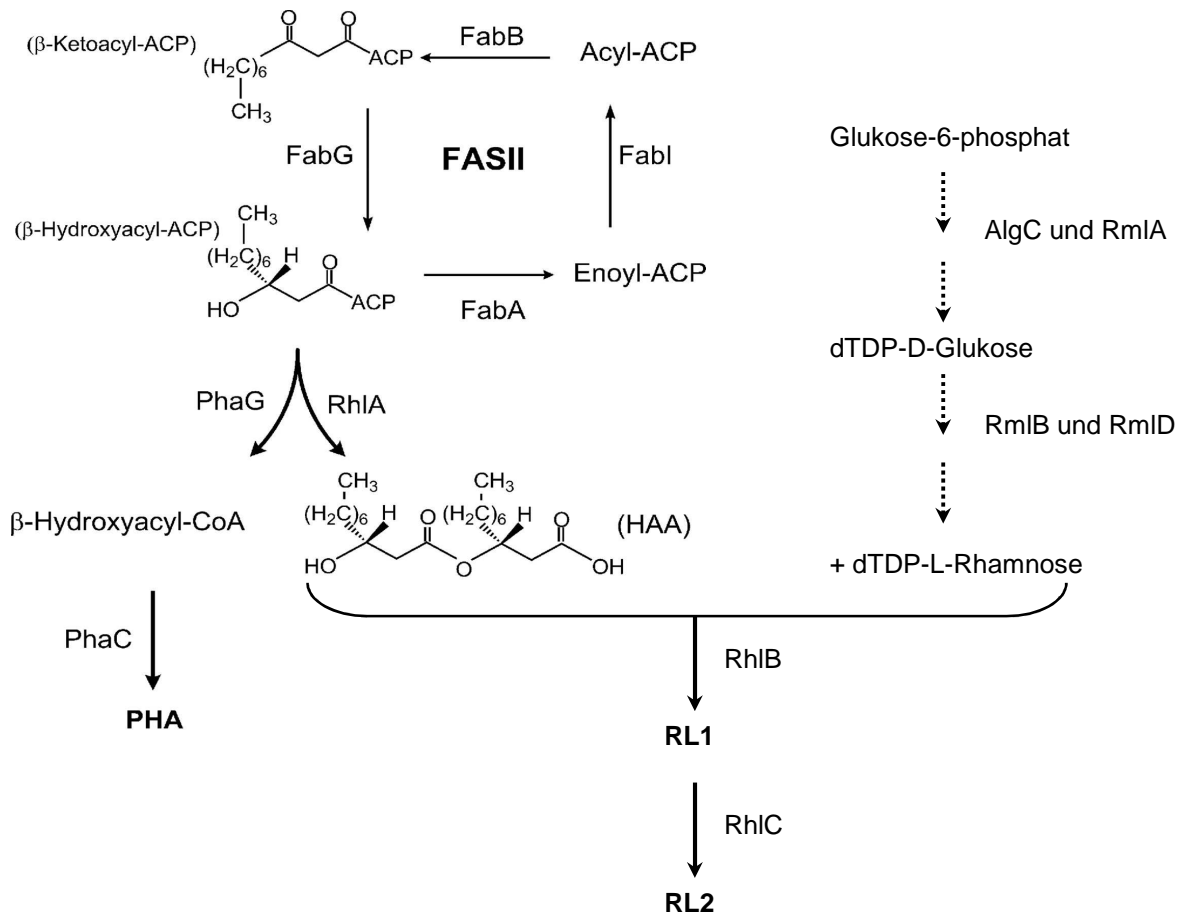


Abb. 4.13: Darstellung der Biosynthesewege für Rhamnolipide (RL) und Polyhydroxyalkanoate (PHA) in *Pseudomonas aeruginosa* (in Anlehnung an Zhu und Rock, 2008). FASII: Stoffwechselweg der Fettsäure-Synthese Typ II; FabB: β-ketoacyl-ACP Synthase; FabG: β-ketoacyl-ACP Reduktase; Enoyl-ACP Reduktase; PhaC: PHA-Synthase; RhlA: Rhamnosyltransferase 1, Untereinheit A, RhlB: Rhamnosyltransferase 1, Untereinheit B; RhlC: Rhamnosyltransferase 2. Gepunktete Pfeile stellen gekürzte Stoffwechselwege dar.

4.2.2 Charakterisierung bei Wachstum auf Minimalmedium

Ziel dieses Teils der Arbeit war es die Rhamnolipid-Produktion in *B. plantarii* DSM 9509^T auf Minimalmedium grundlegend zu charakterisieren. Da kein geeignetes Minimalmedium für *B. plantarii* DSM 9509^T existierte, sollte zunächst eine Elementaranalyse durchgeführt und anschließend ein Minimalmedium ausgelegt werden. In einem ersten Versuch sollte der Einfluss verschiedener Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnisse auf die Rhamnolipid-Bildung untersucht werden. In einem zweiten Versuch sollte das Medium in verschiedenen Ansätzen supplementiert werden.

Elementaranalyse

Die Ergebnisse der Elementaranalyse von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T sind in Tab. 4.2. dargestellt.

Tab. 4.2: Ergebnisse der Elementaranalyse von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T im Vergleich mit der Zusammensetzung einer prokaryontische Zelle (Schlegel, 2006). Gew.-%: Gewichtsprozent, k. A.: keine Angabe.

<i>Analysenparameter</i>	Gew.-% <i>B. plantarii</i> DSM 9509 ¹	Gew.-% prok. Zelle
C	46.90	50.00
O	28.30	20.00
N	13.60	14.00
H	6.40	8.00
P	2.00	3.00
S	0.50	1.00
K	0.38	1.00
Na	1.10	k.A.
Ca	0.0011	0.50
Mg	0.23	0.50
Cl	0.7	0.50
Fe	0.012	0.20
Mn	>0.0001	k.A.

Der prozentuale Anteil von Calcium und Eisen unterschied sich deutlich von den Werten für eine prokaryontische Zelle (Schlegel, 2006). Calcium war nur mit einem sehr geringen Anteil von 0,0011 Gew.-% in der Biotrockenmasse vorhanden. Ob in *B. plantarii* DSM 9509^T eine geringe intrazelluläre Calciumkonzentration die Rhamnolipid-Synthese mit induziert, muss noch untersucht werden.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* scheint eine geringe Menge an Calcium im Medium die Rhamnolipid-Produktion zu begünstigen. Giani et al. (1997) benutzen zur Herstellung von Rhamnolipiden mit *P. aeruginosa* sogar ein Calcium freies Minimalmedium. Welche genaue Rolle die niedrige Calciumkonzentration bei Pseudomonaden und Burkholderien bei der Rhamnolipid-Bildung spielt, ist allerdings noch offen. Auch die Eisenkonzentration war in der Biotrockenmasse sehr niedrig. Von *P. aeruginosa* ist bekannt, dass eine limitierende Eisenkonzentration im Medium die Expression von *rhlAB* erhöht (Glick et al., 2010; Déziel et al., 2003). Ob das für *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T auch gilt, muss noch untersucht werden.

Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis

Die Ergebnisse der Schüttelkolbenexperimente mit verschiedenen Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnissen sind in Abb. 4.14 dargestellt.

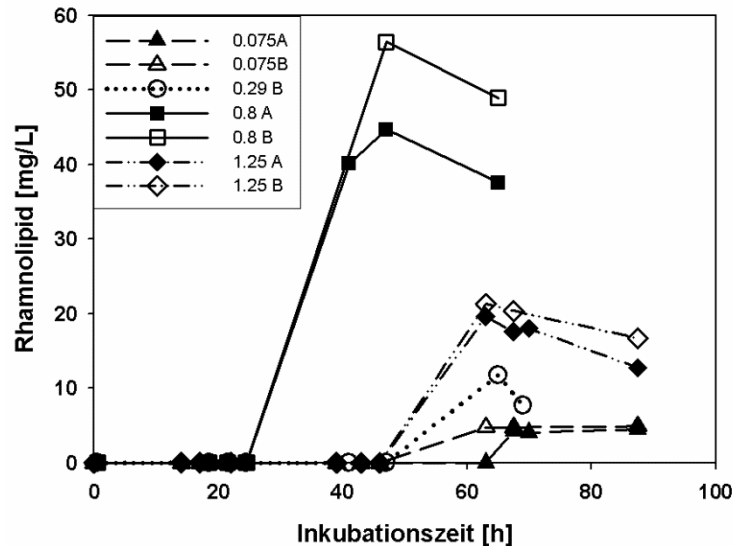


Abb. 4.14: Zeitlicher Verlauf der Rhamnolipidkonzentrationen bei der Kultivierung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T in Minimalmedium mit verschiedenen Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnissen (N/Cs). Es wurden je zwei Schüttelkolben (A und B) bei N/Cs von 0,075; 0,29; 0,8 und 1,25 vermessen. Bei einem N/C von 0,29 konnte der Kolben A nicht ausgewertet werden. Die höchsten Rhamnolipidkonzentrationen wurden bei einem N/C von 0,8 gebildet.

Bei einem N/C von 0,8 wurden fast 60 mg/L Rhamnolipide gebildet. Das ist deutlich mehr als bei der Kultivierung in dem Vollmedium Nutrient Broth, in dem *B. plantarii* DSM 9509^T nur ca. 46 mg/L Rhamnolipide produzierte. Bei einem N/C von 0,29, welcher von der Elementaranalyse vorgegeben wurde, wurden nur etwas mehr als 10 mg/L Rhamnolipide gebildet. Die Ergebnisse zeigen, dass *B. plantarii* DSM 9509^T einen gewissen Stickstoff-Überschuss zur Rhamnolipid-Bildung benötigt. Dies unterscheidet *B. plantarii* DSM 9509^T von *P. aeruginosa*.

In der Literatur wird beschrieben, dass bei *P. aeruginosa* die Produktion der Rhamnolipide erst startet, wenn die Stickstoffmenge limitierend wird (Venkata Ramana und Karanth, 1989; Robert et al., 1989; Manresa et al., 1991). Eine Stickstofflimitierung per se induziert aber nicht die Rhamnolipid-Produktion. Müller et al. (2011) zeigten, dass *P. aeruginosa* schon Rhamnolipide produzierte, als noch genug Stickstoff vorlag. Welche Limitierung bei *B. plantarii* DSM 9509^T zur Rhamnolipid-Bildung führt muss noch herausgefunden werden.

Supplementierung des Minimalmediums

Es war kein erheblicher Unterschied in der Biotrockenmasse- und Rhamnolipid-Bildung bei den verschiedenen Ansätzen zu beobachten. Es wurden ca. 2,5-3 g/L Biotrockenmasse und etwa 25-40 mg/L Rhamnolipid gebildet (s. Abb. 4.15).

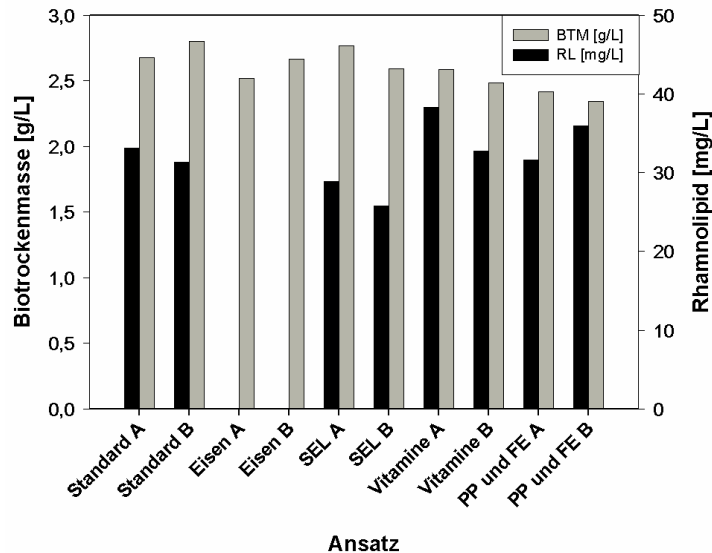


Abb. 4.15. Maximale erreichte Biotrockenmasse- und Rhamnolipidkonzentrationen von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T bei der Kultivierung in supplementiertem Minimalmedium. Jeder Ansatz wurde in Doppelbestimmung durchgeführt (A und B).

Von den Extrakten wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt, unter anderem um zu überprüfen, ob in den beiden Ansätzen mit der 10-fach höheren Eisenkonzentration nicht ein Rhamnolipid gebildet worden war.

Auf dem Dünnschichtchromatogramm waren bei der Probe des Ansatzes mit der 10-fach höheren Eisenkonzentration zwei unbekannte Substanzflecken zu sehen. Die erste Substanz war in geringeren Mengen vorhanden als Rha₂-C₁₄-C₁₄ und lief auf der DC-Platte etwas höher als Rhamnolipid 2 von *P. aeruginosa* (s. Abb. 4.16). Es könnte sich um das Kongener Rha-C₁₄ handeln.

Die zweite neue Substanz, die von *B. plantarii* DSM 9509^T in der größten Menge gebildet wurde, lief etwas höher als der unterste Substanzfleck des Jeneil-Standards. Hierbei könnte es sich entweder um freie Rhamnose oder um das Kongener Rha₂-C₁₄ handeln. Wahrscheinlich handelt es sich um letzteres, da es wahrscheinlicher ist, dass *B. plantarii* DSM 9509^T die Rhamnose verstoffwechselt als die Energiequelle auszuschleusen.

Es fällt auf, dass bei beiden neuen Rhamnolipiden eine β -Hydroxyfettsäure fehlt. Das könnte darauf hinweisen, dass Eisen die Rhamnosyltransferase beeinflusst. Andererseits könnte die Fettsäure auch nachträglich von *B. plantarii* DSM 9509^T durch Lipasen abgespalten worden sein. Dies müsste genauer untersucht werden.

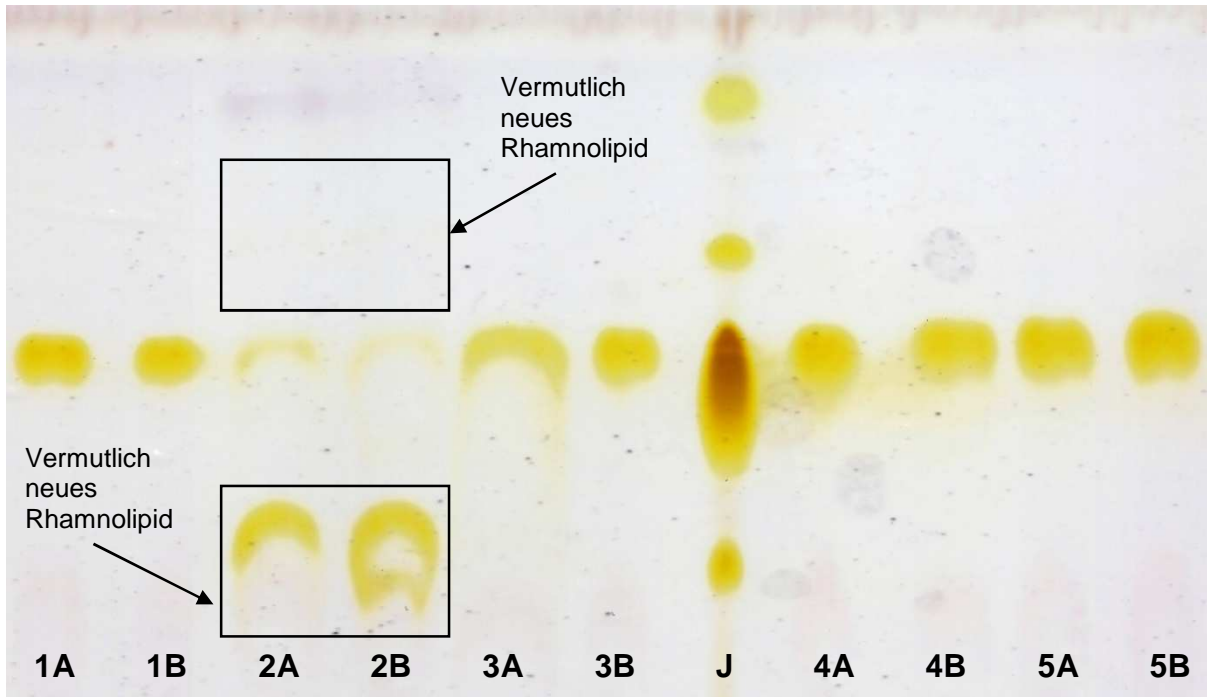


Abb. 4.16: Dünnschichtchromatogramm der Rohextrakte, die aus den Proben der verschiedenen Ansätze gewonnen wurden. Jeder Versuch wurde doppelt durchgeführt (A und B). 1: Standard-Minimalmedium, 2: Ansatz mit 10-fach höherer Eisenkonzentration, 3: Ansatz mit 10-fach höher konzentrierter Spurenelement-Lösung, 4: Ansatz mit Vitaminen, 5: Ansatz mit Proteose-Pepton und Fleischextrakt. Zu sehen ist, dass in Ansatz 2 A und B insgesamt drei Rhamnolipide gebildet wurden. Dabei wurde nicht vorwiegend das Kongener $\text{Rha}_2\text{-C}_{14}\text{-C}_{14}$ gebildet, sondern ein vermutlich anderes, welches einen kleineren R_f -Wert aufweist. Möglicherweise handelte es dabei um ein Rhamnolipid mit zwei Rhamnoseresten und einer C_{14} -Hydroxyfettsäure ($\text{Rha}_2\text{-C}_{14}$) ähnlich dem Rhamnolipid 4 ($\text{Rha}_2\text{-C}_{10}$) von *Pseudomonas aeruginosa*.

In der Literatur gibt es bisher wenige Erkenntnisse wie die Eisenkonzentration die Rhamnolipid-Produktion beeinflusst. Glick et al. (2010) fanden, dass die Rhamnolipid-Produktion in Biofilmen von *P. aeruginosa* unter eisenlimitierenden Bedingungen induziert wird. Die Autoren verfolgten die GFP-Expression von *P. aeruginosa* Zellen, bei denen an das Genprodukt der Rhamnosyltransferase 1 GFP fusioniert war (*rhlA-gfp*). Hierfür kultivierten sie die Zellen zum einen unter eisenlimitierenden und zum

ändern unter nicht eisenlimitierenden Bedingungen. Sie fanden, dass die Zellen, die unter eisenlimitierenden Bedingungen kultiviert worden waren, viel früher Rhamnolipide bildeten. Des Weiteren war der Biofilm ziemlich flach und unstrukturiert. Bei den Zellen, die genug Eisen gestellt bekommen hatten, blieb die Fluoreszenz bzw. die Expression von *rhlAB* gering, wie auch die Rhamnolipid-Produktion. Dafür bildeten sie ausgeprägte, pilzartige Biofilmstrukturen (Glick et al., 2010). Wie die Eisenkonzentration die Expression von *rhlAB* beeinflusst, muss noch aufgeklärt werden. Cornelis (2004) und Oglesby et al. (2008) zeigten, dass es vermutlich eine Verbindung zwischen dem *Quorum Sensing*-System und der Eisenaufnahme gibt.

Unter eisenlimitierenden Bedingungen scheint *P. aeruginosa* mehr von dem Autoinducer C4-HSL zu bilden, was wiederum die Expression RhlR-regulierter Gene wie *rhlAB* erhöht und somit auch die Rhamnolipid-Synthese (Glick et al., 2010).

Déziel et al. (2003) verfolgten die Expression von *rhlAB* mit dem *P. aeruginosa* Stamm PG201, bei dem die Rhamnosyltransferase 1 mit dem Gen der β -Galactosidase fusioniert war (*rhlA*'-LacZ). Sie fanden ebenfalls, dass ein Überschuss an Eisen die Rhamnolipid-Synthese in *P. aeruginosa* sowie das Schwärmen herabsetzt.

Bei *B. plantarii* DSM 9509^T scheint eine höhere Eisenkonzentration nicht die Rhamnolipid-Synthese per se zu erniedrigen, sondern eher dazu zu führen, dass statt dem ansonsten vorherrschenden Rhamnolipid-Kongener Rha₂-C₁₄-C₁₄ ein anderes Rhamnolipid produziert wird. Zwar wird die Produktion von Rha₂-C₁₄-C₁₄ nicht gänzlich eingestellt aber signifikant reduziert (s. Abb. 4.16).

Diese Ergebnisse liefern mögliche neue Erkenntnisse bezüglich der Rhamnolipid-Synthese in *B. plantarii* DSM 9509^T, da sie auf einen Zusammenhang zwischen der Eisen-Aufnahme und der Rhamnolipid-Biosynthese hindeuten. Allerdings sollten diese Ergebnisse reproduziert werden, wenn möglich im größeren Maßstab um genug Substanzen für eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie zu erhalten.

4.3 Herstellung und Screening von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten

In diesem Teil der Arbeit sollten durch eine UV-Bestrahlung von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten hergestellt werden. Für das Screening der UV-Mutanten sollte

des Weiteren ein hochdurchsatzfähiger Screening-Assay entwickelt werden. Die Mutanten wurden mittels Bestrahlung durch UV-Licht hergestellt. Bei Durchführung der Mutagenese ohne direkten Lichteinfall aber mit normaler Raumbelichtung, konnte kein gleichmäßiges Absterben festgestellt werden. Wahrscheinlich besitzt *B. plantarii* DSM 9509^T eine Photolyase, welche die Schädigung bei kurzen Einwirkungen von UV-Licht auf die Zelle bei Lichteinwirkung reparieren kann. Allerdings konnte die Mutagenese erfolgreich im Dunkeln durchgeführt werden. Abb. 4.17 zeigt die Zellzahl und Überlebensrate in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer.

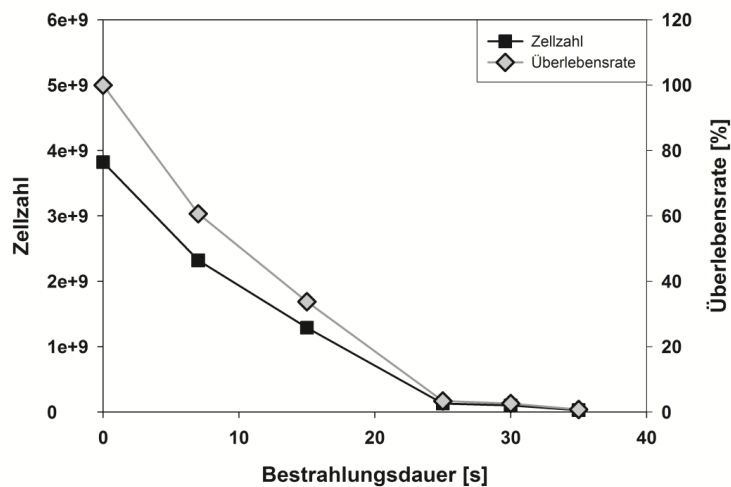


Abb. 4.17: Zellzahl und Überlebensrate von *B. plantarii* DSM 9509^T in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer von UV-Licht.

Erwünscht war eine Überlebensrate von 0,5 – 5 %, da sich in diesem Bereich das Verhältnis von Mutationen zur Überlebensrate in ähnlichen Experimenten als am günstigsten erwiesen hat (Miller, 1992). Bei *B. plantarii* DSM 9509^T konnte diese Überlebensrate mit einer maximalen Bestrahlungsdauer von 35 s erreicht werden (s. Abb. 4.17).

Die UV- Strahlung hatte keine Auswirkungen auf die Agarplatten. Eine Bestrahlung der Agarplatten vor dem Aufbringen einer Bakterienkultur führte zu keinen Änderungen des Wachstumsverhaltens oder der Zellzahl gegenüber nicht bestrahlten Agarplatten.

Methylenblau-Assay

Um die Linearität des Methylenblau-Assays zu testen wurde eine Kalibriergerade mittels Dreifachbestimmung erstellt. Hierfür wurden 0-1000 mg/L Rhamnolipid 3 aus *P. aeruginosa* in Nutrient Broth gelöst, Methylenblau zugegeben und mit Chloroform extrahiert (s. Abb. 4.18).

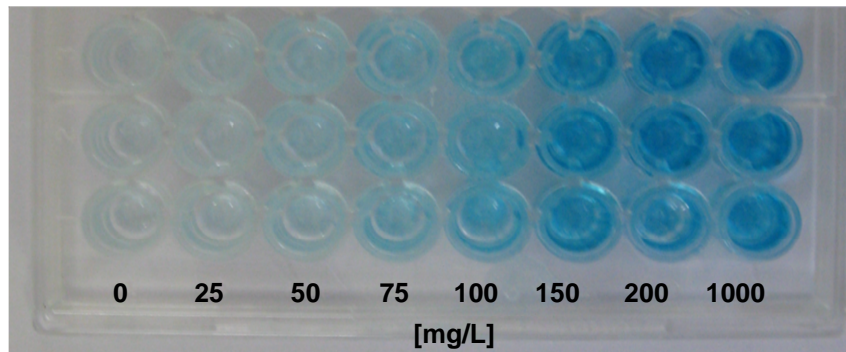


Abb. 4.18: Chloroformphase mit Methylenblau der verschiedenen Rhamnolipidkonzentrationen in einer 96 well Mikrotiterplatte. Verschiedene Mengen von Rhamnolipid 3 aus *P. aeruginosa* wurden in Nutrient Broth gelöst, Methylenblau zugegeben und mit Chloroform extrahiert.

Nach Inkubation wurde die Absorption bei 650 nm gemessen. Abb. 4.19 zeigt die Absorption des Rhamnolipid-Methylenblau-Komplexes in der Chloroformphase bei 650 nm in Abhängigkeit von der eingesetzten Rhamnolipid 3-Konzentration.

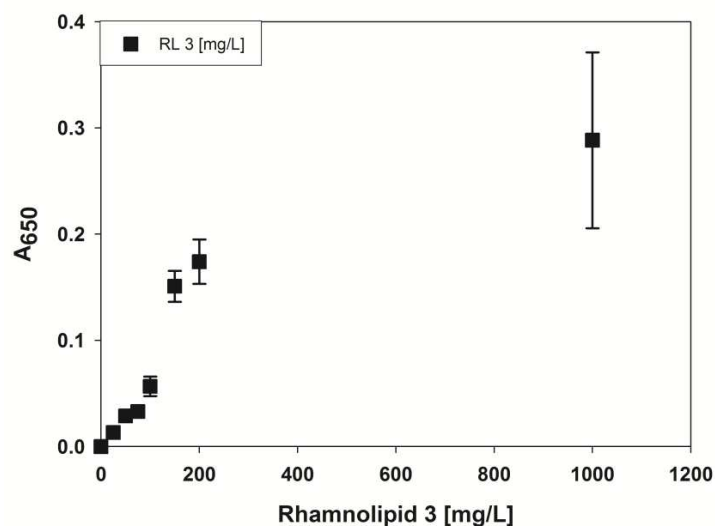


Abb. 4.19: Absorption der Rhamnolipid 3-Konzentrationsreihe bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die Absorption bei 1000 mg/L liegt deutlich nicht mehr im linearen Bereich und wurde daher in die Erstellung der Kalibriergeraden (s. Abb. 4.20) nicht mit einbezogen.

Es konnte ein annähernd linearer Bereich zwischen 0 mg/L und 200 mg/L beobachtet werden (s. Abb. 4.20). Ob sich mit Hilfe der mit Rhamnolipid 3 erstellten Kalibriergerade Rückschlüsse auf die genaue Rha₂-C₁₄-C₁₄-Konzentration im Kulturüberstand von *B. plantarii* DSM 9509^T ziehen lassen, muss noch geklärt werden, da sich Rha₂-C₁₄-C₁₄ im Verhalten bezüglich der Komplexbildung mit Methyleneblau und der Extraktion von Rhamnolipid 3 unterscheiden könnte.

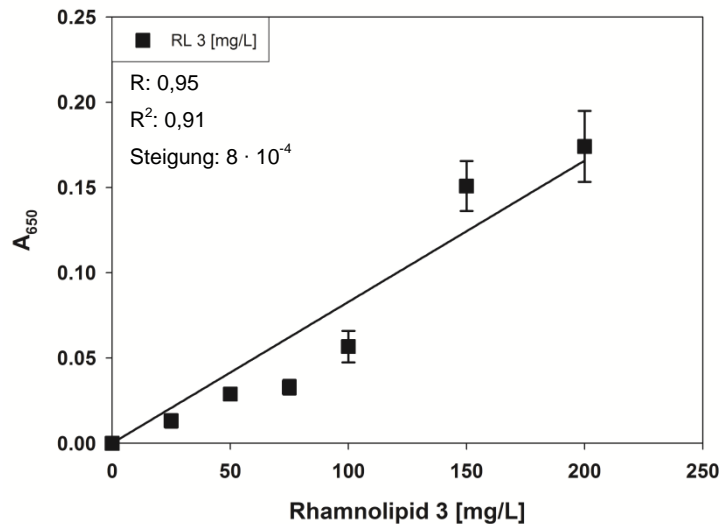


Abb. 4.20: Absorption der Rhamnolipid 3-Konzentrationsreihe bei einer Wellenlänge von 650 nm. Der Bereich von 0-200 mg/L wurde als annähernd linear angesehen.

Es wurde beobachtet, dass sich das Methyleneblau auch bei einem Überschuss an Rhamnolipid 3 nicht vollständig aus der wässrigen Phase extrahieren lässt. Da das Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄ von *B. plantarii* DSM 9509^T aber hydrophober ist, könnte der Komplex aus Rha₂-C₁₄-C₁₄ und Methyleneblau ebenfalls hydrophober sein und somit das Gleichgewicht von den gelösten Einzelkomponenten zum Komplex hin verschieben.

Methyleneblau-Assay im Hochdurchsatzformat

Mittels UV-Mutagenese wurden ca. 100 000 UV-Mutanten erstellt. Danach wurde mit 5000 UV-Mutanten ein Primärscreening in Mikrotiterplatten durchgeführt. Jede UV-Mutante, deren Extrakt bei 650 nm besonders hohe Absorptionswerte zeigte oder deren Verhältnis der Absorption bei 650 nm zur Optischen Dichte der Kultur auffällig hoch war, wurde in einem Sekundärscreening weiter untersucht. Insgesamt wurden

156 Mutanten einem Sekundärscreening unterzogen. In Abb. 4.21 ist beispielhaft ein Ergebnis des Sekundärscreenings dargestellt.

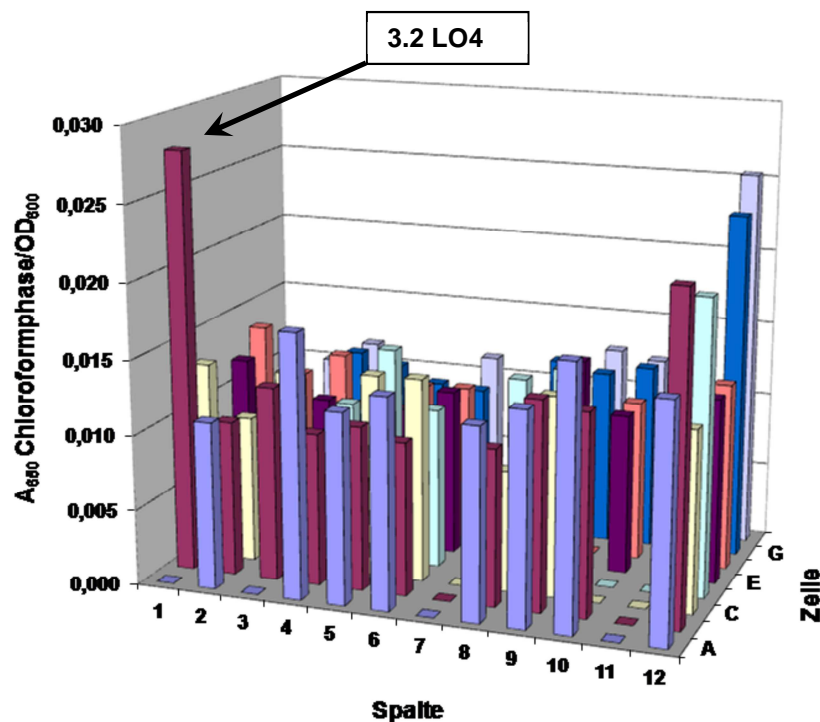


Abb. 4.21: Absorption bei 650 nm im Verhältnis zur Optischen Dichte von Nummer 321H07 bis 533D06 (siehe Tab. 7.4 mit Belegung der Mikrotiterplatte im Anhang). Die Mutante 3.2 LO4 zeigte eine auffällig hohe Extinktion.

Eine UV-Mutante, die wie erhofft mindestens das 5- oder 10-fache an Rhamnolipid bildet, konnte nicht gefunden werden. Allerdings zeigte die UV-Mutante 3.2 LO4 im Sekundärscreening eine auffällig hohe Extinktion. Von dieser UV-Mutante wurden daher Glyzerolstocks angelegt. Des Weiteren wurde diese UV-Mutante in einem Parallelbioreaktor kultiviert und hinsichtlich Wachstum und Rhamnolipid-Bildung mit dem Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T verglichen.

Eine weitere UV-Mutante hatte bereits nach 36 h Inkubation eine sehr große Kolonie gebildet. Die Kolonie hatte zu diesem Zeitpunkt einen viel größeren Durchmesser als die umgebenden Kulturen (s. Abb. 4.22). Diese UV-Mutante wurde deshalb als schnellwachsende Mutante bezeichnet. Von dieser UV-Mutante wurden ebenfalls Glyzerolstocks angelegt. Des Weiteren wurde diese UV-Mutante in einem Parallelbioreaktor kultiviert und hinsichtlich Wachstum und Rhamnolipid-Bildung mit dem Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T verglichen.

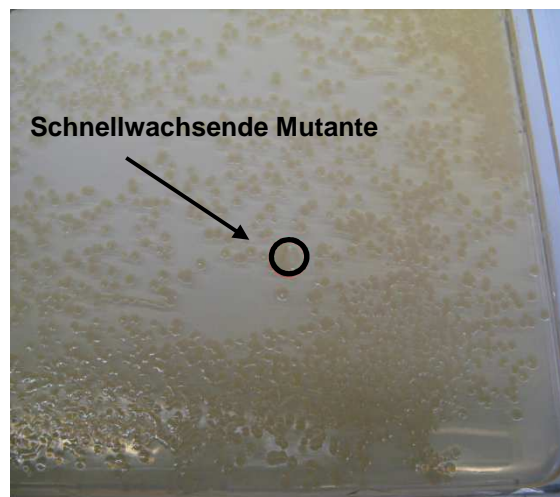


Abb. 4.22: Eine NA-Platte mit *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten nach einer Inkubationsdauer von 36 h. Die UV-Mutante, welche die sehr große Kolonie gebildet hatte, wurde eingekreist.

Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der großen Kolonie um eine Kontamination handelte, war gering, da die Kolonie phänotypisch, die Größe ausgenommen, keine Unterschiede zu den anderen Kolonien der *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten zeigte. Nach der Mutagenese wurden die Agarplatten unter der Clean Bench sofort verschlossen. Auf keiner der über 50 erstellten Agarplatten war eine Kontamination zu erkennen. Mögliche Erklärungen für die Beobachtung wären beispielsweise schnellere Zellteilung oder schnelleres Schwärmen.

Ein Grund für das schnellere Schwärmen könnte eine höhere Rhamnolipid-Produktion sein (Dubeau et al., 2009; Déziel et al., 2003). Bereits vor Erstellung der UV-Mutanten wurde vermutet, dass sich eine Steigerung der Rhamnolipidkonzentration auf das Schwärmen auswirken würde. Sollte sich eine höhere Rhamnolipidkonzentration bestätigen, wäre diese schnellwachsende UV-Mutante im Hinblick auf etwaige weitere Mutageneserunden sehr interessante.

Eventuell wurden von der schnellwachsende UV-Mutante aber auch weniger Speicherstoffe gebildet, was bei einer Rhamnolipid-Produktion eine höhere Ausbeute bedeuten könnte.

Folgeuntersuchung ausgewählter UV-Mutanten und Vergleich mit dem Wildtyp

Die schnellwachsende UV-Mutante und die UV-Mutante 3.2 LO4 wurden in Nutrient Broth (mit 10 g/L Glukose) kultiviert um sie hinsichtlich Wachstum und Rhamnolipid-Bildung mit den Daten für den Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T vergleichen zu können. Allerdings beziehen sich die Raten und Ausbeute-Koeffizienten beim Wildtyp auf eine Prozesszeit von 25 h (Hörmann et al., 2010). Zu diesem Zeitpunkt wurden bei den Fermentationen der UV-Mutanten keine Proben genommen. Allerdings wurden Proben nach einer Prozesszeit von 24 h entnommen. Die Raten wurden daher auf eine Prozesszeit von 24 h bezogen und mit den Daten des Wildtyps *B. plantarii* DSM 9509^T verglichen (s. Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Übersicht über die Raten und Ausbeutekoeffizienten des Wildtyps (WT) *B. plantarii* DSM 9509^T (Hörmann et al., 2010), verglichen mit den Daten der UV-Mutante LO4 und der schnellwachsenden (SW) UV-Mutante.

Rate/Koeffizient	LO4	SW	WT
Rhamnolipid-Bildungsrate qp [mg/L·h]	1,02	1,41	1,83
Spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate qp_{spez} [mg/gBTM·h]	0,27	0,34	0,32
Glukose-Aufnahmerate qs [g/L·h]	0,36	0,42	0,40
Spezifische Glukose-Aufnahmerate qs_{spez} [g/gBTM·h]	0,10	0,10	0,07
Biotrockenmasse-Bildungsrate qx [g/L·h]	0,16	0,17	0,23
Substratbezogener Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,s}$ [mg/g]	2,87	3,39	4,57
Biomassebezogener Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ [mg/g]	6,58	8,12	7,91
Substratbezogener Biomasse-Ausbeutekoeffizient $Y_{x,s}$ [g/g]	0,44	0,42	0,58
Maximale Rhamnolipidkonzentration	36	36	46

Wie Tab. 4.3 zeigt, unterschieden sich die Raten und Ausbeutekoeffizienten der UV-Mutanten nicht wesentlich von denen des Wildtyps *B. plantarii* DSM 9509^T. Für die kleinen Unterschiede könnten Messfehler verantwortlich sein, z. B. kann die Standardabweichung bei der Messung der Rhamnolipide mittels HPLC bis zu 30% betragen. Ein weiterer Grund für die kleinen Unterschiede ist vermutlich, dass der Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T von einem anderen Experimentator kultiviert wurde. Dass aber keine großen Unterschiede sichtbar waren, deutete darauf hin, dass die UV-Mutanten nicht wesentlich produktiver waren als der Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T.

Da die UV-Mutanten unter gleichen Bedingungen parallel fermentiert wurden, konnten diese untereinander genau verglichen werden. Hier schien die schnellwachsende UV-Mutante etwas produktiver zu sein als die UV-Mutante LO4. Die schnellwachsende UV-Mutante wies höhere Rhamnolipid-Bildungsraten sowie höhere Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizienten auf (Tab. 4.3). Die durchschnittliche Rhamnolipid-Bildungsrate qp der schnellwachsenden UV-Mutante war um ca. 38% höher als die der UV-Mutante LO4. Der biomassebezogene Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ der schnellwachsenden UV-Mutante war ca. 23% höher als der $Y_{p,x}$ der UV-Mutante LO4. Die maximale erreichte Rhamnolipidkonzentration von ca. 36 mg/L war zwar bei beiden UV-Mutanten gleich, wurde aber von der schnellwachsenden UV-Mutante früher erreicht.

Es wurde daher entschieden die schnellwachsende UV-Mutante mit dem Wildtyp *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T parallel zu fermentieren um die beiden genauer miteinander zu vergleichen. Die Ausbeutekoeffizienten und relevanten Raten dieser Fermentation sind in Tab. 4.4 wiedergegeben.

Tab. 4.4: Übersicht über die Raten und Ausbeutekoeffizienten des *B. plantarii* DSM 9509^T Wildtyps (WT) und der schnellwachsenden (SW) UV- Mutante.

Rate/Koeffizient	SW	WT
Rhamnolipid-Bildungsrate qp [mg/L·h]	2,54	2,15
Spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate qp_{spez} [mg/gBTM·h]	0,62	0,50
Glukose-Aufnahmerate qs [g/L·h]	0,45	0,45
Spezifische Glukose-Aufnahmerate qs_{spez} [g/gBTM·h]	0,11	0,11
Biotrockenmasse-Bildungsrate qx [g/L·h]	0,19	0,20
Substratbezogener Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,s}$ [mg/g]	5,66	4,73
Biomassebezogener Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ [mg/g]	13,60	10,94
Substratbezogener Biomasse-Ausbeutekoeffizient $Y_{x,s}$ [g/g]	0,42	0,43
Maximale Rhamnolipidkonzentration	56	50

Die Raten und die Ausbeutekoeffizienten des Wildtyps *B. plantarii* DSM 9509^T unterschieden sich kaum von denen der schnellwachsenden UV-Mutante. Die schnellwachsende UV-Mutante wies nur geringfügig höhere Rhamnolipid-Bildungsraten und höhere Rhamnolipid-Ausbeutekoeffizienten auf. Die spezifische Rhamnolipid-Bildungsrate qp_{spez} der schnellwachsenden UV-Mutante war gegenüber der des Wildtyps um ca. 24% höher. Der biomassebezogene Rhamnolipid-

Ausbeutekoeffizient $Y_{p,x}$ der schnellwachsenden UV-Mutante war ebenfalls ca. 24% höher als der des Wildtyps. Die schnellwachsende UV-Mutante schien etwas mehr Substrat für die Bildung der Rhamnolipide zu verwenden als der Wildtyp.

Die schnellwachsende UV-Mutante erreichte des Weiteren eine maximale Rhamnolipidkonzentration von 56 mg/L. Der Wildtyp *B. plantarii* DSM 9509^T erreichte maximal 50 mg/L.

Die schnellwachsende UV-Mutante produzierte etwas mehr Rhamnolipide als der Wildtyp. Die Messpunkte für die Rhamnolipidkonzentration lagen jedoch so nahe beieinander, dass sich ihre Standardabweichungen zum Teil überschneiden. Es gab daher keinen eindeutigen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der schnellwachsenden UV-Mutante hinsichtlich der Produktivität.

Eine Mutationsrunde reicht oft nicht aus um den gewünschten Effekt zu erhalten. Tarabasz-Szymanska und Galas (1993) gelang es aber z. B. mit einer zweistufigen UV-Mutagenese die Produktion des Exopolysaccharids Pullulan in *Pullularia pullulans* zu erhöhen. Die Autoren bestrahlten Agarplatten mit dem Pilz für ungefähr 15 min. Sie untersuchten 200 Klone, von denen die meisten etwa die gleichen Ausbeuten lieferten wie der Wildtyp (ca. 3 g/L Pullulan). Nur drei Klone zeigten eine mehr als doppelt so hohe Ausbeute (>7,1 g/L Pullulan). Leider war das Pullulan dieser Klone stark mit Pigmenten verunreinigt. Es gab aber unter den Klonen einen, der ungefärbtes reineres Pullulan produzierte. Dieser besaß allerdings eine niedrigere Ausbeute als der Wildtyp und wurde von den Autoren ein zweites Mal bestrahlt. Wiederum testeten die Autoren 200 Klone und fanden darunter vier, die ungefärbtes Pullulan mit einer Ausbeute >7,1 g/L produzierten.

Maw et al. (2002) bestrahlten den Pilz *Gongronella butleri*. Sie erhielten ca. 18000 Mutanten, von denen sie 245 näher untersuchten. Sie fanden drei Mutanten, die etwa die doppelte Menge an Chitosan herstellten.

Für die alternativen Produzenten, die viel weniger Rhamnolipide produzieren als *Pseudomonas aeruginosa* (s. Tab. 1.5), wäre eine Mutagenese prinzipiell sinnvoll. Die UV-Mutagenese ist eine einfache und schnelle Methode um in kurzer Zeit viele Klone zu produzieren. Da sich die Mutation aber an jeder beliebigen Stelle im Genom der Zelle ereignen kann ist die Wahrscheinlichkeit, dass mit nur einer Mutationsrunde der gewünschte Effekt erzielt wird, relativ gering.

Effektivere Methoden wären unter anderem die Error-Prone PCR und die Zielgerichtete Mutagenese. Bei der Zielgerichteten Mutagenese wird zuerst diejenige Aminosäure identifiziert, die essentiell für die Funktion des Enzyms ist. Diese Aminosäure kann dann gegen alle 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht werden (Labrou, 2010).

Bei der Error-Prone PCR wird die Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase durch die Einstellung bestimmter PCR-Bedingungen erhöht. Es kann z. B. durch Zugabe von Manganionen (Mn^{2+}) die Spezifität der Basenpaarung reduziert werden (Beckman et al., 1985). Ein unausgeglichenes Verhältnis der zugegebenen dNTPs kann dazu führen, dass die Polymerase dNTPs falsch einbaut (Chaput et al., 2008). Eine erhöhte Zugabe von Magnesiumionen (Mg^{2+}) kann Fehlpaarungen stabilisieren (Eckert und Kunkel, 1991).

Takase et al. (2002) benutzten die zielgerichtete Mutagenese und Error-Prone PCR um die Synthese von rekombinantem PHB in *E. coli* zu erhöhen. Diese Methoden können aber nur angewendet werden, wenn der Stamm bzw. das betreffende Gen schon sequenziert ist, wie das z. B. bei *B. thailandensis* und *B. pseudomallei* der Fall ist (Dubeau et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit wäre die Zugabe mutagener chemischer Substanzen wie Ethylmethansulfonat (EMS). Diese Methode wird als lebensmittelunbedenklich angesehen, da sie nicht die Zugabe von Fremd-DNA oder die Manipulation bereits existierender DNA durch rekombinante erfordert. Des Weiteren ist die Methode sehr einfach durchzuführen (Labrou, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem EMS zu *B. plantarii* DSM 9509^T zugegeben wurde. Allerdings hatte das EMS auch in höheren Konzentrationen keine mutagene Wirkung auf *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T, so dass stattdessen die UV-Mutagenese durchgeführt wurde.

Um die Rhamnolipid-Produktivität in *B. plantarii* DSM 9509^T zu erhöhen, müssten noch weitere Mutationsrunden mit geeigneten UV-Mutanten durchgeführt werden. Da der Stamm nicht sequenziert ist, bleiben die Mutation durch UV-Bestrahlung und die Mutation durch Zugabe chemischer Substanzen vorerst die Methoden der Wahl.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Stamm *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T grundlegend auf Rhamnolipid-Bildung in Vollmedium und Minimalmedium untersucht. Der Stamm wurde ausgewählt, weil er sich in Vorarbeiten (Walter, 2009) als viel-versprechender Kandidat für eine Etablierung erwiesen hatte und bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Rhamnolipid-Produzent beschrieben worden war.

Herstellung und Charakterisierung einer Referenz-Substanz

Das erste Ziel dieser Arbeit war es eine Rhamnolipid-Referenz-Substanz herzustellen und mit dieser eine quantitative Methode zur Bestimmung der Rhamnolipidkonzentration in der Kulturbrühe von *B. plantarii* DSM 9509^T zu entwickeln. Mittels sequenzieller säulenchromatographischer Methoden konnte dieses Ziel erreicht und eine Referenz-Substanz mit einer über 95%-igen Reinheit gewonnen werden. Die säulenchromatographischen Methoden eignen sich sehr gut, um Mengen im mg-Bereich aufzureinigen. Für eine Anwendung im Großmaßstab sind sie nicht geeignet. Hier könnte versucht werden Methoden wie die selektive Kristallisation (Abdel-Mawgoud et al., 2011) zu etablieren.

Die Referenz-Substanz bestand zu über 95% aus dem Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄. Des Weiteren enthielt sie noch geringe Mengen der Kongener Rha₂-C₁₂-C₁₄ und Rha₂-C₁₄-C₁₂.

Die Referenz-Substanz senkte die Oberflächenspannung auf unter 30 mN/m ab und wies eine kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) zwischen 15 und 20 mg/L in Wasser auf. Die CMC scheint deutlich niedriger zu sein als die CMC von Rhamnolipid 3 (Rha₂-C₁₀-C₁₀) von *Pseudomonas aeruginosa*. Für Rhamnolipid 3 wurden Werte von 75,1 mg/L und 106 mg/L bestimmt (Sánchez et al., 2007; Abalos et al., 2001). Eine geringere CMC bedeutet, dass weniger Tensid benötigt wird um Mizellen zu bilden. Dies kann z. B. beim Einsatz in Waschmitteln sinnvoll sein. Beim Waschvorgang werden hydrophobe Stoffe wie Fette in die Mizellen eingelagert. Je weniger Tensid eingesetzt werden muss desto weniger wird die Umwelt belastet. Das Rhamnolipid Rha₂-C₁₄-C₁₄ von *B. plantarii* DSM 9509^T wäre aufgrund seiner tensidischen Eigenschaften und geringen CMC vermutlich von großem Interesse für die Waschmittelindustrie. Ein nächster Schritt wäre daher, eine größere Menge der

Referenz-Substanz herzustellen um diese der Industrie in ausreichenden Mengen für Anwendungstests zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer quantitativen Methode zur Bestimmung der Rhamnolipidkonzentration in der Kulturbrühe von *B. plantarii* DSM 9509^T. Hierfür wurde eine HPLC-Analytik auf Grundlage der Methode von Cooper und Anders (1974) etabliert. Diese Methode lässt sich vermutlich auch auf Rhamnolipide mit längeren β -Hydroxyfettsäuren, z. B. mit β -Hydroxyhexadecansäuren, übertragen. Allerdings wird bei der Analytik giftiges Dimethylformamid als Lösungsmittel eingesetzt. Die Methode könnte hinsichtlich dieses Aspektes weiter optimiert werden.

Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Vollmedium

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die grundlegende Untersuchung der Rhamnolipid-Produktion von *B. plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Vollmedium.

Bei der Kultivierung auf dem Vollmedium Nutrient Broth mit 10 g/L Glukose wurde erstmals der zeitliche Verlauf der Rhamnolipid-Produktion in Abhängigkeit von Biotrockenmasse-Bildung und Substrat-Verbrauch für *B. plantarii* DSM 9509^T gezeigt. Des Weiteren wurde der Verlauf der spezifischen Wachstumsrate und der spezifischen Rhamnolipid-Bildungsrate dargestellt. Diese Daten können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Die Produkt-Bildungsraten bewegten sich im mg/g-Bereich. Maximal wurden ca. 46 mg/L Rhamnolipide gebildet.

Die Daten zeigen, dass die Produktivität von *B. plantarii* DSM 9509^T noch weit unter der von *P. aeruginosa* liegt, mit dem bis zu 100 g/L Rhamnolipide hergestellt wurden (Giani et al., 1997). Die Daten zeigen auch, dass die Rhamnolipide von *B. plantarii* DSM 9509^T zeitversetzt zum Wachstum gebildet werden. Dies ist auch bei *Pseudomonas aeruginosa* der Fall.

Des Weiteren wurde gefunden, dass *B. plantarii* DSM 9509^T als weiteres Nebenprodukt Polyhydroxybutyrat (PHB) bildete. Der substratbezogene Produkt-Ausbeutekoeffizient war etwa zehnmal größer für PHB als für Rhamnolipid. Hier besteht noch dringender Optimierungsbedarf dahingehend, dass die PHB-Produktion vermindert oder möglichst vollständig unterdrückt wird um die Rhamnolipid-Ausbeute zu erhöhen. Es könnte die PHB-Bildung mit einer kontinuierlichen Prozessführung

charakterisiert werden. Es könnte die Menge der eingesetzten Glukose variiert werden bis die PHB-Bildung minimal wird. Mit dieser Glukose-Konzentration könnte dann ein Fed-Batch Prozess etabliert werden. Des Weiteren könnte mit gentechnischen Methoden in die PHB-Synthese eingegriffen werden. Hierfür müsste allerdings erst das Genom von *B. plantarii* DSM 9509^T sequenziert werden.

Charakterisierung der Rhamnolipid-Bildung von *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T bei Wachstum auf Minimalmedium

Bei der Kultivierung auf dem ausgelegten Minimalmedium wurde festgestellt, dass *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T einen gewissen Stickstoffüberschuss für die Rhamnolipid-Synthese brauchte. Die Elementaranalyse ergab, dass das Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff (N/C) in der *B. plantarii* DSM 9509^T Trockenmasse bei 0,29 lag. Die höchste Rhamnolipid-Bildung wurde aber bei einem N/C von 0,8 verzeichnet. Dies unterscheidet *B. plantarii* DSM 9509^T von *P. aeruginosa*, bei dem die Produktion der Rhamnolipide erst startet, wenn die Stickstoffmenge limitierend wird (Venkata Ramana und Karanth, 1989; Robert et al., 1989; Manresa et al., 1991). Des Weiteren wurde gefunden, dass Eisen wahrscheinlich die Rhamnolipid-Synthese in *B. plantarii* DSM 9509^T beeinflusst. Wurde das ausgelegte Minimalmedium mit einer 10-fach höheren Eisenmenge supplementiert, konnte beobachtet werden, dass *B. plantarii* DSM 9509^T statt des normalerweise vorherrschenden Rhamnolipides Rha₂-C₁₄-C₁₄ vermutlich ein anderes Kongener (Rha₂-C₁₄) bildete. Die Struktur des Kongeners sollte durch MS-Experimente noch bestätigt werden. Des Weiteren müsste geklärt werden, ob das Kongener Rha₂-C₁₄ *de novo* produziert oder nur die zweite Fettsäure von Rha₂-C₁₄-C₁₄ abgespalten wurde.

Eine Möglichkeit den Einfluss weiterer Minimalmediums-Komponenten auf die Rhamnolipid-Produktion in *B. plantarii* DSM 9509^T genauer zu untersuchen, wäre eine kontinuierliche Prozessführung. Hiermit könnte auch das Phosphat-zu-Kohlenstoff-Verhältnis genauer untersucht werden. Abalos et al. (2002) zeigten, dass das Phosphat-zu-Kohlenstoff-Verhältnis bei der Rhamnolipid-Bildung in *Pseudomonas aeruginosa* eine Rolle spielt. Des Weiteren könnte mit einer kontinuierlichen Prozessführung herausgefunden werden welche Nährstoff-Limitierungen die Rhamnolipid-Produktion in *B. plantarii* DSM 9509^T induzieren.

Herstellung und Screening von *B. plantarii* DSM 9509^T UV-Mutanten

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer hochdurchsatzfähigen Screening-Methode für mögliche Rhamnolipid-Überproduzenten. Mit dem entwickelten Methylenblau-Assay war es möglich, UV-Mutanten im Mikrotiterplatten zu screenen. Allerdings muss die Methode noch weiter optimiert werden. Da mit Lösungsmitteln in sehr kleinen Volumina gearbeitet wird, ist vermutlich der Messfehler, der durch Verdunstung entsteht, relativ hoch. Dies könnte auch erklären, warum sich die anscheinend hohe Produktivität der UV-Mutante 3.2 LO4 in der Fermentation nicht bestätigt hat. Für Rhamnolipid-Produzenten, die eine deutliche Überproduktion zeigen, ist der Assay aber dennoch geeignet.

Da die Methode der UV-Mutagenese sehr einfach und schnell durchzuführen ist, wurde sie in dieser Arbeit angewendet. Da die Mutation aber an jeder beliebigen Stelle im Genom der Zelle stattfinden kann, ist es sehr unwahrscheinlich, dass nur einer Mutationsrunde den gewünschten Effekt hervorruft. Dies zeigten auch die Ergebnisse: Zwar wurden zwei Mutanten gefunden und weiter untersucht, aber es stellte sich heraus, dass sich deren Produktivität nicht wesentlich von der des Wildtyps *B. plantarii* DSM 9509^T unterschied.

Es wäre vermutlich effektiver, die Rhamnolipid-Synthesegene direkt zu manipulieren, z. B. mit einer zielgerichteten Mutagenese oder mit einer Error-Prone PCR. Dafür müssten aber die Sequenzen der Zielgene bekannt sein. Hierfür müsste das Genom von *B. plantarii* DSM 9509^T erst sequenziert werden.

6. Literaturverzeichnis

Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa MA: Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 2001, 17, S. 1367-1371.

Abalos A, Maximo F, Manresa MA, Bastida J: Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, 77, S. 777-784.

Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E: Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86, S. 1323-1336.

Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lépine F, Müller MM, Déziel E: Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. *Biosurfactants*. Soberón-Chávez G (Hrsg.); Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011, S. 13-55.

Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, Nabi A: Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 2008, 223, S. 143-151.

Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel MH, Heulin T: *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol micro-aggregates in Martinique. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49, S. 787-794.

Aizawa T, Ve NB, Nakajima M, Sunairi M: *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60, S. 1152-1157.

Aizawa T, Ve NB, Vijarnsorn P, Nakajima M, Sunairi M: *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60, S. 2036-2041.

Aizawa T, Vijarnsorn P, Nakajima M, Sunairi M: *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, 61, S. 1645-1650.

Andrä J, Rademann J, Howe J, Koch MHJ, Heine H, Zähringer U, Brandenburg K: Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biol Chem*, 2006, 387, S. 301–310.

Azegami K, Nishiyama K, Watanabe Y, Kadota I, Ohuchi A, Fukazawa C: *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, 37, S. 144-152.

Azegami K, Nishiyama K, Kato H: Effect of iron limitation on "*Pseudomonas plantarii*" growth and tropolone and protein production. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54, S. 844-847.

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R: Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87, S. 427-444.

Barka EA, Nowak J, Clément C: Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72, S. 7246-7252.

Bauer J, Brandenburg K, Zähringer U, Rademann J: Chemical synthesis of a glycolipid library by a solid-phase strategy allows elucidation of the structural specificity of immunostimulation by rhamnolipids. *Chemistry*, 2006, 12, S. 7116-7124.

- Beckman RA, Mildvan AS, Loeb LA: On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 1985, 24, S. 5810-5817.
- Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L: Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 1983, 5, S. 279–313.
- Brämer CO, Vandamme P, da Silva LF, Gomez JG, Steinbüchel A: *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51, S. 1709-1713.
- Brett PJ, DeShazer D, Woods DE: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48, S. 317-320.
- Burkholder WH: Three bacterial plant pathogens. *Phytomonas caryophylli* sp. n., *Phytomonas alliicola* sp. n., and *Phytomonas manihotis* (Arthaud-Berthet et Bondar) Viégas. *Phytopathology*, 1942, 32, S. 141-149.
- Burkholder WH: Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, 1950, 40, S. 115-117.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Santos PE: *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54, S. 1165-1172.
- Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Trevino LG, Déziel E, Lépine F, Soberón-Chávez G: Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73, S. 187-194.
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA: Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2005, 187, S. 7351–7361.
- Celik GY, Aslim B, Beyatli Y: Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J Environ Biol*, 2008, 29, S. 867-870.

Chaput JC, Woodbury NW, Stearns LA, Williams BA: Creating protein biocatalysts as tools for future industrial applications. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8, S. 1087-1098.

Chayabutra C, Ju LK: Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Biotechnol Prog*, 2001, 17, S. 419-423.

Cheng AC, Currie BJ: Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18, S. 383-416.

Chen WM, James EK, Coenye T, Chou JH, Barrios E, de Faria SM, Elliott GN, Sheu SY, Sprent JI, Vandamme P: *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56, S. 1847-1851.

Chen WM, de Faria SM, James EK, Elliott GN, Lin KY, Chou JH, Sheu SY, Cnockaert M, Sprent JI, Vandamme P: *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57, S. 1055-1059.

Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P: *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58, S. 2174-2179.

Christofi N, Ivshina IB: Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *J Appl Microbiol*, 2002, 93, S. 915-925.

Christova N, Tuleva B, Lalchev Z, Jordanova A, Jordanov B: Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. *Z Naturforsch C*, 2004, 59, S. 70-74.

Coenye T, Mahenthiralingam E, Henry D, LiPuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP, Vandamme P: *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51, S. 1481-1490.

Coenye T, Laevens S, Willems A, Ohlén M, Hannant W, Govan JR, Gillis M, Falsen E, Vandamme P: *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51, S. 1099-1107.

Coenye T, Vandamme P: Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol*, 2003, 5, S. 719-729.

Coenye T, Henry D, Speert DP, Vandamme P: *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27, S. 623-627.

Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Barka EA: Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment, *FEMS Microbiol Rev*. 2008, 32, S. 607-626.

Cooper MJ, Anders MW: Determination of long chain fatty acids as 2-naphthacyl esters by high pressure liquid chromatography and mass spectrometry, *Anal Chem*. 1974, 46, S. 1849-1852.

Cornelis P, Aendekerk S: A new regulator linking quorum sensing and iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2004, 150, S. 752-756.

Costa SG, Déziel E, Lépine F: Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53, S. 620-627.

De Andrade Rodrigues MF, Vicente EJ, Steinbüchel A: Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization, *FEMS Microbiol Lett*. 2000, 193, S. 179-185.

Deleu M, Paquot M: From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C R Chim*, 2004, 7, S. 641-646.

Desai JD, Banat IM: Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61, S. 47-64.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).
www.dsmz.de

De Vos P, Goor M, Gillis M, De Ley J: Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1985, 35, S. 169-184

Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisailon J: Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62, S. 1908-1912.

Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R: Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1485, S. 145-152.

Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R: *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 2003, 149, S. 2005-2013.

Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahme LG: The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol*, 2005, 55, S. 998-1014.

Dubeau D, Déziel E, Woods DE, Lépine F: *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol*, 2009, 9:263

Eckert KA, Kunkel TA: DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*, 1991, 1, S. 17-24.

Elliott GN, Chen WM, Chou JH, Wang HC, Sheu SY, Perin L, Reis VM, Moulin L, Simon MF, Bontemps C, Sutherland JM, Bessi R, de Faria SM, Trinik MJ, Prescott AR, Sprent JI, James EK: *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol*, 2007, 173, S. 168-180.

Fabry B: Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chem Unserer Zeit*, 1991, 25, S. 214-222.

Giani C, Wullbrandt D, Rothert R, Meiwes J: *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. Patent der Hoechst Aktiengesellschaft, Deutschland, 1997, US005658793A

Gillis M, Tran Van V, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP: Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in vietnam. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45, S. 274-289.

Glass MB, Steigerwalt AG, Jordan JG, Wilkins PP, Gee JE: *Burkholderia oklahomensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species formerly known as the Oklahoma strain of *Pseudomonas pseudomallei*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56, S. 2171-2176.

Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Déziel E, Greenberg EP, Poole K, Banin E: Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2010, 192, S. 2973-2980.

Götte E: Der Einfluss von Fremdschäumen auf das Schäumen hochverdünnter Tensidlösungen. *Fette, Seifen, Anstrichm*, 1964, 66, S. 528-530.

Goris J, Dejonghe W, Falsen E, de Clerck E, Geeraerts B, Willems A, Top EM, Vandamme P, De Vos P: Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or pEMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B-horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. Syst Appl Microbiol, 2002, 25, S. 340-352.

Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen JF 3rd, Tiedje JM, Vandamme P: Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. Int. J. Syst Evol Microbiol, 2004, 54, S. 1677-1681.

Greenberg EP: Quorum sensing in gram-negative bacteria. ASM News, 1997, 63, S. 371-377.

Gunther NW 4th, Nunez A, Fett W, Solaiman DK: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. Appl Environ Microbiol, 2005, 71, S. 2288-2293.

Häussler S, Nimtz M, Domke T, Wray V, Steinmetz I: Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun, 1998, 66, S. 1588-1593.

Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M, Berensmeier S: Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. Anal Bioanal Chem, 2008, 391, S. 1579-1590.

Hörmann B, Müller MM, Sylatak C, Hausmann R: Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509^T. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 112, S. 674-680.

Hori K, Marsudi S, Unno H: Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol Bioeng, 2002, 78, S. 699-707.

Hommel R: Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. In: Biochemistry of microbial degradation, S. 63–87; Ratledge C (Hrsg.); Kluwer Academic Publishers, London, 1994.

- Itoh S, Honda H, Tomita F, Suzuki T: Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions). *J Antibiot*, 1971, 24, S. 855-859.
- Jarvis FG, Johnson MJ: A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc*, 1949, 71, S. 4124-4126.
- Jurado E, Fernández-Serrano M, Núñez-Olea J, Luzón G, Lechuga M: Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests. *Chemosphere*, 2006, 65, S. 278-285.
- Kim HB, Park MJ, Yang HC, An DS, Jin HZ, Yang DC: *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56, S. 2529-2533.
- Kleerebezem M, Quadri LE; Kuipers OP, de Vos WM: Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 1997, 24, S. 895-904.
- Kosswig K, Stache H: Die Tenside. Kosswig K, Stache H (Hrsg.); Carl Hanser Verlag, München, Wien, 1993.
- Kownatzki R, Tümmler B, Döring G: Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet*, 1987, 329, S. 1026-1027.
- Labrou NE: Random mutagenesis methods for *in vitro* directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sci*, 2010, 11, S. 91-100.
- Lang S, Trowitzsch-Kienast W: Biotenside. Müller-Erlwein E, Trowitzsch-Kienast W, Widdecke H (Hrsg.); B. G. Teubner Verlag, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 2002.
- Leitermann F: Entwicklung und Optimierung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung mikrobieller Rhamnolipide auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Dissertation. Universitätsverlag Karlsruhe, Karlsruhe, 2008.

Lim YW, Baik KS, Han SK, Kim SB, Bae KS: *Burkholderia sordidicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53, S. 1631-1636.

Lim JH, Baek SH, Lee ST: *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58, S. 565-569.

Magario I: Enzyme reaction engineering for the conversion of emulsified di-rhamnolipid by free and immobilized naringinase. Dissertation. Universitätsverlag Karlsruhe, Karlsruhe, 2009.

Makkar RS, Cameotra SS: An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58, S. 428-434.

Manresa MA, Bastida J, Mercadé ME, Robert M, de Andrés C, Espuny MJ, Guinea J: Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. J Ind Microbiol, 1991, 8, S. 133-136.

Manso Pajarron A, De Koster CG, Heerma W, Schmidt M, Haverkamp J: Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. Glycoconj J, 1993, 10, S. 219-226.

Maw T, Tan TK, Khor E, Wong SM: Selection of *Gongronella butleri* strains for enhanced chitosan yield with UV mutagenesis. J Biotechnol, 2002, 95, S. 189-193.

Martínez-Toledo A, Ríos-Leal E, Vázquez-Duhalt R, González-Chávez M Del C, Esparza-García JF, Rodríguez-Vázquez R: Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. Environ Technol, 2006, 27, S. 137-142.

Medina G, Juárez K, Soberón-Chávez G: The *Pseudomonas aeruginosa* *rhIAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator *rhIR* and the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone. J Bacteriol, 2003, 185, S. 377-380.

Medina G, Juárez K, Valderrama B, Soberón-Chávez G: Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR transcriptional regulation of the *rhIAB* promoter. *J Bacteriol*, 2003, 185, S. 5976-5983.

Miller JH: A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1992.

Müller MM, Hausmann R: Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91, S. 251-264.

Müller MM, Hörmann B, Kugel M, Syldatk C, Hausmann R: Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89, S. 585-592.

Mukherjee S, Das P, Sen R: Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol*, 2006, 24, S. 509-515.

Mulligan CN, Gibbs BF: Factors influencing the economics of biosurfactants. In: *Biosurfactants, Production, Properties, Applications*. Kosaric, N (Hrsg.); Marcel Dekker Verlag, New York, 1993, S. 329-371.

Mutalik SR, Vaidya BK, Joshi RM, Desai KM, Nene SN: Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresour Technol*, 2008, 99, S. 7875-7880.

Nayak AS, Vijaykumar MH, Karegoudar TB: Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *Int Biodeter Biodegr*, 2009, 63, S. 73-79.

Nitschke M, Costa SG, Contiero J: Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochem*, 2011, 46, S. 621-630.

Noordman WH, Janssen DB: Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol, 2002, 68, S. 4502-4508.

Oglesby AG, Farrow JM 3rd, Lee JH, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, Vasil ML: The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. J Biol Chem, 2008, 283, S. 15558–15567.

Oliveira FJ, Vazquez L, de Campos NP, de Franca FP: Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. Process Biochem, 2009, 44, S. 383-389.

Onbasli D, Aslim B: Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. J Environ Biol, 2009, 30, S. 161-163.

Otsuka Y, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Matsuda M, Nakamura M, Murata H: *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. Int J Syst Evol Microbiol, 2011, 61, S. 249-254.

Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS: Environmental applications of biosurfactants: recent advances. Int J Mol Sci, 2011, 12, S. 633-654.

Palleroni NJ, Holmes B: *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol, 1981, 31, S. 479-481.

Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M: Nucleic acids homologies in the genus *Pseudomonas*. Int J Syst Bacteriol, 1973, 23, S. 333-339.

Pamp SJ, Tolker-Nielsen T: Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2007, 189, S. 2531-2539.

Pantazaki AA, Dimopoulou MI, Simou OM, Pritsa AA: Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88, S. 939-951.

Partida-Martinez LP, Groth I, Schmitt I, Richter W, Roth M, Hertweck C: *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57, S. 2583-2590.

Perin L, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JI, Estrada-de Los Santos P, Reis VM, Caballero-Mellado J: *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56, S. 1931-1937.

Pinzon NM, Ju LK: Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82, S. 975-981.

Poremba K, Gunkel W, Lang S, Wagner F: Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Z Naturforsch C, 1991, 46, S. 210-216.

Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G: Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol Microbiol, 2001, 40, S. 708-718.

Rahman P, Lungut A, Idowu J, Olea M: Biosurfactant production using novel bacteria from northeast England. Building business on bioscience sustainable innovation conference. Edinburgh: Heriot-Watt University; 2009.

Raza ZA, Rehman A, Khan MS, Khalid ZM: Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. Biodegradation, 2007, 18, S. 115-121.

Rehage H: Selbstorganisation von Tensiden: Biomimetische Synthesen von Nanomaterialien. Chem Unserer Zeit, 2005, 39, S. 36-44.

Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VL, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J: *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54, S. 2155-2162.

Rezanka T, Siristova L, Sigler K: Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles*, 2011, 15, S. 697-709.

Robert M, Mercadé ME, Bosch MP, Parra JL, Espuny MJ, Manresa MA, Guinea J: Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett*, 1989, 11, S. 871-874.

Rocha MV, Souza MC, Benedicto SC, Bezerra MS, Macedo GR, Pinto GA, Goncalves LR: Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 137-140, S. 185-194.

Rooney AP, Price NP, Ray KJ, Kuo TM: Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 295, S. 82-87.

Sánchez M, Aranda FJ, Espuny MJ, Marqués A, Teruel JA, Manresa A, Ortiz A: Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 307, S. 246-253.

Schenk T, Schuphan I, Schmidt B: High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chromatogr A*, 1995, 693, S. 7-13.

Schlegel HG: Allgemeine Mikrobiologie. Fuchs G (Hrsg.); Thieme-Verlag, Stuttgart, 2006.

Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G, Nowak J: *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55, S. 1187-1192.

- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E: Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68, S. 718-725.
- Soberón-Chávez G, Maier RM: Biosurfactants: a general overview. Biosurfactants. Soberón-Chávez G (Hrsg.); Springer-Verlag, Berlin, 2011, S. 1-11.
- Sobrinho HB, Rufino RD, Luna JM, Salgueiro AA, Campos-Takaki GM, Leite LF, Sarubbo LA: Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. Process Biochem, 2008, 43, S. 912-917.
- Sotirova AV, Spasova DI, Galabova DN, Karpenko E, Shulga A: Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. Curr Microbiol, 2008, 56, S. 639-644.
- Syldatk C, Lang S, Wagner F, Wray V, Witte L: Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on *n*-alkanes. Z Naturforsch C, 1985, 40, S. 51-60.
- Takase K, Taguchi S, Doi Y: Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and in vitro recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. J Biochem, 2003, 133, S. 139-145.
- Tarabasz-Szymanska L, Galas E: Two-step mutagenesis of *Pullularia pullulans* leading to clones producing pure pullulan with high yield. Enzyme Microb Technol, 1993, 15, S. 317-320.
- Tuleva BK, Ivanov GR, Christova NE: Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. Z Naturforsch C, 2002, 57, S. 356-360.
- Urakami T, Ito-Yoshida C, Araki H, Kijima T, Suzuki KI, Komagata K: Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44, S. 235-245.

Valverde A, Delvasto P, Peix A, Velázquez E, Santa-Regina I, Ballester A, Rodríguez-Barrueco C, García-Balboa C, Igual JM: *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56, S. 2421-2425.

Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR: Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47, S. 1188-1200.

Vandamme P, Mahenthiralingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, Speert DP: Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol*, 2000, 38, S. 1042-1047.

Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, LiPuma JJ, Speert DP, Govan JR, Mahenthiralingam E: *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, 33, S. 143-149.

Vandamme P, Goris J, Chen WM, De Vos P, Willems A: *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microbiol*, 2002, 25, S. 507-512.

Vandamme P, Opelt K, Knöchel N, Berg C, Schönmann S, De Brandt E, Eberl L, Falsen E, Berg G: *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57, S. 2228-2235.

Van Delden C, Iglewski BH: Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, 1998, 4, S. 551-560.

- Vanlaere E, LiPuma JJ, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P: *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58, S. 1580-1590.
- Vanlaere E, van der Meer JR, Falsen E, Salles JF, De Brandt E, Vandamme P: *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58, S. 420-423.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert D, Dowson C, Vandamme P: Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59, S. 102-111.
- Vasileva-Tonkova E, Gesheva V: Glycolipids produced by antarctic *nocardioides* sp. during growth on *n*-paraffin. Process Biochem, 2005, 40, S. 2387-2391.
- Vasileva-Tonkova E, Galabova D, Stoimenova E, Lalchev Z: Production and properties of biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane. Z Naturforsch C, 2006, 61, S. 553-559.
- Venkata Ramana K, Karanth NG: Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J Chem Technol Biotechnol, 1989, 45, S. 249-257.
- Venzmer J: Alltägliche Phänomene. Grenzflächenchemische Spezialitäten. Chem Unserer Zeit, 2008, 42, S. 72-79.
- Vermis K, Coenye T, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Nelis HJ, Vandamme P: Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54, S. 689-691.

Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Déziel E: *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17, S. 1407-1429.

Viallard V, Poirier I, Cournoyer B, Haurat J, Wiebkin S, Ophel-Keller K, Balandreau J: *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48, S. 549-563.

Walter V: New approaches for the economic production of rhamnolipid biosurfactants from renewable resources. Dissertation. Karlsruhe, 2009.

Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard WA 3rd, Tang Y: Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol Bioeng, 2007, 98, S. 842-853.

Whitlock GC, Estes DM, Torres AG: Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiol Lett, 2007, 277, S. 115-122.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M: Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol Immunol, 1992, 36, S. 1251-1275.

Yabuuchi E, Kawamura Y, Ezaki T, Ikedo M, Dejsirilert S, Fujiwara N, Naka T, Kobayashi K: *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. Microbiol Immunol, 2000, 44, S. 307-317.

Yang HC, Im WT, Kim KK, An DS, Lee ST: *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2006, 56, S. 453-457.

Yoo SH, Kim BY, Weon HY, Kwon SW, Go SJ, Stackebrandt E: *Burkholderia soli* sp. nov., isolated from soil cultivated with Korean ginseng. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57, S. 122-125.

Zähringer U, Rettenmaier H, Moll H, Senchenkova SN, Knirel YA: Structure of a new 6-deoxy-alpha-D-talan from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii* strain DSM 6535, which is different from the O-chain of the lipopolysaccharide. Carbohydr Res, 1997, 300, S. 143-151.

Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R: *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50, 743-749.

Zhang L, Somasundaran P, Singh SK, Felse AP, Gross R: Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp, 2004, 240, S. 75-82.

Zheng Y, Chen X, Shen Y: Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. Chem Rev, 2008, 108, S. 5253-5277.

Zhu K, Rock CO: RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2008, 190, S. 3147-3154.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't Riet K: Modeling of the bacterial growth curve. Appl Environ Microbiol, 1990, 56, S. 1875-1881.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen und Symbole

A_x	Absorption bei x nm Wellenlänge
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>
BTM	Biotrockenmasse
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
g	Gramm
h	Stunde
HAA	3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HU	hämolytische Einheit (<i>hemolytic unit</i>)
L	Liter
m	Meter
M	Molar [Mol/L]
[M]	Molekülion
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatten
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
μ	spezifische Wachstumsrate [1/h]
NA	Nutrient Agar
NaCl	Natriumchlorid
NB	Nutrient Broth
N/C	Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Verhältnis
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD_x	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge

<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Polyhydroxybutyrat
pO ₂	Gelöst-Sauerstoff [%]
<i>qp</i>	volumetrische Produkt-Bildungsrate [g/L·h]
<i>qp_{spez}</i>	spezifische Produkt-Bildungsrate [g/gBTM·h]
<i>qs</i>	volumetrische Substrat-Aufnahmerate [g/L·h]
<i>qs_{spez}</i>	spezifische Substrat-Aufnahmerate [g/gBTM·h]
<i>qx</i>	volumetrische Biotrockenmasse-Bildungsrate [g/L·h]
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RE	Rhamnose-Äquivalent (<i>rhamnose equivalent</i>)
Rf	Retentionsfaktor
Rha _x -C _y -C _z	Rhamnolipid mit x Rhamnoseresesten und β-Hydroxyfettsäuren der Länge y und z
RL	Rhamnolipid
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
UV	Ultraviolett
Vol	Volumenanteil
VE-H ₂ O	deionisiertes Wasser
<i>Y_{p,s}</i>	Substratbezogener Produkt-Ausbeutekoeffizient [g/g]
<i>Y_{p,x}</i>	Biomassebezogener Produkt-Ausbeutekoeffizient [g/g]
<i>Y_{x,s}</i>	Substratbezogener Biomasse-Ausbeutekoeffizient [g/g]
z. B.	Zum Beispiel

7.2 Chemikalien

Tab. 7.1: Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Chemikalie	Summenformel	Firma, Sitz
Acetonitril	C_2H_3N	Roth, Deutschland
Agar, europäisch	-	BD, Deutschland
4-Aminobenzoessäure	$C_7H_7NO_2$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammoniaklösung, 25%-ig	NH_3 in H_2O	Roth, Deutschland
Ammoniumdihydrogenphosphat	$(NH_4)H_2PO_4$	Fluka, Deutschland
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	$(NH_4)_2HPO_4$	Fluka, Deutschland
Ammoniummolybdat-tetrahydrat	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Janssen, Schweiz
Ammoniumsulfat	$(NH_4)_2SO_4$	Roth, Deutschland
Anisaldehyd	$C_8H_8O_2$	Sigma-Aldrich, Deutschland
D(+)-Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma-Aldrich, Deutschland
2-Bromo-2'-acetonaphthon	$C_{10}H_7COCH_2Br$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Calciumchlorid-dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Fluka, Deutschland
Calcium-D(+)-pantothenat	$C_9H_{16}NO_5 \cdot 0,5 Ca$	Sigma- Aldrich, Deutschland
Cerium(IV)-sulfat-tetrahydrat	$Ce(SO_4)_4 \cdot 4H_2O$	Roth, Deutschland
Chloroform	$CHCl_3$	Roth, Deutschland
Chloroform- d_1	$CDCl_3$	Eurisotop, Frankreich
Citrat	$C_6H_8O_7$	Roth, Deutschland
Contraspum A 4050	Enthält Alkene (C7-9), Hydroformulierungsprodukte und Destillationsrückstände	Zschimmer & Schwarz GmbH & Co. KG, Deutschland
Cyanocobalamin	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	Sigma-Aldrich, Deutschland
2,4'-Dibromoacetophenon	$BrC_6H_4COCH_2Br$	Fluka, Deutschland
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	$C_8H_{19}N$	Sigma, Deutschland
Dimethylformamid	C_3H_7NO	Sigma, Deutschland
Dimethylsulfoxid- d_6	CD_3SOCD_3	Eurisotop, Frankreich
Eisenchlorid-tetrahydrat	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Roth, Deutschland
Ethanol, 96%-tig	C_2H_6O	Roth, Deutschland
Ethylacetat	$C_4H_8O_2$	Roth, Deutschland
Fleischextrakt	-	Roth, Deutschland
Formamid	CH_3NO	Roth, Deutschland
D(+)-Glukose	$C_6H_{12}O_6$	Roth, Deutschland
Glyzerin	$C_3H_8O_3$	Roth, Deutschland
Hefeextrakt	-	BD, Deutschland
Jeneil JBR425	Enthält Rhamnolipid 1 und 3	Jeneil Biosurfactant Company,

	von <i>P. aeruginosa</i>	USA
Kaliumsulfat	K_2SO_4	Roth, Deutschland
Kobalt(II)-chlorid-hexahydrat	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Roth, Deutschland
Kupferchlorid-dihydrat	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	Riedel-de Haën, Deutschland
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Fluka, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Fluka, Deutschland
Methanol	CH_4O	Roth, Deutschland
Methylenblau	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid	$NaCl$	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Fluka, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Roth, Deutschland
Natriumhydroxyd	$NaOH$	Roth, Deutschland
Natriummolybdat-dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Fluka, Deutschland
Nicotinsäure	$C_6H_5NO_2$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure, 85%-ig	H_3PO_4	Roth, Deutschland
Proteose Pepton	-	Roth, Deutschland
Pyridoxal-5'-phosphat-monohydrat	$C_8H_{10}NO_6P \cdot H_2O$	Fluka, Deutschland
Salzsäure, 32%-ig	HCl	Roth, Deutschland
Schwefelsäure, 95%-ig	H_2SO_4	Roth, Deutschland
Thiaminchlorid-hydrochlorid	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Roth, Deutschland
Toluol	C_7H_8	Roth, Deutschland
Triethylamin	$C_6H_{15}N$	Fluka, Deutschland
Zinksulfat-heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Roth, Deutschland

7.3 Geräte

Tab. 7.2: In dieser Arbeit verwendete Geräte. HPLC: Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie, MPLC: Mitteldruckflüssigkeitschromatographie.

Gerät	Modell	Firma, Sitz
Autoklav	HX-430	Systemec GmbH, Laborsystemtechnik, Deutschland
Autoklav	V 150	Systemec GmbH, Laborsystemtechnik, Deutschland
Bioreaktor	Sixfors	INFORS AG, Schweiz
Brutschrank	BBD 6220	Kendro Laboratory Products, Deutschland
Clean Bench	LaminAir S-2010 1.8	Heto-Holten A/S, Dänemark
Eismaschine	MF 30 AS-F 230/50/1	Scotsman Ice Systems, Italien
Feinwaage	AT261 Delta Range	Mettler-Toledo, Deutschland
Feinwaage	BP 61S	Sartorius AG, Deutschland
Gefrierschrank	SANYO MDF-U52V VIP™ Series -86°C	MS Laborgeräte Schroeder OHG, Deutschland
Gefrierschränke	Comfort und Premium	Liebherr, Schweiz
HPLC-Anlage	Agilent 1100 System	Agilent Technologies, USA
HPLC-Säule	SUPELCO SIL™ LC-18, 5µm Partikelgröße, 150 mm·4,6 mm	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kernspinresonanzspektroskopie	Bruker AC 250	Bruker BioSpin MRI GmbH, Deutschland
Kühl-/Gefrierschrank	Elektrolux Öko Santo	AEG, Deutschland
Kühlschrank	Profiline	Liebherr, Schweiz
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments, GmbH & Co. KG, Deutschland
Massenspektrometer	API 4000™	Applied Biosystems MDS SCIEX, Kanada
Massenspektrometer	Finnigan MAT95	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Spectramax 190 Plus	Molecular Devices, USA
MPLC-Anlage	mit Pumpenmodul und -manager, Fraktionssammler, UV-Monitor, Differential-Refraktometer	Büchi Labortechnik GmbH, Deutschland
MPLC-Säulen	NP Kieselgel 40-63 µm Partikelgröße und 60 Å Porengröße (Si60), RP18 Kieselgel endcapped	Büchi Labortechnik GmbH, Deutschland

pH-Elektrode Sixfors	405-DPAS-SC-K85/225	Mettler-Toledo, Deutschland
pH-Meter	InfoLab pH Level 1	Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Deutschland
Photometer	Amersham Biosciences Ultrospec™ 1100 <i>pro</i>	GE Healthcare, Deutschland
Photometer	CO 8000 BIOWAVE	Biochrom, England
Plattformschüttler	TITRANAX 100 mit Haube	Heidolph Instruments, GmbH & Co. KG, Deutschland
pO ₂ -Elektrode Sixfors	InPro® 6820/12/220	Mettler-Toledo, Deutschland
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 mit Vacuubrand Pumpe PC2001 vario und Vakuumcontroller CVC 2000	Heidolph Instruments, GmbH & Co. KG, Deutschland
Schmelzpunkt- Bestimmung	Electrothermal Melting Point Apparatus	Electrothermal Engineering Limited, England
Schüttler	Multitron II	INFORS AG, Schweiz
Tensiometer	K10 T	Krüss, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer Comfort mit Wechselblöcke für 1,5 mL- oder 2 mL-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Ultraschall- Homogenisator	Sonoplus HD 3100	Bandelin, Deutschland
Waage	BP 3001S	Sartorius AG, Deutschland
Waage	Acculab VICON 612	Sartorius AG, Deutschland
Wärmeschränke	ED-240 und ED-115	Binder, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Scanvac S-Concentrator BA-VC -300H	Helmut Saur Laborbedarf, Deutschland
Vortexer	Relax top	Heidolph Instruments, GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge	5415 D	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40R Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland

7.4 Belegung der Mikrotiterplatten beim Sekundärscreening

Die Tabellen 7.3 und 7.4 zeigen die Belegung der Mikrotiterplatte mit den Mutanten des Sekundärscreenings.

Tab. 7.3: Belegung einer 96 well Mikrotiterplatte mit den Mutanten des Sekundärscreenings von Nummer 044G12 bis 321F06.

Zeile	A	B	C	D	E	F	G	H	
Spalte	1	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	
	2	0.4 N24	0.4 F20	0.4 N22	0.5 N24	0.6 M23	0.6 M18	0.6 C02	0.6 E02
	3	0.6 G02	0.7 J18	0.7 N11	0.7 B19	0.7 N02	0.7 J12	0.7 N12	0.8 G02
	4	0.8 M01	0.8 C07	0.8 A16	0.8 M16	0.8 E22	0.8 C10	0.8 K24	
	5	1.0 K16	1.0 M14	1.0 H01	1.0 N01	1.0 J09	1.1 O24	1.1 N24	
	6	1.1 P01	1.1 N03	1.1 H07	1.1 P07	1.1 A16	1.1 A24	1.1 K24	1.1 M18
	7	1.1 P12	1.1 P20	1.2 E13	1.2 E21	1.2 K21	1.2 M01	1.2 F06	1.2 A02
	8	1.2 J01	1.2 J03	1.2 N01	1.2 P01	1.2 P09	1.2 P03	1.2 H24	1.2 L22
	9	1.2 P12	1.2 P14	1.2 P20	1.2 P22	1.3 A01	1.3 C23	1.3 F23	1.3 K21
	10	1.3 P22	1.3 N24	1.3 H20	1.3 J16	3.1 K21	3.1 M19	3.1 O03	3.1 O19
	11	3.1 H12	3.1 P02	3.1 P04	3.1 P12	3.2 B24	3.3 O06	3.2 O24	3.2 B23
	12	3.2 F15	3.2 H23	3.2 J23	3.2 P19	3.2 P21	3.2 P23	3.2 K03	3.2 K11

Tab. 7.4: Belegung einer 96 well Mikrotiterplatte mit den Mutanten des Sekundärscreenings von Nummer 321H07 bis 533D06.

Zeile	A	B	C	D	E	F	G	H	
Spalte	1	3.2 O13	3.2 LO4	3.2 L12	3.2 P14	3.2 P12	3.2 H06		
	2	3.1 P09	3.1 L22	3.1 P16	3.1 P20	4.1 O22	4.1 D11	4.1 P10	4.1 A11
	3	4.2 L23	5.1 O13	5.1 O09	5.1 I18	5.1 L09	5.1 N01	5.1 P09	5.2 D11
	4	5.2 I18	5.2 M22	5.2 O20	5.2 O22		5.2 B05	5.2 J17	5.2 L07
	5	5.2 N21	5.2 N23	5.2 P01	5.2 P05	5.2 P19	5.2 J24	5.2 F22	5.2 L16
	6	5.1 L22	5.1 N16	5.1 P16	5.1 P20	5.3 F11	5.3 J07	5.3 J09	5.3 L09
	7	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
	8	5.3 L11	5.3 L13	5.3 L15	5.3 L19	5.3 N07	5.3 N09	5.3 N11	5.3 N21
	9	5.3 P11	5.3 P13	5.3 P21	5.3 H20	5.3 J20	5.3 L20	5.3 L22	5.3 N20
	10	5.3 N22	5.3 P22	5.3 P24		5.3 H09	5.3 H09	5.3 D06	5.3 D06
	11	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
	12	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Hörmann
Geburtsdatum: 24. Juli 1981
Nationalität: Deutsch

Akademischer Werdegang

06/2001 Abitur an der Jörg-Ratgeb-Schule in Stuttgart-Neugereut, Deutschland.
10/2001-08/2008 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart, Deutschland, Schwerpunkte Bioverfahrenstechnik, Technische Biochemie, Bioinformatik.
12/2007-07/2008 Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Deutschland, Titel: Entwicklung und Charakterisierung eines DNA-microarrays zur Detektion von probiotischen Bakterien.

Berufliche Tätigkeiten

10/2005-01/2007 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Deutschland.
12/2005-11/2007 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Deutschland.
08/2008-04/2012 Promotion am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe, Deutschland. Titel: Herstellung mikrobieller Rhamnolipide mit nicht-pathogenen Stämmen.

Veröffentlichungen

Publikationen

- 04/2010 Hörmann B, Müller MM, Sylatk C, Hausmann R: Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. Eur J Lipid Sci Technol, 2010, 112, S. 674-680.
- 02/2010 Müller MM, Hörmann B, Sylatk C, Hausmann R: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87, 1S. 67-174.
- 09/2010 Müller MM, Hörmann B, Kugel M, Sylatk C, Hausmann R: Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89, S. 585-592.
- 11/2011 Müller MM, Kügler J, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Sylatk C, Hausmann R: Rhamnolipids-Next generation surfactants? J Biotechnol, 2012, 162, S. 366-380.

Buchkapitel

Müller MM, Hörmann B, Sylatk C, Hausmann R: Microbial Rhamnolipids IN *Carbohydrate Modifying Biocatalysts*. Prof. Peter Grunwald (ed.), Pan Stanford Publishing Pte Ltd. ISBN-10: 981-4-241-679.

Poster

- 09/2009 Hörmann B, Müller MM, Sylatk C, Hausmann R: Production of microbial rhamnolipids with non-pathogenic strains. Poster auf der gemeinsamen Jahrestagung von ProcessNet und DECHEMA in Mannheim, Deutschland.
- 05/2010 Hörmann B, Müller MM, Sylatk C, Hausmann R: Production of microbial rhamnolipids with non-pathogenic strains. Poster auf der Vortrags- und Diskussionstagung Bioprozessorientiertes Anlagendesign, in Nürnberg, Deutschland.
- 04/2011 Hörmann B, Müller MM, Sylatk C, Hausmann R: Production of microbial rhamnolipids with the non-pathogenic strain *Burkholderia plantarii*. Poster auf der VAAM-Jahrestagung in Karlsruhe, Deutschland.
-

