

Untersuchungen zur Acyltransferaseaktivität der Lipase A
aus *Candida antarctica*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von
Janett Müller
geboren am 25.12.1986
in Pasewalk

Greifswald, September 2015

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fessner

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Tag der Promotion: 2.12.2015

“..., there's something that doesn't make sense. Let's go and poke it with a stick.”

Der Doktor, Doctor Who, Staffel 5, Episode 7,

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	II
Zielstellung und Publikationen zur kumulativen Dissertation	IV
1 Einleitung	1
1.1 Fettsäureester: Synthese und Bedeutung.....	1
1.2 Lipasen	1
1.2.1 Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>	3
1.2.2 Systeme zur rekombinanten Expression von Lipasen	5
1.2.3 Immobilisierung von Lipasen	7
1.2.4 Analytik von Lipasen-katalysierten Reaktionen.....	8
1.3 Protein-Engineering	9
2 Etablierung des Oxidase-Assays als Hochdurchsatztest (Artikel I)	11
3 Protein-Engineering der CAL-A (Artikel II)	12
3.1 Rationales Design	12
3.2 Expression von CAL-A Varianten in <i>P. pastoris</i>	13
3.3 Weitere Untersuchungen der CAL-A Varianten	14
3.4 Immobilisierung von CAL-A WT und Asp122Leu	15
4 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A (Artikel III)	16
5 Zusammenfassung	18
6 Literatur.....	19
Autorenschaft.....	24
Artikel.....	25
Artikel I.....	25
Artikel II.....	27
Artikel III.....	51
Eigenständigkeitserklärung	65
Lebenslauf	67
Danksagung.....	68

Abkürzungen

°C	Grad Celsius	ISM	iterative Sättigungsmutagenese
Å	Ångström	L	Liter
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
CAL-A	Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>	M	Molar (mol/L)
CAL-B	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	m	Meter
CAST	<i>combinatorial active-site saturation test</i>	Mut ⁺	<i>methanol utilization plus</i>
CLEA	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>	Mut ^s	<i>methanol utilization slow</i>
CLEC	<i>cross-linked enzyme crystals</i>	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
CoA	Coenzym A	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PDB	Proteindatenbank
FNR	Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
g	Gramm	PKO	Palmkernöl
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
GC	Gaschromatografie	SDS	Natriumdodecylsulfat
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>	U	Unit
h	Stunde	WT	Wildtyp
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>		

Für die Bezeichnung von Aminosäureresten wurde der Dreibuchstabencode verwendet.

Abkürzungen

Zielstellung und Publikationen zur kumulativen Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Acyltransferaseaktivität der Lipase A aus *Candida antarctica* (CAL-A) für die Anwendung in Umesterungsreaktionen zu optimieren.

Artikel I beschreibt die Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatztests zur Quantifizierung der Acyltransferaseaktivität. Das Protein-Engineering der CAL-A sowie die Expression, das *Screening* und die biochemische Charakterisierung der CAL-A Varianten wird in **Artikel II** beschrieben. Der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter wie Temperatur und Wassergehalt auf die Acyltransferaseaktivität wird in **Artikel III** erläutert.

Artikel I A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A

Janett Müller*, Birte Fredrich*, Christina Kohlmann, Lukas Maksym, Uwe T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, 116, 232-236

In dieser *short communication* wird die Etablierung eines Hochdurchsatztests beschrieben, der die Quantifizierung der Acyltransferaseaktivität ermöglicht. Dabei wird im Mikrotiterplatten-Maßstab eine Enzym-Kaskade verwendet, die letztendlich zu einer photometrisch messbaren Farbänderung führt.

Artikel II Enhancing the acyltransferase activity of *Candida antarctica* lipase A by rational design

Janett Müller, Miriam A. Sowa, Birte Fredrich, Henrike Brundiek and Uwe T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1791-1796

Die Veröffentlichung befasst sich mit dem Protein-Engineering der CAL-A. Beschrieben wird das rationale Design sowie die Expression der Varianten in *Escherichia coli* und *Pichia pastoris*. Durch das anschließende *Screening* konnte die CAL-A Variante Asp122Leu identifiziert werden, die im Vergleich zum CAL-A Wildtyp (WT) deutlich weniger freie Säure bildete. Daraufhin wurde die CAL-A Variante Asp122Leu genauer charakterisiert und adsorptiv immobilisiert, um sie in weiteren Biokatalysen einzusetzen.

Artikel III The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment

Janett Müller, Miriam A. Sowa, Mark Dörr and Uwe T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, 117, 1903-1907

Dieser Artikel beschreibt den Einfluss unterschiedlicher Reaktionsparameter auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A. Dabei wurden Methanol sowie Ethanol in Biokatalysen eingesetzt und die Temperatur sowie der Wassergehalt variiert. Es zeigte sich dabei in den Biokatalysen mit Methanol ein deutlich höherer Umsatz als mit Ethanol. Allerdings wurde in einem Langzeit-Stabilitätstest gezeigt, dass Ethanol das verwendete CAL-A Immobilisat nicht so stark inaktiviert wie Methanol.

1 Einleitung

Der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren in der Lebensmittel-, Textil-, pharmazeutischen und chemischen Industrie gewann in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung^[1-3]. Enzyme haben im Vergleich zu chemischen Katalysatoren den Vorteil, dass sie Reaktionen meist unter milderden Bedingungen hinsichtlich pH-Wert, Druck und Temperatur katalysieren. Darüber hinaus sind sie häufig chemo-, regio- und enantioselektiv, was die Bildung von Nebenprodukten verringert^[4]. Eine häufig im industriellen Maßstab eingesetzte Enzymklasse sind Lipasen^[5]. Bereits seit längerem ist bekannt, dass diese Enzyme auch zur Produktion von Fettsäureestern genutzt werden können, sofern sie in möglichst wasserfreien Systemen eingesetzt werden^[6]. Allerdings gibt es auch einige Lipasen, die eine sogenannte Acyltransferaseaktivität besitzen und somit Umesterungen auch in einem wässrigen Milieu katalysieren. Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über die Enzymklasse der Lipasen geben und erläutern, welche Vorteile der Einsatz einer Lipase mit Acyltransferaseaktivität haben kann.

1.1 Fettsäureester: Synthese und Bedeutung

Fettsäureester sind wichtige industrielle Produkte. Sie können z.B. als Duft- und Aromastoffe^[7] eingesetzt werden oder stellen als Biodiesel^[8] eine Alternative zu erdölbasierten Kraftstoffen dar. Als Ausgangsstoffe zur Synthese von Fettsäureestern können eine Vielzahl von Alkoholen (Methanol, Ethanol, Butanol usw.) mit freien Fettsäuren bzw. pflanzlichen Ölen (Palmöl, Rapsöl, Kokosnussöl, Sojaöl usw.) verwendet werden^[9-11]. Die Synthese dieser Verbindungen kann chemisch z. B. durch Säure- oder Basen-katalysierte Reaktionen erfolgen^[12, 13], ist aber auch enzymatisch möglich^[14]. Für das enzymatische Verfahren werden häufig Lipasen in organischen Lösungsmitteln verwendet, um ein wasserarmes Milieu zu gewährleisten^[14-16]. Lipasen mit einer Acyltransferaseaktivität können Umesterungen jedoch auch in wässrigen Reaktionsmedien katalysieren, was den Einsatz von organischen Lösungsmitteln verringern und so zu einem umweltfreundlicheren Prozess führen würde. Zu den Lipasen mit Acyltransferaseaktivität zählen z. B. die CAL-A^[17] aber auch die Lipase 2 aus *Candida parapsilosis*^[18].

1.2 Lipasen

Lipasen gehören wie viele andere Hydrolasen auch zu den Enzymen mit α/β -Hydrolase-Faltung^[19, 20]. Dieses konservierte Strukturmerkmal besteht aus acht β -Strängen von denen sieben parallel, der zweite jedoch antiparallel angeordnet ist, das so gebildete β -Faltblatt wird von sechs Helices umgeben wie es in Abb.1. dargestellt ist. Innerhalb dieses Strukturmerkmals befindet sich die katalytische Triade, bestehend aus einem nukleophilen

1 Einleitung

Aminosäurerest (meist Serin, seltener Aspartat oder Cystein), einem Histidinrest und einem sauren Rest (Aspartat oder Glutamat).

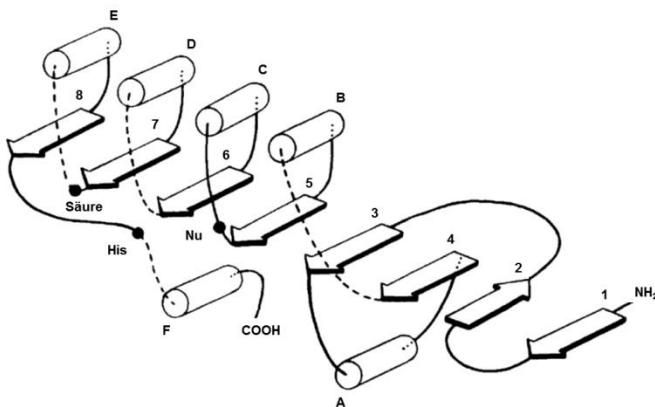


Abb. 1. Schematische Darstellung der α/β -Hydrolase-Faltung nach Ollis *et al.* 1992. Die β -Stränge sind als Pfeile und die α -Helices als Zylinder dargestellt. Schwarze Punkte markieren die Positionen der katalytischen Triade, wobei Nu für das entsprechende Nukleophil steht. Variable Bereiche wurden mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Lipasen zählen zu den Serinhydrolasen, folglich bildet Serin über seine Hydroxylgruppe den nukleophilen Aminosäurerest in der katalytischen Triade. Die Acylbindestelle in unterschiedlichen Lipasen kann sich bezüglich Größe und Form^[21, 22] stark unterscheiden, dementsprechend variieren auch die Substratspezifitäten für die jeweils umgesetzten Fettsäureester. Abb. 2. verdeutlicht anhand einiger Beispiele, wie variabel diese Bindestelle ausgebildet sein kann.

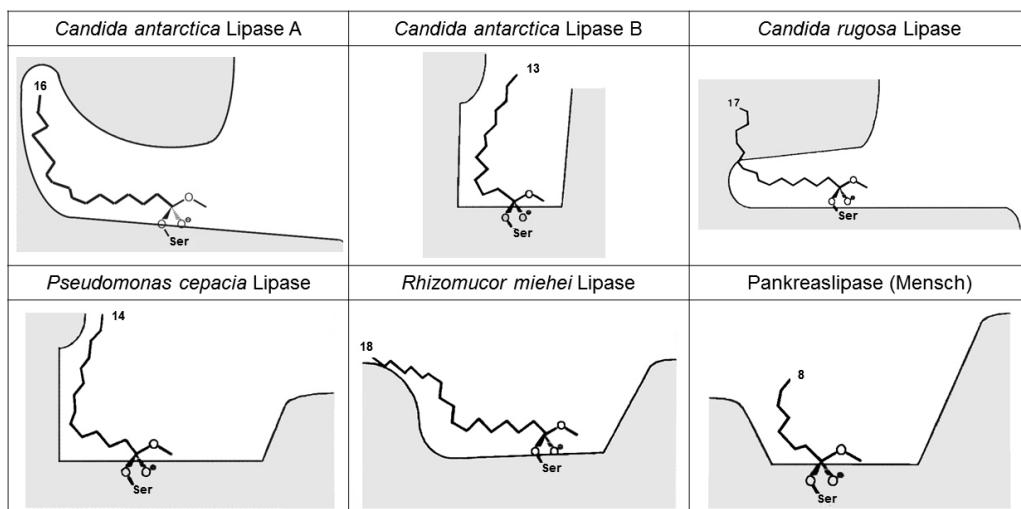
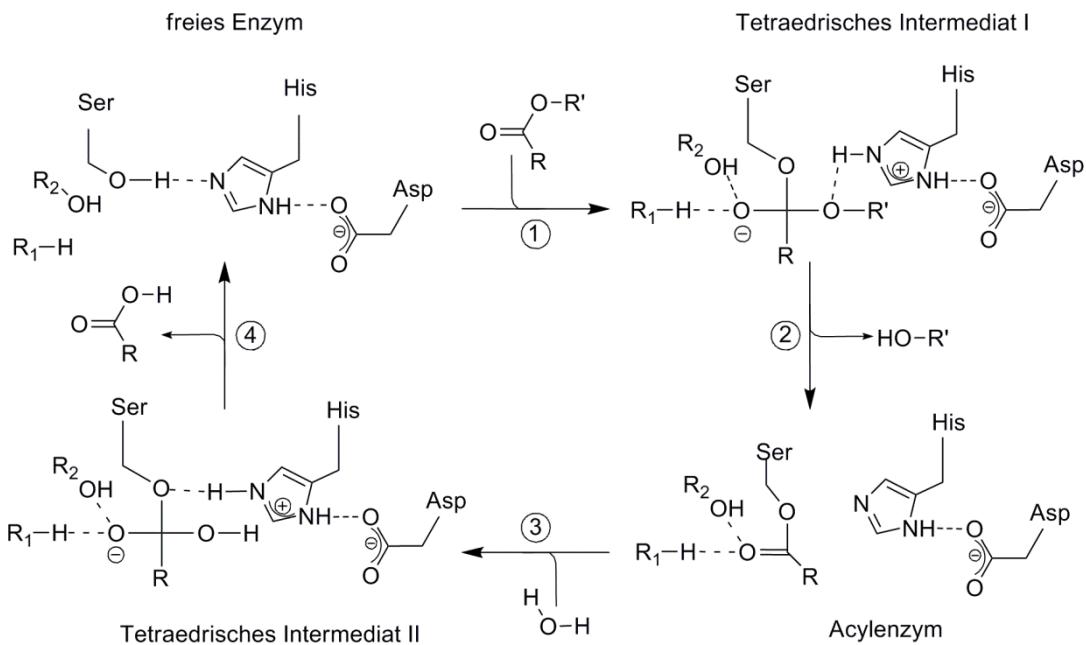


Abb. 2. Schematische Darstellung der Acylbindestellen von sechs Lipasen in der Seitenansicht, modifiziert nach Pleiss *et al.*^[21] und Widmann *et al.*^[22].

Die natürlich von Lipasen katalysierte Reaktion ist die Hydrolyse von Triglyceriden zu den jeweiligen Fettsäuren und Glycerol wobei der in Schema 1 dargestellte Mechanismus zu Grunde gelegt wird. Neben der Hydrolyse von Triglyceriden können Lipasen auch Veresterungen und Umesterungen katalysieren.



Schema 1. Mechanismus der Lipasen-katalysierten Hydrolyse von Estern modifiziert nach Ericson *et al.*^[23]. Die Reste R₁ und R₂ sind dabei die Aminosäurereste der Oxyanionentasche. 1: Nukleophiler Angriff des katalytischen Serinrestes auf den Carbonylkohlenstoff des Esters, was zur Bildung des tetraedrischen Intermediats führt; 2: Bildung des Acylenzymkomplexes durch die Hydrolyse des Esters und Freisetzen des Alkohols; 3: Die Anlagerung eines Wassermoleküls führt zur Bildung des zweiten tetraedrischen Intermediats; 4: Abtrennen der Fettsäure und Regeneration der freien Lipase.

Lipasen können ohne teure Cofaktoren eingesetzt werden und sind zudem häufig stabil in organischen Lösungsmitteln, was vorteilhaft für den Einsatz in industriellen Prozessen ist. Anwendung finden Lipasen hauptsächlich in der Waschmittel-, Lebensmittel-, kosmetischen und pharmazeutischen Industrie^[5, 24, 25], sie können allerdings auch zur Produktion von Biodiesel eingesetzt werden. Einige relevante Prozesse, in denen Lipasen verwendet werden, wären z. B. die Produktion von Kakaobutter-Derivaten^[26, 27], die Herstellung von Margarine^[28], von Emulsions- und Wachsestern^[10], die Synthese von S-Methoxypropylamin und anderen chiralen Aminen^[29, 30], von Diacylglyceriden^[31] als alternatives Speiseöl sowie von strukturierten Lipiden wie Betapol^[32].

1.2.1 Lipase A aus *Candida antarctica*

Der Hefepilz *Candida antarctica* (reklassifiziert als *Pseudozyma antarctica*) produziert unter anderem zwei verschiedene Lipasen, die als Lipase A und B bezeichnet werden^[33]. Dabei

weisen CAL-A und CAL-B nur eine Sequenzidentität von 7,8% auf^[34] und unterscheiden sich weiterhin deutlich in ihren Eigenschaften und ihren dreidimensionalen Strukturen. CAL-A besteht aus 431 Aminosäureresten und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa^[35].

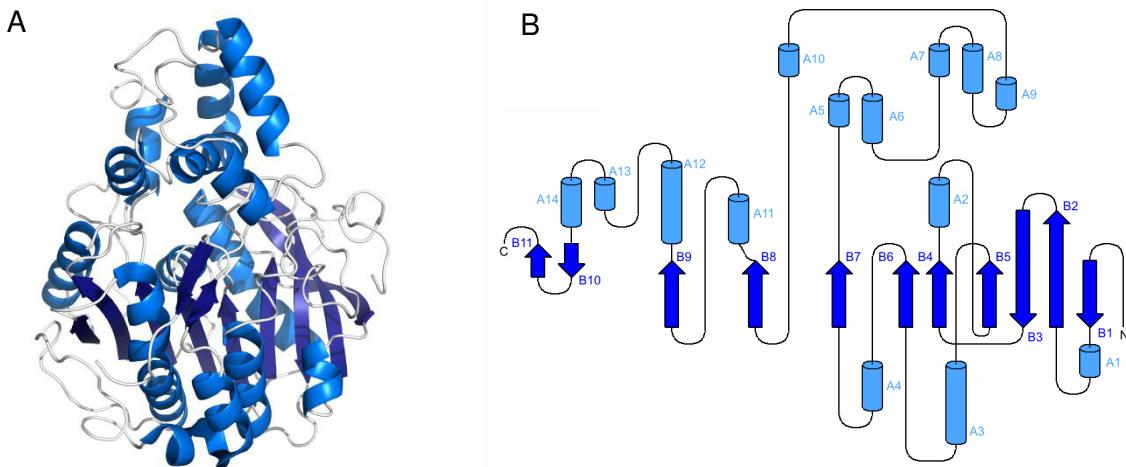


Abb.4. zeigt die 3D-Struktur der CAL-A (A) und ein Topologie-Diagramm^[36] dieser Struktur, modifiziert nach Ericsson *et al.* 2008; Eintrag in die Proteindatenbank (PDB): 2VEO; das Topologie-Diagramm zeigt die β-Stränge als dunkelblaue Pfeile, nummeriert von B1-B11 und die α-Helices als blaue Zylinder, nummeriert mit A1-A14.

Die Struktur der CAL-A wurde 2008 von Ericsson *et al.* beschrieben^[23] (PDB: 2VEO). Es zeigte sich, dass das Enzym aus 14 α-Helices und 11 β-Strängen aufgebaut ist (Abb.4.). Darüber hinaus wies die Struktur der CAL-A einen sogenannten *lid* auf, welcher als eine Art Deckel den Zugang zum aktiven Zentrum blockiert. Das Vorhandensein dieses *lids* konnte in vorherigen, computergestützten Modellstrukturen nicht vorausgesagt werden^[37]. Der *lid* der CAL-A wird von sechs α-Helices (A6-A10) gebildet, die sich zwischen den β-Strängen 6 und 7 der α/β-Hydrolase Domäne befinden. Die Struktur enthält zwei Disulfidbrücken, eine befindet sich in der α/β-Hydrolase Domäne, während die andere diese Domäne mit dem *lid* verbindet. Des Weiteren besitzt die CAL-A auch ein flexibles Strukturmerkmal am C-Terminus, den sogenannten *flap*. Diese *flap*-Domäne wird von 11 Aminosäureresten der β-Stränge 10 und 11 gebildet. Während der Grenzflächenaktivierung vollzieht dieser *flap* vermutlich eine Bewegung, sodass die CAL-A in ihre aktive Konformation übergeht und der Zugang zum aktiven Zentrum möglich ist. Die Acylbindetasche der CAL-A ist ein ca. 30 Å langer Tunnel, der in der Mitte eine Biegung von ca. 90° erfährt. Er beginnt in der Nähe der katalytischen Reste und verläuft durch die Helices der *lid*-Domäne. Die katalytische Triade wird von den Aminosäureresten Ser184, Asp334 und His366 gebildet. Noch nicht abschließend geklärt ist, welche Reste die Oxyanionen-Tasche formen, sowohl Gly185 zusammen mit Asp95^[23], aber auch Tyr93^[22] wurden vorgeschlagen. Allerdings führten Sandström *et al.* unter anderem Mutagenesestudien an Asp95 und Tyr93 durch, die eine Beteiligung von Asp95 am katalytischen Prozess nahelegen, nicht aber von Tyr93^[38].

CAL-A wurde weiterhin als ein sehr lösungsmittel- sowie thermostabiles Enzym beschrieben^[35, 39]. Sie verfügt über einige besondere Eigenschaften wie eine gewisse Selektivität gegenüber *trans*-Fettsäuren^[40] und die Fähigkeit sterisch anspruchsvolle Substrate wie tertiäre Alkohole umzusetzen^[41, 42]. Darüber hinaus ist die CAL-A in der Lage, enantioselektive N-Acylierungen zu katalysieren, was zur Synthese enantiomerenreiner β -Aminosäuren genutzt werden kann^[43-45].

Des Weiteren gehört die CAL-A auch zu den Lipasen mit Acyltransferaseaktivität^[17]. Dennoch bildet sie in Umesterungsreaktionen freie Fettsäuren als unerwünschtes Nebenprodukt. Dies ist für eine industrielle Anwendung hinderlich, da es die Ausbeute und somit die Effizienz des Verfahrens begrenzt.

1.2.2 Systeme zur rekombinanten Expression von Lipasen

Zur rekombinanten Expression von Lipasen können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Systeme genutzt werden. Eines der am häufigsten genutzten prokaryotischen Expressionssysteme stellt *E. coli* K12 bzw. ausgehend von diesem entwickelte Stämme dar^[46]. *E. coli* gehört im Hinblick auf seine Physiologie, Genetik und Biochemie zu den am besten charakterisierten Mikroorganismen, sodass viele Informationen über dieses gramnegative Bakterium, unter anderem auch die komplette Genomsequenz, verfügbar sind^[47]. Ein großer Vorteil dieses Expressionssystems ist die hohe Wachstumsrate, so verdoppelt sich die Zellzahl unter idealen Bedingungen ca. alle 20 min^[48]. Des Weiteren kann *E. coli* für Expressionen in sehr unterschiedlichen Volumina vom Mikrotiterplatten-Maßstab bis zur industriellen Hochzelldichte-Fermentation genutzt werden. Bei Letzterem kann der Anteil des Zielproteins dabei ca. 30% des Gesamtproteins ausmachen^[49], was einer sehr hohen volumetrischen Produktivität entspricht. Darüber hinaus sind eine Vielzahl von *E. coli* Stämmen sowie Vektoren kommerziell erhältlich^[46], die für die rekombinante Expression verschiedener Proteine optimiert wurden, so ist der Stamm *E. coli* SHuffle besonders geeignet für die Expression von Proteinen mit Disulfidbrücken^[50, 51]. Allerdings können in *E. coli* exprimierte Proteine nicht ins Medium sekretiert werden, was komplexere *downstream*-Verfahren notwendig macht^[52]. Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Möglichkeit, Proteine posttranslational zu modifizieren, was besonders die Expression von Lipasen eukaryotischen Ursprungs erschwert. Für die Lipase aus *Rhizopus oryzae*^[53, 54] und CAL-A ist jedoch auch eine funktionelle Expression in *E. coli* beschrieben^[40].

Eine Alternative zu prokaryotischen Expressionssystemen stellen z. B. Hefen dar^[55, 56]. Diese sind in der Lage Proteine auch in das Medium zu sekretieren und können posttranskriptionale Modifikationen wie Glykosylierungen durchführen. Dabei wurde in der Vergangenheit häufig *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionssystem verwendet. *S. cerevisiae* ist ebenso wie *E. coli* ein besonders gut charakterisierter Mikroorganismus^[57], der auf Grund seiner langen

Verwendung als Brau- bzw. Backhefe auch den GRAS-Status (*generally recognized as safe*) besitzt^[58]. Allerdings kann es bei rekombinanten Expressionen in *S. cerevisiae* Einschränkungen bei der Sekretionskapazität geben und es gibt eine starke Tendenz zur Hyperglykosylierung rekombinant exprimierter Proteine, was deren Stabilität bzw. Aktivität beeinflussen kann^[55]. Zusätzlich wird der terminale Mannoserest in N-Glykosylierungen von *S. cerevisiae* über eine α-1,3-Bindung verknüpft, was allergische Reaktionen hervorrufen kann^[55].

Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden in den letzten Jahrzehnten immer mehr Alternativen zu *S. cerevisiae* etabliert, eine von ihnen ist die methylotrophe Hefe *P. pastoris* (reklassifiziert als *Komagataella pastoris*)^[59-61], deren Genom ebenfalls in den letzten Jahren sequenziert und annotiert wurde^[62-64]. *P. pastoris* ist in der Lage, mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dabei wird Methanol zunächst im Peroxisom durch eine Alkoholoxidase zu Formaldehyd oxidiert, welches dann sowohl zur Energiegewinnung als auch zum Aufbau von Biomasse weiter metabolisiert wird^[65]. In *P. pastoris* gibt es zwei Alkoholoxidasen für die Oxidation von Methanol (AOX1 und AOX2), wobei das AOX1-Gen auf Grund eines stärkeren Promotors deutlich stärker exprimiert wird^[66]. Zur rekombinanten Expression werden die entsprechenden Gene in der Regel über homologe Rekombination in das Genom von *P. pastoris* integriert. Dabei wird der Ort der Integration durch homologe Sequenzen auf dem verwendeten Vektor und dem Genom definiert. Häufig erfolgt eine solche Integration am AOX1-Gen, sodass das Ziel-Gen unter der Kontrolle eines starken und durch Methanol induzierbaren Promotors steht^[67]. Für die Integration eines Gens ist dabei nur ein einfaches *crossover* notwendig, es kann allerdings auch zu einem doppelten *crossover* kommen, was den Verlust des AOX1-Gens bedeutet. Dementsprechend können zwei verschiedene Phänotypen entstehen, Mut⁺ (*methanol utilization plus*) und Mut^s (*methanol utilization slow*). Beide unterscheiden sich in der Geschwindigkeit, in der sie Methanol metabolisieren^[65]. So zeigt der Mut^s-Phänotyp ein deutlich langsameres Wachstum auf Methanol, was auf das Fehlen von AOX1 zurückzuführen ist. Neben dem AOX1-Promotor gibt es allerdings noch eine Reihe von anderen Promotoren wie den konstitutiven Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) Promotor^[68]. Dieser erfordert nicht die Induktion mit Methanol, was für eine Anwendung im industriellen Maßstab vorteilhaft ist. In Fermentationen kann *P. pastoris* sehr hohe Zelldichten erreichen und es sind Trockenzellgewichte von >100 g/L möglich^[52, 56].

Darüber hinaus können rekombinant exprimierte Proteine auch ins Medium sekretiert werden. *P. pastoris* sekretiert fast keine Eigenproteine, was das *downstream processing* vereinfacht. Ein weiterer Vorteil von *P. pastoris* ist, dass das Problem der Hyperglykosylierung in dieser Hefe deutlich geringer ausgeprägt ist, als z. B. in *S. cerevisiae*. Ebenso werden terminale Mannosereste in *P. pastoris* über eine α-1,2-Bindung mit dem

Glykan verknüpft, die im Gegensatz zu α -1,3-verknüpften Mannoseresten kein allergenes Potential haben^[59]. Für die Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Geotrichum candidum* und *Candida rugosa* wurde die rekombinante Expression in *S. cerevisiae* mit der in *P. pastoris* verglichen, wobei *P. pastoris* stets zu deutlich besseren Ergebnissen führte und die erhaltenen Aktivitäten bis zu 100-fach erhöht sein konnten^[69]. Auch die erfolgreiche Expression vieler anderer Lipasen wie z. B. der CAL-A in *P. pastoris* wurde bereits in der Literatur beschrieben^[52, 70].

Neben *P. pastoris* können auch andere Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Klyveromyces lactis* und *Yarrowia lipolytica* sowie filamentöse Pilze wie *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger* zur rekombinanten Expression verwendet werden^[52, 55].

1.2.3 Immobilisierung von Lipasen

Die Immobilisierung ist meist eine Voraussetzung für die industrielle Anwendbarkeit von Enzymen, denn so wird eine einfache Trennung von Katalysator und Produkt gewährleistet. Darüber hinaus führt die Immobilisierung häufig auch zu einer erhöhten Stabilität des Enzyms. Zur Immobilisierung von Enzymen wurden verschiedene Techniken etabliert, die sich wie folgt unterteilen lassen: Immobilisierung durch Adsorption, Einschluss, kovalente Bindung und Quervernetzung^[9, 71]. Dabei konnten die meisten dieser Methoden auch zur Immobilisierung von Lipasen verwendet werden.

Die Adsorption stellt dabei die wohl einfachste Immobilisierungsmethode dar. Hierbei wird die meist wässrige Enzymlösung mit einem Trägermaterial inkubiert, was bei ausreichend starken Interaktionen zwischen Enzym und Trägermaterial zur Adsorption des Enzyms führt. Dabei können zwischen Enzym und Träger unter anderem Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und auch ionische Wechselwirkungen stattfinden. Im Falle von Lipasen erfolgt die Adsorption meist durch hydrophobe Interaktion. Lipasen können besser als viele andere Proteine aus wässrigen Lösungen an hydrophobe Materialien adsorbieren, sodass eine gleichzeitige Reinigung und Immobilisierung möglich ist^[72, 73]. Als Trägermaterialen können z. B. anorganische Materialien^[74] wie Kieselgur oder Hydroxylapatit, mesoporöse Silikate oder organische Polymere verwendet werden. Mesoporöse Silikate bieten den Vorteil einer hohen Flexibilität in Bezug auf ihre Eigenschaften wie Poren- oder Partikelgröße^[75, 76]. Darüber hinaus kann auch ihre Oberflächen-Hydrophobizität beeinflusst werden, was besonders für die Immobilisierung von Lipasen interessant ist, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Hydrophobizität auch zu einer erhöhten Aktivität des Immobilisats führt^[77, 78]. Als organische Polymere werden z. B. auf Acrylaten basierende Materialen wie Lewatit VP OC 1600 genutzt. Dieser Träger wird unter anderem auch zur Herstellung des Lipase-Immobilisats Novozyme 435 genutzt, dass bereits für viele verschiedene Reaktionen angewendet

wurde^[79-81]. Allerdings kann es bei einer adsorptiven Immobilisierung leichter zu einem Ablösen des Enzyms vom Träger kommen, da die Immobilisierung auf relativ schwachen Wechselwirkungen basiert.

Der Einschluss von Enzymen kann z. B. in Sol-Gel-Materialien oder organischen Polymeren erfolgen. Bei der Sol-Gel-Methode wird die Enzylösung mit hydrolysierbaren Silanderivaten gemischt. Diese formen nach der Hydrolyse und anschließender Kondensationsreaktion ein Gel, welches das Enzym einschließt^[82]. Die Verwendung von Silanen mit einer oder mehreren Alkylgruppen sowie von verschiedenen Additiven (Polyethylenglycol, Proteine, Tween 80 usw.) hat sich bei der Immobilisierung von Lipasen mit dieser Methode als vorteilhaft erwiesen^[83-85]. Der Einschluss in organische Polymere konnte unter anderem für die Lipasen aus *Rhizomucor miehei* und *Rhizopus oryzae* gezeigt werden^[86, 87].

Die kovalente Immobilisierung von Enzymen bietet den Vorteil einer sehr stabilen Bindung zwischen Trägermaterial und Enzym, sodass ein Ablösen des Enzyms selbst unter aggressiven Reaktionsbedingungen unwahrscheinlich ist. Jedoch können durch kovalente Immobilisierungen unter Umständen auch katalytisch relevante Aminosäurereste modifiziert werden, was die Aktivität beeinträchtigen kann. Die kovalente Bindung erfolgt häufig an den Aminogruppen des Enzyms und es werden meist Trägermaterialen verwendet, die durch Epoxid- oder Aminogruppen aktiviert wurden. Zur kovalenten Immobilisierung werden oft Eupergit-Träger eingesetzt, wie z. B. für die Immobilisierung der Lipase aus *Candida rugosa*^[88].

Durch die Immobilisierung mittels Quervernetzung lassen sich z. B. sogenannte CLECs (*cross-linked enzyme crystal*)^[89] als auch CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*)^[90, 91] erzeugen. In beiden Fällen werden meist die Aminogruppen der Enzyme mittels Glutaraldehyd quervernetzt, um so stabile Immobilisate zu erhalten. Sowohl in CLECs als auch CLEAs ist das Enzym die Hauptkomponente, was eine hohe katalytische Aktivität pro Volumeneinheit ermöglicht. Zur Gewinnung von CLECs muss das Enzym zunächst kristallisiert werden, was diese Methode nur begrenzt anwendbar macht, da nicht alle Proteine leicht kristallisierbar sind. CLEAs hingegen basieren auf Enzymaggregaten, die durch den Zusatz von Salzen oder organischen Lösungsmitteln entstehen. Sowohl bei der Präparation von CLECs als auch CLEAs von Lipasen konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Detergenzien zu einer erhöhten Aktivität führen kann^[92, 93], da diese vermutlich den Übergang in die aktive Konformation stimulieren.

1.2.4 Analytik von Lipase-katalysierten Reaktionen

Für die Quantifizierung der hydrolytischen Aktivität von Lipasen sind bereits eine Reihe von Verfahren etabliert worden. Dabei werden für eine sehr genaue Analyse zumeist Gaschromatografie (GC) oder *high performance liquid chromatography* (HPLC) verwendet,

es sind aber auch eine Vielzahl von Hochdurchsatztests beschrieben. Zu diesen gehört unter anderem der *para*-Nitrophenol-Assay (*p*NP-Assay). Dabei können verschiedene *p*NP-Fettsäureester als Substrate eingesetzt werden, deren enzymatische Hydrolyse zur Freisetzung der Fettsäure und des *p*-Nitrophenols führt. Das gebildete *p*NP absorbiert unter leicht basischen Bedingungen bei ca. 410 nm, sodass eine photometrische Detektion möglich ist^[40, 94]. Auf ähnliche Weise können auch Fettsäureresorufinester für die Aktivitätsmessung eingesetzt werden^[95]. Dabei entsteht die freie Säure und das fluoreszierende Resorufin. Auch die bei solchen Reaktionen entstehenden Fettsäuren können zur Detektion verwendet werden. Sie können eine Änderung des pH-Wertes verursachen, der durch die Verwendung bestimmter Indikatoren auch photometrisch detektierbar sein kann^[96]. Die pH-Stat-Methode nutzt ebenfalls die durch freie Fettsäuren verursachte Änderung des pH-Wertes zur Messung der Aktivität. Bei diesem titrimetrischen Verfahren wird durch kontinuierliche Zugabe einer Base definierter Konzentration ein bestimmter pH-Wert konstant gehalten^[97]. Über den Verbrauch an Base lässt sich dann schließlich die Aktivität berechnen. Allerdings eignet sich keiner der bereits beschriebenen Hochdurchsatztests zur Quantifizierung der Acyltransferaseaktivität einer Lipase. Auch die für andere Acyltransferasen beschriebenen analytischen Methoden sind für einen solchen Test ungeeignet, denn häufig basieren sie auf zeitaufwendigen Verfahren wie GC bzw. GC-MS^[98, 99] oder LC-MS^[100] (*liquid chromatography-mass spectrometry*), erfordern die Verwendung radioaktiv markierter Substrate^[101, 102] oder die Freisetzung von Coenzym A (CoA)^[99, 102].

1.3 Protein-Engineering

Unter dem Begriff des Protein-Engineering werden verschiedene Methoden zusammengefasst, die zur Optimierung eines Enzyms verwendet werden können^[103-105]. Dabei unterscheidet man im Wesentlichen zwischen gerichteter Evolution und rationalem Design, wobei auch Kombinationen aus beiden Strategien möglich sind. Die gerichtete Evolution nutzt die Zufallsmutagenese, um eine Vielzahl von Enzymvarianten zu erzeugen. Dazu können sowohl rekombinierende als auch nicht-rekombinierende Mutagenesemethoden angewendet werden^[106]. Bei nicht-rekombinierenden Methoden wird nur ein Ausgangsgen verwendet, wie z. B. bei der *error-prone-PCR*^[107]. Bei rekombinierenden Mutagenesemethoden wie z. B. dem *gene shuffling* werden mehrere sequenzhomologe Gene verwendet, um ein neues Hybridgen zu erzeugen^[108]. In jedem Fall ist die Anzahl der generierten Varianten sehr hoch, sodass ein Hochdurchsatz-Screening erforderlich ist, um die entsprechenden Mutantenbibliotheken zu durchmustern. Demzufolge ist der Screening-Aufwand sehr hoch, jedoch werden im Vorfeld keine Informationen über die dreidimensionale Struktur bzw. den Mechanismus des zu optimierenden Enzyms benötigt.

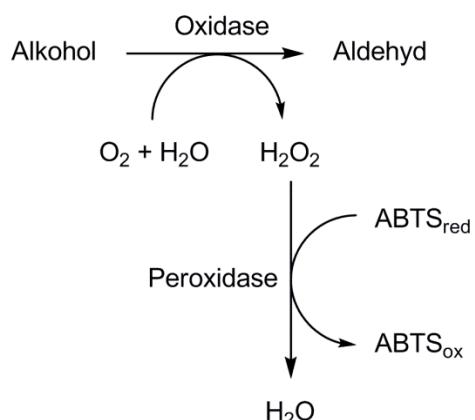
Im Gegensatz dazu basiert das rationale Design darauf, dass möglichst viele Informationen (Struktur, Mechanismus, Substratbindung, usw.) über das zu optimierende Enzym vorliegen^[109, 110]. Je besser das Enzym dabei in seiner Struktur und Funktionsweise charakterisiert ist, desto zuverlässiger lassen sich die Auswirkungen von gezielten Aminosäureaustauschen auf bestimmte Eigenschaften vorhersagen. Durch computergestütztes *molecular modelling* können dabei Mutationen *in silico* erzeugt werden, um z. B. ihren Einfluss auf die Substratbindung zu beurteilen. Auf diese Weise kann eine relativ kleine Anzahl von Enzymvarianten bestimmt werden, die die gewünschten Verbesserungen aufweisen sollten. Durch die wesentlich kleinere Anzahl an Mutanten ist in der Regel kein Hochdurchsatztest notwendig und die Analyse der Varianten kann direkt mit chromatografischen Verfahren wie der GC oder HPLC erfolgen.

Heutzutage werden häufig Kombinationen aus beiden Strategien angewendet, die als semi-rationales oder fokussiertes rationales Design bezeichnet werden^[111]. Dabei können ebenfalls mit Hilfe des *molecular modelling* Positionen identifiziert werden, die dann z.B. für eine Sättigungsmutagenese genutzt werden. Somit kann der *Screening*-Aufwand bereits deutlich verringert werden, auch wenn die Informationen über das zu optimierende Enzym begrenzt sind. Als bekanntes Beispiel wäre hierbei das sogenante CASTing^[112] zu nennen (*combinatorial active-site saturation test*). Beim CASTing werden Gruppen von Aminosäureresten, deren Seitenketten ins aktive Zentrum ragen, basierend auf der dreidimensionalen Struktur ausgewählt und mutiert. Dabei kann es durch die gleichzeitige Mutation mehrerer Reste zu kooperativen Effekten kommen. Eine Weiterentwicklung des CAST-Konzeptes ist die iterative Sättigungsmutagenese (ISM)^[113], wobei die beste Variante einer Gruppe als Matrize für die Mutagenese der nächsten Gruppe verwendet wird.

Für Lipasen konnten sowohl die Methoden der gerichteten Evolution, als auch des rationalen Protein Designs sowie Kombinationen aus beiden für verschiedene Fragestellungen erfolgreich angewendet werden^[114].

2 Etablierung des Oxidase-Assays als Hochdurchsatztest (Artikel I)

Zur Quantifizierung der Acyltransferaseaktivität von CAL-A wurde der Oxidase-Assay als ein Hochdurchsatztest im Mikrotiterplatten-Maßstab etabliert, der auf dem Verbrauch des Alkohols in Umesterungsreaktionen basiert. Dazu wird eine Enzymkaskade verwendet, deren Ablauf in Schema 2. dargestellt ist. Die erste Reaktion wird von einer Alkohol-Oxidase katalysiert, wodurch der Alkohol oxidiert und in äquimolaren Mengen Wasserstoffperoxid gebildet wird. Wasserstoffperoxid wird im Folgenden von einer Peroxidase reduziert, was gleichzeitig zur Oxidation von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) führt, die photometrisch bei 695 nm detektierbar ist. Als Oxidase und Peroxidase wurden in diesem Assay die Alkohol-Oxidase aus *P. pastoris* und die Peroxidase aus Meerrettich verwendet. Beide Enzyme stammten aus kommerziellen Präparationen.



Schema 2. Reaktionsverlauf der enzymatischen Reaktionen im Oxidase-Assay.

Zur Etablierung des Assays wurde zunächst überprüft, ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der Änderung der Absorption bei 695 nm und der eingesetzten Menge an Alkohol gab. Dazu wurden Standardproben verwendet, die verschiedene Mengen an Ethanol enthielten. Neben Ethanol beinhalteten diese Standardproben auch Palmkernöl (PKO), Wasser, Glycerol und Ethyllaurat, um möglichst ähnliche Bedingungen zu späteren Biokatalysen zu gewährleisten. Die Standardproben zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen der verwendeten Ethanolkonzentration und der Absorptionsänderung bei 695 nm. Bei allen späteren Anwendungen des Oxidase-Assays wurden stets Standardproben mitgeführt, um über eine Standardkurve die entsprechenden Ethanolkonzentrationen zu berechnen. Im Folgenden wurden in parallelen Ansätzen Biokatalysen durchgeführt, die dem Vergleich des Oxidase-Assays mit der GC-Analyse dienen sollten. Als Substrate in diesen Biokatalysen wurden Ethanol sowie PKO bzw. Trilaurin verwendet. Darüber hinaus wurde Wasser im volumetrischen Verhältnis von 1:1 bezogen auf die Menge an Ethanol zu den Biokatalysen gegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Biokatalysen beendet und mit der entsprechenden Methode untersucht. Dabei zeigte sich, dass es besonders bei

3 Protein-Engineering der CAL-A

geringeren Umsätzen zu stärkeren Abweichungen zwischen GC und Oxidase-Assay kommen kann. Bei größeren Umsätzen ($\geq 40\%$) fand sich jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Analysemethoden mit Abweichungen zwischen 5-20%, wobei die durchschnittliche Abweichung innerhalb dieser Proben 10,6% betrug. Demzufolge sollte bei der Anwendung dieses Assays ein gewisser Umsatz nicht unterschritten werden, da sonst mit stärkeren Schwankungen zu rechnen ist, die zu einem falschpositiven Ergebnis führen könnten.

3 Protein-Engineering der CAL-A (Artikel II)

Zur Optimierung der Acyltransferaseaktivität der CAL-A sollten im Folgenden die Methoden des Protein-Engineerings angewendet werden. Da die Kristallstruktur der CAL-A bereits gelöst war, wurde versucht, mittels rationalem Design Mutagenesepositionen zu identifizieren.

3.1 Rationales Design

Basierend auf der 3D-Struktur der CAL-A wurden *docking*-Experimente durchgeführt, durch die vier Mutagenesepositionen, Thr118, Asp122, Thr221 und Glu370, identifiziert werden konnten. Diese vier Positionen wurden ausgewählt, weil hydrophile Aminosäurereste gegen Hydrophobere ausgetauscht werden sollten. So könnte sich die Hydrophobizität in der Nähe des aktiven Zentrums erhöhen, was zur Bevorzugung von Alkoholen als Nukleophilen gegenüber Wasser führen sollte^[115]. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die verfügbare Struktur der CAL-A nur die geschlossene und somit inaktive Form darstellt. Folglich war es z. B. nicht möglich, sterisch anspruchsvolle Substrate wie Triglyceride für *docking*-Experimente zu nutzen.

Die in *E. coli* exprimierten und anschließend gereinigten Varianten wurden für eine initiales *Screening* eingesetzt. Allerdings waren die Umsätze in diesem *Screening* sehr gering, sodass die Ergebnisse eher qualitativ als quantitativ zu betrachten sind. Aufgrund der geringeren Umsätze wurden GC-Messungen und nicht der Oxidase-Assay zur Analyse der Proben verwendet. Tab. 1 zeigt, dass drei CAL-A Varianten identifiziert werden konnten, die eine anscheinend ähnlich gute oder verbesserte Esterbildung im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, nämlich Thr118Ile, Asp122Leu und Thr221Ala.

Tab.1 Ergebnisse des initialen Screenings der CAL-A Varianten basierend auf GC-Messungen; die Symbole $-/-$, $-$, $+/-$ und $+$ stellen die Aktivität qualitativ zum Wildtyp dar; $-/-$: keine oder stark verringerte Aktivität; $-$: verringerte Aktivität; $+/-$: gleiche oder leicht erhöhte Aktivität; $+$: erhöhte Aktivität.

Position \ Aminosäure	Ala	Val	Leu	Pro	Ile	Trp	Phe
Position							
Thr118	$-/-$	$-/-$	-	$-/-$	$+$	$-/-$	$-/-$
Asp122	-	-	$+/-$	-	-	-	-
Thr221	$+$	$-/-$	$-/-$	$-/-$	-	$-/-$	$-/-$
Glu370	-	-	-	-	-	-	$-/-$

Ursächlich für die geringen Umsätze in diesem initialen Screening sind vermutlich die unzureichende Expression der CAL-A Varianten in *E. coli* und eine nicht vollständige Reinigung des Enzyms. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen das Expressionssystem zu *P. pastoris* gewechselt.

3.2 Expression von CAL-A Varianten in *P. pastoris*

Zur Expression der CAL-A in *P. pastoris* wurde das entsprechende Gen bereits in früheren Arbeiten in den Vektor pPICZα kloniert^[40]. Dabei ist die Expression der CAL-A durch Methanol induzierbar und die Expression erfolgt sekretorisch in das Medium. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden die Varianten Thr118Ile, Asp122Leu und Thr221Ala durch positionsgerichtete Mutagenese erzeugt. Anschließend wurden die Plasmide linearisiert, gereinigt und konzentriert, um sie zur Transformation elektrokompetenter *P. pastoris* X-33 Zellen zu verwenden. Dabei wurden zwischen 1,5-2,5 µg DNA eingesetzt, wobei kommerzielle Anbieter 5-10 µg DNA empfehlen^[116]. Dennoch konnten mindestens 29 Klone erhalten werden.

Je vier Klone jeder Variante wurden daraufhin für die Phänotypisierung verwendet. Da beide Phänotypen (Mut⁺ und Mut^s) sich in der Geschwindigkeit in der sie Methanol metabolisieren unterscheiden, können sie mit einem einfachen Wachstumsassay unterschieden werden. Mut⁺-Klone sollten auf Methanol als Kohlenstoffquelle genauso schnell wachsen, wie auf Glukose, während Mut^s-Klone auf Methanol ein deutlich langsameres Wachstum zeigen sollten. Für alle untersuchten Klone wurde der Mut⁺-Phänotyp bestätigt. Dies entsprach den Erwartungen, da der verwendete *P. pastoris* Stamm diesen Phänotyp stark bevorzugt.

Anschließend wurden die Klone mit bestätigtem Phänotyp für eine Testexpression verwendet, um zu untersuchen, ob es Unterschiede im Expressionsniveau gab. Alle Klone einer CAL-A Variante zeigten dabei ein ähnliches Wachstum, wie Abb. 5. verdeutlicht. Nach einer Expression von ca. 91 h wurden alle Kulturüberstände mittels SDS-PAGE und pNP-Myristat-Assay untersucht, dabei zeigten die Klone mit der stärksten CAL-A Bande auch die höchste Aktivität. Anzumerken ist hierbei, dass jeweils nur die vier Klone einer

3 Protein-Engineering der CAL-A

CAL-A Variante miteinander verglichen werden konnten, nicht aber die Varianten untereinander, da nur volumetrische und keine spezifischen Aktivitäten bestimmt wurden.

Der jeweils aktivste Klon der CAL-A Varianten wurde für weitere Expressionen im Bioreaktor verwendet. Diese wurden im 400 ml Maßstab durchgeführt und es konnten nach ca. 5 Tagen Expression OD₆₀₀-Werte von 200-280 sowie Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand von 1,7-2,5 mg/mL erreicht werden. Die Kulturüberstände wurden anschließend konzentriert und lyophilisiert.

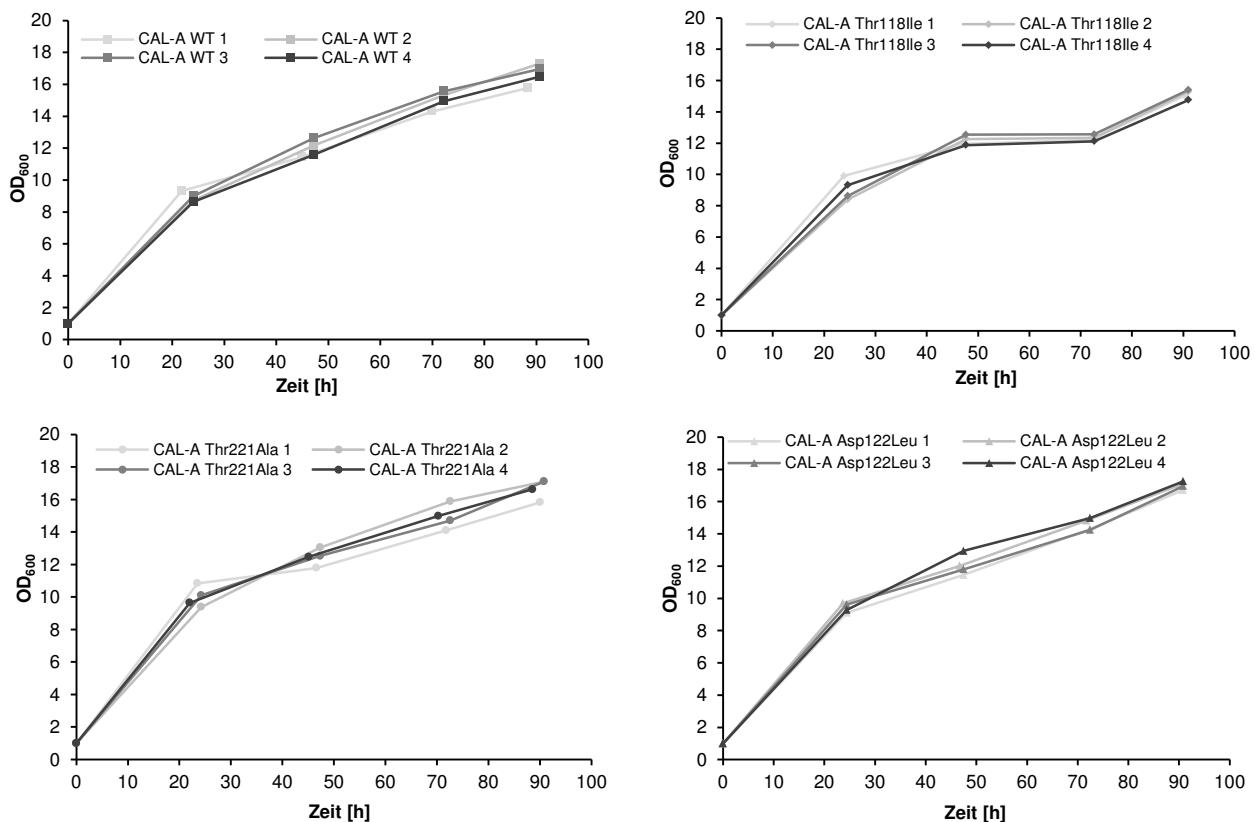


Abb. 5. Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) nach der Induktion der Textexpressionen von CAL-A WT (oben links), CAL-A Thr118Ile (oben rechts), CAL-A Asp122Leu (unten rechts) und CAL-A Thr221Ala (unten links). Für jede CAL-A Variante wurde jeweils vier Klone untersucht.

3.3 Weitere Untersuchungen der CAL-A Varianten

Zur weiteren Untersuchung der CAL-A Varianten wurden die in *P. pastoris* exprimierten und in Puffer gelösten Enzyme in Biokatalysen mit PKO und Ethanol eingesetzt. Es wurden Proben nach einer Biokatalysedauer von 1 h und 24 h analysiert. Dabei zeigten der CAL-A WT sowie die Varianten Thr118Ile und Thr221Ala nach 1 h einen ähnlichen Umsatz von ca. 15% während die Variante Asp122Leu bereits einen Umsatz von 30% aufwies. Nach 24 h lag in allen Biokatalyseansätzen ein ähnlich hoher Umsatz von ca. 80% vor. Für die Variante Asp122Leu zeigte sich in beiden Zeitproben, dass das Verhältnis von freier Laurinsäure zu Ethyllaurat deutlich zugunsten des Esters verschoben war (Abb. 6.). Warum

die Mutation Asp122Leu diesen Effekt hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht genau beantwortet werden. Für weitere Erkenntnisse wäre zunächst eine Kristallstruktur der CAL-A im aktiven Zustand notwendig, um so den Mechanismus besser verstehen zu können. Der Aminosäurerest Asp122 liegt allerdings in der Nähe der *flap*-Domäne, also dem Eingang zum aktiven Zentrum. Aus diesem Grund wird vermutet, dass der Austausch des polaren Aspartatrests zum unpolaren Leucinrest den Zugang von Wassermolekülen zum aktiven Zentrum erschweren könnte und so die Hydrolyse verringert wird. Ein sterischer Effekt wird als eher unwahrscheinlich angesehen, da Aspartat- und Leucinreste einen ähnlichen sterischen Anspruch haben.

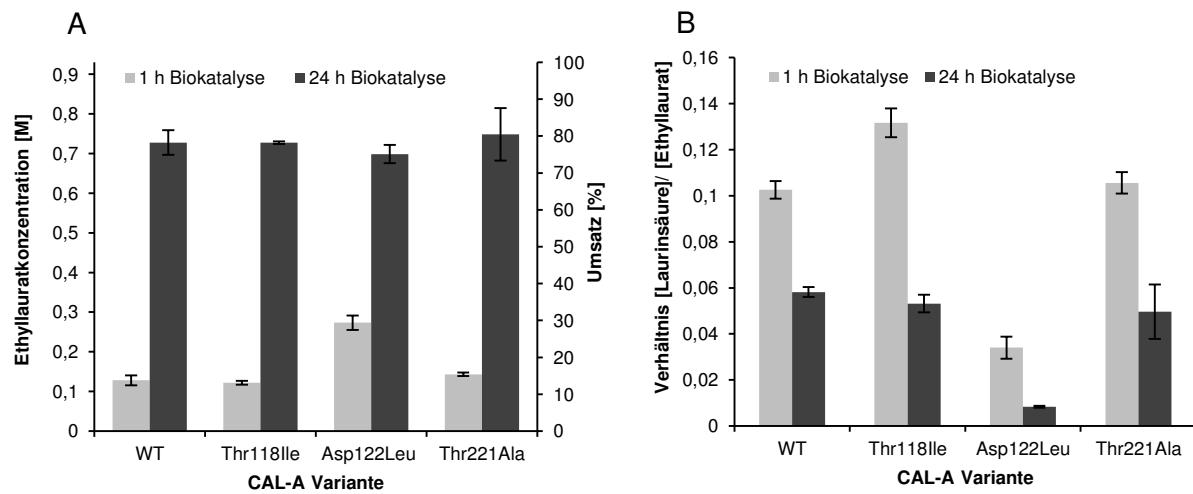


Abb. 6. Zeigt die Ethyllauratkonzentration nach einer bzw. 24 h Biokatalyse für unterschiedliche CAL-A Varianten (A). Darüber hinaus ist das Verhältnis der gebildeten Mengen an Laurinsäure/ Ethyllaurat für beiden Zeitproben dieser Varianten dargestellt (B). Die Analyse der Proben wurde mittels GC durchgeführt.

Daraufhin wurde die CAL-A Variante Asp122Leu näher charakterisiert, um zu überprüfen, ob die eingefügte Mutation unter Umständen andere Eigenschaften der CAL-A wie die Thermostabilität beeinflusst hat. Neben dem T_{50}^{60} -Wert als Maß für die Thermostabilität eines Enzyms wurden auch das Temperatur- und pH-Optimum bestimmt. Sowohl für CAL-A WT als auch für Asp122Leu wurde ein pH-Optimum von 6 und ein Temperaturoptimum von $\geq 70^\circ\text{C}$ ermittelt. Die berechneten T_{50}^{60} -Werte für CAL-A WT bzw. Asp122Leu betrugen 83°C und 79°C , sodass beide Enzyme als thermostabil anzusehen sind.

3.4 Immobilisierung von CAL-A WT und Asp122Leu

Zur Immobilisierung von Enzymen steht eine Reihe von Verfahren zur Verfügung. Eines der einfachsten und kostengünstigsten stellt dabei die adsorptive Immobilisierung dar, sodass diese Methode auch für die Immobilisierung des CAL-A WT und der Variante Asp122Leu verwendet wurde. Als Trägermaterial diente Lewatit VP OC 1600. Sowohl für CAL-A WT als

4 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A

auch für CAL-A Asp122Leu konnte aktives Immobilisat erzeugt werden ($0,17 \text{ U/mg}_{\text{Immobilisat}}$ bzw. $0,08 \text{ U/mg}_{\text{Immobilisat}}^*$). Theoretisch hätten 84-88% der eingesetzten Proteinmenge, basierend auf der Abnahme des Proteingehalts in der verwendeten Enzymlösung nach der Immobilisierung, auf dem Trägermaterial gebunden sein sollen. Es konnten jedoch nur zwischen 2,5-5,5% der eingesetzten Aktivität auf dem Immobilisat wiedergefunden werden. Daher wird vermutet, dass ein Großteil des gebundenen Enzyms durch die Waschschrifte vom Trägermaterial gelöst worden sein könnte. Eine Denaturierung des gebundenen Enzyms scheint eher unwahrscheinlich, da die CAL-A als ein sehr stabiles Enzym bekannt ist. Die hergestellten Immobilisate wurden in Biokatalysen mit PKO, Methanol und 10% Wasser (bezogen auf die Einwaage an Öl) eingesetzt. Für die CAL-A Variante Asp122Leu ließ sich nach einer Biokatalysedauer von 24 h ein Umsatz von über 90% feststellen, während CAL-A WT nur ein Umsatz von ca. 65% erreichte. Der geringere Umsatz, der mit dem CAL-A WT erzielt wurde, könnte durch eine geringere Prozessstabilität des Immobilisats verursacht werden. Des Weiteren zeigte sich auch bei der Verwendung der Immobilisate, dass die Variante Asp122Leu deutlich weniger freie Säure bildete als der CAL-A WT.

4 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A (Artikel III)

Neben dem Protein-Engineering der CAL-A besteht eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Estersynthese in der Optimierung der Prozessbedingungen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter wie z.B. Temperatur und Wassergehalt auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A untersucht. Dabei wurden als Substrate PKO sowie Methanol bzw. Ethanol verwendet. Als Biokatalysator wurde kommerziell erhältliches CAL-A Immobilisat eingesetzt. Die Biokatalysen wurden bei 30°C, 40°C und 50°C sowie einem Wassergehalt von entweder 10% oder 5% (bezogen auf die Einwaage an Öl) durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass die Reaktionen mit Methanol unter allen getesteten Bedingungen einen hohen Umsatz ca. 85-95% zeigten. Zu beachten war bei diesen Biokatalysen jedoch, dass bei einem Wassergehalt von nur 5% die Zugabe des Methanols schrittweise erfolgen musste (drei Zugaben im Abstand von 2 h), da ansonsten nur sehr geringe Umsätze erzielt werden konnten. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine durch Methanol bedingte Denaturierung bzw. Inaktivierung des Enzyms sein, die durch die portionierte Zugabe des Alkohols verhindert wird^[117, 118].

In den Biokatalysen mit Ethanol schwankten die erzielten Umsätze zwischen 55-85%. Es zeigte sich, dass die Umsätze bei einem Wassergehalt von 5% geringer waren als bei 10%. Der höchste Umsatz ließ sich bei einem Wassergehalt von 10% und 40°C erzielen, während

ein Wassergehalt von 5% und eine Reaktionstemperatur von 30°C den geringsten Umsatz lieferten.

Anschließend wurde für alle Bedingungen das Verhältnis der gebildeten freien Laurinsäure zum jeweiligen Laurinsäureester verglichen. Insgesamt wurden unter allen Bedingungen nur zwischen 2-8% Laurinsäure gebildet. Auffällig ist allerdings, dass die höchsten Werte für die Laurinsäure bei den Biokatalysen mit Methanol und einem Wassergehalt von 5% gefunden wurden. Dies ist vermutlich auf die schrittweise Zugabe von Methanol zurückzuführen, denn so liegt Methanol zeitweise in einem geringeren molaren Verhältnis zum Triglycerid vor, was die Hydrolyse vermutlich befördert und zu einer erhöhten Säuremenge führen kann.

Im Anschluss daran wurde die Langzeitstabilität des verwendeten Immobilisats untersucht. Dazu wurden Biokatalysen mit PKO, Methanol bzw. Ethanol und einem Wassergehalt von 5% sowie 10% in einem größeren Maßstab durchgeführt. Die Biokatalysen wurden bei 40°C für 97 h inkubiert. Anschließend wurde das verwendete Immobilisat wiedergewonnen, getrocknet und die verbleibende Aktivität bestimmt. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von Methanol nur 24-29% der ursprünglichen Aktivität erhalten blieben, während es bei den Biokatalysen mit Ethanol 40-42% waren. Dass Methanol im Vergleich zu anderen Alkoholen deutlich schneller zur Denaturierung bzw. Inaktivierung von Enzymen führen kann, ist bereits seit längerem bekannt^[119]. Allerdings sind die zugrunde liegenden Mechanismen nicht komplett verstanden, es sind jedoch detaillierte Untersuchungen für einige Enzyme vorhanden. Dabei sind die Untersuchungen der Effekte von Methanol auf die CAL-B besonders interessant^[120], da diese Lipase eigentlich lösungsmittelstabil und dennoch methanolsensitiv ist. Im Fall der CAL-B konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung durch Methanol bereits bei relativ geringen Konzentrationen auftritt, während strukturelle Änderungen höhere Konzentrationen erfordern.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Synthese von Fettsäureestern aus Pflanzenölen mit Methanol bzw. Ethanol in Gegenwart von Wasser durch die Lipase CAL-A zu optimieren, wobei insbesondere die Bildung von freien Fettsäuren minimiert werden sollte.

Zunächst wurde ein Hochdurchsatztest zur Bestimmung der Acyltransferaseaktivität der CAL-A etabliert, welcher auf der Abnahme des Alkoholgehalts in Umesterungsreaktionen basiert. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Umsätzen, die mit GC und dem Oxidase-Assay ermittelt wurden, wobei die Umsätze nicht zu gering sein sollten da sonst größere Schwankungen im Oxidase-Assay möglich sind.

Durch das rationale Design anhand der gelösten Struktur der CAL-A konnten vier Mutagenesepositionen identifiziert werden: Thr118, Asp122, Thr221 und Glu370. Durch den Austausch der Aminosäurereste an diesen Positionen gegen hydrophobere Aminosäuren wurden 28 CAL-A Varianten generiert. Diese wurden für eine initiales, qualitatives *Screening* eingesetzt, indem drei CAL-A Varianten eine ähnliche bzw. erhöhte Esterbildung im Vergleich zum Wildtyp zu haben schienen. Die drei Varianten Thr118Ile, Asp122Leu und Thr221Ala wurden daraufhin für weitere Untersuchungen in *P. pastoris* im Bioreaktor hergestellt und in Biokatalysen verwendet. Eine erhöhte Esterbildung für die Varianten Thr118Ile und Thr221Ala ließ sich jedoch nicht bestätigen, allerdings zeigte sich, dass die CAL-A Variante Asp122Leu deutlich weniger freie Säure bildete als der CAL-A WT. In der anschließenden Charakterisierung von CAL-A Asp122Leu zeigte sich, dass diese Variante wie CAL-A WT auch thermostabil ist und dass beide Enzyme das gleiche pH- und Temperaturoptimum haben. Des Weiteren wurden CAL-A WT und Asp122Leu adsorptiv auf Lewatit VP OC 1600 immobilisiert und in Biokatalysen eingesetzt, in denen CAL-A Asp122Leu erneut deutlich weniger freie Säure bildete.

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Acyltransferaseaktivität der CAL-A untersucht. Es wurden dazu Biokatalysen mit Ethanol oder Methanol durchgeführt, in denen der Wassergehalt (5% oder 10% bezogen auf die Einwaage an Öl) und die Reaktionstemperatur (30°C, 40°C oder 50°C) variiert wurden. Die Biokatalysen mit Methanol zeigten dabei generell einen hohen Umsatz zwischen 85-95%, während die Biokatalysen mit Ethanol nur zu geringeren Umsätzen führten (55-85%). Allerdings zeigte sich in einem Langzeitstabilitätstest mit einer Biokatalysedauer von 97 h auch, dass Methanol das verwendete CAL-A Immobilisat stärker inaktiviert als Ethanol. Ebenso musste bei einem Wassergehalt von nur 5% die Methanolzugabe schrittweise erfolgen, um eine Inaktivierung des CAL-A Immobilisats zu verhindern.

Somit konnte eine Optimierung der CAL-A-katalysierten Umesterungsreaktionen sowohl durch das Protein-Engineering des Biokatalysators als auch durch die Anpassung der Prozessbedingungen erreicht werden. Dabei wurden Erkenntnisse gewonnen, die auch zur Beurteilung der industriellen Anwendbarkeit eines solchen Prozesses beitragen können.

6 Literatur

- [1] O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 345-351.
- [2] A. Liese, K. Seelbach and C. Wandrey (Hrsg.), *Industrial Biotransformations*, 2. Auflage, Wiley-VCH Verlag, **2006**.
- [3] S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, Industrial biotechnology—the future of green chemistry?, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.
- [4] K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 2. Auflage, Wiley- Blackwell, **2012**
- [5] U. Schörken, P. Kempers, Lipid biotechnology: industrially relevant production processes, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 627-645.
- [6] G. Hills, Industrial use of lipases to produce fatty acid esters, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 601-607.
- [7] J. Schrader, M. Etschmann, D. Sell, J.-M. Hilmer, J. Rabenhorst, Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds—current industrial processes and future prospects, *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 463-472.
- [8] B. R. Moser, Biodiesel, Production, Properties, Feedstocks, in *Biofuels-Global Impact on Renewable Energy, Production Agriculture, and Technological Advancements*, Hrsg.: D. Tomes, P. Lakshmanan, D. Songstad, Springer, **2011**
- [9] P. Adlercreutz, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406-6436.
- [10] M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum, Immobilised lipases in the cosmetics industry, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6475-6490.
- [11] O. S. Stamenković, A. V. Veličković, V. B. Veljković, The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolation: current state and perspectives, *Fuel* **2011**, *90*, 3141-3155.
- [12] M. Mittelbach, M. Wörgetter, J. Pernkopf, H. Junek, Diesel fuel derived from vegetable oils: preparation and use of rape oil methyl ester, *Energy in Agriculture* **1983**, *2*, 369-384.
- [13] G. Vicente, M. Martinez, J. Aracil, Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems, *Bioresour. Technol.* **2004**, *92*, 297-305.
- [14] M. Adamczak, U. T. Bornscheuer, W. Bednarski, The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 800-813.
- [15] M. Mittelbach, Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 168-170.
- [16] Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 789-793.
- [17] R. Brenneis, B. Baeck, G. Kley, Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 809-814.
- [18] L. Brunel, V. Neugnot, L. Landucci, H. Boze, G. Moulin, F. Bigey, E. Dubreucq, High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.* **2004**, *111*, 41-50.
- [19] M. Nardini, B. W. Dijkstra, α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 732-737.
- [20] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolov, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197-211.
- [21] J. Pleiss, M. Fischer, R. D. Schmid, Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67-80.
- [22] M. Widmann, P. B. Juhl, J. Pleiss, Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A, *BMC genomics* **2010**, *11*, 123.
- [23] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandstrom, J. E. Backvall, S. L. Mowbray, X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109-119.
- [24] U. T. Bornscheuer, Enzymes in lipid modification: Past achievements and current trends, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, 1322-1331
- [25] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme. Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235-251.
- [26] R. Sridhar, G. Lakshminarayana, T. Kaimal, Modification of selected Indian vegetable fats into cocoa butter substitutes by lipase-catalyzed ester interchange, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 726-730.

6 Literatur

- [27] S. Sellappan, C. C. Akoh, Applications of Lipases in Modifications of Food Lipids, in *Handbook of Industrial Biocatalysis*, Hrsg.: C. T. Hou, CRC press, **2005**.
- [28] H. C. Holm, D. Cowan, The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 679-691.
- [29] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824
- [30] A. Schmid, J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- [31] Y. Katsuragi, T. Yasukawa, N. Matsuo, B. Flickinger, I. Tokimitsu, M. G. Matlock (Hrsg.), *Diacylglycerol oil*, AOCS Press, **2004**.
- [32] U. Schmid, U. Bornscheuer, M. Soumanou, G. McNeill, R. Schmid, Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1527-1531.
- [33] I. Høegh, S. Patkar, T. Halkier, M. T. Hansen, Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*, *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 869-875.
- [34] A. Liljeblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, Formation and hydrolysis of amide bonds by lipase A from *Candida antarctica*; exceptional features, *Org. & Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886-895.
- [35] O. Kirk, M. W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 446-451.
- [36] C. S. Bond, TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons, *Bioinformatics* **2003**, *19*, 311-312.
- [37] A. Kasrayan, M. Bocola, A. G. Sandström, G. Lavén, J. E. Bäckvall, Prediction of the *Candida antarctica* lipase A protein structure by comparative modeling and site-directed mutagenesis, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1409-1415.
- [38] A. G. Sandström, K. Engström, J. Nyhlén, A. Kasrayan, J.-E. Bäckvall, Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 413-420.
- [39] C. Yang, F. Wang, D. Lan, C. Whiteley, B. Yang, Y. Wang, Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 533-537.
- [40] H. B. Brundiek, A. S. Evitt, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, Creation of a lipase highly selective for trans fatty acids by protein engineering, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 412-414.
- [41] S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2693-2696.
- [42] E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: insights into structure–function relationships, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211-3213.
- [43] P. D. de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, R. van Gemert, Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.
- [44] A. Liljeblad, L. T. Kanerva, Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β-amino acids, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.
- [45] S. Gedey, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. T. Kanerva, Preparation of highly enantiopure β-amino esters by *Candida antarctica* lipase A, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110.
- [46] J. Yin, G. Li, X. Ren, G. Herrler, Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, *J. Biotechnol.* **2007**, *127*, 335-347.
- [47] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* **1997**, *277*, 1453-1462.
- [48] D. S. Martin, The oxygen consumption of *Escherichia coli* during the lag and logarithmic phases of growth, *J. Gen. Physiol.* **1932**, *15*, 691-708
- [49] J. C. Joly, W. Leung, J. R. Swartz, Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 2773-2777.
- [50] P. H. Bessette, F. Åslund, J. Beckwith, G. Georgiou, Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 13703-13708.

- [51] J. Lobstein, C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, M. Berkmen, SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microb. Cell. Fact.* **2012**, 11, 56-56.
- [52] F. Valero, Heterologous Expression Systems for Lipases: A Review, in *Lipases and Phospholipases*, Hrsg.: G. Sandoval, Springer, **2012**
- [53] H. D. Beer, J. E. McCarthy, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*, *Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Exp.* **1998**, 1399, 173-180.
- [54] M. Di Lorenzo, A. Hidalgo, M. Haas, U. T. Bornscheuer, Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 8974-8977
- [55] E. Böer, G. Steinborn, G. Kunze, G. Gellissen, Yeast expression platforms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 77, 513-523.
- [56] G. Gellissen, G. Kunze, C. Gaillardin, J. M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis, I. Klei, New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*-a comparison, *FEMS Yeast Res.* **2005**, 5, 1079-1096.
- [57] A. Goffeau, B. Barrell, H. Bussey, R. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, Life with 6000 genes, *Science* **1996**, 274, 546-567.
- [58] G. Gellissen, C. P. Hollenberg, Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review, *Gene* **1997**, 190, 87-97.
- [59] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 98, 5301-5317.
- [60] J. M. Cregg, K. Barringer, A. Hessler, K. Madden, *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol. Cell Biol.* **1985**, 5, 3376-3385.
- [61] J. M. Cregg, T. S. Vedvick, W. C. Raschke, Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Nature Biotechnol.* **1993**, 11, 905-910.
- [62] K. De Schutter, Y.-C. Lin, P. Tiels, A. Van Hecke, S. Glinka, J. Weber-Lehmann, P. Rouzé, Y. Van de Peer, N. Callewaert, Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*, *Nature Biotechnol.* **2009**, 27, 561-566.
- [63] A. Kübel, J. Schneider, G. G. Thallinger, I. Anderl, D. Wibberg, T. Hajek, S. Jaenicke, K. Brinkrolf, A. Goesmann, R. Szczepanowski, High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435, *J. Biotechnol.* **2011**, 154, 312-320.
- [64] D. Mattanovich, A. Graf, J. Stadlmann, M. Dragosits, A. Redl, M. Maurer, M. Kleinheinz, M. Sauer, F. Altmann, B. Gasser, Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Fact.* **2009**, 8, 29.
- [65] R. Daly, M. T. Hearn, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production, *J. Mol. Rec.* **2005**, 18, 119-138.
- [66] J. Cregg, K. Madden, K. Barringer, G. Thill, C. Stillman, Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Mol. Cell Biol.* **1989**, 9, 1316-1323.
- [67] J. F. Tschopp, P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman, T. R. Gingeras, Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 3859-3876.
- [68] H. R. Waterham, M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, J. M. Cregg, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene* **1997**, 186, 37-44.
- [69] C. Schmidt-Dannert, Recombinant microbial lipases for biotechnological applications, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2123-2130.
- [70] J. Pfeffer, S. Richter, J. Nieveler, C. E. Hansen, R. B. Rhlid, R. D. Schmid, M. Rusnak, High yield expression of lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72, 931-938.
- [71] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, Understanding enzyme immobilisation, *Chem Soc. Rev.* **2009**, 38, 453-468.
- [72] A. Bastida, P. Sabuillo, P. Armisen, R. Fernandez-Lafuente, J. Huguet, J. M. Guisan, A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 58, 486-493.
- [73] T. Gitlesen, M. Bauer, P. Adlercreutz, Adsorption of lipase on polypropylene powder, *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metabol.* **1997**, 1345, 188-196.

- [74] S. Cao, Z. Liu, Y. Feng, L. Ma, Z. Ding, Y. Cheng, Esterification and transesterification with immobilized lipase in organic solvent, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, 32, 1-6.
- [75] H. Gustafsson, C. Thörn, K. Holmberg, A comparison of lipase and trypsin encapsulated in mesoporous materials with varying pore sizes and pH conditions, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **2011**, 87, 464-471.
- [76] Y. Wan, D. Zhao, On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2821-2860.
- [77] J. A. Bosley, J. C. Clayton, Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 43, 934-938.
- [78] Z. Zhou, A. Inayat, W. Schwieger, M. Hartmann, Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas, *Micropor. Mesopor. Mater.* **2012**, 154, 133-141.
- [79] S. Sommerwerk, L. Heller, B. Siewert, R. Csuk, Chemoenzymatic synthesis and cytotoxicity of oenanthotoxin and analogues, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 5595-5602
- [80] M. A. Veld, K. Hult, A. R. Palmans, E. Meijer, Fast DKR of Amines Using Isopropyl 2-Methoxyacetate as Acyl Donor, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 5416-5421.
- [81] L. Veum, M. Kuster, S. Telalovic, U. Hanefeld, T. Maschmeyer, Enantioselective synthesis of protected cyanohydrins, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, 1516-1522.
- [82] M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1995**, 34, 301-303.
- [83] M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 527-534.
- [84] D. Weiser, Z. Boros, G. Hornyánszky, A. Tóth, L. Poppe, Disubstituted dialkoxysilane precursors in binary and ternary sol-gel systems for lipase immobilization, *Process Biochem.* **2012**, 47, 428-434.
- [85] M. T. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhöfer, W. Könen, A. Zonta, Second generation sol-gel encapsulated lipases: Robust heterogeneous biocatalysts, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 717-728.
- [86] S. Dech, V. Wruck, C. P. Fik, J. C. Tiller, Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents, *Polymer* **2012**, 53, 701-707.
- [87] S. Sakai, K. Antoku, T. Yamaguchi, K. Kawakami, Transesterification by lipase entrapped in electrospun poly (vinyl alcohol) fibers and its application to a flow-through reactor, *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, 105, 687-689.
- [88] Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic, R. Prodanovic, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* **2006**, 30, 269-278.
- [89] N. L. St. Clair, M. A. Navia, Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7314-7316.
- [90] R. A. Sheldon, Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 92, 467-477.
- [91] L. Cao, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1361-1364.
- [92] N. Khalaf, C. P. Govardhan, J. J. Lalonde, R. A. Persichetti, Y.-F. Wang, A. L. Margolin, Cross-linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5494-5495.
- [93] P. Lopez-Serrano, L. Cao, F. Van Rantwijk, R. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases, *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 1379-1383.
- [94] H. Brundiek, S. K. Padhi, R. Kourist, A. Evitt, U. T. Bornscheuer, Altering the scissile fatty acid binding site of *Candida antarctica* lipase A by protein engineering for the selective hydrolysis of medium chain fatty acids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, 114, 1148-1153.
- [95] V. Lam, M. Henault, K. Khougaz, L.-J. Fortin, M. Ouellet, R. Melnyk, A. Partridge, Resorufin butyrate as a soluble and monomeric high-throughput substrate for a triglyceride lipase, *J. Biomol. Screen.* **2012**, 17, 245-251.
- [96] D. Wang, J. Wang, B. Wang, H. Yu, A new and efficient colorimetric high-throughput screening method for triacylglycerol lipase directed evolution, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 82, 18-23.
- [97] T. Vorhaben, D. Böttcher, D. Jasinski, U. Menyes, V. Brüser, K. Schröder, U. T. Bornscheuer, Plasma-modified polypropylene as carrier for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B and *Pyrobaculum calidifontis* esterase, *ChemCatChem* **2010**, 2, 992-996.

- [98] R. Kalscheuer, T. Stöveken, H. Luftmann, U. Malkus, R. Reichelt, A. Steinbüchel, Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 1373-1379.
- [99] B. M. Barney, B. D. Wahlen, E. Garner, J. Wei, L. C. Seefeldt, Differences in substrate specificities of five bacterial wax ester synthases, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 5734-5745.
- [100] J. Rucker, J. Paul, B. A. Pfeifer, K. Lee, Engineering *E. coli* for triglyceride accumulation through native and heterologous metabolic reactions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 2753-2759.
- [101] A. Alpert, R. Kisliuk, L. Shuster, A simple radioisotopic assay for choline acetyltransferase and its application in the *Lactobacillus plantarum* system, *Biochem. Pharmacol.* **1966**, 15, 465-473.
- [102] R. Brandes, J. Olley, B. Shapiro, Assay of glycerol phosphate acyltransferase in liver particles, *Biochem. J.* **1963**, 86, 244-247.
- [103] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, Engineering the third wave of biocatalysis, *Nature* **2012**, 485, 185-194.
- [104] R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, Finding better protein engineering strategies, *Nature Chem. Biol.* **2009**, 5, 526-529.
- [105] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 137-143.
- [106] U. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, Survey of protein engineering strategies, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2011**, 26.27. 21-26.27. 14.
- [107] D. S. Wilson, A. D. Keefe, Random mutagenesis by PCR, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2001**, 8.3. 1-8.3. 9.
- [108] W. P. Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* **1994**, 370, 389-391.
- [109] F. Cedrone, A. Ménez, E. Quéméneur, Tailoring new enzyme functions by rational redesign, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 405-410.
- [110] M. Zhang, H. Chang, Y. Zhang, J. Yu, L. Wu, W. Ji, J. Chen, B. Liu, J. Lu, Y. Liu, Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins, *Nature Meth.* **2012**, 9, 727-729.
- [111] H. Jochens, U. T. Bornscheuer, Natural diversity to guide focused directed evolution, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1861-1866.
- [112] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4192-4196.
- [113] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes, *Nature Prot.* **2007**, 2, 891-903.
- [114] R. Kourist, H. Brundiek, U. T. Bornscheuer, Protein engineering and discovery of lipases, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, 112, 64-74.
- [115] M. W. Larsen, D. F. Zielinska, M. Martinelle, A. Hidalgo, L. J. Jensen, U. T. Bornscheuer, K. Hult, Suppression of water as a nucleophile in *Candida antarctica* lipase B catalysis, *ChemBioChem* **2010**, 11, 796-801.
- [116] Invitrogen (life technologies), Carlsbad U. S. A., *EasySelect™ Pichia Expression Kit, For expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in Pichia pastoris*, **2010**, Cat. no. K1740-01
- [117] M. Kaieda, T. Samukawa, A. Kondo, H. Fukuda, Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 91, 12-15.
- [118] M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, 88, 627-631.
- [119] M. Lotti, J. Pleiss, F. Valero, P. Ferrer, Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel, *Biotechnol. J.* **2015**, 10, 22-30.
- [120] T. Kulszewski, F. Sasso, F. Secundo, M. Lotti, J. Pleiss, Molecular mechanism of deactivation of *C. antarctica* lipase B by methanol, *J. Biotechnol.* **2013**, 168, 462-469.

Autorenschaft

Artikel I A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A

Janett Müller*, Birte Fredrich*, Christina Kohlmann, Lukas Maksym, Uwe T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, 116, 232-236

U. T. B. initiierte das Projekt und C. K. sowie L. M. fungierten als Projektpartner. Die Experimente wurden von U. T. B., J. M. und B. F. geplant. J. M. und B. F. führten die Experimente durch. U. T. B., J. M. und B. F. schrieben und überarbeiteten das Manuskript.

Artikel II Enhancing the acyltransferase activity of *Candida antarctica* lipase A by rational design

Janett Müller, Miriam A. Sowa, Birte Fredrich, Henrike Brundiek and Uwe T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1791-1796

U. T. B. initiierte das Projekt. Die Experimente wurden von U. T. B. und J. M. geplant. J. M. führte die Experimente mit der Hilfe von M. A. S., B. F. und H. B. durch. Das Manuskript wurde von J. M. geschrieben, alle Autoren lasen und überarbeiteten das Manuskript.

Artikel III The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment

Janett Müller, Miriam A. Sowa, Mark Dörr and Uwe T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, 117, 1903-1907

U. T. B. initiierte das Projekt. Die Experimente wurden von U. T. B. und J. M. geplant. J. M. führte die Experimente mit der Hilfe von M. A. S. und M. D durch. Das Manuskript wurde von J. M. geschrieben, alle Autoren lasen und überarbeiteten das Manuskript.

Unterschrift Uwe T. Bornscheuer

Artikel

Artikel I

Short Communication

A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A

Janett Müller^{1*}, Birte Fredrich^{1*}, Christina Kohlmann², Lukas Maksym² and Uwe T. Bornscheuer¹

¹ Department of Biotechnology & Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, Greifswald University, Greifswald, Germany

² Department of Lipid Biotechnology, BASF Personal Care and Nutrition GmbH, Düsseldorf, Germany

Certain lipases such as *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) are known to possess acyltransferase activity, which allows ester synthesis even in the presence of water. Discovery of novel lipases and identification of lipase variants with improved acyltransferase activity is laborious using standard methods such as gas chromatography. To overcome this limitation, an enzyme cascade was established based on quantification of the alcohol consumed in fatty acid ester synthesis from plant oils. For this, an alcohol oxidase converts the remaining alcohol to the corresponding aldehyde with concomitant formation of hydrogen peroxide. This is then quantified by the action of horseradish peroxidase leading to the oxidation of the co-substrate ABTS, which is determined spectrophotometrically at 695 nm. The conversions thus determined correspond well to data measured by off-line gas chromatography analysis and the assay could be adapted to the microtiterplate format.

Practical applications: Fatty acid esters are valuable compounds in various industrial applications, i.e., fatty acid methyl esters are used as biofuels and ethyl esters can serve as fragrance or flavoring compounds in the cosmetic industry. The enzymatic synthesis of these compounds is possible, but often enzymes need to be adapted to meet process requirements. This assay simplifies the identification of suitable enzymes. Moreover, substrate specificities of a lipase for a certain alcohol or acyl acceptor can also be easily studied with this assay.

Keywords: CAL-A / Enzyme / Ester synthesis / High-throughput assay / Lipase

Received: July 1, 2013 / Revised: September 26, 2013 / Accepted: October 27, 2013

DOI: 10.1002/ejlt.201300226

1 Introduction

Biofuels can be produced chemically, but also by an enzymatic process [1–3]. The enzymes used in such a process are lipases that synthesize biofuels in a transesterification reaction with different oils and alcohols as substrates in a water-free medium [4–6]. Interestingly, some enzymes such as *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) and *Candida parapsilosis* lipase (CpLip2) are also able to synthesize alcohol esters of fatty acids even in an aqueous media because of their additional acyltransferase activity [7]. In this way a water-free

system is not necessary and for the biocatalysis organic solvents are not needed. This is not only a cost reducing factor, but also provides a greener approach for an industrial application.

Most enzymes need to be improved in terms of stability or activity to be applicable in an industrial process [8, 9]. The improvement of an enzyme is achieved by protein engineering where different strategies can be used (rational design, random mutagenesis, or semi-rational approaches) [10, 11]. Afterwards, a suitable screening method is necessary to identify the desired variants. For a transesterification reaction this can be done with standard analytical tools such as GC, but this method requires a lot of time for sample preparation and measurements, and therefore strongly limits the throughput. Assays with a higher throughput are hence desired because a large number of mutants can then be screened.

Correspondence: Prof. Uwe T. Bornscheuer, Department of Biotechnology & Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, Greifswald University, Felix-Hausdorff-Str. 4, Greifswald 17487, Germany
E-mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

Fax: +49 3834 86 794367

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); CAL-A, *Candida antarctica* lipase A; HRP, horseradish peroxidase

*These authors contributed equally to this work.

In this paper we propose such an assay for the quantification of acyltransferase activity that is based on the consumption of the alcohol co-substrate. For this, the alcohol is oxidized by an oxidase (alcohol oxidase from *Pichia pastoris*) in the first step [12]. This reaction produces H₂O₂ that is reduced by horseradish peroxidase that at the same time oxidizes ABTS leading to a change in absorption at 695 nm, which is quantified spectrophotometrically.

2 Materials and methods

2.1 Enzymes and chemicals

The alcohol oxidase from *P. pastoris* was purchased from MP Biomedicals (Santa Ana, USA) (26 U/mg protein with methanol as substrate) and the horseradish peroxidase (HRP) from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) (250–330 U/mg solid with pyrogallol as substrate). CAL-A was used as lyophilized powder purchased from Roche (Basel, Switzerland). Palm kernel oil was kindly provided by the BASF Personal Care and Nutrition GmbH (Düsseldorf, Germany). All other chemicals used in the experiments were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

2.2 Standards

Standards were prepared from ethanol, palm kernel oil, ethyl laurate, water, and glycerol. These compounds were mixed so that they mimicked different conversions of ethanol (0, 20, 40, 60, 80, and 100%). The sample that mimicked 0% conversion was prepared in the same way as for biocatalysis reactions performed later on (palm kernel oil: 0.251 mmol, ethanol: 0.267 mmol, water: 0.867 mmol; and total reaction volume was approx. 225 µL). Before the standards were quantified, 1.1 mL of a mixture of DMSO and chloroform (1:0.84) were added to make the solution homogeneous. The standard sample without ethanol served as blank to reflect background reactions possibly catalyzed by the peroxidase.

2.3 Oxidase assay

The alcohol oxidase was purchased as a liquid. Four microliters of this solution were diluted with 25 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and used for the assay reaction. The peroxidase from horseradish was also dissolved in sodium phosphate buffer (2 mg/15 mL). ABTS was dissolved in the same buffer in a concentration of 25 mM. The oxidase assay was carried out in a total volume of 200 µL that contained 108 µL sodium phosphate buffer, 60 µL oxidase solution, 6 µL peroxidase solution, 20 µL ABTS solution, and 6 µL standard solution or real sample from biocatalysis. The sodium phosphate buffer, the ABTS solution and the peroxidase solution were mixed together

and 134 µL of this master mix were transferred to each well. The change in absorption at 695 nm was measured for 10 min at 30°C. Each measurement was at least performed in triplicate and standards were always measured in parallel with the biocatalysis samples.

2.4 Biocatalysis conditions

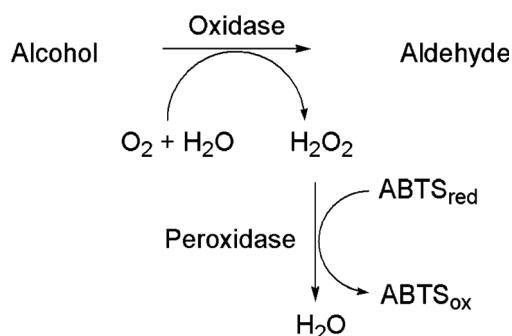
Trilaurin or palm kernel oil and ethanol were used as substrates for biocatalysis. The composition of this biocatalysis approach for palm kernel oil was the same as stated above for the 0% conversion standard. For the biocatalysis with trilaurin as substrate, 0.267 mmol of the triglyceride, 0.267 mmol ethanol, and 0.867 mmol water were used (total reaction volume was approx. 215 µL). CAL-A lyophilisate was dissolved in the corresponding amount of water (100 mg/mL) or in sodium phosphate buffer (50 mM; pH 7.5). The reaction was carried out at 40°C (palm kernel oil) or 48°C (trilaurin) in sealed glass vials to avoid evaporation of the ethanol. For every time point a separate biocatalysis was prepared and the entire reaction mixture was extracted three times with 600 µL solvent (hexane:diethylether, 75:25) mixture. The extracts were combined for GC measurement.

2.5 Gas chromatography

For the GC analysis a BPX-5 column (25 m × 0.22 mm, SGE Europe, Kiln Farm Milton Keynes, United Kingdom) was used. The temperature program started at 120°C for 1 min followed by heating (5°C/min) to 360°C. The final temperature was kept for 5 min. The retention times for the main fatty acid and ethyl ester products were 10.76 min (lauric acid), 11.14 min (ethyl laurate), 15.22 min myristic acid, 15.8 min ethyl myristate, 19.13 palmitic acid, and 19.7 ethyl palmitate.

3 Results and discussion

The principle of the oxidase assay is shown in Scheme 1. Triglycerides such as palm kernel oil are converted by lipase



Scheme 1. Principle of the enzyme cascade to measure alcohol conversion using an oxidase/peroxidase-coupled assay.

CAL-A in the presence of ethanol to yield the corresponding ethyl ester. Alcohol not consumed is then quantified by the combined action of the alcohol oxidase and the horseradish peroxidase. The oxidase reaction yields acetaldehyde and stoichiometrically hydrogen peroxide as by-product. This H₂O₂ then serves as substrate for HRP and this leads in the presence of ABTS_{red} to its oxidized form, which is quantified in a spectrophotometer at 695 nm [13]. In order to verify the feasibility of this assay, we first determined calibration curves using defined standards followed by biocatalytic formation of ethyl esters using CAL-A. The results obtained were then compared to GC analysis of fatty acid ethyl ester concentrations.

The standard samples contained palm kernel oil and ethanol as substrate at an equimolar ratio (1:1), to enable a fast conversion of ethanol for high-throughput screening and ensuring that the oxidase-assay based quantification of residual ethanol works best. Further standards also contained the esterification product ethyl laurate and glycerol to mimic as close as possible a biocatalysis reaction. Figure 1 clearly shows an excellent linearity between the increase in absorption at 695 nm and the ethanol concentration present in the standard samples. Furthermore, the average SD was very low and we could confirm that both, oxidase and HRP were not inhibited by glycerol or other components present in the sample (data not shown).

Next, biocatalysis reactions with CAL-A were performed with palm kernel oil or trilaurin in the presence of water and ethanol (note that the molar ratio water:ethanol was approx. 3:1) to verify its acyltransferase activity and to identify possible limitations of the oxidase assay. Ester formation was measured by quantification of remaining ethanol using the oxidase assay as well as by GC, which also allowed to quantify free fatty acids and dilaurins. Calculation of the conversion in GC measurements was based on ethyl laurate as about 51% of

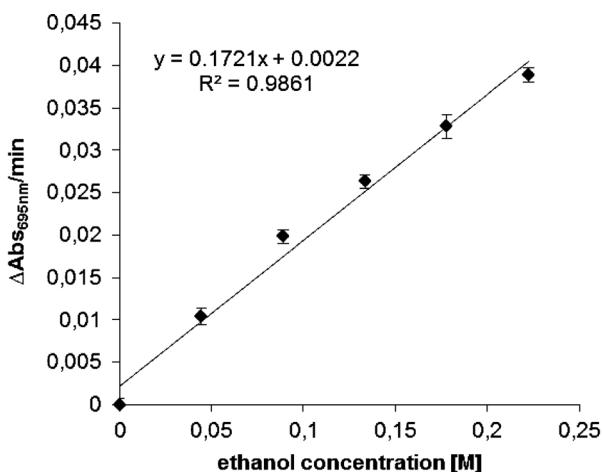


Figure 1. Linear regression of the increase in absorption at 695 nm with standard samples to verify the oxidase assay. All measurements were performed five times and absorption was measured for 10 min.

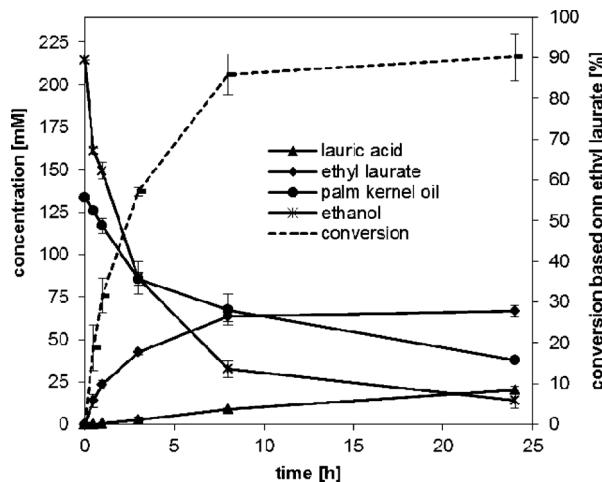


Figure 2. Time course of product formation and substrate conversion in biocatalysis with CAL-A using palm kernel oil, water, and ethanol. The dashed line indicates the conversion based on ethyl laurate formation. The amount of ethanol was measured with the oxidase assay; all other compounds were quantified by GC. The conversion based on the formation of ethyl laurate should be the same as the conversion based on ethanol consumption. The data points represent the average values of biocatalysis using CAL-A dissolved in water or buffer.

all fatty acids in palm kernel oil is lauric acid. As ethanol was present at sub-stoichiometric concentrations in this experiment, the formation of free lauric acid is possible at elevated conversion. Figures 2 and 3, however, show that CAL-A

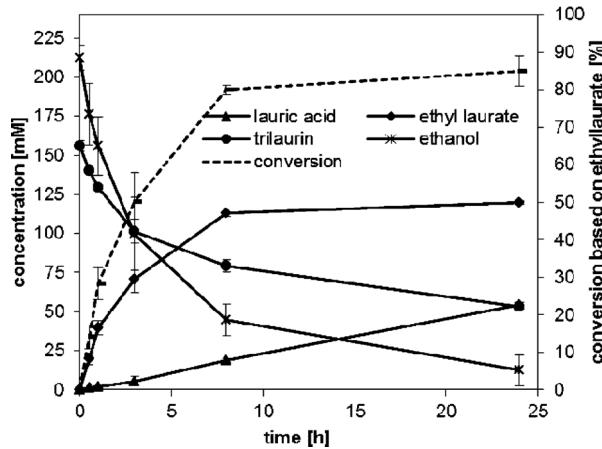


Figure 3. Time course of product formation and substrate conversion in biocatalysis with CAL-A using trilaurin, water, and ethanol. The dashed line indicates the conversion based on ethyl laurate formation. The amount of ethanol was measured with the oxidase assay, all other compounds were quantified by GC. The conversion based on the formation of ethyl laurate should be the same as the conversion based on ethanol consumption. The data points represent the average values of biocatalysis using CAL-A dissolved in water or buffer.

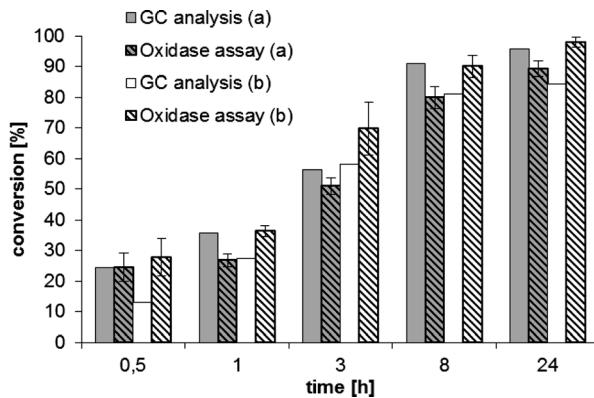


Figure 4. Comparison of the conversions determined by GC analysis (based on the formation of ethyl laurate) and the oxidase assay (based on ethanol consumption). Palm kernel oil was used as substrate. (a) CAL-A was dissolved in buffer for the reaction. (b) CAL-A was dissolved in water for the reaction.

possesses outstanding acyltransferase activity as about 90% (with palm kernel oil as substrate) or about 85% (with trilaurin as substrate) of the ethanol was converted into ethyl laurate and only small amounts of free lauric acid were determined. Even at very low ethanol concentrations the transesterification is clearly the favored reaction, which further underlines the high acyltransferase activity.

Finally, various samples taken at different time points of the biocatalysis reactions were analyzed using both methods (GC and oxidase assay). Figures 4 and 5 show a good correlation between the conversions determined by GC and the enzyme assay, although at low concentrations the GC method is more accurate. This can easily be related to the very high ethanol concentration present at low conversion. In the more interesting area – at high conversions – the data for both assays are much closer and data deviation was usually

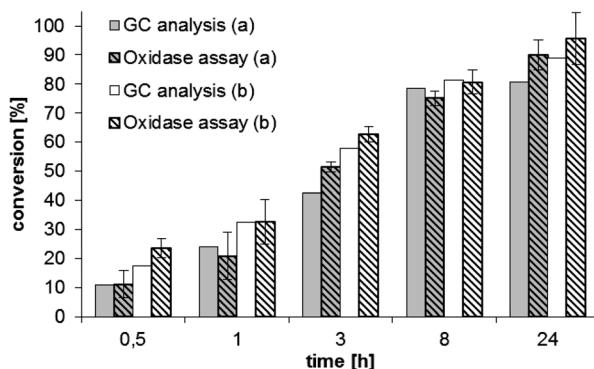


Figure 5. Comparison of the conversions determined by GC analysis (based on the formation of ethyl laurate) and the oxidase assay (based on ethanol consumption). Trilaurin was used as substrate. (a) CAL-A was dissolved in buffer for the reaction. (b) CAL-A was dissolved in water for the reaction.

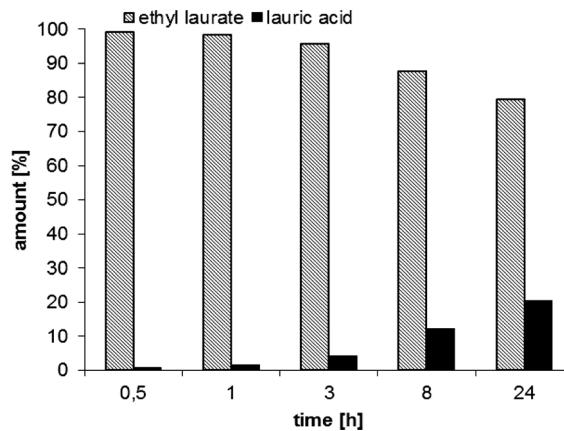


Figure 6. Distribution of ethyl laurate and lauric acid in biocatalysis samples after different periods of time. The samples were analyzed by GC. Palm kernel oil was the triglyceride substrate and the CAL-A was dissolved in buffer.

between 5 and 20%. The average deviation between GC analysis and the oxidase assay for samples that had at least a conversion of 40% was 10.6%. Consequently, this simple enzymatic assay is highly suitable for the identification of lipases and variants exhibiting high acyltransferase activity with the major advantage that it can be performed in microtiterplates and without the need for laborious sample preparation required for GC analysis. Nevertheless, after an initial screening with the assay interesting mutants should be analyzed by GC to determine the ratio of hydrolytic and acyltransferase activity, because it could be possible that an enzyme variant with a higher acyltransferase activity also has an increased hydrolytic activity. According to this it is important for the assay to choose a suitable reaction time, due to the fact that after all ethanol is consumed hydrolysis of the remaining triglyceride will occur under these specific biocatalysis conditions as Fig. 6 indicates.

We are grateful to the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, GÜLZOW, Germany (FKZ: 22005311) for financial support within the Metaglyc2.0 project. We also thank the BASF Personal Care and Nutrition GmbH for supplying plant oils.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Hills, G., Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 601–607.
- [2] Mittelbach, M., Wörgetter, M., Pernkopf, J., Junek, H., Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl ester. *Energy Agric.* 1983, 2, 369–384.
- [3] Mittelbach, M., Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1990, 67, 168–170.

- [4] Kaied, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 91, 2–15.
- [5] Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., et al., Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 1999, 88, 627–631.
- [6] Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., Dan Irimie, F., Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renew. Energy* 2012, 39, 10–16.
- [7] Neugnot, V., Moulin, G., Dubreucq, E., Bigey, F., The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*. Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 1734–1745.
- [8] Ma, S. K., Gruber, J., Davis, J., Newman, L. et al., A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.* 2010, 12, 81–86.
- [9] Morikawa, S., Nakai, T., Yasohara, Y., Nanba, H. et al., Highly active mutants of carbonyl reductase S1 with inverted coenzyme specificity and production of optically active alcohols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69, 544–552.
- [10] Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S. et al., Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 2012, 485, 185–194.
- [11] Strohmeier, G. A., Pichler, H., May, O., Gruber-Khadjawi, M., Application of designed enzymes in organic synthesis. *Chem. Rev.* 2011, 111, 4141–4164.
- [12] Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F. et al., Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell Biol.* 1985, 5, 1111–1121.
- [13] Okuda, J., Miwa, I., Maeda, K., Tokui, K., Rapid and sensitive, colorimetric determination of the anomers of D-glucose with D-glucose oxidase, peroxidase, and mutarotase. *Carbohydr. Res.* 1977, 58, 267–270.

Artikel II

Enhancing the Acyltransferase Activity of *Candida antarctica* Lipase A by Rational Design

Janett Müller,^[a] Miriam A. Sowa,^[a] Birte Fredrich,^[a] Henrike Brundiek,^[b] and Uwe T. Bornscheuer^{*[a]}

A few lipases, such as *Candida antarctica* lipase A (CAL-A), are known to possess acyltransferase activity. This enables the enzyme to synthesize fatty acid esters from natural oils and alcohols even in the presence of bulk water. Unfortunately, fatty acids are still formed in these reactions as undesired side-products. To reduce the amount of fatty acids, several CAL-A variants were rationally designed based on its crystal structure. These variants were expressed in *Escherichia coli* and *Pichia*

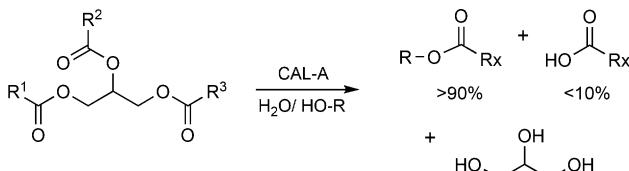
pastoris, purified, and their acyltransferase/hydrolase activities were investigated by various biocatalytic approaches. Among the investigated variants, mutant Asp122Leu showed a significant decrease in the hydrolytic activity, thus reducing the side-product yield during acylation. As desired, this variant retained wild-type process-relevant features like pH profile and thermostability.

Introduction

Fatty acid esters form a significant group of compounds with broad applicability. They can be used for biodiesel, as flavoring agents in the food industry, and as fragrance compounds in the cosmetic industry. Thus efficient production methods are needed in order to meet the demand. Fatty acid esters can be synthesized by chemical catalysis,^[1] but also by enzymatic processes.^[2] The enzymatic synthesis is often achieved by transesterification reactions catalyzed by lipases in low water systems by using natural oils as renewable substrates. However, some lipases, such as lipase A from *Candida antarctica* (CAL-A)^[3] and lipase 2 from *Candida parapsilosis*,^[4] exhibit acyltransferase activity even in aqueous media (Scheme 1). Biocatalytic synthesis

of fatty acid esters employing lipases in an aqueous system could lead to a more cost-efficient and environmentally friendly process, as no organic solvents are needed. In order to be competitive with chemical synthesis, the biocatalyst has to be robust in terms of temperature and solvent stability.^[5] CAL-A is generally considered as a very stable enzyme and is therefore an interesting candidate for industrial ester synthesis.^[6] The drawback of wild-type CAL-A is that in aqueous medium it is not totally selective towards transesterification: it also acts as hydrolase, thereby releasing free fatty acids as a side product, hence preventing its industrial use.^[7]

Protein engineering strategies, such as rational design, semi-rational approaches, and random mutagenesis, are able to modify lipases.^[8] We decided to use rational design, because the crystal structure of CAL-A^[9] is available. We used *in silico* design of CAL-A variants possessing higher acyltransferase activity and suppressed undesired hydrolytic activity.



Scheme 1. Simplified transesterification of a triglyceride to the desired ester in aqueous medium catalyzed by CAL-A. The major product is the ester, and the minor product is the free acid.

[a] J. Müller, M. A. Sowa, B. Fredrich, Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institute of Biochemistry
Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis
Greifswald University
Felix-Hausdorff-Strasse 4, 17487, Greifswald (Germany)
E-mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

[b] Dr. H. Brundiek
Enzymicals AG
Walther-Rathenau-Strasse 49a, 17489 Greifswald (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500187>.

Results and Discussion

Rational design

In order to identify targets for the protein engineering we performed molecular docking experiments based on the crystal structure of CAL-A (PDB ID: 2VEO). As the crystal structure represents a closed (and therefore inactive) form, a triglyceride could not be docked. However, methyl laurate (one of the products of interest) could be docked into the active site. From this analysis, four positions with polar amino acid residues were identified in proximity to the active site:^[10] Thr118, Asp122, Thr221, and Glu370 (Figure 1).

The product interacts with Thr221, which is close to the hydrophobic binding tunnel. The other three positions are closer to the “flap” domain (the entrance to the active site) of CAL-A,

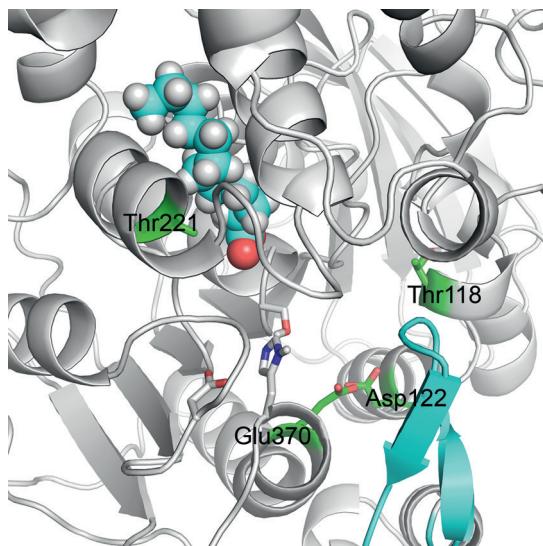


Figure 1. Methyl laurate (cyan) docked into the active site of CAL-A. The catalytic triad is in the center of the picture (gray sticks). The four selected positions for mutagenesis are in green and labeled (hydrogens omitted for clarity). The flap that blocks the entrance to the active site is at the lower right (cyan).

but would probably form contacts to triglycerides entering the active site close to these positions. As the flap domain blocks the active site, it was not possible to dock such bulky substrates into the structure of CAL-A. Thus, these residues were exchanged to more hydrophobic residues (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Trp, and Phe) to increase the hydrophobicity around the active-site pocket so that the aliphatic alcohol would be preferred over water.^[11] All 28 single-mutant variants were generated by site-directed mutagenesis by using the QuikChange method. For the initial screening, the variants were expressed in *E. coli* C41(DE3) followed by affinity chromatography for purification, although the efficiency was limited as not all other proteins could be removed (Figure S1 in the Supporting Information). Nevertheless, all variants were used in transesterification reactions between ethanol and palm kernel oil (PKO), and their productivity in the formation of ethyl laurate was compared to that of wild-type CAL-A. From this initial screening, three variants were selected (Thr118Ile, Asp122Leu, and Thr221Ala). These had transesterification activities similar to or better than that of wild-type CAL-A; the other variants showed lower (or nearly no) ester formation.

Before proceeding to characterization of these variants, a better expression system was required. The successful expression of CAL-A in *P. pastoris* X-33 has been described in previous studies.^[12] Therefore this host was used for further expressions. The Mut⁺ phenotype was verified for all *P. pastoris* transformants^[13] (Figure S2). CAL-A expression experiments were performed on a small scale in shake flasks. Four clones were checked for each variant, and the ones with the highest expression level and activity were selected (Table S1 and Figure S3).

The secretory expression of wild-type CAL-A and variants Thr118Ile, Asp122Leu, and Thr221Ala was then performed in a

bioreactor. After 24 h enzyme production was induced by methanol; the total fermentation period was five days, during which methanol was fed constantly. At the end of the fermentations all variants reached an OD₆₀₀ of 200–280. The protein content in the supernatants was 1.7–2.5 mg mL⁻¹, consistent with a previous report.^[12b] The supernatants were concentrated by tangential flow filtration (TFF) and lyophilized for long-term storage. Purity was verified by SDS-PAGE analysis: the CAL-A variants were well expressed with only minor amounts of other proteins (Figure 2).

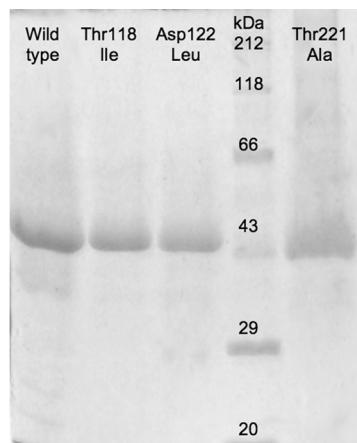


Figure 2. Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the lyophilizates (10 mg mL⁻¹) of each variant.

Next, the hydrolytic activities of the CAL-A variants were evaluated by using the pH-stat method. All variants showed some hydrolytic activity, however variant Asp122Leu exhibited a significantly lower specific activity compared to the wild-type enzyme and the other variants (Table 1). The other two variants (Thr118Ile and Thr221Ala) had similar or slightly lower hydrolysis rates compared to wild-type.

Table 1. Specific activity [U mg⁻¹] of CAL-A/variants in the hydrolysis of tributyrin at 40 °C and pH 7.5.

Wild type	Thr118Ile	Asp122Leu	Thr221Ala
397.3 ± 7.0	425.9 ± 17.3	175.8 ± 4.0	341.9 ± 4.0

To confirm these results, transesterification in aqueous medium was performed with PKO and ethanol as substrates. After 1 h, the ester syntheses by wild-type CAL-A and variants Thr221Ala and Thr118Ile were quite similar (~15%), whereas Asp122Leu showed almost doubled conversion over the same period (Figure 3). These results are consistent with the results from the pH-stat hydrolytic assay; thus Asp122Leu was the most interesting variant. However, the advantage of this variant was lost after long incubations (the ester content after 24 h was ~80% for all variants). The activity experiments indicate that under the given conditions, Asp122Leu is faster in

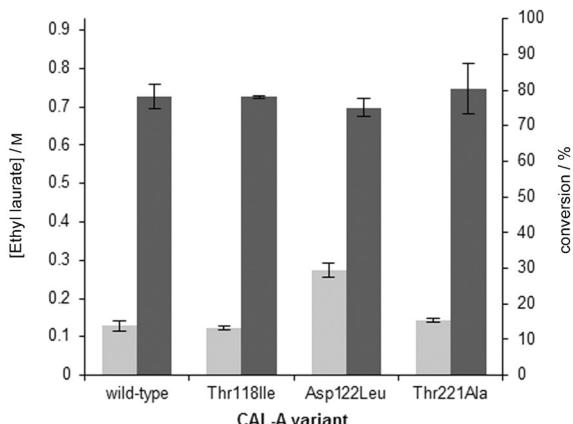


Figure 3. Conversions [%] based on ethyl laurate formation for wild-type CAL-A and variants. Reactions were performed at pH 7.5 for 24 h at 40 °C with shaking (1200 rpm). The samples were analyzed by GC, and the quantification of ethyl laurate was based on a standard curve determined for this compound. ■: conversion after 1 h; □: conversion after 24 h.

synthesizing esters than the wild-type enzyme. However, there is evidently an equilibrium threshold at about 80% conversion, where the reaction stopped.

The positive effect of the mutation Asp122Leu on the specificity of the reaction after 24 h is presented in Figure 4 (corresponding figure for the 1 h samples in Figure S4). It is obvious that the Asp122Leu exhibited improved specificity for the de-

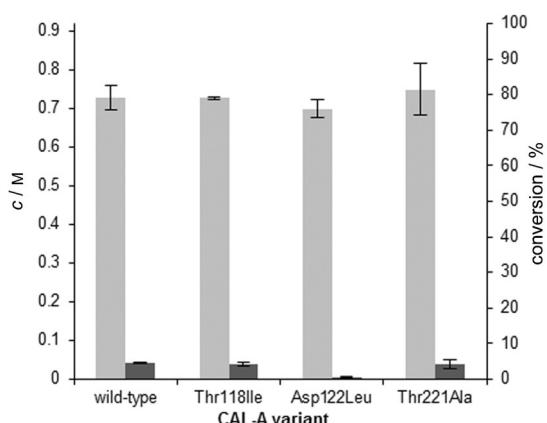


Figure 4. Amounts of lauric acid (■) and lauric acid ethyl ester (□) formed by wild-type CAL-A and variants in transesterification reactions with PKO and ethanol in aqueous medium. Reactions were performed for 24 h at 40 °C with shaking (1200 rpm).

sired transesterification. Interestingly, the better performance was maintained, even after 24 h; the results show that despite the reaction stopping at 80%, extensive hydrolytic activity did not take place, and that the reaction did not reach 100% conversion (only minor amounts of free fatty acids formed, especially with variant Asp122Leu).

Variant Asp122Leu was then characterized for pH-, temperature-dependence and thermostability, and compared with the wild-type. The pH profiles for wild-type CAL-A and Asp122Leu were quite similar: optimal pH for both under the experimen-

tal conditions was pH 6 (Figure S5). Thus, the temperature optima and thermostabilities were tested at pH 6. Activity reached a maximum at just above 70 °C for both enzymes (Figure S6). Pfeffer et al.^[12b] reported an optimal pH value for CAL-A of approximately pH 7 and a temperature optimum of 50 °C with similar activities between 50 and 70 °C, which correlates with the results presented in this study. The T_{60}^{50} value (temperature at which half the enzyme activity remains after 1 h of incubation) was 83 °C for the wild-type enzyme and 79 °C for variant Asp122Leu, so both enzymes can be considered thermostable, as known for the wild-type enzyme from literature.^[14] Taking all the results into consideration, variant Asp122Leu seems to have improved reaction specificity (improved acyltransferase activity with reduced hydrolytic activity), without affecting significantly the catalytic characteristics of the biocatalyst.

In order to facilitate the industrial application of enzymes, immobilization is required, in order to enable the reusability of the biocatalyst and to achieve better stability.^[15] Wild-type CAL-A and variant Asp122Leu were absorbed on Lewatit VP OC 1600 beads because of the ease and low cost of this immobilization technique. This enabled us to investigate methanol as substrate in the transesterification reaction (typically, methanol at high concentrations inactivates enzymes).^[2b] Methanol is an interesting substrate because of the use of fatty acid methyl esters as biofuels. Methanol is also preferred as an alcohol for the production of ester because of its low cost.^[16]

The protein loading was calculated to be between 8 and 9 mg_{protein/g_{carrier}} (Table 2), which is consistent with literature data,^[17] although loadings up to 200 mg_{protein/g_{carrier}} have been

Table 2. Amounts of protein [mg] used for immobilization, and hydrolytic activity [U] determined by pH-stat for wild-type CAL-A and Asp122Leu. Protein [mg] bound to the carrier for both CAL-A variants and the total activity of the immobilizate are also shown.

	Initial amount of protein [mg]	Immobilized protein ^[a] [mg]	Initial activity [kU]	Activity of the immobilizate [kU]
wild type	13.8	11.6	8.07	0.23
Asp122Leu	10.8	9.5	1.51	0.08

[a] Calculated based on the amount of protein in the supernatant after immobilization.

reported.^[18] In this study no higher protein loadings were used to ensure that most of the enzyme bound to the carrier. The activity of the immobilizates measured after several washing steps revealed that less than 10% of the initial activity was retained. This could be a consequence of protein loss during the washing steps due to weak interactions between the carrier and the enzyme. Denaturation of the bound enzyme is unlikely because the enzymes are quite robust and no harsh conditions were applied.

In the biocatalysis reaction with immobilized enzyme, methanol and 2 U of immobilizate (based on pH-stat measurement) were used. Both immobilizates catalyzed the desired reaction,

but immobilized Asp122Leu achieved a conversion of over 90%, whereas wild-type CAL-A showed only around 65% conversions after 24 h (Figure 5).

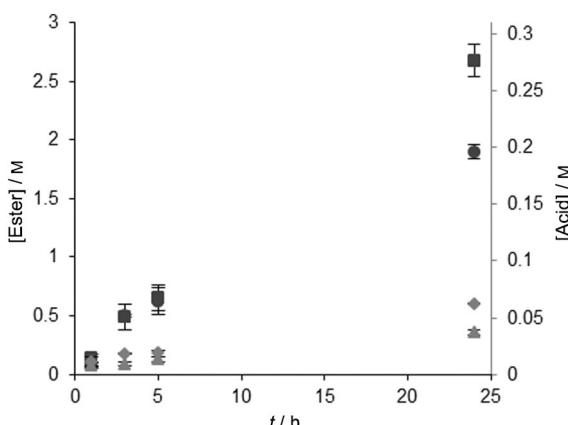


Figure 5. Product formation in transesterification reactions with methanol and PKO as substrates, catalyzed by immobilized wild-type CAL-A (●: ester or ♦: acid formation) or the Asp122Leu variant (■: ester or ▲: acid formation) at 40 °C. For each biocatalysis reaction, 2 U of the immobilizate were used.

All the experiments support improved reaction selectivity by introducing the single mutation Asp122Leu. Unfortunately, as the crystal structure of CAL-A is only available in an inactive form without bound triglyceride, we can only speculate on the structural reasons for the improved acyltransferase activity. As position 122 is in front of the flap domain, this residue is one of the first of the active-site pocket to be exposed to the solvent when the flap moves to the open conformation. Leucine has about the same steric properties as aspartate, but is non-polar. This increased hydrophobicity seems to deter water from entering the active site to act as co-substrate for the hydrolysis of triglyceride; rather, aliphatic alcohols might diffuse more easily into the active site, and thus the increased transesterification reaction performance.

Conclusion

In this work we identified and characterized a CAL-A variant that produces a significantly lower amount of free fatty acids compared to the wild-type enzyme in transesterification reactions, even in an aqueous system. In addition, it was shown that variant Asp122Leu retains all the characteristics of wild-type CAL-A, such as thermostability and high activity over a broad pH range (beneficial in industrial applications). Moreover, the immobilization of this variant was possible by adsorption, which is a very easy and cost-efficient immobilization strategy. The immobilized enzyme was also used in transesterification reactions with methanol, thus confirming the reduced production of free fatty acid. Therefore, this variant could be interesting for enzymatic transesterification applications on an industrial scale.

Experimental Section

Materials: Where not stated otherwise, all chemicals and consumables were purchased from Sigma–Aldrich, Sarstedt (Numbrecht, Germany), Thermo Scientific, Analytik Jena (Jena, Germany), Qiagen, Roche, Roboklon (Berlin, Germany), NEB (Frankfurt am Main, Germany) and Carl Roth. All primers were from Thermo Scientific, and all sequencing results were from GATC (Konstanz, Germany) or Eurofins (Ebersberg, Germany).

Computational methods: YASARA (www.yasara.org/) was used as the modeling program for the rational design. Lauric acid and lauric acid methyl ester were docked in the crystal structure of CAL-A (PDB ID: 2VEO). The images were generated with PyMOL (www.pymol.org/).

Site-directed mutagenesis: As template DNA for site-directed mutagenesis either pET-22b with the CAL-A gene (expression in *E. coli*) or pPICZα with the CAL-A gene (expression in *P. pastoris*) were used. Both templates were constructed previously.^[12a] The mutations were generated by site-directed mutagenesis. All mutations were verified by sequencing. A detailed description is given in the Supporting Information (Tables S2 and S3).

Transformation and expression in *E. coli*: Chemocompetent *E. coli* Top10 (Life Technologies) and C41(DE3) cells (Lucigen, Middleton, USA) were prepared according to Hanahan et al.^[19] and transformation was achieved by heat shock.^[20] For expression in *E. coli* C41 (DE3) the cells of an overnight culture (5 mL) were used to inoculate terrific broth (TB, 50 mL) containing ampicillin (amp, 100 µg mL⁻¹). This pre-culture was incubated at 37 °C and 200 rpm until an OD₆₀₀ of 1 was reached. The pre-culture was then used to inoculate TB (350 mL) with amp (100 µg mL⁻¹). This culture was again incubated under the same conditions, and after an OD₆₀₀ of 1 was reached, CAL-A expression was induced by adding IPTG (1 mM). The culture was further incubated at 20 °C for approximately 18 h, then cells were harvested by centrifugation (4000 g, 20 min, 4 °C), washed with sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5), and stored at -20 °C. The CAL-A variants expressed in *E. coli* were only used for the initial screening. Further investigations of the CAL-A variants Thr118Ile, Asp122Leu, and Thr221Ala were performed with enzymes produced in *P. pastoris*.

Purification by metal affinity chromatography: *E. coli* C41(DE3) cells from a 400 mL culture were resuspended in sodium phosphate buffer (50 mM, 25 mL) and disrupted by sonication (3 × 10 min, 50% power) in a Sonoplus sonicator HD2070 UW2070 (Bandelin, Berlin, Germany). After this, the suspension was centrifuged (10000 g, 4 °C) until the supernatant appeared clear. The supernatant was added to TALON metal affinity resin (600 µL; TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) in an Econo-Pac chromatography column (Bio-Rad), and this mixture was incubated (1 h, 4 °C) with mild shaking. The supernatant was discarded, and the beads were washed with wash buffer (2 × 5 mL; sodium phosphate (50 mM, pH 7.5) with imidazole (15 mM)). The bound proteins were eluted with elution buffer (10 mL; sodium phosphate (50 mM, pH 7.5) with imidazole (250 mM)). Centrifugal filter units (MWCO 10 kDa) were used to exchange the elution buffer to sodium phosphate and to concentrate this fraction.

Transformation in *P. pastoris*: The preparation of competent cells for electroporation, the preparation of plasmid DNA for transformation and the transformation procedure were performed with an EasySelect *Pichia* Expression Kit (Life Technologies). The plasmid DNA was linearized by using Pmel, and purified with the High Pure PCR Micro Clean up Kit (Roche). *P. pastoris* X-33 cells were trans-

formed by electroporation (2.0 kV, single pulse) in a 0.2 cm cuvette with DNA (1.5–2.5 µg DNA for ca. 1.7×10^9 cells). The phenotyping of *P. pastoris* clones and expression in shake flasks was performed as described in the EasySelect manual. For phenotyping, four clones of each variant were tested; *P. pastoris* X-33 served as Mut⁺ control and GS115/Albumin was the Mut⁻ control (the strains were supplied in the EasySelect *Pichia* Expression Kit).

pNP assay and protein quantification: A pNP assay was performed with an Infinite M200 PRO photometer (410 nm; TECAN, Männedorf, Switzerland). The reaction mixture contained substrate solution (20 µL; pNP-myristate (10 mM) in isopropanol), enzyme solution (20 µL) and sodium phosphate buffer (160 µL; 50 mM, pH 7.5, with gum arabic (0.1%, w/v)). The measurements were performed at room temperature for 5 min. The linear increase in absorption over time was used to calculate the volumetric activities. One Unit (U) was defined as the conversion of 1 µmol pNP-myristate per minute.

An Uptima BC Assay Kit (Interchim, Montluçon, France) was used for protein quantification with bovine serum albumin as the standard, according to the supplier's instructions.

Expression in *P. pastoris*: For expression in shake flasks, the complex media BMGY (5 mL) and BMMY (25 mL) were used (BMGY and BMMY were prepared as described in the instructions for the Easy-Select *Pichia* Expression Kit), and the flasks were sealed with Aeraseal sterile breathable membranes (Excel Scientific, Victorville, CA). Samples (500 µL) were taken every day, then cells were isolated by centrifugation (16200 g, 5–10 min, 4 °C) and stored at 20 °C. Before expression in a 1 L bioreactor, two pre-cultures in shake flasks were prepared. The first was in BMGY (20 mL) with zeocin (100 µg mL⁻¹) at 30 °C and 220 rpm. After 24 h, the cells were harvested by centrifugation (4570 g, 20 min, 4 °C) and used to inoculate the second pre-culture in basal salt medium^[21] (100 mL, pH 5.4, with PTM1 (435 µL)) with zeocin. The PTM1 solution was prepared according to Higgins and Cregg^[21] but with 0.08 g sodium iodide instead of potassium iodide, 0.02 g boric acid, and no calcium sulfate. For expression in a BioFlo 110 bioreactor (Eppendorf, Hamburg, Germany) the same basal salt medium (400 mL) was used, with the pH adjusted to pH 5.4 in the bioreactor, then PTM1 solution (1.74 mL) was added, and the second pre-culture was used to inoculate the medium. During the fermentation the following parameters were regulated automatically: pH 5.4, 30% dO₂, 30 °C, with stirring at 250–800 rpm (depending on the dO₂ level). After 24 h protein expression was induced by feeding (4.08 mL h⁻¹ L⁻¹ culture) with methanol containing PTM1 (1.2%, v/v). The feeding rate was doubled after another 24 h. After approximately 100 h of protein expression, the cells were harvested by centrifugation (4570 g, 1 h, 4 °C), and the supernatants were concentrated by TFF and lyophilized overnight. The purity of the obtained lyophilizate was assessed by SDS-PAGE (12% gel) according to Laemmli et al.^[22]

pH-stat measurements: A Titrino Plus 877 (Metrohm, Filderstadt, Germany) was used for pH-stat measurements. The substrate solution was tributyrin (5%, v/v) and gum arabic (2%) in deionized water.^[23] An Ultraturrax T25 homogenizer (IKA, Staufen, Germany) was used at to emulsify the substrate solution (22 000 rpm, 5 min). For each measurement (over 5 min) substrate solution (20 mL) was used with sodium hydroxide (0.01 M) as the titrant. Except for the experiments to characterize the CAL-A variants, the measurements were done at pH 7.5 and 40 °C. For every measurement either enzyme solution (50 µL) or immobilized enzyme (10–20 mg) was used. The enzyme solutions were dialyzed before the measurement against sodium phosphate buffer (pH 7.5; 50 mM) or Davies

buffer^[24] (100 mM). All measurements were performed at least in triplicate. To determine the pH profile of wild-type CAL-A and Asp122Leu, pH-stat measurements were performed at different pH values (pH 5–9) and 40 °C. The pH values of the substrate solution and the enzyme solution were always adjusted to pH value that was used during the measurement. To investigate temperature optimum and thermostability, the enzyme solutions were dialyzed against Davies buffer (100 mM, pH 6); pH 6 was used for these pH-stat reactions. For examination of optimum temperature, the reaction temperature was varied from 30 to 70 °C. Thermostability was determined by measuring the residual activity after 1 h of incubation at different temperatures (30–90 °C) and then cooling for at least 10 min on ice. The measuring temperature was 40 °C. The data obtained in that way were used to calculate T_{50}^{50} values. One unit (U) was defined as the release of 1 µmol of product (butyric acid) per minute.

Biocatalysis conditions: The initial screening was performed in glass vials (capacity: ~1.8 mL), and the reaction mixture was incubated for 24 h at 40 °C in an Eppendorf shaker (1200 rpm). The reaction mixture contained PKO (169.2 mg, ~241 µmol), enzyme solution (14.1 µL; purified CAL-A variants after concentration) and ethanol (14.1 µL, ~245 µmol). The reaction mixture was extracted twice with hexane/diethyl ether (75:25; 600 µL); the combined extracts were dried with anhydrous sodium sulfate and analyzed by GC. For further investigation of the three interesting variants, the composition of the reaction mixture was PKO (200 mg, ~285 µmol), ethanol (74 µL, 0.5 molar excess based on the amount of fatty acid in the PKO), and enzyme solution (8 U, determined by a pH-stat assay). The final reaction volume was 470.9 µL. The enzyme solutions were dialyzed against sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) before the biocatalysis reactions (incubation parameters as for the initial screening). Separate approaches were used for samples after 1 and 24 h of biocatalysis. Reactions were performed in triplicate. The samples were extracted with hexane/diethyl ether (3 × 600 µL). The biocatalysis reactions with immobilized CAL-A variants contained PKO (250 mg, ~360 µmol), methanol (65.7 µL, 0.5 molar excess based on the amount of fatty acid in the PKO), immobilizate (2 U, as determined by a pH-stat assay), and deionized water (25 µL). The final reaction volume was 368.5 µL. The reaction vessel and reaction conditions were the same as described above. For every time point a separate biocatalysis sample was prepared, and each reaction was done in triplicate. The biocatalysis samples were extracted with extraction solution (750 µL × 3). Quantification of lauric acid esters, oleic acid esters, lauric acid, oleic acid, and PKO was done by using standard curves. The other free fatty acids and fatty acid esters were quantified by extrapolation with the peak of lauric acid or the corresponding lauric acid ester. The extraction for all compounds was complete (data not shown).

GC analysis: The GC analysis was performed as described by Müller et al.,^[3b] but the final step was extended to 15 min at 360 °C. The column flow was 0.76 mL min⁻¹, the injection volume was 1 µL, the injector temperature was 300 °C, and the split was 25.8. A GC-2010 Plus Gas Chromatograph (Shimadzu) with a flame ionization detector was used for all GC analyses (chromatogram in Figure S7; GC analysis for the fatty acid profile of the PKO with different temperature programs in Tables S4–S6).

Immobilization: The CAL-A variants were immobilized by adsorption onto Lewatit VP OC 1600 (Lanxess, Köln, Germany). For the immobilization of wild-type CAL-A, protein (13.8 mg) and carrier (1.4 g) were used. For CAL-A Asp122Leu, protein (10.8 mg) and carrier (1 g) were used. The enzyme solution was dialyzed against

sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and incubated with the carrier for 6 h at room temperature with mild shaking. The immobilized enzyme was collected by filtration. The immobilizes were washed with deionized water (50 mL) and isopropanol (3 mL). The immobilizes were dried and stored at 4 °C.

Acknowledgements

We are grateful to the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, GÜLZOW, Germany (FKZ: 22005311) for financial support within the Metaglyc2.0 project. We also thank Dr. Lukas Maksym from the BASF Personal Care and Nutrition GmbH for supplying plant oils and for useful discussions. In addition to that the authors wish to thank Drs. Ioannis Pavlidis and Dominique Böttcher for critical reading of the manuscript.

Keywords: acyltransferases • biocatalysis • CAL-A • ester synthesis • immobilization

- [1] a) M. Mittelbach, M. Wörgetter, J. Pernkopf, H. Junek, *Energy Agric.* **1983**, *2*, 369–384; b) G. Vicente, M. Martínez, J. Aracil, *Bioresour. Technol.* **2004**, *92*, 297–305.
- [2] a) G. Hills, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 601–607; b) M. Kaieda, T. Samukawa, A. Kondo, H. Fukuda, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 12–15; c) M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, H. Fukuda, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 627–631; d) M. Mittelbach, J. Am. Oil Chem. Soc. **1990**, *67*, 168–170.
- [3] a) R. Brenneis, B. Baech, G. Kley, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 809–814; b) J. Müller, B. Fredrich, C. Kohlmann, L. Maksym, U. T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 232–236.
- [4] L. Brunel, V. Neugnot, L. Landucci, H. Boze, G. Moulin, F. Bigey, E. Dubreucq, *J. Biotechnol.* **2004**, *111*, 41–50.
- [5] G. D. Haki, S. K. Rakshit, *Bioresour. Technol.* **2003**, *89*, 17–34.
- [6] C. Yang, F. Wang, D. Lan, C. Whitley, B. Yang, Y. Wang, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 533–537.
- [7] U. Schörken, P. Kempers, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 627–645.
- [8] a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; b) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 526–529; c) H. Brundiek, S. K. Padhi, R. Kourist, A. Evitt, U. T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 1148–1153; d) R. Kourist, H. Brundiek, U. T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 64–74.
- [9] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Backvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109–119.
- [10] K. L. Morley, R. J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 231–237.
- [11] M. Wittrup Larsen, D. F. Zielinska, M. Martinelle, A. Hidalgo, L. J. Jensen, U. T. Bornscheuer, K. Hult, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 796–801.
- [12] a) H. B. Brundiek, A. S. Evitt, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 412–414; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 425–428; b) J. Pfeffer, S. Richter, J. Nieveler, C.-E. Hansen, R. B. Rhilid, R. D. Schmid, M. Rusnak, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 931–938.
- [13] F. W. Krainer, C. Dietzsch, T. Hajek, C. Herwig, O. Spadiut, A. Glieder, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 22–35.
- [14] B. L. Zamost, H. K. Nielsen, R. L. Starnes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *8*, 71–81.
- [15] a) P. Adlercreutz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406–6436; b) M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6475–6490.
- [16] B. R. Moser in *Biofuels* (Eds.: D. Tomes, P. Lakshmana, D. Songstad), Springer, **2011**, pp. 285–347.
- [17] L. Zhang, L. I. Hellgren, X. Xu, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84*, 237–247.
- [18] a) A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 550–563; b) D. S. No, T. Zhao, J. Lee, J.-S. Lee, I.-H. Kim, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8934–8940.
- [19] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.
- [20] C. T. Chung, S. L. Niemela, R. H. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2172–2175.
- [21] D. R. Higgins, J. M. Cregg, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 103: *Pichia Protocols*, Humana, Totowa, **1998**.
- [22] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [23] T. Vorhaben, D. Böttcher, D. Jasinski, U. Menyes, V. Brüser, K. Schröder, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 992–996.
- [24] M. T. Davies, *Analyst* **1959**, *84*, 248–251.

Manuscript received: April 12, 2015

Accepted article published: June 9, 2015

Final article published: July 14, 2015

Supporting Information

Enhancing the Acyltransferase Activity of *Candida antarctica* Lipase A by Rational Design

Janett Müller,^[a] Miriam A. Sowa,^[a] Birte Fredrich,^[a] Henrike Brundiek,^[b] and Uwe T. Bornscheuer^{*[a]}

[cbic_201500187_sm_miscellaneous_information.pdf](#)

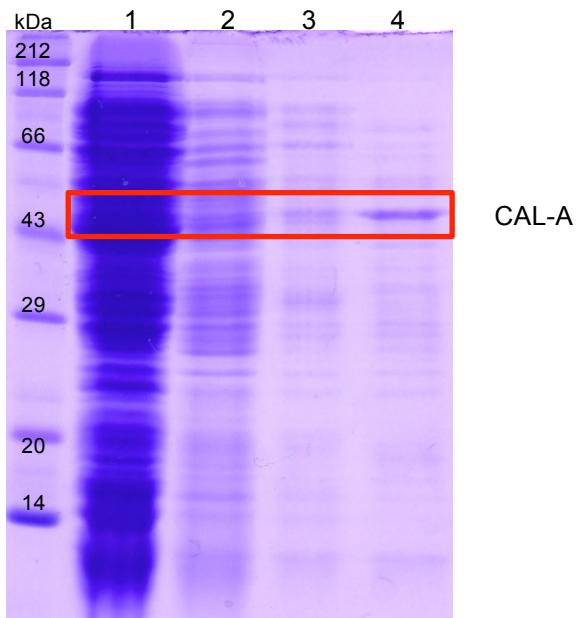


Fig. S1 shows a purification of CAL-A expressed in *E. coli* C41 by metal affinity chromatography. The following samples can be seen on the SDS-gel: lane 1: flow through; lane 2/3: wash fraction 1 and 2; lane 4: combined and concentrated elution fractions. Roti-mark standard (Roth, Karlsruhe, Germany) was used as protein ladder.

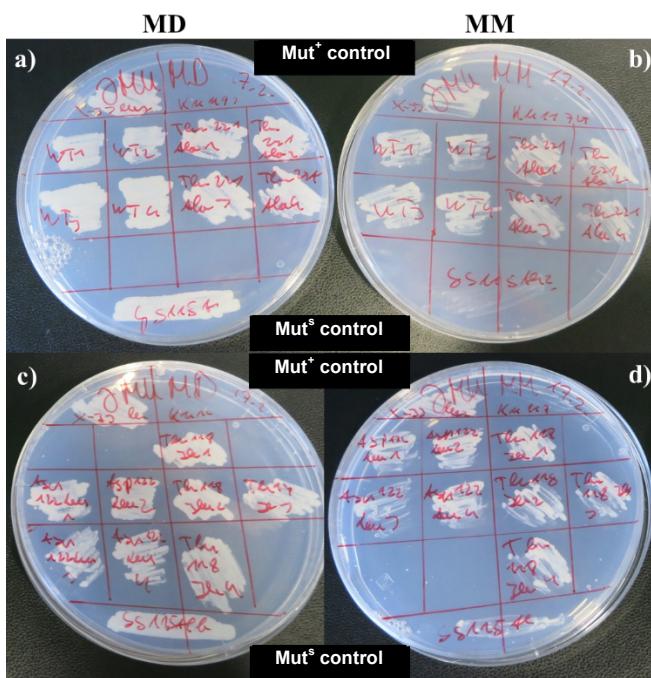


Fig. S2 shows the minimal agar plates used for phenotyping. MD plates contained glucose and MM plates contained methanol as carbon source. Part a) and b) show the growth of CAL-A wild type and Thr221Ala on MD and MM plates. Part c) and d) show the growth of CAL-A Asp122Leu and Thr118Ile on these different types of plates. For every CAL-A variant four clones were tested. *P. pastoris* served as Mut^t control (in the upper left corner of every plate) and *P. pastoris* GS115Albumin as Mut^s control (on the bottom of every plate).

Tab. S1 presents the activities of different clones for each variant measured with the pNP-myristate assay. The clones with the highest activities are highlighted and they were used in further experiments. It has to be considered that volumetric activities were measured in this experiment, so that the clones of one variant can be compared with each other but not the different variants. Every value represents the average of three measurements.

variant	clone	activity against pNP-myristate [U/ml]			
		1	2	3	4
Thr118Ile		19.47	27.58	21.43	20.58
Asp122Leu		50.44	50.34	55.80	15.81
Thr221Ala		24.76	48.65	25.46	29.41

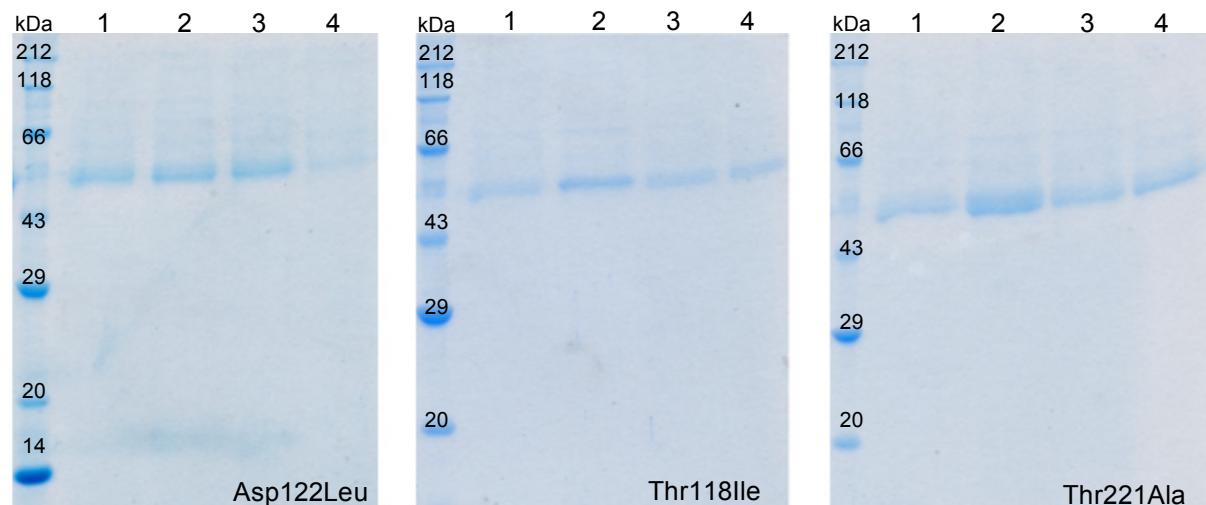


Fig. S3 shows the SDS-PAGE analysis of four different clones (numbers above each gel) for each variant. The expression was done in a small scale in shake flasks as described in the methods. After approx. 91 h of expression the supernatant was separated from the cells by centrifugation and 15 µl of every supernatant were used as sample for the SDS-PAGE. Roti-mark standard was used as protein ladder.

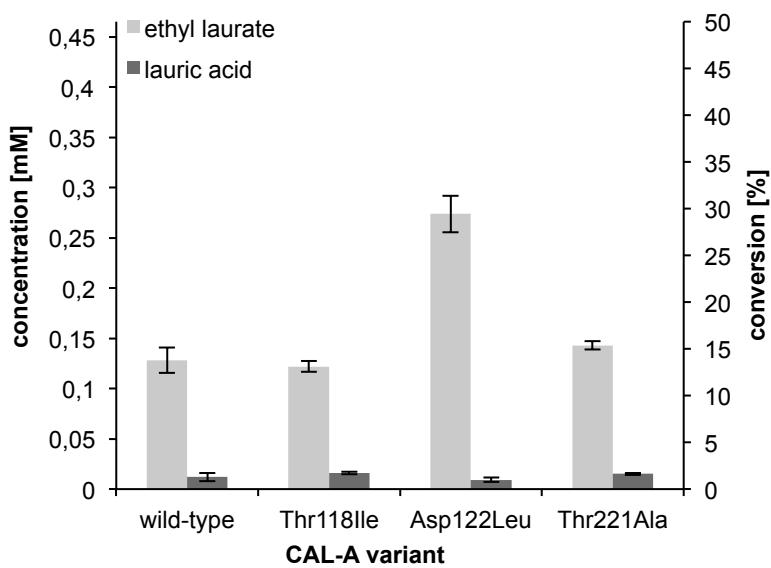


Fig. S4 Amount of lauric acid and lauric acid ethyl ester formed by CAL-A wild type and different variants in a transesterification reaction with PKO and ethanol in aqueous medium. Reactions were performed for 1 h at 40°C and 1200 rpm.

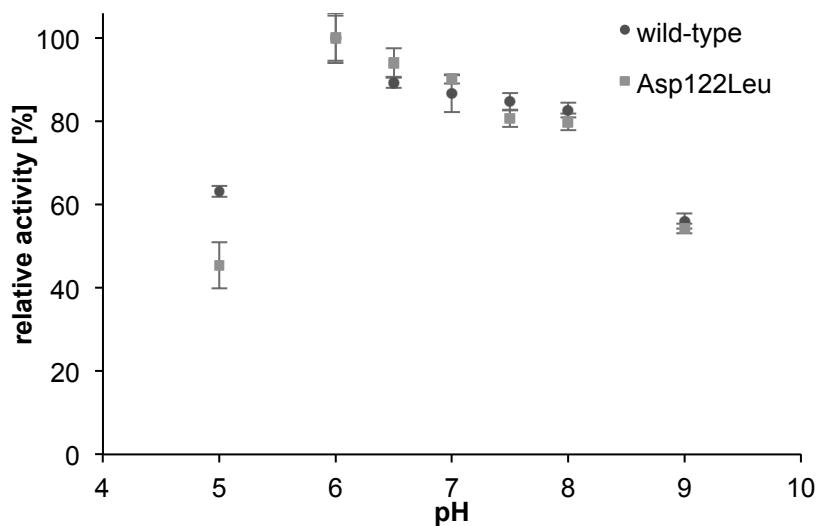


Fig. S5 shows the pH profile of CAL-A wild-type and Asp122Leu. All measurements were done at the pH-stat at 40°C. Every data point is the average of three measurements and the error bars indicate the standard deviation. The activity at pH 6 was set to 100% and the other activities are presented relative to that.

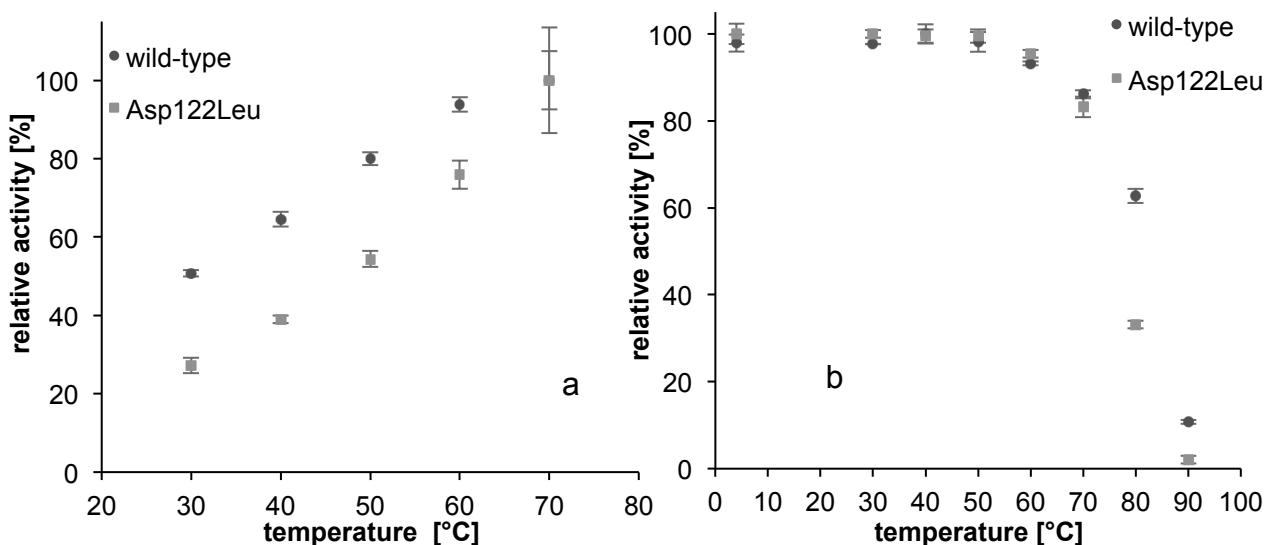


Fig. S6 shows the pH-stat measurements concerning the temperature optimum (a) and thermostability (b) of CAL-A wild-type and Asp122Leu. These measurements were done at pH 6 and in triplicates. The error bars indicate the standard deviation. To estimate the thermostability the enzyme solutions were incubated for 1 h at different temperatures, cooled on ice for at least 10 min and then used in the reaction (the reaction temperature was 40°C).

Site-directed mutagenesis

For every site-directed mutagenesis 1 µl of template, 0.5 µl of forward and reverse primer (Tab. S1 and S2), 2 µl of dNTPs, 0.5-1 u *Pfu*⁺, 5 µl 10x*Pfu*⁺ buffer were used and sterile water was added to a total volume of 50 µl. Afterwards the mixture was divided into 10 µl aliquots and used for PCR. The PCR program consisted of the following steps: initial denaturation (1 min, 95°C), 25 cycles of melting (45 s, 95°C), annealing (45 s, 55-70°C) and elongation (5-6.5 min, 72°C), the last step was a final elongation (7 min 72°C). Every aliquot was incubated at a different annealing temperature. The amplification of the template was verified by agarose gel electrophoresis. All aliquots that showed amplification were combined again and the template DNA was digested with *Dpn*I (1 µl for 50 µl PCR product) for 2 h at 37°C followed by 20 min at 65°C.

Tab. S2 shows the sequences of all primers that were used for site-directed mutagenesis or sequencing of pET-22b-CAL-A (used for expression in *E. coli*).

primer	sequence (5'→3')	use
T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG	sequencing
pET-RP reverse	CTAGTTATTGCTCAGCGG	sequencing

Asp122Pro forward	CCGCGGTGCTGCCGACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Pro reverse	CAATAATAATCGGGTCGGCAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Phe forward	CCGCGGTGCTGTTACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Phe reverse	CAATAATAATCGGGTAAACAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Val forward	CCGCGGTGCTGGACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Val reverse	CAATAATAATCGGGTCACCAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Trp forward	CCGCGGTGCTGTGGACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Trp reverse	CAATAATAATCGGGTCCACAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Ile forward	CCGCGGTGCTGATTACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Ile reverse	CAATAATAATCGGGTAATCAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Leu forward	CCGCGGTGCTGCTGACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Leu reverse	CAATAATAATCGGGTCAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Asp122Ala forward	CCGCGGTGCTGGCAGACCCGATTATTATGGCTG	QuikChange™
Asp122Ala reverse	CAATAATAATCGGGTCGCCAGCACCGCGGTAC	QuikChange™
Thr118Ala forward	CAGCCGAACAAAGTGGCGGGTGCTGGATACC	QuikChange™
Thr118Ala reverse	GGTATCCAGCACCGCCACTTGTTCGGCTG	QuikChange™
Thr118Trp forward	TCAGCCGAACAAAGTGTGGCGGTGCTGGATACCC	QuikChange™
Thr118Trp reverse	GGGTATCCAGCACCGCCACACTTGTTCGGCTGA	QuikChange™
Thr118Phe forward	GATCAGCCGAACAAAGTGTTCGGTGCTGGATACCCG	QuikChange™
Thr118Phe reverse	CGGGGTATCCAGCACCGCAAACACTTGTTCGGCTGATC	QuikChange™
Thr118Pro forward	CAGCCGAACAAAGTGCAGCGGTGCTGGATACC	QuikChange™
Thr118Pro reverse	GGTATCCAGCACCGCCGGACTTGTTCGGCTG	QuikChange™
Thr118Ile forward	CCTGGATCAGCCGAACAAAGTATTGCGGTGCTGGAT	QuikChange™
Thr118Ile reverse	ATCCAGCACCGCAATCACTTGTTCGGCTGATCCAGG	QuikChange™
Thr118Leu forward	ATCAGCCGAACAAAGTGTGGCGGTGCTGGATACCC	QuikChange™
Thr118Leu reverse	GGGTATCCAGCACCGCCAGCACTTGTTCGGCTGAT	QuikChange™
Thr118Val forward	ATCAGCCGAACAAAGTGGTGGCGGTGCTGGATACCC	QuikChange™
Thr118Val reverse	GGGGTATCCAGCACCGCCACCACTTGTTCGGCTGAT	QuikChange™
Thr221Ala forward	CGGTGAGCGCAAAGATGCGTTACCTTCTGAACGG	QuikChange™
Thr221Ala reverse	CCGTTCAGAAAGGTAAACGCATCTTCGCGCTACCG	QuikChange™
Thr221Trp forward	CCGGTGAGCGCAAAGATTGGTTACCTTCTGAACGGC	QuikChange™
Thr221Trp reverse	GCCGTTCAGAAAGGTAAACCAATCTTCGCGCTACCGG	QuikChange™
Thr221Phe forward	CCGGTGAGCGCAAAGATTGGTTACCTTCTGAACGGCG	QuikChange™
Thr221Phe reverse	CGCCGTTCAGAAAGGTAAAAAATCTTCGCGCTACCGGG	QuikChange™
Thr221Pro forward	CGGTGAGCGCAAAGATCCGTTACCTTCTGAACGGG	QuikChange™
Thr221Pro reverse	CCGTTCAGAAAGGTAAACGGATCTTCGCGCTACCG	QuikChange™
Thr221Ile forward	CCGGTGAGCGCAAAGATTTTACCTTCTGAACGGCG	QuikChange™
Thr221Ile reverse	CGCCGTTCAGAAAGGTAAAAAATCTTCGCGCTACCGGG	QuikChange™
Thr221Leu forward	CCGGTGAGCGCAAAGATCTGTTACCTTCTGAACGGCG	QuikChange™
Thr221Leu reverse	CGCCGTTCAGAAAGGTAAACAGATCTTCGCGCTACCGGG	QuikChange™
Thr221Val forward	CCGGTGAGCGCAAAGATGTGTTACCTTCTGAACGGCG	QuikChange™
Thr221Val reverse	CGCCGTTCAGAAAGGTAAACACATCTTCGCGCTACCGGG	QuikChange™
Glu370Ala forward	GGAACATCTGACCGCGGCGATTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Ala reverse	GGCACCAAGGCCAAAATGCCCGGGTCAGATGTTCC	QuikChange™
Glu370Trp forward	GCGAACATCTGACCGCGTGGATTTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Trp reverse	CGGCACCAGGCCAAAATCCACGCGGTCAAGATGTTCCG	QuikChange™
Glu370Phe forward	GCGAACATCTGACCGCGTGTGTTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Phe reverse	CGGCACCAGGCCAAAATACGCGGTCAAGATGTTCCG	QuikChange™
Glu370Pro forward	GCGAACATCTGACCGCGCCGATTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Pro reverse	GGCACCAAGGCCAAAATCGCGCGGTCAAGATGTTCCG	QuikChange™
Glu370Ile forward	GCGAACATCTGACCGCGATTGGCCTGGTGCC	QuikChange™

Glu370Ile reverse	CGGCACCAGGCCAAAATAATCGCGGTAGATGTTCCG	QuikChange™
Glu370Leu forward	CGGAACATCTGACCGCGCTGATTTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Leu reverse	GGCACCAAGGCCAAAATCAGCGCGTCAGATGTTCCG	QuikChange™
Glu370Val forward	GGAACATCTGACCGCGGTGATTTGGCCTGGTGCC	QuikChange™
Glu370Val reverse	GGCACCAAGGCCAAAATCACCGCGTCAGATGTTCC	QuikChange™

Tab. S3 shows the sequences of all primers that were used for site-directed mutagenesis or sequencing of pPICZα-CAL-A (used for expression in *P. pastoris*).

primer	sequence (5'→3')	use
5' AOX1 (forward)	GACTGGTCCAATTGACAAGC	sequencing
3' AOX1 (reverse)	GCAAATGGCATTCTGACATCC	sequencing
α-Factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	sequencing
CAL-A forward	AACCGAGACGCTGGACC	sequencing
Thr221Ala forward	GCACGCCCGTGAGCGCCAAGGACGCCTTACATTCTCAAC	QuikChange™
Thr221Ala reverse	GGCGTCCTGGCGCTCACGGCGTGCGCCGTGCGAACAC	QuikChange™
Asp122Leu forward	GGTGACGGCGGTGCTCCTACGCCCATCATCATCGGCTGG	QuikChange™
Asp122Leu reverse	CCCAGCCGATGATGATGGCGTAAGGAGCACGCCGTACC	QuikChange™
Thr118Ile forward	GGACCAGCCGAACAAGGTGATTGCGGTGCTGACACGCC	QuikChange™
Thr118Ile reverse	GGGCGTGTGAGCACCGCAATCACCTGTTGGCTGGTCC	QuikChange™

Fatty Acid Profile

To determine the fatty acid profile of the used PKO, methyl esters were synthesized chemically. Boiling chips (2-3) and 6 ml of 0.5 N methanolic sodium hydroxide solution were added to 350 mg of oil in a 100 ml round-bottom flasks. This solution was boiled under reflux for 5-10 min. Afterwards 7 ml of methanolic boron trifluoride solution were added through the reflux condenser and boiled for additional 2 min. Hexane (3.5 ml) was added to the solution and it was boiled for 1 min . After this, a small amount of saturated sodium chloride solution was added to the mixture, so that the organic phase could be transferred in another vessel. The organic phase was dried with sodium sulfate and analyzed by GC as soon as possible.

For GC analysis the BPX-5 (length: 25 m, diameter: 0.22 mm) and BPX-70 (length: 30 m, diameter: 0.25 mm) columns were used (Tab. S3 and S4). The BPX-70 was used to separate the methyl esters of linoleic acid and oleic acid. Two different programs were used for these columns. The quantification of the different methyl esters was done with standard curves.

Tab. S4 shows the temperature program used for GC analysis of the fatty acid profile with the column BPX-5. The column flow was 1.4 ml/min, 1 µl of the sample was injected with a split of 25.8.

rate [°C/min]	temp. [°C]	time [min]
-	80	10
10	220	10
2	225	4
10	300	10

Tab. S5 shows the temperature program used for GC analysis of the fatty acid profile with the column BPX-70. The column flow was 1.32 ml/min, 1 µl of the sample was injected with a split of 40.

rate [°C/min]	temp. [°C]	time [min]
-	60	5
10	230	10

After the analysis by GC the fatty acid profile of the PKO was determined and the average molecular weight was calculated. In this study, 2 different PKOs were used but both had a very similar fatty acid distribution. The first PKO was used for the initial screening and the further investigations of Thr118Ile, Asp122Leu and Thr221Ala, it had an average molecular weight of 702.5 g/mol. The second PKO (Tab. S6) was used for the biocatalysis reactions with immobilized enzymes and had an average molecular weight of 694.8 g/mol.

Tab. S6 shows the fatty acid profile of the used PKO with an average molecular weight of 694.8 g/mol.

fatty acid	amount [%]
caprylic acid (C8)	4.4
decanoic acid (C10)	3.9
lauric acid (C12)	51.4
myristic acid (C14)	15.7
palmitic acid (C16)	7.8
stearic acid (C18)	1.8
oleic acid (C18:1)	13.6
linoleic acid (C18:2)	1.8

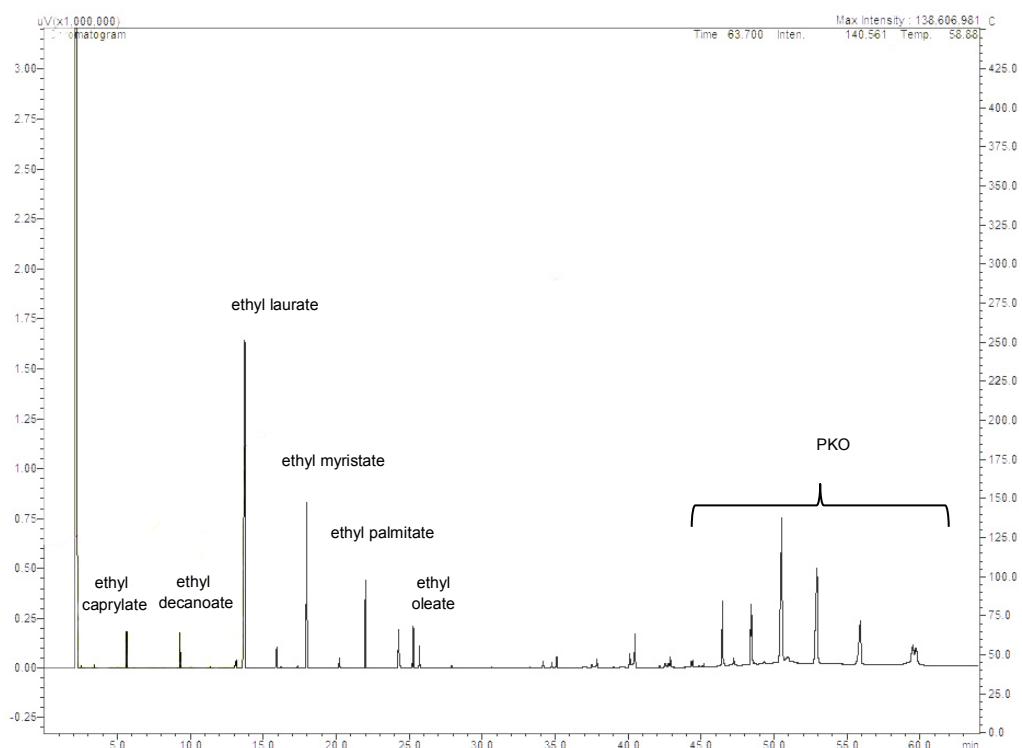


Fig. S7 shows a GC chromatogram of a biocatalysis sample of a transesterification with PKO and ethanol. The peaks of relevant compounds are labelled.

Artikel III

Research Article

The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment

Janett Müller, Miriam A. Sowa, Mark Dörr and Uwe T. Bornscheuer

Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, Greifswald University, Greifswald, Germany

The enzymatic synthesis of fatty acid esters (FAE) can be performed by lipases in reaction systems in the absence of bulk water. However, some lipases such as *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) have an acyltransferase activity, which enables FAE synthesis from natural oils and suitable alcohols even in the presence of water. The ability to generate these compounds in an aqueous system would be interesting for an industrial application, because this could lead to a more cost-efficient and environmentally friendly process as the alcohol donor also serves as solvent. Using refined palm kernel oil (PKO) the CAL-A-catalyzed ester synthesis was studied with methanol or ethanol in the presence of 5–10% (w/w) water. Optimizing reaction parameters (e.g., temperature and water content) resulted in up to 95% ester formation after 24 h. In addition, methanol allowed higher ester formation than ethanol.

Practical applications: The enzymatic synthesis of fatty acid esters from plant oils using standard lipases is hampered by the fact that the presence of water leads to undesired formation of free fatty acids. The use of CAL-A with its unique acyltransferase activity overcomes this limitation and hence makes the industrial scale synthesis of these esters more feasible. The identification of important parameters influencing the ester formation is crucial to establish such processes.

Keywords: Acyltransferase / Alcohol / CAL-A / Transesterification / Water content

Received: June 4, 2015 / Revised: July 1, 2015 / Accepted: July 23, 2015

DOI: 10.1002/ejlt.201500292

1 Introduction

Fatty acid esters are valuable compounds and can be used as biodiesel [1] or flavoring and fragrance compounds [2]. The ester synthesis is possible using chemical [3, 4] or enzymatic catalysts [5–8]. For the enzymatic synthesis, lipases are often used in transesterification reactions with natural oils in a reaction system in the absence of water to avoid undesired hydrolysis. However, some lipases like lipase A from *Candida antarctica* (also known as *Pseudozyma antarctica*) (CAL-A) [9, 10] or lipase 2 from *Candida parapsilosis* [11] exhibit an acyltransferase activity that enables the synthesis of fatty acid esters even in the presence of water. Employing this kind of lipase for the synthesis of fatty acid

esters in an aqueous system could lead to a more cost-efficient and environmentally friendly process due to the fact that no additional organic solvents are necessary. Frequently, lauric oils [12] and methanol or ethanol [13] are applied in transesterification reactions because these substrates are widely available and quite cheap. To be competitive with chemical syntheses, the enzyme for such a reaction has to be very robust [14, 15] and therefore, we decided to have a closer look into transesterification reactions catalyzed by CAL-A, because this lipase is considered to have a high thermal and solvent stability [16]. To determine the optimal reaction conditions, several parameters were investigated systematically. Moreover the long-term stability under certain reaction conditions was examined.

2 Materials and methods

2.1 Materials

If not stated, otherwise, all chemicals and consumables were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany),

Correspondence: Uwe T. Bornscheuer; Greifswald University, Dept. of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

Email: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

Fax: +49 (0)3834-86-794367

Abbreviations: **CAL-A**, *Candida antarctica* lipase A; **PKO**, palm kernel oil

Sarstedt (Nürnberg, Germany), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Germany), and Eppendorf (Hamburg, Germany) were of analytical grade. The refined PKO (palm kernel oil) was received from the BASF Personal Care and Nutrition GmbH (Düsseldorf, Germany). Immobilized CAL-A was purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Gas chromatography analysis

The gas chromatography (GC) analysis was performed with the following temperature program: 120°C for 1 min, heating (5°C/min) to 360°C, and 15 min at 360°C [10]. The column flow was 0.76 mL/min, the injection volume was 1 µL and the split ratio 1:25.8. The injector temperature was set to 300°C and the detector temperature was 360°C. A GC-2010 Plus from Shimadzu (Duisburg, Germany) with the BPX5(25 m × 0.22 mm, SGE Europe, Kiln Farm Milton Keynes, United Kingdom) column was used for all GC measurements.

The quantification of lauric acid esters, oleic acid esters, lauric acid, oleic acid, and PKO was done using standard curves (10–300 mM). The other free fatty acids and fatty acid esters were quantified by extrapolation using the peak of lauric acid or the corresponding lauric acid ester. The GC analysis for the fatty acid profile of the PKO was performed with different temperature programs and is described in the Supporting Information (Tables S1 and S2). The conversion is based on the consumption of PKO.

2.3 Biocatalysis

The biocatalysis reactions were performed in glass vials (capacity: approx. 1.8 mL) that were incubated in an Eppendorf Thermomixer comfort at 1200 rpm and different temperatures (30, 40, or 50°C). A total of 500 mg of refined PKO (712 µmol triglycerides, see Supplementary data) and 10 mg of immobilized CAL-A (approx. 3.8 U, determined by pH-stat, see below) were used for every biocatalysis. Methanol (130 µL, 3.2 mmol) or ethanol (187 µL, 3.2 mmol) served as alcohol substrates and were added in a 50% molar excess based on the theoretical amount of free fatty acids. Based on the amount of oil, 5% (25 µL) or 10% (50 µL) (w/w) water were added to the reaction mixture. The final reaction volumes for the different biocatalysis reactions were 736 µL (methanol, 10% water), 711 µL (methanol, 5% water), 792 µL (ethanol, 10% water), and 767 µL (ethanol, 5% water). For the biocatalysis reactions with 5% water, methanol was added stepwise in three portions in an interval of 2 h. Every reaction was performed in triplicates. Prior to analysis, the biocatalysis samples were extracted with 4.5 mL of a mixture of *n*-hexane: diethylether (75:25; v/v), the extracts were dried with anhydrous sodium sulfate and analysed by GC.

The biocatalysis reactions to investigate the long term stability were performed on a larger scale. To glass vials

(capacity: approx. 10 mL), 3.5 g (approx. 5 mmol) refined PKO were added, and the respective amounts of alcohol, water and immobilized CAL-A in the same ratios as used in the small scale reactions were added with a water content of 5 or 10%. The vials were incubated at 40°C and 1200 rpm. A special adapter that was generated by a 3D printer was used (Supplementary Fig. S2) with temperature regulation in an incubation hood (TH 30 from Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Germany). The samples were incubated under the described conditions for 97 h. Afterwards the enzyme was separated from the reaction mixture by centrifugation (5 min, 16 200 g, 22°C), the supernatant was discarded and the immobilizate was washed two times with 2 mL ethanol. Subsequently, the immobilizate was air-dried and the hydrolytic activity was measured by pH-stat.

2.4 pH-stat

The Titrino Plus 877 (Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Germany) was used for pH-stat measurements. The substrate solution consisted of 5% (v/v) tributyrin and 2% gum arabic in deionised water [17]. To emulsify the substrate solution, a homogenizer (Ultraturrax T25, IKA, Staufen, Germany) was used at 22 000 rpm for 5 min. For every measurement the same amount of substrate solution (20 mL) was used and the reaction temperature was set to 40°C. The measurement time was 5 min and 0.01 M sodium hydroxide solution served as titrant. A defined amount of immobilized CAL-A (10–25 mg) was used for every measurement. All measurements were performed at least in triplicates. One Unit (U) of lipase activity corresponds to the release of 1 µmol of product (butyric acid) per minute.

3 Results

3.1 Biocatalysis with methanol

For the biocatalysis with methanol, three different temperatures (30, 40, and 50°C) and two different water contents (5 or 10% based on the amount of oil) were applied. The amounts of refined PKO, immobilized enzyme and methanol were kept constant. For the reactions with 5% water the methanol was added in three portions, because otherwise almost no activity could be measured (Supplementary Fig. S3). Figure 1 shows the conversion and total ester formation in these transesterifications.

For all examined conditions, almost full conversions (between 85–95%) were obtained after 24 h incubation. No significant difference between the reaction temperatures 30 and 40°C, regardless of the water content, could be found. At higher temperature (50°C), the conversion decreased at both water contents.

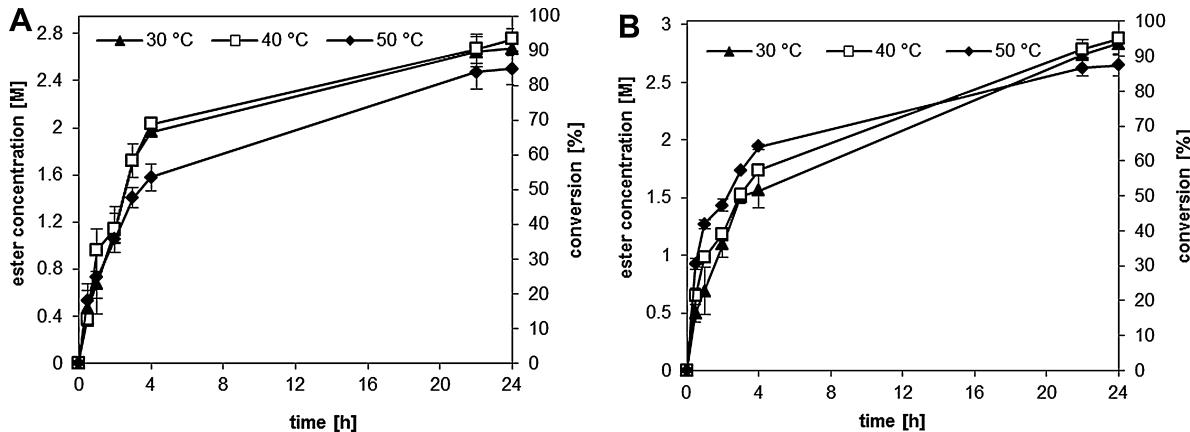


Figure 1. Ester concentration and PKO conversion in a transesterification reaction catalyzed by immobilized CAL-A. Refined PKO and methanol were used as substrates. The water content was 10% (A) or 5% (B) (based on the weight of oil) and reaction temperatures of 30, 40, and 50°C were applied. All samples were prepared as triplicates.

3.2 Biocatalysis with ethanol

The biocatalysis with ethanol was performed under identical conditions in terms of temperature and water content as with methanol. As seen in Fig. 2, the obtained conversions varied between 55 and 85%. This shows that methanol is preferred as an alcohol compared to ethanol. In general, the conversions with just 5% of water were lower than with 10%. For both water contents used, the lowest conversions were measured at a reaction temperature of 30°C. This differs from the profiles observed for methanol.

3.3 Free acids

Free fatty acids are by-products in the performed biocatalytic reactions, as the lipase CAL-A in principle can also catalyze the hydrolysis of the triglycerides instead of

transesterification. To evaluate the selectivity of the CAL-A toward the transesterification reaction, the amount of free lauric acid was compared to the amount of the corresponding lauric acid ester (lauric acid is the main fatty acid in the used PKO, approx. 51%, see Supplementary Table S3 and Fig. S1). Figure 3 illustrates that the amount of free lauric acid varies from 3 to 7% whereas 92–97% of the corresponding ester are formed.

3.4 Long-term stability

To study the long-term stability, biocatalysis was performed with PKO, alcohol and 5 or 10% water. The different mixtures were incubated at 40°C for 97 h. The immobilized CAL-A was recovered afterwards and the remaining activity was measured by pH-stat. Table 1 shows that immobilized CAL-A retained some of its activity under all conditions

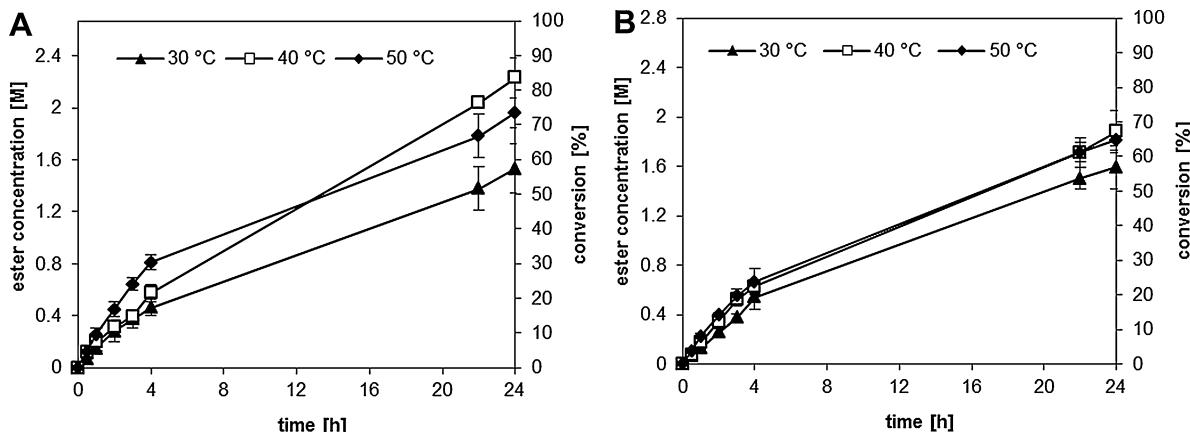


Figure 2. Ester concentration and conversion of PKO in a transesterification reaction catalyzed by immobilized CAL-A. Refined PKO and ethanol were used as substrates. The water content was 10% (A) or 5% (B) (based on the weight of oil) and reaction temperatures of 30, 40, and 50°C were applied. All samples were prepared as triplicates.

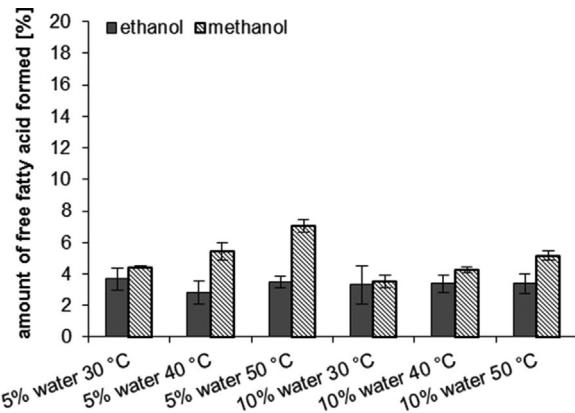


Figure 3. Percentage of free lauric acid relative to the total products (free lauric acid and lauric acid ester) after 24 h biocatalysis under different reaction conditions (temperature and water content) with refined PKO and methanol or ethanol as alcohol donor, catalyzed by immobilized CAL-A.

studied, and that methanol inactivates the enzyme to a larger extent, compared to ethanol.

4 Discussion

The presented results show that under the same reaction conditions, transesterification reactions with methanol lead to higher conversions than with ethanol. In general, the conversions obtained with methanol are quite high (between 85 and 95%) for all investigated conditions, significantly improved compared to the ones observed with ethanol (55–85%), implying a preference of CAL-A for methanol. In the case of ethanol, the water content seems to play a significant role, as the conversions observed were better at higher water content. This is not related to the selectivity of the CAL-A towards the transesterification; in all cases the major product was the ester and only rather small amounts of free fatty acids were detected. Hence, lipase CAL-A also does not exhibit a positional selectivity toward the esters bonds in the triglycerides of PKO. In the case of methanol, the free fatty acid content was higher compared to reactions with ethanol. More interestingly, the hydrolysis reaction with methanol was favored at higher temperatures, which was not observed for reactions with ethanol. As we have also shown in previous work [18], CAL-A strongly favors the transesterification, even in aqueous medium.

However, methanol is known to inactivate enzymes [19] faster than ethanol, which is in line with our results. The long term stability test underlines that the inactivation of CAL-A immobilize is stronger with methanol than with ethanol. Practically, this was overcome by the stepwise addition of methanol when working at a water content of 5%, due to inactivation problems. The reasons for the partly strong

Table 1. Residual activity (%) of immobilized CAL-A after incubation under biocatalysis conditions for 97 h. The reaction temperature was 40°C and refined PKO was used as oil substrate. The residual activity was measured by pH-stat and the activity of the non-treated immobilize was used as reference (100%)

Alcohol	Methanol	Ethanol
Water content	5% 10%	5% 10%
Res. activity [%]	24.1 ± 8.3 29.4 ± 5.7	42.2 ± 2.9 40.2 ± 1.7

inactivation caused by methanol even on enzymes that are otherwise resistant to organic solvent are not completely understood but some case studies are described in literature [20, 21]. Kulschewski et al. [20] described the effect of different methanol concentrations on CAL-B in a defined model system revealing that inhibition by methanol occurs at relatively low methanol concentrations while structural changes require higher concentrations.

5 Conclusions

In this work, we could demonstrate that with lipase CAL-A ester formation takes place almost exclusively even if 5–10% water is present in the reaction system. This underlines that CAL-A has a strong and unique acyltransferase activity. Investigation of various reaction parameters revealed that ester formation depends on temperature, water content, and type of alcohol donor. Methanol lead to higher conversions under all conditions studied, but also inactivated the enzyme more strongly than ethanol. On the other hand, lower ester formation took place with ethanol. Further work to improve methanol tolerance of CAL-A would be desirable as it could already be shown for lipase CAL-B that methanol inactivation can be reduced by either protein engineering of the lipase or by improving the process strategy [19].

We are grateful to the FNR, GÜLZOW, Germany (FKZ: 22005311) for financial support within the Metaglyc2.0 project. We also thank the BASF Personal Care and Nutrition GmbH for supplying plant oils and useful discussions. In addition to that the authors wish to thank Dr. Ioannis Pavlidis and Dr. Dominique Böttcher for editing the manuscript.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Moser, B. R., *Biofuels*. Springer, Berlin Heidelberg 2011, pp. 285–347.
- [2] Schrader, J., Etschmann, M., Sell, D., Hilmer, J.-M., Rabenhorst, J., Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.* 2004, 26, 463–472.

- [3] Mittelbach, M., Wörgetter, M., Pernkopf, J., Junek, H., Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl ester. *Energ. Agr.* 1983, 2, 369–384.
- [4] Vicente, G., Martinez, M., Aracil, J., Integrated biodiesel production: A comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.* 2004, 92, 297–305.
- [5] Hills, G., Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 601–607.
- [6] Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 91, 12–15.
- [7] Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., et al., Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 1999, 88, 627–631.
- [8] Mittelbach, M., Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1990, 67, 168–170.
- [9] Brenneis, R., Baeck, B., Kley, G., Alcoholysis of waste fats with 2-ethyl-1-hexanol using *Candida antarctica* lipase A in large-scale tests. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2004, 106, 809–814.
- [10] Müller, J., Fredrich, B., Kohlmann, C., Maksym, L., Bornscheuer, U. T., A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2014, 116, 232–236.
- [11] Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., et al., High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2004, 111, 41–50.
- [12] Rupilius, W., Ahmad, S., Palm oil and palm kernel oil as raw materials for basic oleochemicals and biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007, 109, 433–439.
- [13] Stamenković, O. S., Veličković, A. V., Veljković, V. B., The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. *Fuel* 2011, 90, 3141–3155.
- [14] Haki, G., Rakshit, S., Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour. Technol.* 2003, 89, 17–34.
- [15] Schörken, U., Kempers, P., Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *Bioresour. Technol.* 2009, 111, 627–645.
- [16] Yang, C., Wang, F., Lan, D., Whiteley, C., Yang, B., Wang, Y., Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*. *Proc. Biochem.* 2012, 47, 533–537.
- [17] Vorhaben, T., Böttcher, D., Jasinski, D., Menyes, U., et al., Plasma-modified polypropylene as carrier for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B and *Pyrobaculum calidifontis* esterase. *ChemCatChem* 2010, 2, 992–996.
- [18] Müller, J., Sowa, M. A., Fredrich, B., Brundiek, H., Bornscheuer, U. T., Enhancing the acyltransferase activity of *Candida antarctica* lipase A by rational design. *Chem-BioChem*, DOI: 10.1002/cbic.201500187.
- [19] Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., Ferrer, P., Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnol. J.* 2015, 10, 22–30.
- [20] Kulszewski, T., Sasso, F., Secundo, F., Lotti, M., Pleiss, J., Molecular mechanism of deactivation of *C. antarctica* lipase B by methanol. *J. Biotechnol.* 2013, 168, 462–469.
- [21] Santambrogio, C., Sasso, F., Natalello, A., Brocca, S., et al., Effects of methanol on a methanol-tolerant bacterial lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 8609–8618.

Supplement

Fatty Acid Profile

To determine the fatty acid profile of the refined PKO used, methyl esters were synthesized chemically. Boiling chips (2-3) and 6 ml 0.5 N methanolic sodium hydroxide solution were added to 350 mg oil in a 100 ml round-bottom flask. This solution was boiled under reflux for 5-10 min. Afterwards 7 ml of methanolic boron trifluoride solution were added through the reflux condenser and boiled for additional 2 min. Hexane (3.5 ml) was added to the solution and it was boiled for 1 min. After this, a small amount of saturated sodium chloride solution was added to the mixture, so that the organic phase could be transferred in another vessel. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate and analyzed by GC as soon as possible.

For GC analysis the BPX-5 (length: 25 m, diameter: 0.22 mm) and BPX-70 (length: 30 m, diameter: 0.25 mm) columns were used (Tab. S3 and S4). The BPX-70 was used to separate the methyl esters of linoleic acid and oleic acid. Two different programs were used for these columns. The quantification of the different methyl esters was done with standard curves.

Tab. S1. Temperature program used for GC analysis of the fatty acid profile with the column BPX-5. The column flow was 1.4 ml/min, 1 μ l of the sample was injected with a split of 25.8.

rate [°C/min]	temp. [°C]	time [min]
-	80	10
10	220	10
2	225	4
10	300	10

Tab. S2. Temperature program used for GC analysis of the fatty acid profile with the column BPX-70. The column flow was 1.32 ml/min, 1 μ l of the sample was injected with a split of 40.

rate [°C/min]	temp. [°C]	time [min]
-	60	5
10	230	10

After the analysis by GC the fatty acid profile of the PKO was determined and the average molecular weight was calculated to be 702.5 g/mol.

Tab. S3. Fatty acid profile of the used refined PKO.

Fatty acid	Conc. [%]
Caprylic acid (C8)	4.2
Decanoic acid (C10)	2.8
Lauric acid (C12)	50.9
Myristic acid (C14)	16.2
Palmitic acid (C16)	6.1
Stearic acid (C18)	1.6
Oleic acid (C18:1)	16.3
Linoleic acid (C18:2)	2.0

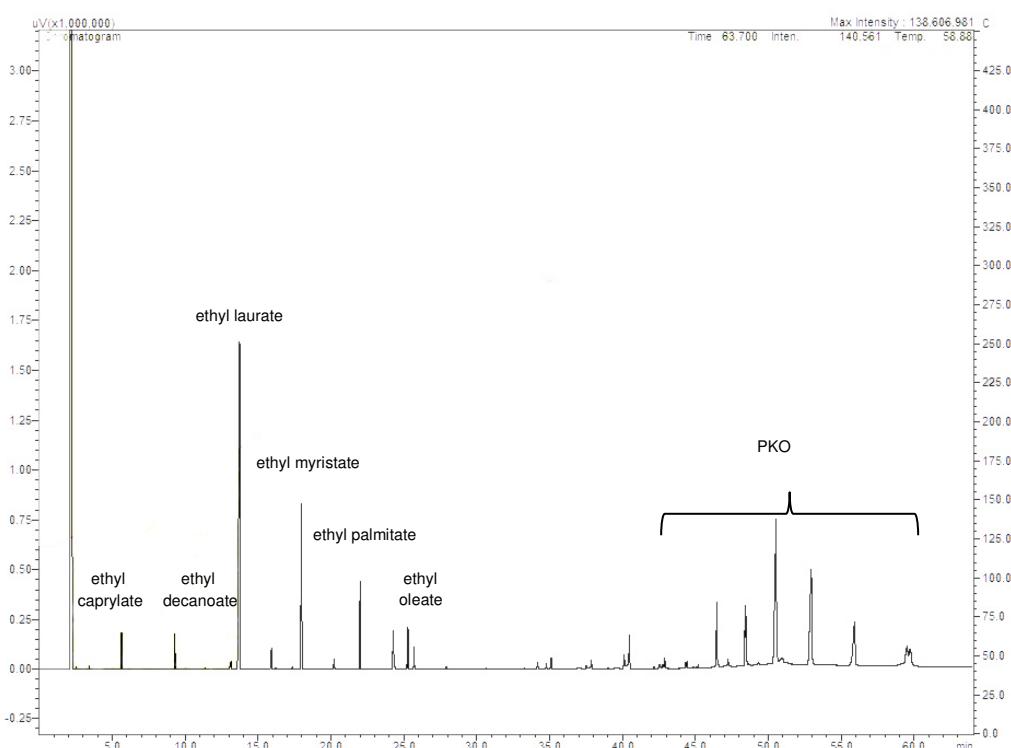


Figure S1. GC chromatogram of a biocatalysis sample from a transesterification of PKO with ethanol catalyzed by lipase CAL-A. The peaks of the relevant compounds are labelled.



Figure S2. Adapter for the Eppendorf shaker that was used for the biocatalysis reactions performed at a larger scale.

Inactivation of CAL-A

Figure S3 shows that almost no ester is generated, if methanol is added in one portion at a water content of 5 %. To investigate whether this is related to denaturation of CAL-A, biocatalysis was performed at a larger scale as described for the long term stability test in the main text. The reaction was performed at 40°C and 1200 rpm for approx. 3.8 h. The immobilized CAL-A was recovered afterwards through separation from liquid components by centrifugation, washed two times with 2 ml of ethanol, dried and the remaining activity was measured by pH-stat. The recovered immobilizates showed no activity above the autohydrolysis rate. Therefore, one can conclude that the enzyme was inactivated under the reaction conditions used. A certain amount of immobilize was just washed with ethanol and the activity was measured to exclude that the washing steps lead to inactivation (data not shown).

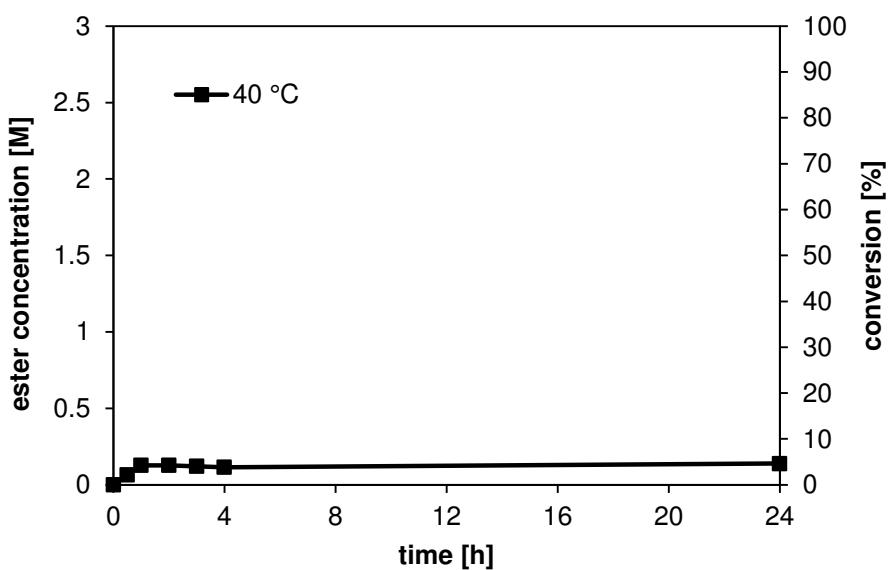


Figure 3. Ester formation and conversion in a transesterification reaction catalyzed by immobilized CAL-A. Refined PKO and methanol were used as substrates. The water content was 5 %, the reaction temperature 40 °C and methanol was added in one portion.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Unterschrift Janett Müller

Eigenständigkeitserklärung

Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

- Seit 06/2015 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich der *targeted proteomics* an der Universitätsmedizin Greifswald in der Abteilung für klinische Pharmakologie
- 10/2011-03/15 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der E.-M.-A.-Universität Greifswald im Arbeitskreis für Biotechnologie & Enzymkatalyse
- 10/2014-03/15 Betreuung der Pharmaziestudierenden im Praktikum „Allgemeine und analytische Chemie anorganischer Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe“ sowie Durchführung des dazugehörigen Seminars

Veröffentlichungen

Publikationen im Rahmen der kumulativen Dissertation

- 02/2014 J. Müller*, B. Fredrich*, C. Kohlmann, L. Maksym, U. T. Bornscheuer, A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, 116, 232-236.
- 06/2015 J. Müller, M. A. Sowa, B. Fredrich, H. Brundiek, U. T. Bornscheuer, Enhancing the acyltransferase activity of *Candida antarcica* lipase A by rational design, *ChemBioChem* **2015**, 16, 1791-1796
- 07/2015 J. Müller, M. A. Sowa, M. Dörr, U. T. Bornscheuer, The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, 117, 1903-1907

Weitere Publikationen

- 08/2015 D. Last, J. Müller, A. W. H. Dawood, E. J. Moldenhauer, I. V. Pavlidis, U. T. Bornscheuer, Highly efficient and easy protease-mediated protein purification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, accepted manuscript, DOI: 10.1007/s00253-015-7206-9

Danksagung

Hiermit möchte ich mich als erstes bei Prof. Dr. Uwe Bornscheuer für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie die Unterstützung und Hilfe in den letzten Jahren bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) für die finanzielle Förderung des Projektes und der BASF Personal Care and Nutrition GmbH sowie allen weiteren Projektpartnern für die interessanten Diskussionen und Anregungen bedanken. Dabei gilt besonderer Dank Dr. Lukas Maksym, Dr. Christina Kohlmann und Dr. Anne van den Wittenboer als Projektmanager bei der BASF Personal Care and Nutrition GmbH sowie Dr. Henrike Brundiek und Eric Kupitz als Ansprechpartner bei der Enzymicals AG.

Ich möchte mich weiter bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Biotechnologie & Enzymkatalyse bedanken. Ihr seid einfach toll und ich bin stolz darauf, dass viele von euch nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde für mich sind. Ioannis, Mark und Dominique möchte ich nochmals besonders für ihre Unterstützung im Rahmen des Projektes und für die Hilfe beim Verfassen der Publikationen danken.

Des Weiteren bedanke ich mich vielmals bei Miri, Birti, Jule, Nika und Benni, die im Rahmen einer Abschlussarbeit, Hiwi-Stelle oder eines Praktikums an diesem Projekt mitgearbeitet haben. Es war mir stets eine große Freude, mit euch zusammenzuarbeiten und besonders Miri und Birti waren eine enorme Hilfe im Labor.

Ebenso bedanke ich mich bei all meinen Freunden, ihr wart in den letzten Jahren immer für mich da und habt mich aufgeheizt, wenn gerade gar nichts mehr lief. Mit euch kann ich Pen-&-Paper spielen, SchleFaZ gucken, ins Kino, Theater oder Museum gehen oder einfach nur einen entspannten Abend verbringen. Für all diese Dinge bin ich euch unendlich dankbar.

Meiner Familie danke ich, dass sie es mir ermöglicht haben zu studieren, damit ich den Beruf ergreifen konnte, den ich wollte. Auch ihr habt mich immer unterstützt und ich weiß, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Zum Schluss möchte ich mich noch beim besten Mann der Welt bedanken. Paul, du hast in den letzten Jahren alle Hochs und Tiefs miterlebt und warst immer an meiner Seite. Dafür kann ich dir gar nicht genug danken und ich hoffe, dass wir noch lange so glücklich sind.