

# **Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
Ulrike Schmid  
aus Nürtingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf Schmid  
Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Schwack  
Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2000

Institut für Technische Biochemie  
Universität Stuttgart

1999

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Rolf Schmid für dieses überaus interessante und vielseitige Thema, das mir sowohl biokatalytisches Arbeiten als auch einen Einstieg in die genetische Methodenvielfalt ermöglichte. Seine vertrauensvolle Betreuung erlaubte mir ein optimales Arbeiten. Ich danke ihm sehr für seine konstruktiven Anregungen und seinen Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. Uwe Bornscheuer, Leiter der Biokatalysegruppe, für die vielen Diskussionen und hilfreichen Vorschläge zu meiner Arbeit und die gute Zusammenarbeit während dieser Zeit sowie für die superschnellen und konstruktiven Korrekturen von Veröffentlichungen, Abstracts und natürlich dieser Arbeit.

Dr. Jutta Schmitt, Leiterin der Genetikgruppe, die mir verständlich das genetische Arbeiten erklärte und immer gerne mit mir meine genetischen Probleme und Fortschritte erörterte und Lösungen mit mir erarbeitete.

Elisabetta Catoni, die mir beim genetischen Arbeiten mit hilfreichen Tips zur Seite stand.  
Holger Scheib für die Betrachtung der Mutanten aus *Candida rugosa* nach dem rationalen Design und Volker Nödinger für die Hilfsbereitschaft im Labor und das Anfertigen meiner Sequenzen.

Dem BMBF und Lodars Crokiaan für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit

Allen ITBlern, die dazu beitrugen, dass mir meine Arbeit am ITB so viel Freude gemacht hat. In schöner Erinnerung werden mir auch die Gespräche z. B. beim Mittagessen mit Sabine, Jutta und Jürgen bleiben, in denen es uns meistens gelang über andere Dinge als Arbeit zu reden, und natürlich die vielen Feste, die es zu feiern gab.

Sandra Pisch für die fachlichen und auch weniger fachlichen Gespräche.

Meinen Freunden Silke, Martina, Hermann, Annegret, Holger und Christina, Dave und Andrea, Ralf und Daniela, Thomas und Steffi.

Meinen Eltern Doris Schmid und Uli Schmid, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Meinem Mann Andreas für das Mitfühlen und die Diskussionen über meine Arbeit. Das gleichzeitige Anfertigen unserer Doktorarbeiten mit zwei Computern an einem Schreibtisch bleibt uns sicher noch lange in Erinnerung.

für Andreas

für meine Eltern

**Abkürzungen**

ABA	Triglycerid mit Fettsäuren A und B, wobei $A \neq B$
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
$a_w$	Wasseraktivität
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CRL	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>
Cy	Caprylsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
1,2(2,3)-DG	1,2(2,3)-Diglyceride
1,3-DG	1,3-Diglyceride
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DHA	Docosahexaensäure
EP 100	Polypropylen
EPA	Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LCT	langkettige Fettsäuren (longchain fatty acids)
Lipozyme IM	Lipase von <i>Rhizomucor miehei</i> immobilisiert auf Anionenaustauscher
1(3)-MG	1(3)-Monoglyceride
2-MG	2-Monoglyceride
min	Minute
MLM	Triglycerid mit M = mittelkettige Fettsäure; L = langkettige Fettsäure
2-MO	2-Monoolein

1-MP	1-Monopalmitin
2-MP	2-Monopalmitin
MSHFBA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -Trimethylsilylheptafluorbutyramid
MTBE	Methyl- <i>tert.</i> -butylether
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OS	Ölsäure
OPO	1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerin
PA	Palmitinsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
POP	1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerin
POSt	1-Palmitoyl-3-stearoyl-2-oleoylglycerin
PPL	Schweinepankreaslipase
PPP	Tripalmitin
RDL	Lipase aus <i>Rhizopus delemar</i>
RML	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
Ser	Serin
slip1	synthetisches Lipasegen 1 aus <i>Candida rugosa</i>
ST	strukturierte(s) Triglycerid(e)
StOSt	1,3-Distearoyl-2-palmitoylglycerin
Tab.	Tabelle
TG	Triglycerid
TO	Triolein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit
WT	Wildtyp
% w/t	Gewichtsprozent
% v/v	Volumenprozent

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Lipasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Einfluss des Lösungsmittels	5
1.1.2	Einfluss des Wassergehalts bzw. der Wasseraktivität	6
1.1.3	Einfluss des Trägermaterials	7
<b>1.2</b>	<b>Enzymkinetik</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Eigenschaften von Fetten und Ölen</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Ernährungsphysiologische Bedeutung von Fetten, Ölen und strukturierten Triglyceriden</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Metabolismus von Fetten und Ölen</b>	<b>12</b>
<b>1.6</b>	<b>Chemisch-physikalische Methoden zur Fettmodifikation</b>	<b>15</b>
1.6.1	Umesterung	15
1.6.2	Hydrierung	16
1.6.3	Fraktionierung	16
<b>1.7</b>	<b>Lipase-katalysierte Fettmodifikationen</b>	<b>17</b>
1.7.1	Einschrittsynthese	18
1.7.2	Zweischrittsynthese	20
<b>1.8</b>	<b>Gerichtete Evolution von Enzymen</b>	<b>24</b>
<b>1.9</b>	<b>Veränderung der Kettenlängenspezifität einer Lipase aus <i>Candida rugosa</i></b>	<b>27</b>
<b>1.10</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Ergebnisse Teil I: Lipase-katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Entwicklung einer effizienten Analytik</b>	<b>30</b>
<b>2.2</b>	<b>Einfluß des Lösungsmittels auf die Alkoholyse von Triolein</b>	<b>33</b>
<b>2.3</b>	<b>Untersuchung der Kinetik der Alkoholysereaktion am Beispiel Triolein</b>	<b>34</b>
2.3.1	Bestimmung von $V_{max}$ und $K_m$	35
<b>2.4</b>	<b>Hoch-selektive Synthese von 1,3 Dioleoyl-2-palmitoylglycerin (OPO) nach dem Zweischrittverfahren</b>	<b>36</b>
2.4.1	<b>Alkoholyse von Tripalmitin</b>	<b>36</b>
2.4.2	<b>Veresterung von 2-Monopalmitin mit Ölsäure</b>	<b>46</b>
<b>2.5</b>	<b>Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Ölen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren</b>	<b>54</b>
2.5.1	Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Leinöl	55
2.5.2	Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Fischöl	56
2.5.3	Darstellung von Kakaobutteräquivalenten	60

<b>3</b>	<b>Ergebnisse Teil II: Gerichtete Evolution des <i>slip1</i>-Gens aus <i>Candida rugosa</i></b>	<b>62</b>
3.1	Ortsspezifische Mutagenese	63
3.2	Gerichtete Evolution – error-prone PCR	67
3.3	Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
3.4	Tributyrylplatten-Assay	68
3.5	Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Assays	69
3.5.1	Mikrotiterplattenassay mit <i>p</i> -Nitrophenylestern	70
3.5.2	Screening der <i>slip1</i> "Mutantenbibliothek" aus <i>Candida rugosa</i>	72
3.6	Sequenzierung positiver Klone	73
3.6.1	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
3.6.2	Ergebnis der Sequenzierung	74
3.7	Charakterisierung der Mutanten	75
3.8	3-D-Struktur der Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Lipase-katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride	79
4.1.1	Entwicklung einer effizienten Analytik	79
4.1.2	Kinetische Untersuchungen	80
4.1.3	Synthese von OPO	81
4.1.4	Synthese von strukturierten Triglyceriden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren	86
4.2	Gerichtete Evolution des <i>slip1</i> -Gens aus <i>Candida rugosa</i>	87
4.2.1	Error prone PCR	88
4.2.2	Entwicklung eines <i>p</i> -Nitrophenylesterassays in Mikrotiterplatten	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>92</b>
6.1	Biotransformation	92
6.1.1	Bestimmung der hydrolytischen Lipaseaktivität	92
6.1.2	Adsorptive Immobilisierung von Lipasen	92
6.1.3	Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer	93
6.1.4	Einstellung der Wasseraktivität	94
6.1.5	Bestimmung der freien Fettsäuren mittels GC	94
6.1.6	Bestimmung der gebundenen Fettsäuren	95
6.1.7	Regiospezifische Analyse von Triglyceriden mit Pankreaslipase	95
6.1.8	Regiospezifische Analyse von Triglyceriden mit Grignard-Reagenz	96

6.1.9	Trennung von Triglyceriden, Fettsäuren, Di- und Monoglyceriden mittels Säulenchromatographie .....	96
6.1.10	Lipase-katalysierte Synthese von OPO .....	98
6.1.11	Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Leinöl .....	100
6.1.12	Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Fischöl.....	102
6.1.13	Darstellung von Kakaobutteräquivalenten .....	105
<b>6.2</b>	<b>Molekulargenetische und mikrobiologische Techniken und Methoden .....</b>	<b>106</b>
6.2.1	Übernachtskultur für kompetente Zellen.....	106
6.2.2	Herstellung von kompetenten Zellen .....	106
6.2.3	Transformation in DH5 $\alpha$ .....	106
6.2.4	Plasmid Midipräparation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit.....	106
6.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	107
6.2.6	Quik-change zur Durchführung einer ortsspezifischen Mutagenese .....	107
6.2.7	Transformation mit Epicurian coli superkompetenten Zellen.....	108
6.2.8	Übernachtskultur für <i>E. coli</i> .....	108
6.2.9	Hauptkultur für <i>E. coli</i> .....	109
6.2.10	Plasmid Flexipräparation .....	109
6.2.11	Verdau mit <i>Bgl</i> .....	109
6.2.12	Verdau mit <i>Bgl</i> und <i>Bam</i> HI .....	109
6.2.13	Error prone PCR .....	110
6.2.14	Agarosegel-Extraktion .....	110
6.2.15	Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	110
6.2.16	Glycerinstock.....	112
6.2.17	Tributyrylplatten-Assay.....	112
6.2.18	p-Nitrophenylester –Assay in Mikrotiterplatten.....	112
6.2.19	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	113
6.2.20	Plasmid Minipräparation mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit.....	114
6.2.21	DNA-Sequenzierung .....	115
6.2.22	Kultivierung von Hefeklonen im 2l Maßstab.....	116
6.2.23	Konzentrierung der Lipase durch Ultrazentrifugation .....	117
6.2.24	SDS-Polyamidacrylgelelektrophorese .....	117
6.2.25	Kompetitiver Assay zur Bestimmung der Kettenlänge selektivität der Mutanten .....	118
6.3	Chemische Synthesen .....	121
6.3.1	Synthese von p-Nitrophenyldocosanat .....	121
6.3.2	Synthese von p-Nitrophenyleicosapentanoat.....	121
<b>6.4</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>122</b>

---

6.4.1	Lipasen .....	122
6.4.2	Chemikalien .....	122
6.4.3	Medien, Puffer und Lösungen .....	125
6.4.4	Geräte .....	130
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>133</b>
7.1	Sequenz des synthetischen <i>lip1</i> -Gens aus <i>Candida rugosa</i> .....	133
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>136</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>138</b>
<b>10</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>139</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipasen

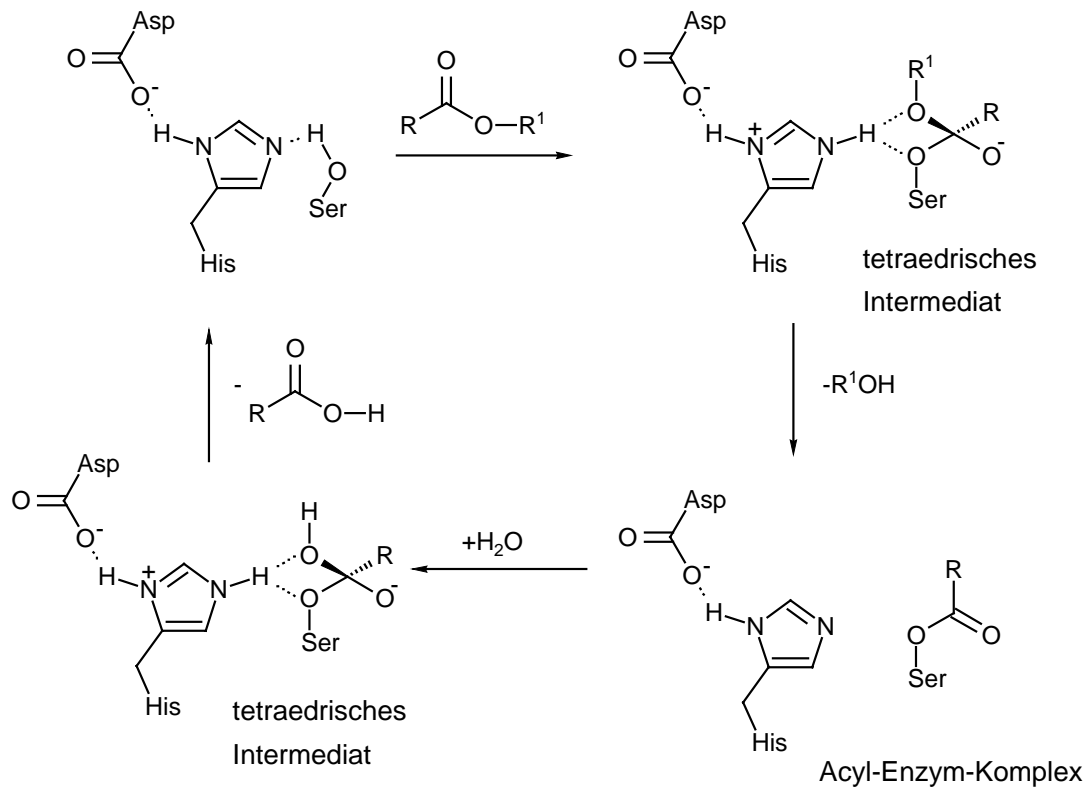
Lipasen sind wie Esterasen und Phospholipasen Triacylglycerid-Hydrolasen (EC 3.1.1.3.), die in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen als zelluläre und extrazelluläre Proteine vorkommen. Lipasen heben sich von den Esterasen durch Unterschiede im Substratspektrum ab. Lipasen bevorzugen wasserunlösliche Substrate, sind aber durchaus in der Lage, Triglyceride aus kurzkettigen Fettsäuren umzusetzen. Im Gegensatz dazu hydrolysieren Esterasen nur kurzkettige, wasserlösliche Substrate (Brockerhoff and Jensen, 1974). Ein weiteres Unterscheidungskriterium begründet sich auf den Raumstrukturen. Lipasen haben einen Deckel (engl.: lid) über dem aktiven Zentrum, der bei Esterasen fehlt. Als geeignet erweist sich die Klassifizierung der Lipasen nach Proteinsequenzen, die in Übereinstimmung mit 3-D-Strukturen stehen (Tab. 1).

**Tabelle 1** Klassifizierung kommerziell erhältlicher Lipasen nach Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999; Cygler et al., 1993; Svendsen, 1994)

Klassifizierung	Größe	Beispiele
<b>Lipasen aus Säugetieren</b> (Pankreaslipasen)	50 kDa	PPL
<b>Lipasen aus Pilzen</b>		
<i>Candida rugosa</i> Familie	60-65 kDa	CRL, GCL, CE
<i>Rhizomucor</i> Familie	30-35 kDa	CAL-B, RML, ROL, HLL
Unklassifiziert		ANL, CAL-A, CLL
<b>Lipasen aus Bakterien</b>		
<i>Pseudomonas</i> Familie	30-35 kDa	PCL, PFL, CVL
<i>Staphylococcus</i> Familie	40-45 kDa	BTL2

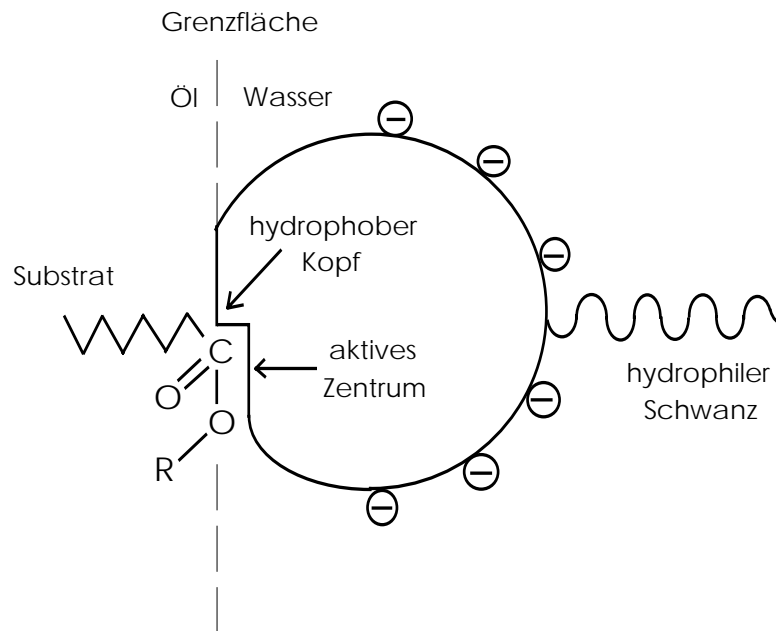
Sowohl Lipasen als auch Esterasen sind  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen, d.h. sie weisen eine  $\alpha/\beta$ -Faltung auf. Die Faltung besteht aus acht parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die auf beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Abb. 1)(Ollis et al., 1992).





**Schema 1** Mechanismus der Lipase-Katalysierten Hydrolyse von Esterbindungen

Lipasen sind essentielle Bestandteile des Fettstoffwechsels und hydrolysieren die Esterbindungen von Glycerinestern an einer Öl/Wasser-Grenzfläche (Abb. 2). Bevorzugt hydrolysieren sie dabei wasserunlösliche Substrate wie z.B. Olivenöl. Dabei kommt es zu einer Grenzflächenaktivierung (engl.: interfacial activation). Die Kristallstrukturen von Enzymen zeigen gewöhnlich die geschlossene Konformation, bei der ein Deckel über dem aktiven Zentrum der Lipase liegt. Im Gegensatz dazu zeigen Kristallstrukturen, die gebundene Übergangszustandsanaloge oder Triglyceride enthalten, die offene Konformation, bei welcher der Deckel geöffnet ist und einen Zugang zum aktivem Zentrum erlaubt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Grenzflächenaktivierung durch Lipid-induzierte Veränderung der Deckelkonformation ermöglicht wird (Brady et al., 1990; Grochulski et al., 1993; Winkler et al., 1990). Gegen wasserlösliche Substrate zeigen Lipasen eine schlechte Aktivität, da der Deckel über dem aktiven Zentrum der Lipase geschlossen bleibt. Bei Bindung an eine hydrophobe Oberfläche wie z.B. an einen Öltropfen öffnet sich der Deckel und die katalytische Aktivität der Lipase erhöht sich.



**Abbildung 2** Modell für die Grenzflächenaktivierung von Substraten durch Lipasen

Diese Grenzflächenaktivierung stellt zudem einen wichtigen Unterschied zu den Esterasen dar, bei denen ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden konnte.

Lipasen zeigen verschiedene Spezifitäten gegenüber Fetten und Ölen. Diese lassen sich in fünf verschiedene Gruppen einteilen (Villeneuve und Foglia, 1997):

#### a) Substratspezifität

Acylglyceride sind die normalen Substrate für Lipasen. Das bedeutet, dass Lipasen nicht nur Triglyceride sondern auch Diglyceride, Monoglyceride und Phospholipide spalten können. Bestimmte Lipasen zeigen eine Präferenz für bestimmte Acylglyceride. So weist z.B. eine Lipase aus *Penicillium camembertii* eine deutlich hydrolytische Aktivität gegen Monoglyceride und Diglyceride auf, nicht aber gegen Triglyceride (Yamagushi und Mase, 1991).

#### b) Positionsspezifische oder regioselektive Lipasen

Regioselektivität ist definiert als die Fähigkeit von Lipasen, zwischen den zwei außenständigen Positionen (*sn1* bzw. *sn3*-Position) und der innenständigen Position (*sn2*-Position) zu unterscheiden. So hydrolysieren *sn1,3*-regiospezifische Lipasen bevorzugt die *sn1* bzw. *sn3*-Position. Bedeutende Vertreter von *sn1,3*-regiospezifischen Lipasen sind Lipasen aus *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* und *Aspergillus niger*. Als *sn2*-

regiospezifische Lipase ist nur eine Lipase aus *Candida antarctica* A bekannt (Rogalska et al., 1993).

### c) Unspezifische Lipasen

Einige Lipasen weisen keine speziellen regiospezifischen Eigenschaften auf und hydrolysieren alle Esterbindungen mehr oder weniger gleich. Unspezifische Lipasen konnten vorwiegend aus den Organismen *Candida rugosa* und *Pseudomonas cepacia* isoliert werden.

### d) Fettsäurespezifische oder acylselektive Lipasen

Manche Lipasen können für ganz bestimmte Fettsäuren spezifisch sein, wie z.B. eine Lipase aus *Geotrichum candidum* (Jensen et al., 1983), die hochspezifisch gegenüber  $\Delta^9$ -ungesättigten Fettsäuren (z.B. Ölsäure) ist. Andere Lipasen wiederum zeigen eine erhöhte Aktivität gegenüber kurzkettigen Fettsäuren wie Lipasen aus *Penicillium roquefortii* (Mase et al., 1995).

### e) Stereospezifische Lipasen

Diese Lipasen können z.B. zwischen der *sn*1-Position und der *sn*3-Position im Triglycerid unterscheiden. Die menschliche Zungenlipase ist eine *sn*1-spezifische Lipase, die in der Fettverdauung eine bedeutende Rolle spielt (Jensen et al., 1982). Eine große Anzahl weiterer Lipasen aus *Humicola lanuginosa*, *Pseudomonas fluorescens* etc. weisen Stereospezifität auf (Rogalska et al., 1993).

## 1.1.1 Einfluss des Lösungsmittels

Das übliche Reaktionsmedium für Enzyme ist Wasser. Das Arbeiten in nichtwässrigem Medium erlaubt jedoch Enzymen, Reaktionen zu katalysieren, die kinetisch oder thermodynamisch in wässrigem Medium unmöglich sind, z.B. die Acylierung von Substraten mit Hilfe von Enzymen. Organische Lösungsmittel können die Leistung von Enzymen bezüglich Stabilität, Spezifität und Enantioselektivität beeinflussen (van Tol et al., 1992). Wichtig ist deshalb die Wahl des richtigen Lösungsmittels. Ein geeignetes Auswahlkriterium stellt das logP-Konzept dar. Der logP-Wert entspricht dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines Lösungsmittels in einem Oktanol-Wasser-Gemisch. Die enzymatische Aktivität ist bei logP-Werten kleiner zwei gering, dagegen bei logP-Werten größer vier relativ hoch. In einem logP-Bereich zwischen zwei und vier lässt sich die Aktivität von Lipasen nur schwer vorhersagen (Laane et al., 1987).

**Tabelle 2** Übersicht über einige Lösungsmittel und deren logP-Werte (Laane et al., 1987)

logP-Wert < 2		logP-Wert >2 bis < 4		logP-Wert > 4	
Ethanol	- 0.24	Chloroform	2.0	Heptan	4.0
Aceton	- 0.23	Toluol	2.5	Oktan	4.5
Ethylacetat	0.68	Oktanol	2.9	Decan	5.6
Diethylether	0.85	Hexan	3.5		

### 1.1.2 Einfluss des Wassergehalts bzw. der Wasseraktivität

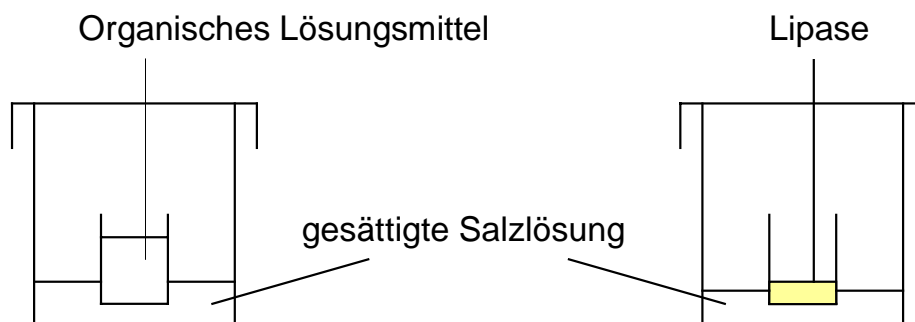
Lipasen benötigen zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität eine bestimmte Menge an Wasser, die bei etwa 1-3 % in polaren und 0.05-1 % in unpolaren Lösungsmitteln liegt (Adlercreutz, 1994; Rupley et al., 1983).

Da Wasser nicht nur frei, sondern auch an Enzymmoleküle und Substrate gebunden vorliegen kann, stellt die thermodynamische Wasseraktivität ( $a_w$ ) ein besseres Maß zur Optimierung Enzym-Katalytischer Reaktionen dar. Die thermodynamische Wasseraktivität ist definiert als:

$$a_w = P/P_0 = \text{Wasserdampfdruck in der Salzlösung/Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers}$$

Zur Kontrolle der Wasseraktivität gibt es verschiedene Möglichkeiten:

- Äquilibrierung von Enzym und Lösungsmittel über gesättigten Salzlösungen (Abb. 3) (Adlercreutz, 1991; Goderis et al., 1986; Valivety et al., 1992a)
- Äquilibrierung mit Salzhydraten (Halling, 1992; Kvittingen et al., 1992)
- Messung mit einem  $a_w$ -Sensor (Khan et al., 1990)



**Abbildung 3** Äquilibrierung von Lösungsmittel und Lipase über gesättigte Salzlösungen

Die Beziehung zwischen Wasseraktivität und katalytischer Aktivität in organischem Lösungsmittel (Valivety et al., 1994) bzw. verschiedenen Lösungsmitteln (Valivety et al., 1992b) und Substraten (Kvittingen et al., 1992) wurde ausführlich untersucht. Dabei zeigte sich, dass die katalytische Aktivität von Lipasen stark von der Wasseraktivität abhängt (Valivety et al., 1992a). So war eine Lipase aus *Rhizomucor miehei* bei einer Wasseraktivität unter 0.0001 aktiv (Valivety et al., 1992c), während für andere Lipasen die Wasseraktivität zwischen 0.11 und 1.0 variiert (Valivety et al., 1992a)

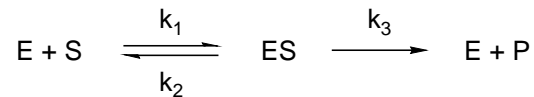
### 1.1.3 Einfluss des Trägermaterials

In organischen Lösungsmitteln zeigen Lipasen in der Regel geringere Aktivität als in wässrigem Medium, da sie suspendiert vorliegen und nicht gelöst sind (Bornscheuer et al., 1994). Eine einfache Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms zu erhöhen, stellt die Immobilisierung auf einem Träger dar. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten. In der vorliegenden Arbeit, wurden ausschließlich durch Adsorption gebundene Enzyme verwendet. Die adsorptive Methode ist die älteste und zugleich einfachste Immobilisierungsmethode und beruht hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Biokatalysator und Träger. Als Träger dienen sowohl anorganische Stoffe wie Aktivkohle, silikatische und mineralische Materialien (Celite), als auch organische Materialien wie natürliche und synthetische Polymere (Polypropylen), die in der Regel keine besonderen funktionellen Gruppen tragen. Hauptvorteil der Adsorptionsmethode ist, dass durch die relativ schwachen Bindungskräfte die biologische Aktivität des Enzyms kaum beeinträchtigt wird. Durch die Schwäche der Bindungen kann es allerdings bereits bei geringen Änderungen von z.B. Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur, Substrat- und Produktkonzentration zur Desorption des Biokatalysators kommen (Malcata et al., 1990; Wisdom et al., 1984).

Alternativ gibt es dazu die kovalente Bindungsmethode, bei der eine Bindung höherer Stabilität zwischen Enzym und Trägermaterial eingegangen wird. Dabei werden die Enzyme z.B. durch Verwendung von bifunktionellen Reagentien wie Glutaraldehyd quervernetzt. Bei diesen quervernetzten Enzymkristallen (engl.: cross-linked enzyme crystals, Abk. CLEC) handelt es sich um reine Enzymkristalle (Margolin, 1996; St. Clair und Navia, 1992). Eine ebenfalls neuere Immobilisierungsmethode ist der Einschluss von Lipasen in hydrophobe Sol-Gele. Diese entstehen durch Hydrolyse von Tetramethoxysilanen und Alkyltrimethoxysilanen in Gegenwart des Enzyms (Reetz et al., 1995).

## 1.2 Enzymkinetik

Das einfachste Modell zur Beschreibung einer Ein-Substrat-Reaktion ist das Michaelis und Menten-Modell. Die Reaktionsgleichung lautet:



Das Enzym E bindet S unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES-Komplex) mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_1$ . Dieser ES-Komplex kann entweder mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  wieder in Enzym und Substrat zerfallen, oder aber mit einer Konstanten  $k_3$  in das Produkt P und freies Enzym umgewandelt werden.

Im Fließgleichgewicht lässt sich aus Gleichung (1) unter Einführung der Michaelis-Menten Konstante die Michaelis-Menten-Gleichung (2) ableiten.

$$(1) \quad \text{Michaelis-Menten-Konstante:} \quad K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$(2) \quad \text{Michaelis-Menten-Gleichung:} \quad v = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Bei sehr kleinen Substratkonzentrationen – wenn  $[S]$  viel kleiner als  $K_M$  ist – gilt:

$V = [S] \cdot V_{\max} / K_M$ ; das heißt, die Geschwindigkeit ist der Substratkonzentration direkt proportional. Bei hohen Substratkonzentrationen – wenn  $[S]$  viel größer ist als  $K_M$  – wird  $V = V_{\max}$ ; das bedeutet, dass die Geschwindigkeit maximal ist, unabhängig von der Substratkonzentration. Bei  $[S] = K_M$  ist  $V = V_{\max} / 2$ .  $K_M$  entspricht dann der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht (Segel, 1975; Stryer, 1991).

Bei der Betrachtung von Zwei-Substrat-Reaktionen, um die es sich in dieser Arbeit ausschließlich handelt, kann das Michaelis-Menten-Modell nur bedingt herangezogen werden, da in der Ableitung der kinetischen Parameter die Konzentration des zweiten Substrates unberücksichtigt bleibt. Drei verschiedene Reaktionsmechanismen – zufälliger Bi-Bi-Mechanismus (engl.: rapid equilibrium random bi bi), geordneter Bi-Bi-Mechanismus (engl.: ordered bi bi) und Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus – werden als Modellvorstellungen in der Literatur beschrieben (Segel, 1975).

Beim zufälligen Bi-Bi-Mechanismus addieren sich die beiden Substrate A und B zufällig an das Enzym, ebenso verlassen die Produkte P und Q das Enzym zufällig. Beim geordneten

Bi-Bi-Mechanismus hingegen muß zunächst A an das Enzym E gebunden sein. Hierdurch kommt es zu einer konformativen Änderung des Enzyms, welche erst im zweiten Schritt B die Bindung an den EA-Komplex erlaubt. Für die Lipase-Katalysierte Umesterung wird der Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus angenommen (Lortie et al., 1993).

Im ersten Schritt bindet Ester A an die Lipase, gefolgt von der Abspaltung des Alkohols P. Erst jetzt bindet Alkohol B an das Acyl-Enzym F. Im letzten Schritt wird der Ester Q abgespalten und das Enzym liegt wieder in freier Form vor. Die Lipase oszilliert folglich zwischen zwei stabilen Zuständen E und F.

### 1.3 Eigenschaften von Fetten und Ölen

Seit der Zeit vor dem 2. Weltkrieg hat sich die Fetterzeugung weltweit verdoppelt. Zugenommen hat insbesondere die Produktion von Sojaöl und Palmfetten und auch von Sonnenblumenöl, während die Erträge an Seetierölen relativ gesunken sind. In Deutschland werden bevorzugt Sojaöl, Butter und Schlachtfett verbraucht.

Wichtige tierische Rohstoffe für die Fetterzeugung sind die Depot- und Organfette von Rindern und Schweinen, sowie Milchfett. Die Abtrennung tierischer Fette aus dem Gewebe ist im Gegensatz zur Gewinnung von Fetten aus Pflanzen nicht durch starre Zellwände oder durch Stützgewebe behindert. Es genügt eine Erwärmung des Fettgewebes (Trocken- oder Nassschmelze mit heißem Wasser oder Dampf). Das Fett dehnt sich aus, sprengt die Zellmembranen und fließt heraus.

Die Pflanzenfette lassen sich in Fruchtfleisch- und Samenfette einteilen. Während nur zwei Fruchtfleischfette (Olivenöl, Palmöl) von Bedeutung sind, ist die Zahl der Samenfette wesentlich größer. Alle Speiseöle mit Ausnahme des Schmalzöls sind pflanzlicher Herkunft. Vermarktet werden entweder Öle, die nur aus einer Pflanzenart stammen, z.B. Oliven-, Sonnenblumen- und Maisöl, oder Mischungen, die dann ganz allgemein als Speise-, Tafel-, oder Backöl bezeichnet werden.

Die Triglyceride werden in den Fettzellen der Säugetiere ebenso wie in höheren Pflanzen aus L-Glycerin-3-phosphat und Fettsäureestern des Coenzym A synthetisiert. Zur Bereitstellung von L-Glycerin-3-phosphat wird aus der Glykolyse stammendes Dihydroxyacetonphosphat von einer NAD-abhängigen Glycerinphosphat-Dehydrogenase reduziert. Die synthetisierten Triglyceride werden als Öltröpfchen (Sphärosomen), die von einer Membran umgeben sind, in den Geweben abgelagert. Die Fettsäurezusammensetzung der in einer bestimmten Pflanzenart synthetisierten Triglyceride hängt vom Klima, insbesondere von der Temperatur, ab. Allgemein gilt die Regel, dass Pflanzen in einem kälteren Klima einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Offensichtlich soll dadurch die Mobilität der Triglyceride erhalten bleiben.

Das Schmelzverhalten der Triglyceride hängt sowohl von der Fettsäurezusammensetzung als auch von den Positionen, die von den Fettsäuren im Glycerinmolekül eingenommen werden, ab. Mono-, Di- und Triglyceride sind polymorph, d.h. sie kristallisieren in verschiedenen Modifikationen, die mit  $\alpha$ ,  $\beta'$  und  $\beta$  bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich im Schmelzpunkt und in den spektroskopischen Eigenschaften. Beim Abkühlen des geschmolzenen Acylglycerides, beeinflusst u.a. von der Temperaturführung, wird eine der drei polymorphen Formen erhalten. Beim Erwärmen geht sie zunächst in die  $\beta'$ - und dann in die  $\beta$ -Modifikation über, die am stabilsten ist, den höchsten Schmelzpunkt aufweist und die auch bevorzugt aus einer Lösung kristallisiert. Die unterschiedlichen Eigenschaften der drei Modifikationen beruhen auf der Kristallisation in verschiedenen System. Bei der  $\alpha$ -Modifikation liegt ein hexagonales System vor. Da Bereiche der Methylenen ungeordnet sind, ist der Schmelzpunkt relativ niedrig. Die  $\beta'$ -Modifikation beruht auf dem orthorhombischen System. Dabei stehen die Kohlenstoffketten senkrecht zueinander. Dagegen liegt bei der  $\beta$ -Modifikation ein triklines System vor, d.h. eine parallele Anordnung der Kohlenstoffketten.

Ungesättigte Fettsäuren stören die regelmäßige Anordnung der Moleküle im Kristall, der Schmelzpunkt sinkt infolgedessen (Belitz and Grosch, 1992).

## **1.4 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Fetten, Ölen und strukturierten Triglyceriden**

Triglyceride sind hochkonzentrierte Speicher für Stoffwechselenergie, da sie in reduzierter und wasserfreier Form vorliegen. Bei vollständiger Oxidation liefern Fettsäuren ungefähr 38 kJ/g, gegenüber circa 17 kJ/g bei Kohlenhydraten und Proteinen. Die Ursache dieses großen Unterschieds in der Energieausbeute liegt darin, dass Fettsäuren in einem weit höher reduzierten Zustand vorliegen. Ferner sind Triglyceride ausgesprochen unpolar und werden deshalb in nahezu wasserfreier Form gespeichert. Proteine und Kohlenhydrate dagegen sind weitaus polarer und deshalb stärker hydratisiert.

In neuerer Zeit rücken Triglyceride mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Blickpunkt des Interesses. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit nicht konjugierten Doppelbindungen werden in  $\omega$ 6-Fettsäuren und  $\omega$ 3-Fettsäuren unterteilt.

**Tabelle 3** Zusammenstellung von einigen wichtigen  $\omega$ -6- und  $\omega$ -3-Fettsäuren und deren Vorkommen

Bezeichnung	Kettenlänge und Ort der Doppelbindung	Vorkommen
<b><math>\omega</math>6-Familie:</b>		
Linolsäure	18:2 (9, 12)	ca. 76% in Mohnöl, Safloröl ca. 60% in Sonnenblumenöl, Walnussöl ca. 50% in Soja-, Mais-, Baumwoll-, Kürbiskernöl ca. 40% in Sesamöl, Erdnussöl
$\gamma$ -Linolensäure	18:3 (6, 9, 12)	Nachtkerzenöl, Borretschöl, Schwarze Johannisbeere
Arachidonsäure	20:4 (5, 8, 11, 14)	Fleisch, Leber, Eilipide
<b><math>\omega</math>3-Familie:</b>		
$\alpha$ -Linolensäure	18:3 (9, 12, 15)	ca. 58% in Leinöl
Eicosapentaensäure (EPA)	20:5 (5, 8, 11, 14, 17)	ca. 15% in Fischöl
Docosahexaensäure (DHA)	22:6 (4, 7, 10, 13, 16, 19)	ca. 15% in Fischöl

Die  $\omega$ 3-Fettsäuren haben einige positive Gesundheitseffekte bei kardiovaskulären Erkrankungen, Störungen des Immunsystems (Hughes, 1995), Entzündungen, Nierenerkrankungen, Allergien (Terano et al., 1986; Uauy-Dagach und Valenzuela, 1992) und Diabetes (Haines et al., 1986). Bezüglich Krebs wird der Einfluss der Fettsäuren noch kontrovers diskutiert. Zum Teil wurden bereits positive Effekte im Tierversuch beobachtet, diese konnten allerdings bis jetzt nicht eindeutig auf den Menschen übertragen werden (Braden und Carroll, 1986; Wisont, 1999).

Moore und McNeill gelang z.B. die Synthese von Triglyceriden, die in  $\omega$ -3-Fettsäuren angereichert sind (McNeill, 1996; McNeill et al., 1996). Sie synthetisierten Triglyceride ausgehend von Fischöl mit unterschiedlichen Gehalten an EPA und DHA. Einige Studien beobachteten nämlich negative Effekte auf des Wachstum von Kindern bei Verabreichung von DHA in Kombination mit EPA. Zusätzlich wurde festgestellt, dass vor allem DHA wichtig für die Entwicklung von Gehirn und Augen bei Kindern ist (Carlson, 1995).

## 1.5 Metabolismus von Fetten und Ölen

Für die effiziente Absorption von Fetten und Ölen ist die Triglyceridstruktur, im Speziellen die Position der Fettsäuren, von Bedeutung.

Ein Triglycerid mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge durchläuft bei der Fettabsorption folgende Schritte:

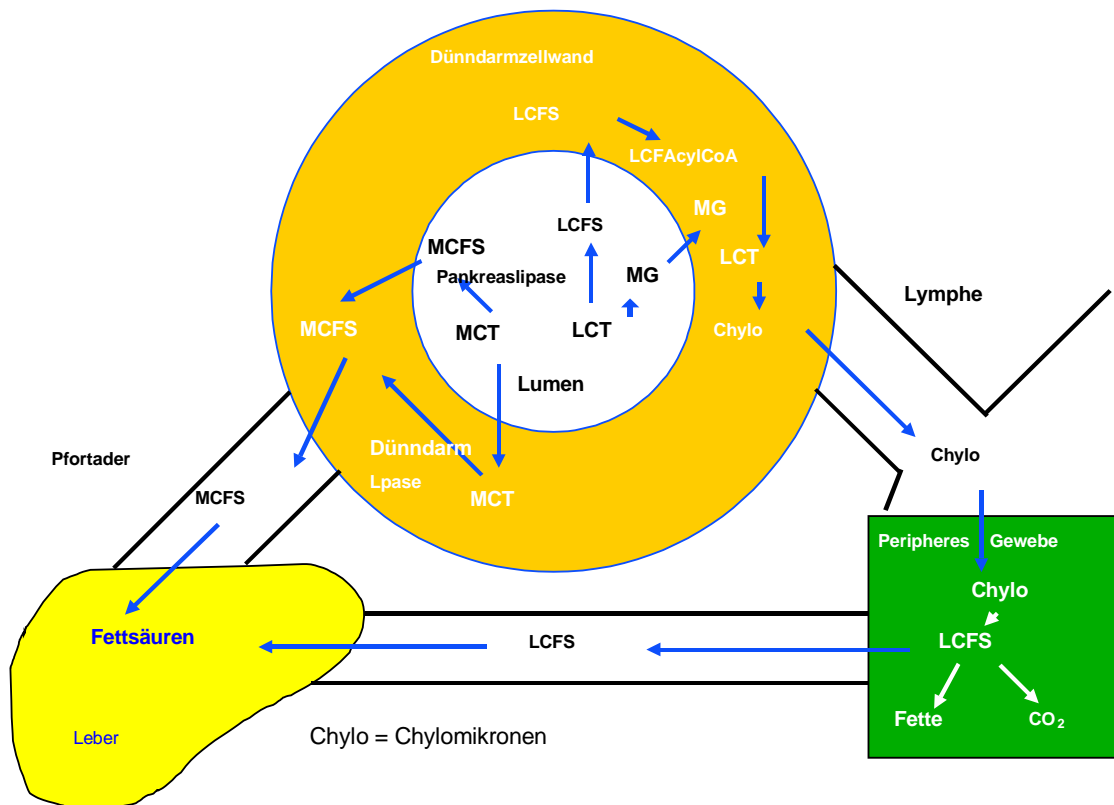
Die ersten Verdauungsschritte beginnen bereits im Mund und später im Magen durch die Zungen- bzw. Magenlipase. Die Lipasen hydrolysieren einige der Fettsäuren (vor allem kurzkettige Fettsäuren) in *sn3*-Position des Triglycerides und bilden somit freie Fettsäuren und 1,2-Diglyceride. Eine Mischung aus Triglyceriden, Diglyceriden und Fettsäuren gelangt dann in den Dünndarm, wo zwei weitere Enzyme in Aktion treten. Zuerst hydrolysiert Pankreaslipase die Fettsäure in *sn1*-Position des 1,2-Diglycerides und bildet 2-Monoglyceride und freie Fettsäuren. Pankreaslipase greift aber ebenfalls die Triglyceride an, die von der Magenlipase unberücksichtigt gelassen wurden, mit einer leichten Präferenz für die *sn1*-Position. Als nächstes wird dann das gebildete 2,3-Diglycerid durch die Carboxylester-Hydrolase oder Pankreaslipase weiter in freie Fettsäure und 2-Monoglycerid hydrolysiert. Der Carboxylester-Hydrolase kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Sie kann im Gegensatz zur Pankreaslipase langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA, DHA oder Arachidonsäure hydrolysieren und erlaubt dadurch die Absorption dieser ernährungsphysiologisch bedeutenden Fettsäuren. Bei Neugeborenen ist eine weitere Lipase von Bedeutung, die im Dünndarm von mit Muttermilch gefütterten Säuglingen vorkommende und durch Gallensalze aktivierte Milchlipase. Diese ist wahrscheinlich für die Hydrolyse von 2-Monoglyceriden in Glycerin und Fettsäure zuständig.

Nach der Absorption der Fettsäuren und 2-Monoglyceride in den Enterocyten, werden die 2-Monoglyceride durch die Monoacylglycerin-Transferase reacyliert. Die dabei verwendeten aktivierten Fettsäuren stammen entweder aus neu synthetisierten Fettsäuren in den Zellen, oder durch die Fettverdauung absorbierter Fettsäuren. Anschließend werden die neu gebildeten Diglyceride durch die Diglyceridacyl-Transferase zu Triglyceriden acyliert. Die Position der Fettsäure in *sn2* bleibt dabei weitgehend erhalten. Die neu synthetisierten Triglyceride werden im nächsten Schritt in Chylomikronen oder VLDL (very low density lipoproteins) gepackt und in die Lymphe sekretiert. Beim Übergang von der Lymphe ins Plasma nehmen sie HDL (high density lipoproteins) auf. Sie binden an die Oberfläche von Kapillaren, z.B. an die Heparin-Bindungsstelle der Apolipoproteine. Lipoproteinlipase greift bevorzugt in *sn1*-Position an. Befinden sich EPA oder Arachidonsäure in *sn1*- oder *sn3*-Position, werden diese durch Lipoproteinlipase sehr schlecht gespalten. In diesem Fall ist eine weitere Lipase von Bedeutung, die sogenannte Hepaticlipase, die für die Spaltung der Diglyceride in Fettsäuren und 2-Monoglyceride zuständig ist. Die nun entstehenden

Hydrolyseprodukte können verschiedene weitere Stoffwechselwege beschreiten (Small, 1991).

Im Gegensatz dazu steht der Stoffwechselweg mittelkettiger Triglyceride (MCT = medium chain triglycerides). Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkette  $<12$  haben einen  $pK_s = 4.5$ , sind wasserlöslich bei Protonierung und ionisiert. Dagegen sind Fettsäuren  $>12$  kaum wasserlöslich und liegen nur bei einem sehr hohen pH-Wert ionisiert vor (Bracco, 1994). Pankreaslipase hydrolysiert MCTs schneller und vollständiger als LCTs. In einer Mischung aus MCTs und LCTs werden die mittelkettigen Triglyceride bevorzugt gespalten (Babayan, 1987; Bach und Babayan, 1982). Bei der Hydrolyse von MCTs entstehen vor allem freie Fettsäuren und nur ein geringer Anteil an 2-Monoglyceriden. Zudem erfolgt die Absorption der Hydrolyseprodukte der MCTs schneller als bei LCTs, ähnlich der Absorption von Glucose. Der große Vorteil der MCTs liegt aber vor allem darin, dass diese bei Mangel an Gallensalzen und Pankreaslipase vollständig als Triglyceride absorbiert werden können, was mit LCTs nicht möglich ist. Im nächsten Schritt werden die MCTs in den Enterocyten durch eine Dünndarmlipase hydrolysiert und ohne Bindung an Chylomikronen folgen sie der Pfortader direkt in die Leber (Abb. 4).

Bei verschiedenen Fettstoffwechselkrankheiten wie Pankreatitis wurden MCTs mit Erfolg eingesetzt (Akoh, 1995; Babayan, 1986).



**Abbildung 4** Metabolismus von langkettigen Triglyceriden im Vergleich zu kurzkettigen Triglyceriden

Eine besondere Bedeutung für die Fettverdauung kommt der Verteilung der Fettsäuren im Glycerin zu. Ein wichtiges Beispiel dafür ist das Muttermilchfett. 1,3-Oleoyl-2-palmitoylglycerin (OPO) ist der Hauptbestandteil des Muttermilchfetts und wird als Fettkomponente in Muttermilchersatz eingesetzt. Entscheidend ist dabei die Position der Palmitinsäure, da palmitinsäurehaltige Triacylglyceride nur dann gut resorbiert werden, wenn diese Fettsäure analog zur Muttermilch in *sn2*-Position des Glycerins gebunden ist. Befindet sich hingegen Palmitinsäure in *sn1* bzw. *sn3*-Position, wird diese bei der Lipolyse gespalten und führt in Gegenwart von Calcium zu schwer löslichen Seifen. Als Folgeerscheinung treten u.a. Verdauungsstörungen und Calciumverlust auf (Lien et al., 1997). Die bessere Absorption von Muttermilchfett gegenüber Kuhmilchfett lässt sich auf derartige positionsspezifische Unterschiede zurückführen. In der Fettsäurezusammensetzung sind sich diese beiden Fette relativ ähnlich. Muttermilchfett zeichnet sich allerdings durch einen höheren Anteil an Palmitinsäure in *sn2*-Position aus (Bracco, 1994).

**Tabelle 4** Fettsäurezusammensetzung und Verteilung der wichtigsten Fettsäuren in Muttermilch und Kuhmilch

Fettsäuren	Muttermilchfett		Kuhmilchfett	
	Zusammensetzung [%]	[%] in <i>sn</i> 2	Zusammensetzung [%]	[%] in <i>sn</i> 2
12:0	4.7	36	2.9	51
14:0	7.8	57	12.0	69
<b>16:0</b>	<b>27.3</b>	<b>68</b>	<b>30.7</b>	<b>43</b>
18:0	9.7	5	11.6	11
18:1	34.5	9	26.0	16
18:2	9.5	18	1.8	18
18:3	1.5	–	0.9	–

## 1.6 Chemisch-physikalische Methoden zur Fettmodifikation

Die am besten bekannten Methoden zur Fettmodifikation sind Hydrierung, Umesterung und Fraktionierung. Während Umesterung und Hydrierung auf einer chemischen Veränderung der Zusammensetzung beruhen, handelt es sich bei der Fraktionierung um eine selektive Trennung verschiedener Komponenten. Bei allen Verfahren ist zu beachten, dass nicht nur die Funktionalität der Fette und Öle, sondern auch ihre ernährungsphysiologischen Eigenschaften verändert werden können.

### 1.6.1 Umesterung

Unter Umesterung wird die Reaktion eines Fettes mit einer Fettsäure (Acidolyse), mit einem Alkohol (Alkoholyse) oder mit einem anderen Triglycerid (Transesterifikation) verstanden. Zur Zeit ist die Umesterung die am wenigsten eingesetzte Technologie zur Fettmodifikation. Sie wird vorwiegend zur Änderung der physikalischen Eigenschaften eines Fettes eingesetzt, z.B. wird das Schmelzpunktprofil etwas flacher und die Plastizität durch eine verbesserte Kristallisation verändert.

Die Umesterung, die im Labormaßstab kontinuierlich oder halbkontinuierlich durchgeführt wird, teilt sich dabei in vier wichtige Schritte: Vorbehandlung des Öls, Zugabe des Katalysators, Reaktion, Deaktivierung des Katalysators.

Natriummethanolat ist der am häufigsten eingesetzte Katalysator mit dem Vorteil bei Temperaturen <100 °C zu reagieren. Alternativ werden Zinkchlorid oder Natriumhydroxid als Katalysatoren eingesetzt, die allerdings den Nachteil haben, dass die Reaktionstemperatur zwischen 120 – 260 °C liegt. Die Inaktivierung des Katalysators erfolgt entweder durch

Zugabe von Wasser oder von Säure (Phosphorsäure, Citronensäure), wobei in der industriellen Anwendung der wasserfreien Inaktivierung den Vorzug gegeben wird.

Mittels Interesterifikation wurden z.B. Produkte wie Zero-*trans*-Margarine hergestellt, die sich durch einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und einen vernachlässigbaren Anteil an *trans*-Fettsäuren auszeichnet. Des Weiteren sind sogenannte low-calorie Fette von Bedeutung wie z.B. Caprenin von Procter & Gamble (De Greyt et al., 1989).

### 1.6.2 Hydrierung

Die Hydrierung ist die zur Zeit immer noch am häufigsten eingesetzte Methode zur Fettmodifikation. Sie dient zur Fetthärtung. Dabei werden durch Wasserstoff und Katalysator ungesättigte Doppelbindungen in Fetten und Ölen hydriert und neue Fettprodukte mit einem höheren gesättigten Fettsäureanteil gebildet. Durch Reduzierung des Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren wird gleichzeitig die Stabilität gegenüber Oxidation erhöht und die Eigenschaften des Produktes derartig verändert, dass es als Backfett, Margarine oder Überzugsfett für Pralinen geeignet ist.

Als Katalysator findet Nickel immobilisiert auf einen Kieselgelträger Verwendung. Bei der Hydrierung kann eine *cis/trans*-Isomerisierung der Doppelbindung auftreten (De Greyt et al., 1989). Die Bildung von *trans*-Fettsäuren ist aufgrund möglicher negativer Auswirkungen auf die Gesundheit unerwünscht (Willett et al., 1993). Zur Zeit beträgt die angenommene Aufnahmemenge in Deutschland an *trans*-Fettsäuren für Frauen 1,9 g/d und für Männer 2,3 g/d (Fritsche und Steinhart, 1997). Interessant dabei ist, dass konjugierte Linolsäure (CLA), ebenfalls eine *trans*-Fettsäure, außergewöhnlich positive physiologische Wirkungen zeigt (Fritsche und Steinhart, 1998).

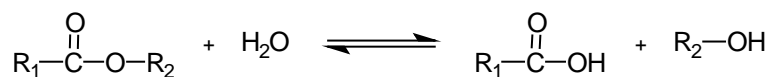
### 1.6.3 Fraktionierung

Unter Fraktionierung versteht man die physikalische Trennung eines Komponentengemisches in mehrere Fraktionen, die sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden. Die Fraktionierungsprozesse sind hauptsächlich Kristallisation oder Abtrennung durch Filtration, Zentrifugation oder Dekantieren.

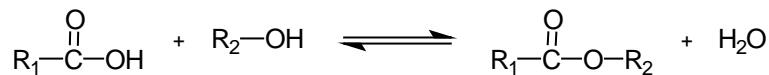
## 1.7 Lipase-Katalysierte Fettmodifikationen

Zur Synthese hochselektiver, symmetrisch strukturierter Triglyceride eignet sich besonders der Einsatz von Lipasen, aufgrund ihrer hohen Regioselektivität und Aktivität unter milden Reaktionsbedingungen. 1,3-selektive Lipasen hydrolysieren bevorzugt die primäre Alkoholgruppe des Glycerins und eignen sich daher besonders für die Synthese von Triglyceriden des ABA-Typs.

### Hydrolyse

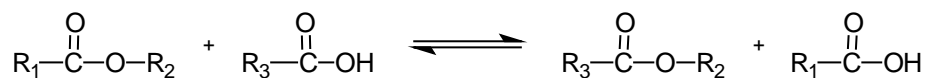


### Estersynthese (Veresterung)

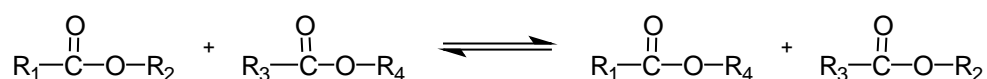


### Transesterifikation

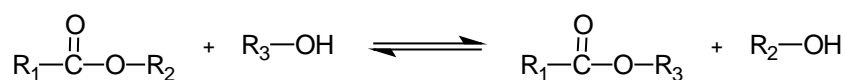
#### Acidolyse



#### Interesterifikation



#### Alkoholyse



### Abbildung 5: Lipase-Katalysierte Reaktionen

Die Hydrolyse ist die natürliche Reaktion von Lipasen unter Bildung von freien Fettsäuren und Glycerin. Bei Verwendung einer 1,3-spezifischen Lipase werden Fettsäuren und 2-Monoglyceride gebildet, ebenso 1,2(2,3)-Diglyceride. Bei Verwendung einer unspezifischen Lipase entstehen freie Fettsäuren und Glycerin.

Die Estersynthese ist die Umkehrung der Hydrolyse und wird durch Lipasen nur katalysiert, wenn der Wassergehalt im Reaktionsmedium entsprechend niedrig ist. Die Reaktion kann sowohl in einem lösungsmittelfreien System als auch unter Verwendung von Lösungsmitteln durchgeführt werden. Ebenso ist eine große Variation der Alkoholkomponente möglich. Um eine hohe Ausbeute zu erzielen ist bei der Estersynthese die Entfernung des gebildeten Wassers sehr wichtig.

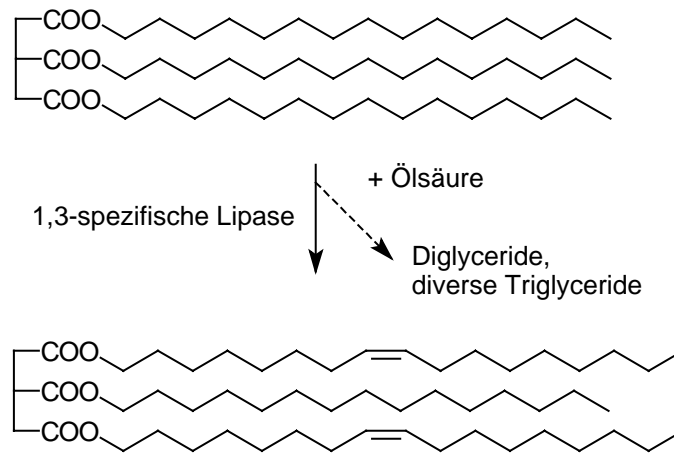
Bei der Acidolyse reagiert ein Ester mit Fettsäure und die Lipase katalysiert den Transfer der Alkoholkomponente des Esters auf die neue Fettsäure bis ein Gleichgewicht eingestellt ist. Die Interesterifikation ist der Acidolyse ähnlich mit dem Unterschied, dass zwei Ester miteinander reagieren. Bei der Alkohololyse eines Esters wird ein neuer Ester mit einer anderen Alkoholkomponente gebildet. Je nach Wahl der Lipase entstehen bei der Alkohololyse von Triglyceriden Fettsäureester oder bei Verwendung einer 1,3-spezifischen Lipase 2-Monoglyceride und 1,2(2,3)-Diglyceride (Adlercreutz, 1994).

### 1.7.1 Einschrittsynthese

Ein wichtiges Beispiel für die enzymatische Darstellung von strukturierten Triglyceriden in industriellem Maßstab ist die Synthese von Kakaobutteräquivalenten nach dem Einschrittverfahren (Bloomer et al., 1990). Eine Mittelfraktion aus Palmöl mit Stearinsäure oder Stearinsäureester reagiert in einer Acidolyse unter Verwendung einer 1,3-spezifischen Lipase aus *Aspergillus niger* (Quinlan und Moore, 1993; Weyland, 1992). Als Reaktionsprodukte entstehen eine Mischung aus POP, POST und StOSt (P = Palmitinsäure; O = Ölsäure; St = Stearinsäure) in einem Verhältnis von 19%, zu 32% und 13%. Die Reaktion wird in einem Rührkessel-Reaktor in Petrolether als Lösungsmittel bei 40°C und einer Reaktionszeit von 16 h durchgeführt.

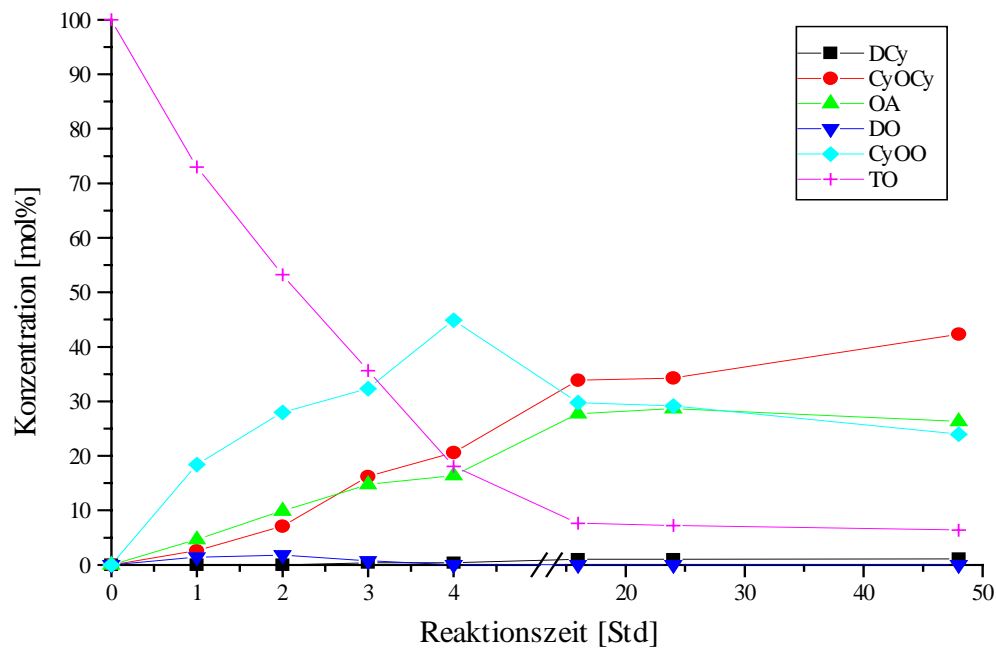
Die meisten Nebenprodukte wie Diglyceride werden dabei in der ersten Stunde gebildet. Nach 16 h Reaktionszeit wird das auf Kieselgel immobilisierte Enzym durch Filtration abgetrennt und die Produkte durch Flüssig-flüssig-Extraktion und Kristallisation abgetrennt (Macrae, 1983). Alternativ kann StOSt durch Umesterung von stark ölsäurehaltigem Sonnenblumenöl mit Stearinsäure in einem lösungsmittelfreien Satzreaktor dargestellt werden, wobei immobilisierte Lipase aus *Rhizomucor miehei* zum Einsatz kommt. In Japan betreibt Fuji Oil Co. eine Anlage mit einer Produktionskapazität von einigen 1000 Tonnen pro Jahr für einen ähnlichen Prozess, bei dem Lipase aus *Rhizopus sp.* verwendet wird (Coleman und Macrae, 1977; Matsuo et al., 1982; Schmid und Verger, 1998). Ein weiteres industriell etabliertes Produkt der Firma Loders Crocklaan (Tochter von Unilever), das durch enzymatische Synthese dargestellt wird, ist Betapol, das als Muttermilchfettersatz Verwendung findet (Schema 2). Dabei wird Tripalmitin mit Ölsäure und einer 1,3-regiospezifischen Lipase versetzt. Dieses Produkt wird dann in einem weiteren Downstream-

Prozess mit anderen Ölen versetzt, um am Ende ein Produkt zu erhalten, das in der Verteilung und Zusammensetzung der Fettsäuren dem Milchfett der Muttermilch entspricht (Quinlan und Moore, 1993).



**Schema 2** Synthese von OPO aus Tripalmitin und Ölsäure unter Verwendung einer 1,3-spezifischen Lipase nach dem Einschrittverfahren

Neuere Arbeiten zeigen aufgrund der ernährungsphysiologischen Eigenschaften Interesse an strukturierten Triglyceriden des MLM-Typs, wobei L eine mehrfach ungesättigte Fettsäure sein kann. So gelang z.B. die Inkorporation von  $\omega$ -3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Nachtkerzenöl. Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung ergab einen Gehalt von 34%  $\omega$ -3-Fettsäuren im Nachtkerzenöl (Akoh et al., 1996). Ein weiteres Beispiel ist Acidolyse von Thunfischöl mit Caprylsäure (Shimada et al., 1996). Am Institut für Technische Biochemie wurde die Acidolyse von Triolein mit Caprylsäure ( $C_8$ ) und die Interesterifikation von Erdnussöl mit Tricaprylin ausführlich untersucht. Die Ergebnisse der Acidolyse ergaben mit einer Lipase aus *Rhizopus sp.* immobilisiert auf Celite bei einer Wasseraktivität von 0,11 die höchste Inkorporation von Caprylsäure ins Triglycerid (38,9 %) mit einer Ausbeute von 36,2 % an CyOCy. Eine etwas höhere Ausbeute von CyOCy konnte durch Verwendung einer Lipase aus *Rhizomucor miehei* immobilisiert auf Anionenaustauscher erzielt werden (Soumanou et al., 1997). Abbildung 6 zeigt einen typischen Reaktionsverlauf einer Acidolyse von Triolein mit Caprylsäure.



**Abbildung 6** Reaktionsverlauf der Bildung von strukturierten Triglyceriden durch Reaktion von Triolein mit Caprylsäure in *n*-Hexan unter Verwendung von Lipozyme (Soumanou, 1997)

Akoh und Mitarbeiter führten eine Reihe von Umesterungen mit verschiedenen Substraten durch, wie z.B. die Synthese von MLM aus Triolein mit Caprylsäureethylester (Huang und C., 1996) bzw. die Inkorporation von  $\omega$ -3-Fettsäuren in pflanzlichen Ölen (Huang und Akoh, 1994), oder die Synthese von kalorienreduzierten Triglyceriden (Akoh und Fomuso, 1997). Die Reaktionen wurden dabei vorwiegend in Hexan als Lösungsmittel durchgeführt. Alternativ beschrieben Yoon et al. eine Transesterifikation von Triolein mit Ethylbehenat in überkritischem Kohlendioxid als Lösungsmittel (Yoon et al., 1996). Das Einschrittverfahren weist bezüglich Ausbeute und Reinheit des synthetisierten Triglycerides Limitierungen auf. Die durchschnittliche Ausbeute an reinem ABA beträgt maximal 40 %. Die als Nebenprodukte gebildeten Triglyceride lassen sich sehr schwer vom gewünschten Produkt abtrennen.

Da sich das Einschrittverfahren nicht zur Synthese von hochreinen ABA-Triglyceriden eignet, wurde in der vorliegenden Arbeit nach Alternativen gesucht.

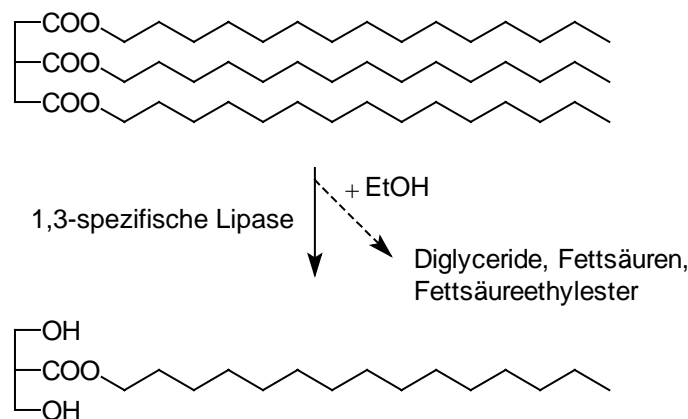
### 1.7.2 Zweischristsynthese

Um die beim Einschrittverfahren auftretenden Probleme zu umgehen, wurde am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart das Ziel verfolgt, ein neues Verfahren zur Synthese von strukturierten Triglyceriden zu entwickeln. Die Idee war, strukturierte

Triglyceride nach einem Zweischnittverfahren zu synthetisieren (Bornscheuer et al., 1999). Der erste Reaktionsschritt ist dabei eine Alkoholysereaktion. Ein Triglycerid reagiert mit Ethanol und einer *sn1(3)*-spezifischen Lipase zu 2-Monoglycerid (2-MG) (Schema 3). Die ebenfalls gebildeten Fettsäuren werden dabei in die Ethylester überführt. 2-MG wird durch Kristallisation sehr rein erhalten und im zweiten Prozeßschritt mit Fettsäure einer Veresterungsreaktion unterzogen, wobei wiederum eine *sn1(3)*-spezifische Lipase zum Einsatz kommt (Schema 4). Erste Arbeiten von Soumanou und Mitarbeiter wendeten das Zweischnittverfahren erfolgreich auf die Synthese von MLM an (Soumanou et al., 1998b; Soumanou et al., 1998a)

### Alkoholyse

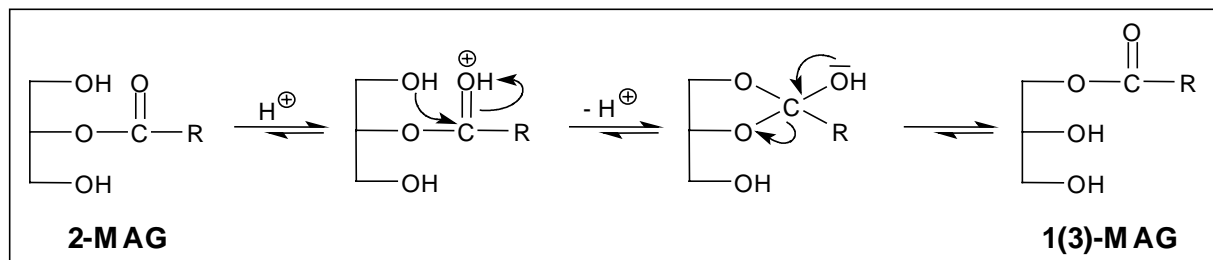
Die Alkoholyse stellt eine geeignete Möglichkeit zur Synthese von reinen 2-Monoglyceriden dar, die als Zwischenstufe für die Synthese von strukturierten Triglyceriden dienen. Andere Wege wie Hydrolyse oder Glycerolyse führen hingegen zu den 1(3)-Isomeren. Millqvist und Mitarbeiter beschrieben z.B. die Lipase-katalysierte Alkoholyse ausgehend von Tripalmitin und Triolein.



**Schema 3** Alkoholyse von Tripalmitin mit einer 1,3-spezifischen Lipase in organischem Lösungsmittel

Dabei wurden besondere Schwerpunkte auf den Einfluss der Lösungsmittel und der Wasseraktivität gelegt. Unter den untersuchten Lösungsmitteln (MTBE, Diisopropylether, Hexan, Isooctan, Methylisobutylketon, Toluol) ergab die Reaktion in MTBE als Lösungsmittel die höchste Konzentration (97 %) an 2-Monopalmitin. Eine Wasseraktivität zwischen 0,11 und 0,53 erwies sich als geeignet (Millqvist et al., 1994). Ein Problem, das bei der Bildung von 2-Monoglyceriden auftreten kann, ist die nicht enzymatische Acylwanderung der Acylgruppe von einer Hydroxylgruppe auf eine benachbarte Hydroxylgruppe. Die Acylwanderung wird durch Hitze, Säuren, Basen und Anionenaustauscher katalysiert.

Zusätzlich wird die Acylwanderung entscheidend von der Wahl des Lösungsmittels beeinflusst (Fureby et al., 1996).



**Schema 4** Nichtenzymatische Acylwanderung in 2-Monoglyceriden

Soumanou und Mitarbeiter führten die Alkohololyse mit Substraten wie Triolein, Trilinolein und Erdnussöl in MTBE als Lösungsmittel durch (Soumanou et al., 1998b). Als geeignetstes Lösungsmittel erwies sich hierbei MTBE. In Aceton dagegen konnte bei der Alkohololyse von Triolein nur 34,2 % 2-MO isoliert werden.

**Tabelle 5** Einfluß des Lösungsmittels auf die Ausbeute von 2-MO, dass durch Alkohololyse mit immobilisierter Lipase aus *Rhizopus delemar* (24 h) erhalten wurde (Soumanou et al., 1998b)

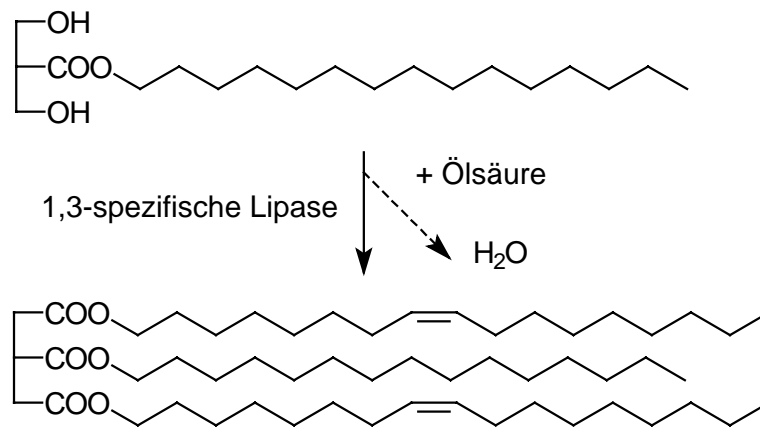
Lösungsmittel	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ( $\mu\text{mol/h/U}$ )	Ausbeute (%)
MTBE	$0.30 \pm 0.04$	71,8
Petrolether	$0.20 \pm 0.03$	71,8
Aceton	$0.10 \pm 0.04$	34,2

Die 2-Monoglyceride wurden durch mehrfaches Umkristallisieren isoliert und die Reinheit mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR bestätigt.

### Veresterung

Im zweiten Reaktionsschritt wurde nun das reine 2-Monoglycerid mit Caprylsäure verestert. Im Gegensatz zur Acidolyse oder Transesterifikation – wo eine gewisse Menge an Wasser notwendig für eine Hydrolyse der Triglyceride ist – sollte bei der Veresterung der Wassergehalt so gering wie möglich sein, um zum einen die Hydrolyse der durch Isomerisation entstandenen 1(3)-Monoglyceride und zum anderen die Hydrolyse der synthetisierten Triglyceride zu verhindern. Aus diesen Gründen muss auch das während der Reaktion gebildete Wasser aus der Reaktion entfernt werden. Geeignete Methoden sind

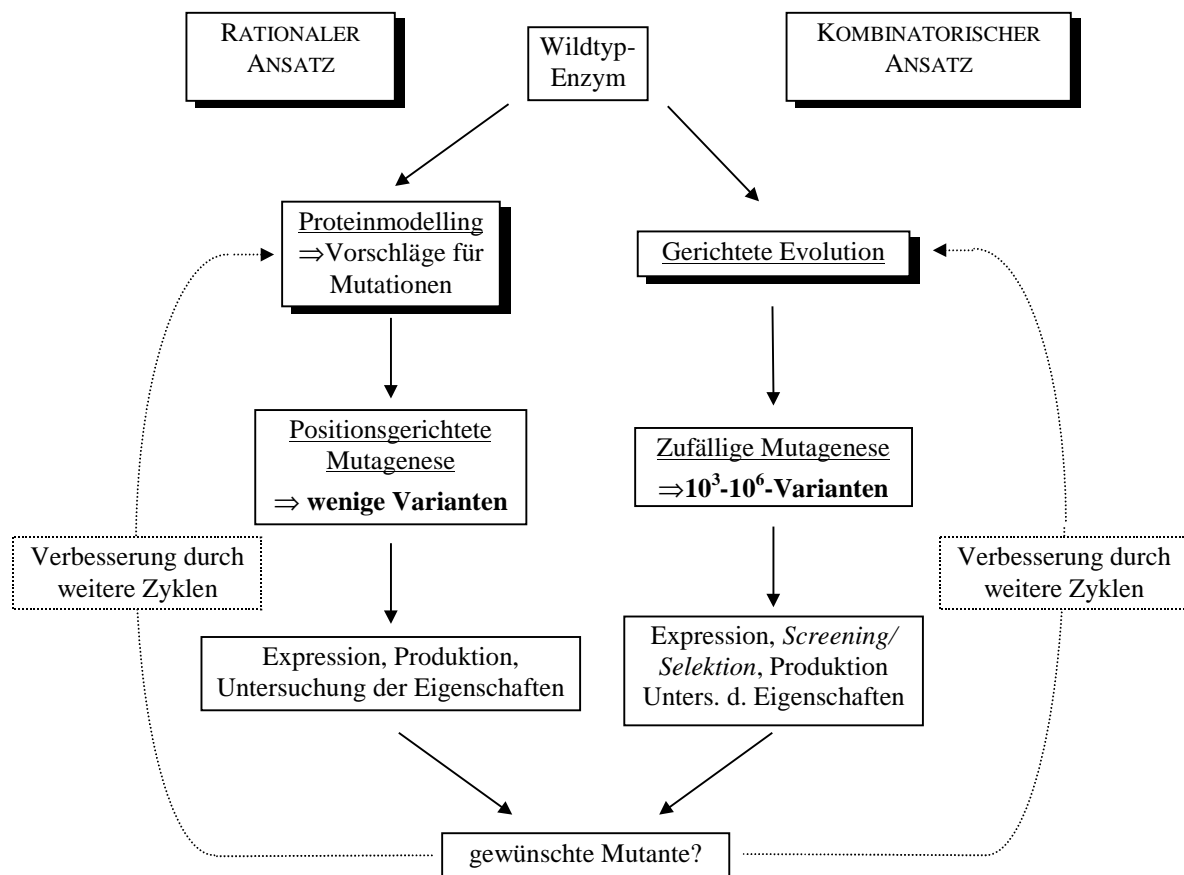
hierbei das Anlegen von Vakuum, Verdampfung, Einleiten von trockener Luft, Pervaporation durch Membranen und Zugabe von Molekularsieb (Schema 5).



**Schema 5** Veresterung von 2-Monopalmitin mit Ölsäure unter Verwendung einer 1,3-regiospezifischen Lipase.

## 1.8 Gerichtete Evolution von Enzymen

Das Interesse an Enzymen als Katalysatoren für die organische Synthese steigt stetig. Viele Enzyme entsprechen jedoch hinsichtlich Aktivität, Thermo-, Lösungsmittelstabilität und Regio- bzw. Stereoselektivität nicht den gewünschten Erfordernissen und können dann durch Mutagenese verändert werden. Zum einen ist ein rationaler Ansatz durch Protein modeling zum anderen ein kombinatorischer Ansatz, auch gerichtete Evolution (directed evolution) genannt, möglich



**Abbildung 7** Rationaler Ansatz versus kombinatorischen Ansatz zur Mutagenese von Enzymen (Bornscheuer, 1999)

Für das Protein modeling, das bereits seit einiger Zeit Anwendung findet, ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz, der Struktur und des Katalysemechanismus notwendig. Durch ortsspezifische Mutagenese werden dann gezielt Mutationen in die Nucleotidsequenz eingeführt. Aufgrund des relativ hohen Zeitaufwandes lassen sich durch diese Methode nur eine begrenzte Anzahl an Enzymvarianten darstellen.

Eine andere Idee liegt der gerichteten Evolution zugrunde, die erst in neuerer Zeit zur Enzymvariation eingesetzt wird. Dabei werden durch moderne molekularbiologische Techniken Enzymlibliotheken erzeugt, die in Kombination mit einem Assaysystem die Identifizierung verbesserter Biokatalysatoren ermöglichen. Die Idee der gerichteten Evolution beruht auf zufälligen Mutationen, die die Unabhängigkeit von Aminosäuresequenz, Struktur und Katalysemechanismus erlauben. Entscheidend für den Erfolg der gerichteten Evolution sind einige Parameter so z.B. eine effiziente Mutationsstrategie, eine funktionelle Expression des Proteins in einem mikrobiellen Wirtsorganismus und ein schnelles, zuverlässiges Assaysystem, welches das Screening einer riesigen Menge an Mutanten erlaubt.

Die bis jetzt durch gerichtete Evolution positiv erhaltenen Mutanten wurden nach drei verschiedenen Möglichkeiten erzeugt:

- 1 Fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (Error prone PCR) (Cadwell und Joyce, 1992)
- 2 Verwendung von Mutationsstämmen (Greener et al., 1996)
- 3 DNA- oder Gene-shuffling (Harayama, 1998; Stemmer, 1994)

Die wichtigste Methode zur Erzeugung sequentieller Generationen ist die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (error-prone-PCR). Durch Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen in der PCR kann die Fehlerhäufigkeit der *Thermus-aquaticus* (*Taq*-) Polymerase von 0,001-0,02% unter Standardbedingungen auf über 1 % gesteigert werden. Zu beachten ist die richtige Einstellung der Mutationsrate. Ist die Mutationsrate zu gering, findet man nur die Sequenz des Wildtyps ohne Mutationen wieder, ist jedoch die Mutationsrate zu hoch, kann dies zu einer großen Anzahl an inaktiven Mutanten führen.

Ein großer Vorteil der error-prone PCR ist ihre einfache Durchführung und die exakte Definition der Nukleotidsequenzbereiche, in die Mutationen eingeführt werden sollen. Nachteilig sind der nicht-statistische Austausch der Nucleotide und eine häufig geringe Effizienz bei der Ligation der PCR-Produkte. Alternativ können auch sogenannte Mutationsstämme eingesetzt werden. Diese weisen Defekte in ihren Reparaturmechanismen auf, die während der Replikation zum fehlerhaften Einbau von Nucleotiden führen. Durch Verwendung von Plasmiden, die das Gen des interessierten Proteins enthalten, wird die Mutation auf diese Bereiche beschränkt. Im Vergleich zur fehlerhaften PCR ist die Verwendung der käuflich erhältlichen Mutationsstämme einfacher und auch unproblematischer, nachteilig ist allerdings die fehlende Möglichkeit zur Einstellung der Mutationshäufigkeit.

Auf einer anderen theoretischen Grundlage beruht das DNA- oder gene-shuffling. Bei dieser Methode wird ein partieller DNase-I-Verdau durchgeführt. Die nachfolgende Rekombination der Bruchstücke erfolgt durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR).

Das Ziel ist die Akkumulation positiver und die Eliminierung negativer Mutationen. Nicht ganz unproblematisch sind die Kontrolle des DNase-Verdau zur Herstellung von Bruchstücken optimaler Größe und die Ligationseffizienz bei der PCR (Bornscheuer, 1998).

Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung des DNA shufflings ist die Verbesserung des GFPs (Green Fluorescent Protein). Das GFP ist ein wichtiger Reporter für die Genexpression und Regulation (Chalfie et al., 1994; Prasher, 1995; Prasher et al., 1992). Die Autoren setzten sich zum Ziel, die gesamte Zellfluoreszenz des GFPs zu verbessern, um es allgemein als Reporter sowohl in prokaryontischen als auch eukaryontischen Zellen einzusetzen. Nach drei Zyklen DNA-shuffling konnte das gesamte Zellfluoreszenzsignal um den Faktor 45 gegenüber dem Standard erhöht werden (Crameri et al., 1996).

Als Pionierin auf dem Gebiet der gerichteten Evolution kann Francis Arnold gelten (Halling, 1996). In ihren Beiträgen über "Directed Evolution" (Arnold und Moore, 1997; Arnold und Volkov, 1999; Schmidt-Dannert und Arnold, 1999)] nennt sie einige Beispiele, bei denen diese Methode bereits erfolgreich angewendet wurde, wie z.B. die Erhöhung der Thermostabilität einer Katamycin Nucleotidyltransferase (Liao et al., 1986) oder die Evolution von Substratspezifitäten, die allerdings öfters mit einer Abnahme des  $K_M$ -Wertes verbunden sind (Black et al., 1996; el Hawrani et al., 1996; Zhang et al., 1997). Arnold und Mitarbeiter gelang es z. B. die katalytische Aktivität von Subtilisin E durch gerichtete Evolution deutlich zu erhöhen (You und Arnold, 1994). Eine Kombination von error-prone PCR und des DNA-shuffling ermöglichte es, die Aktivität einer Esterase aus *Bacillus subtilis*, die den *p*-Nitrobenzylester von Loracarbef, eines Cephalosporin-Antibiotikums, in 15% Dimethylformamid hydrolysieren kann, um den Faktor 60 im Vergleich zum Wildtyp zu steigern (Moore und Arnold, 1996). Interessant dabei ist, dass die Positionen der erhaltenen Mutationen vorwiegend an der Oberfläche des Enzyms liegen, d. h. eine Vorhersage durch rationales Design wäre sehr unwahrscheinlich gewesen (siehe auch Kap. 3.8)

Ein interessantes Anwendungsgebiet für die organische Synthese ist die Veränderung der Stereoselektivität von Enzymen durch gerichtete Evolution. So konnten z.B. Bornscheuer et al. unter Verwendung eines Mutationsstammes *Epicurian coli* XL1-Red eine Doppelmutante einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* erzeugen. Diese Esterase besaß nun die Fähigkeit, im Gegensatz zur Wildtyp-Esterase und 19 anderer Hydrolasen, einen 3-Hydroxyester, der als Baustein zur Synthese von Epothilonen eingesetzt werden kann, mit mäßiger Reaktivität und Stereoselektivität zu hydrolysieren (Bornscheuer et al., 1998).

## 1.9 Veränderung der Kettenlängenspezifität einer Lipase aus *Candida rugosa*

Lipasen aus *Candida rugosa* werden unter den kommerziell erhältlichen Lipasen sehr häufig für die Synthese und Hydrolyse einer Vielzahl von Estern eingesetzt (Benjamin und Pandey, 1998; Köttig und Eibl, 1994; Vulfson, 1994). Darüber hinaus spielen sie bei der Lebensmittelproduktion eine wichtige Rolle, wie z.B. bei der Herstellung von Säften, Backwaren, Aromastoffen und der Modifikation von Fetten und Ölen (Benjamin und Pandey, 1998; McNeill et al., 1996). CRL erwies sich auch zur Racematspaltung zur Gewinnung optisch reiner Enantiomere als geeignet (Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Interessant ist die ausgeprägte (S)-Stereospezifität, die es z. B. erlaubte, S-(+)-Ibuprofen selektiv in den Ester zu überführen (Goto et al., 1996). Bei *Candida rugosa* und *Geotrichum candidum* Lipasen bilden die drei Aminosäuren Ser-His-Glu die katalytische Triade und zeigen eine hohe Sequenzhomologie von > 40%. Homologien in der Aminosäuresequenz sind neben der Lipase aus *Geotrichum candidum* nur noch bei einigen Esterasen und bei Acetylcholinesterase gegeben (Lotti et al., 1994). Es wurden bis zu sieben Gene identifiziert, die für verschiedene Lipasen in *Candida rugosa* kodieren (Lotti et al., 1993). Rúa und Mitarbeiter gelang die Reinigung von zwei Isoformen, die sich im isoelektrischen Punkt und Glykolysierungsgrad unterschieden (Rúa et al., 1993). Die verschiedenen *C. rugosa* Lipaseproteine bestehen aus 534 Aminosäuren langen Polypeptiden, die aufgrund ihrer Glykosylierung, isoelektrischen Punkte und Hydrophobizität unterschieden werden können. Sie weisen 70% Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf, haben das gleiche Molekulargewicht und verhalten sich bei der PAGE gleich (Lotti et al., 1998). Von kommerziell erhältlichen Enzympräparationen konnte eine Mischung verschiedener Isoformen isoliert und gezeigt werden, dass das *lip1*-Gen das wichtigste darstellte. Um reines *lip1*-Gen zu erhalten wurde am Institut für Technische Biochemie von Brocca und Mitarbeitern ein synthetisches *lip1*-Gen kloniert und erfolgreich in den Hefen *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert (Brocca et al., 1998). Leider gehorcht *C. rugosa* einer nicht kanonischen Kodierung, bei der das Triplet CUG, eine übliche Kodierung für Leucin, als Serin gelesen wird (Kawaguchi et al., 1989). Im *lip1* Gen sind 20 von 47 Serinresten, das katalytische Serin<sub>209</sub> eingeschlossen, durch das Triplet CUG kodiert. Bei der Gensynthese wurden sämtliche CUG-Triplets durch universale Serin-Kodierungen ausgetauscht. Um die Expression in konventionellen Hefen wie *S. cerevisiae* und *P. pastoris* zu vereinfachen, wurden selten auftretende Kodierungen in diesen Hefen durch häufig auftretende ersetzt (Sharp et al., 1988). Abschließend gelang es, das recombinante *lip1* Gen in hoher Reinheit und mit einer Aktivität von 150 U/ml Kulturmedium zu exprimieren. Bei CRL handelt es sich um eine unspezifische Lipase, die die Fettsäuren unabhängig von ihrer

Position im Glycerin spaltet (Benzonana und Esposito, 1971). Bei Hydrolyseversuchen zeigte sie eine Präferenz für kurzkettige Fettsäuren (Janssen et al., 1996).

Sehr wenige Publikationen beschäftigen sich mit der Veränderung der Kettenlängenselektivität einer Lipase (Atomi et al., 1995; Joerger und Haas, 1994). Dabei wurden durch ortsspezifische Mutagenese verschiedene Punktmutationen eingeführt und die Kettenlängenselektivität der Mutanten mit dem Wildtyp verglichen. Da die Kristallstruktur der RDL vorlag, wurde durch rationales Design überlegt, welche Aminosäureaustausche möglicherweise einen Effekt auf die Selektivität der Lipase haben könnten. Da die Strukturen der RML und der RDL große Ähnlichkeiten aufweisen, machte man sich die Erkenntnisse über die RML beim rationales Design der RDL zunutze. So wurde z.B. angenommen, dass wie bei RML die Aminosäuren 86 bis 92 den Deckel über dem aktiven Zentrum bilden (Brzozowski et al., 1991; Derewenda et al., 1992). Zunächst wurde Threonin 83 gegen Alanin oder Serin ausgetauscht. Beide Veränderungen führten zu einer Abnahme der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Den stärksten Effekt auf die Substratpräferenz hatte der Austausch von Valin 209 durch Tryptophan. Die Lipase zeigte nun eine hohe Aktivität gegenüber den kurzkettigen Fettsäuren Tricaprylin und Tributyrin.

## 1.10 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Lipase-Katalysierte Synthese von strukturierten Triglyceriden des ABA-Typs in hoher Reinheit und Ausbeute, die aufgrund ihrer symmetrischen Struktur zur Therapie von Fettabsorptionsproblemen wie z.B. Pankreasinsuffizienz eingesetzt werden können. Darüber hinaus sind sie in Baby-, Sportler- sowie Diät-nahrung von Bedeutung. Bei der Synthese dieser symmetrischen Triglyceride sollten Lipasen zum Einsatz kommen, die sich durch eine hohe 1,3-Regiospezifität auszeichnen. Darüber hinaus ermöglichen Lipasen das Arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen. Die Synthese strukturierter Triglyceride erfolgte bisher nach einem Einschrittverfahren durch Acidolyse von Triglyceriden und Fettsäure oder durch Umesterung zweier Triglyceride unter Verwendung von 1,3-regiospezifischen Lipasen. Durch während der Reaktion auftretende Acylwanderung entstanden jedoch eine Vielzahl an unerwünschten Produkten, so dass das eigentliche Zielprodukt nur mit einer Ausbeute von bis zu 40% isoliert werden konnte. Um die Reinheit und dadurch auch die Effektivität der ABA-Triglyceride in Nahrungsmitteln zu erhöhen, sollte ein neues Zweischnittverfahren unter Berücksichtigung lebensmittelrechtlicher Aspekte entwickelt werden. Ein wichtiges Zielprodukt war 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerin (OPO), das als Fettkomponente in Muttermilchersatz Verwendung findet. Durch Optimierung der für Lipase-Katalysierte Reaktionen relevanten Reaktionsbedingungen wie Wassergehalt, Wasseraktivität, Temperatur, Enzym und Trägermaterial sollte die Synthese von OPO in lebensmittelrechtlich erlaubten Lösungsmitteln ermöglicht werden. Desweiteren wird die Übertragung dieses Zweischnittverfahren auf die Synthese von strukturierten Triglyceriden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie die Synthese von Kakaobutteräquivalenten vorgestellt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Veränderung der Kettenlängenspezifität der lip1-Lipase aus *C. rugosa* durch gerichtete Evolution. Unter den möglichen Methoden zur Durchführung der gerichteten Evolution sollte in der vorliegenden Arbeit die error prone PCR (fehlerhafte Polymerasekettenreaktion) zum Einsatz kommen. Um zielsicher Mutationen zu erkennen, sollte ein Assaysystem entwickelt werden, mit welchem sehr schnell und reproduzierbar eine große Anzahl an Klonen überprüft werden können. Nach der Selektion "positiver Mutanten" sollten diese sequenziert und in einem kompetitiven Assay mit der Aktivität des Wildtyps bezüglich eines Fettsäurespektrums mit Kettenlängen von C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> verglichen werden.

## 2 Ergebnisse Teil I: Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride

Strukturierte Triglyceride sind aufgrund ihrer therapeutischen und ernährungsphysiologischen Wirkung für Menschen mit Absorptionsproblem, für Sportler und auch im Babynahrungsbereich von großer Bedeutung. Da sie im Nahrungsmittelbereich Verwendung finden, ist ihre Herstellung besonderen Kriterien unterworfen.

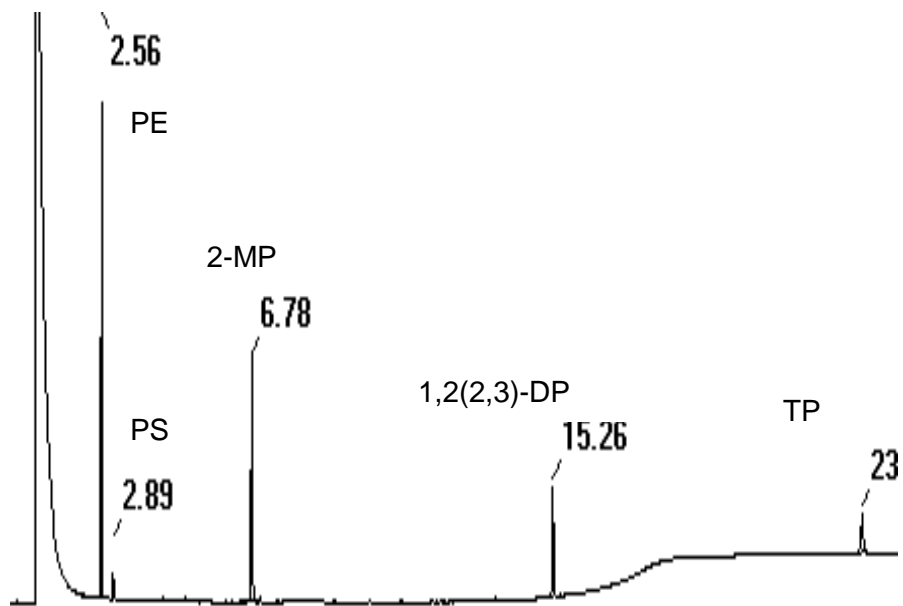
Die Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach einem neu entwickelten Zweischnittverfahren, das aus einer Alkohololyse und einer Veresterung als zweiten Reaktionsschritt besteht. Die Alkohololyse wurde mit Ethanol als Alkohohlkomponente und folgenden Substraten durchgeführt: Tripalmitin, Triolein, Leinöl und Fischölen. Die Zielverbindungen der Alkohololyse waren die 2-MG, die in hoher Ausbeute und Reinheit erhalten werden sollten. Die anschließende Veresterung von 2-MG mit verschiedenen Fettsäuren führte zu strukturierten Triglyceriden des ABA-Typs, die in ihrer Anwendung unterschiedlich sind. Um die bei der Alkohololyse und Veresterung entstehenden Reaktionsprodukte zu detektieren wurde zunächst eine effiziente Analytik entwickelt. Ebenso wurden einige Lösungsmittelversuche durchgeführt und die kinetischen Parameter bestimmt, bevor mit den Synthesen der Triglyceride OPO, MLM und der Kakaobutteräquivalente begonnen wurde.

### 2.1 Entwicklung einer effizienten Analytik

Zur Überprüfung der Reaktionszusammensetzung und der Reinheit der synthetisierten Produkte wurden analytische Methoden und Geräte wie Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie, HPLC und  $^{13}\text{C}$ -NMR eingesetzt. Die im folgenden beschriebene Analytik wurde mit verschiedenen Modifikationen zur Detektion der Produkte sowohl bei der Alkohololyse als auch bei der Veresterung eingesetzt.

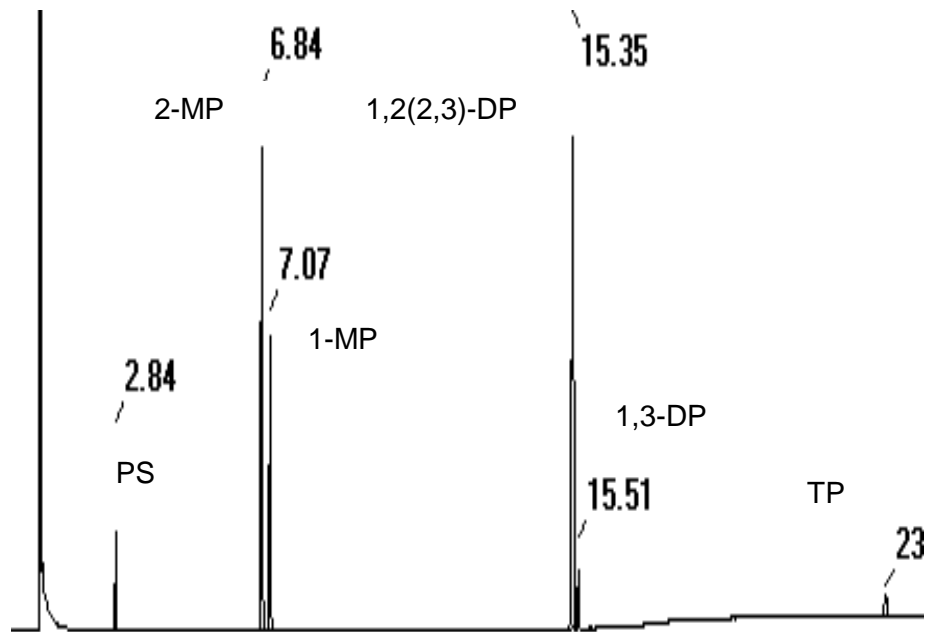
Die Reinheit der 2-Monoglyceride nach Isolierung durch Kristallisation oder Säulenchromatographie wurde gaschromatographisch überprüft. Dazu wurden die OH-Gruppen mit *N*-Methyl-*N*-Trimethylsilylheptafluorbutyramid (MSHFBA) silyliert. Bei dieser Methode ist eine Trennung der Isomeren 2-MG und 1-MG sowie der 1,2(2,3)-DG bzw. 1,3-DG durch die nun unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix möglich. Diese GC-Methode wurde ebenfalls zur Reaktionskontrolle eingesetzt. Die Umrechnung in Mol% erfolgte über Response-Faktoren, die mit Hilfe eines Standardgemisches bestimmt wurden.

Abbildung 8 zeigt ein Chromatogramm einer Alkoholysereaktion von Tripalmitin bei der keine Acylwanderung aufgetreten ist. Es entstanden nur 2-MP und 1,2(2,3)-DP.



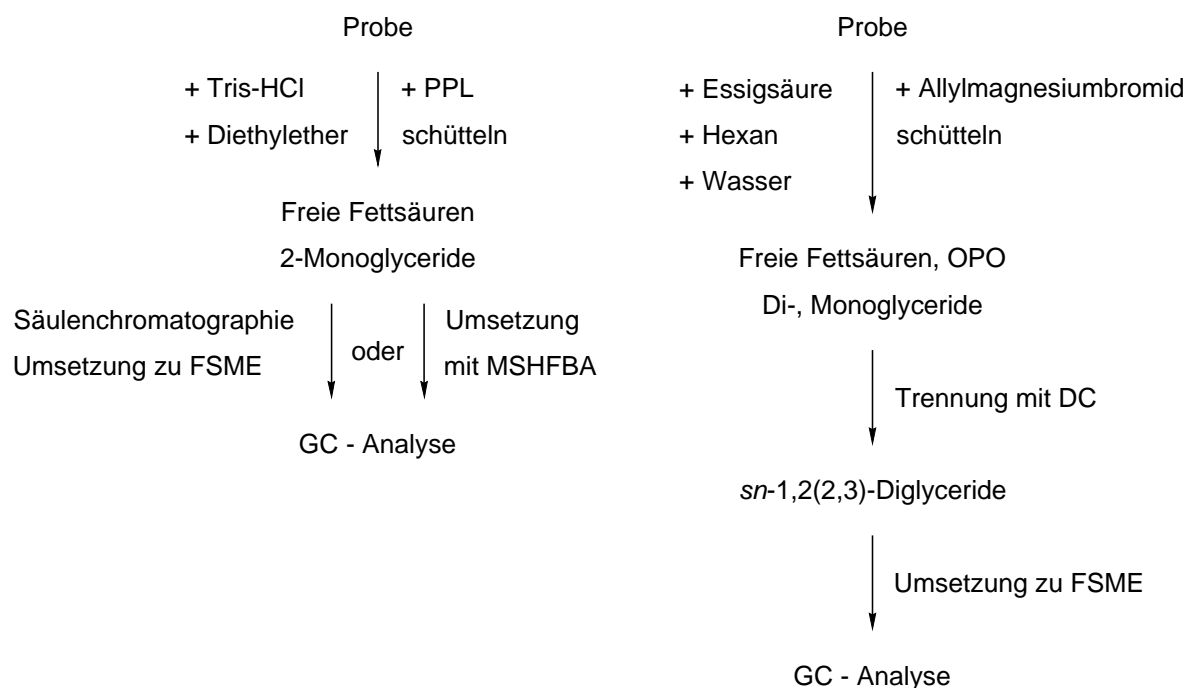
**Abbildung 8** GC-Chromatogramm der Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton nach Derivatisierung mit MSHFBA

In Abbildung 9 ist eine Alkoholysereaktion zu sehen, bei der Acylwanderung auftrat. Dem 2-MP-Peak (6,84 min) folgt ein weiterer Peak bei 7,07 min nach. Dabei handelt es sich um 1-MP. Ebenso ist nun neben dem Peak (15,35 min), der dem 1,2(2,3)-Dipalmitin zuzuordnen ist, ein zweiter Peak entstanden – das 1,3-DP (15,51 min).



**Abbildung 9** GC-Chromatogramm der Alkoholyse von Tripalmitin nach Derivatisierung mit MSHFBA mit deutlicher Acylwanderung

Die Detektion der Veresterungsprodukte erfolgte ebenfalls mittels GC. Zum einen wurde die Zusammensetzung der Triglyceride durch Überführung der Fettsäuren in die Fettsäuremethylester bestimmt. Zum anderen wurden die einzelnen Triglyceride voneinander getrennt (siehe Kap. 2.5.2). Ein Schwerpunkt der Analytik war die regiospezifische Analyse der Triglyceride. Für Fettsäuren mit einer Kettenlänge bis C18 erfolgte die Reaktion mit Pankreaslipase, eine unter den gewählten Reaktionsbedingungen streng 1,3-regioselektiv reagiert. Da Pankreaslipase aber Fettsäuren mit Kettenlängen >C18 nicht mehr so effektiv spaltet, wurde hier die Analytik mit dem Grignardreagenz Allylmagnesiumbromid durchgeführt. In Abbildung 10 ist das Prinzip der beiden Methoden dargestellt. Bei der Hydrolyse mit Pankreaslipase entstehen 2-Monoglyceride und freie Fettsäuren. Diese können durch Säulenchromatographie voneinander getrennt werden und dann durch Überführung der beiden Fraktionen in die Fettsäuremethylester die Zusammensetzung gaschromatographisch bestimmt werden. Alternativ kann das Reaktionsgemisch auch ohne Abtrennung silyliert werden und danach gaschromatographisch bestimmt werden. Bei der Umsetzung mit Allylmagnesiumbromid wurden die entstehenden Reaktionsprodukte mittels DC aufgetrennt, die 1,2(2,3)-Diglyceride von der Platte gekratzt und in die Fettsäuremethylester überführt. Mit Hilfe einer Berechnungsformel kann dann der Gehalt der Fettsäuren in 1,3-Position bzw. 2-Position bestimmt werden.



**Abbildung 10** Regiospezifische Analyse von ABA-Triglyceriden mit Pankreaslipase oder Grignard-Reagenz

## 2.2 Einfluß des Lösungsmittels auf die Alkoholyse von Triolein

Sowohl von Millqvist-Furbey und Mitarbeitern als auch von Soumanou und Mitarbeitern wurde die Alkoholyse von Triolein in MTBE als Lösungsmittel durchgeführt (Fureby et al., 1996; Soumanou et al., 1998b). In dieser Arbeit sollte nun die Alkoholyse von Triolein beispielhaft in Lösungsmitteln, die für die Produktion von Lebensmitteln zugelassen sind, durchgeführt werden.

**Tabelle 6** Konzentration (in %) von 2-MO in verschiedenen Lösungsmitteln

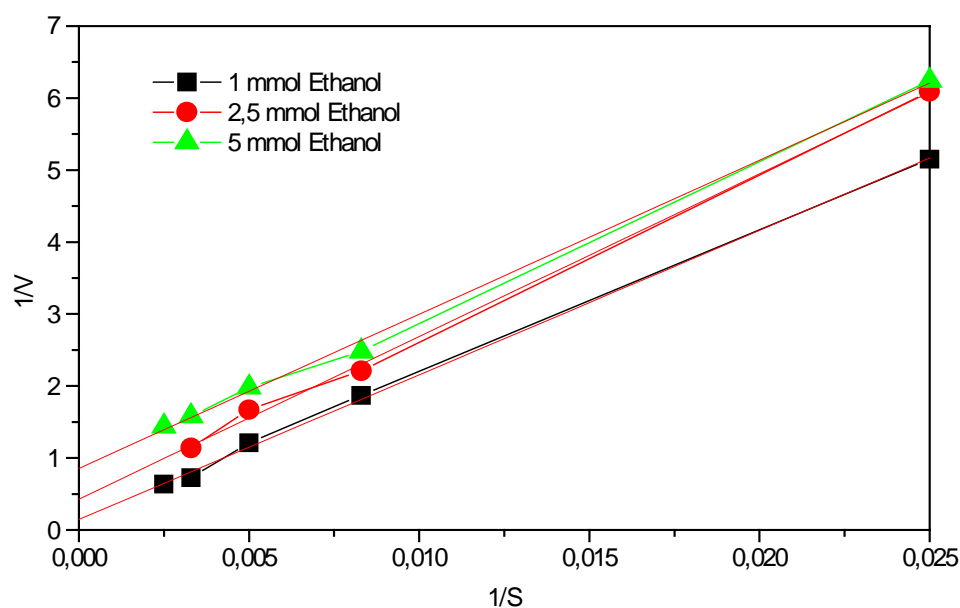
	MTBE	Aceton	Ethanol	Methanol	2-Propanol
<i>R. miehei</i>	75,9	79,5	< 1	< 1	< 1

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen lief die Reaktion in Aceton vergleichbar gut ab wie in MTBE. In Ethanol, Methanol und 2-Propanol konnte kein Umsatz von Triolein beobachtet werden. Die nun folgenden kinetischen Untersuchungen wurden in Aceton als Lösungsmittel durchgeführt.

## 2.3 Untersuchung der Kinetik der Alkoholysereaktion am Beispiel Triolein

Sowohl für die Alkohololyse als auch für die Veresterung im zweiten Prozessschritt wird bei der kinetischen Modellierung ein Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus (siehe Kap. 1.2) unter Bildung eines Acyl-Enzym-Komplexes angenommen (Lortie et al., 1993). Experimentell wurden die Daten mit verschiedenen Konzentrationen an Triolein bei jeweils verschiedenen fixen Konzentrationen an Ethanol mittels HPLC bestimmt. Die Alkohololyse wurde in Aceton als Lösungsmittel unter Verwendung einer 1,3-regiospezifischen Lipase aus *R. miehei* als Biokatalysator durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden sowohl nach Lineweaver-Burk als auch nach Eadie-Hofstee durch lineare Regression ausgewertet. Allerdings hat die Lineweaver-Burk-Auftragung den Nachteil, daß bei hohen Substratkonzentrationen aufgenommene Werte gestaucht und Daten für niedrige Konzentrationen höher bewertet werden. Etwas exakter ist die Auftragung nach Eadie-Hofstee. Dabei wird  $V$  gegen  $V/[S]$  aufgetragen, was zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Messpunkte auf der Geraden führt.

Bei Auftragung von  $1/V$  versus  $1/[S]$  (Substratkonzentration) nach Lineweaver-Burk bei verschiedenen festen Konzentrationen an B (Ethanolkonzentration) erhält man für einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus parallel verlaufende Geraden. Im Gegensatz dazu werden sowohl beim zufälligen Bi-Bi-Mechanismus als auch beim geordneten Bi-Bi-Mechanismus Geraden mit gemeinsamem Schnittpunkt erhalten.



**Abbildung 10** Auftragung von  $1/V$  versus  $1/S$  nach Lineweaver-Burk. Bildung von 2-MO durch Alkohololyse von Triolein mit 1,3-spezifischer Lipase.

Die Geraden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol zeigen einen weitgehend parallelen Verlauf. Dieses experimentelle Ergebnis deutet auf einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus für die Alkoholyse von Triolein mit Ethanol hin.

### 2.3.1 Bestimmung von $V_{\max}$ und $K_m$

Die Bestimmung von  $V_{\max}$  und  $K_m$  erfolgte zum einen durch die Lineweaver-Burk-Auftragung, zum anderen durch die Eadie-Hofstee-Auftragung.

Lineweaver-Burk-Diagramm:  $1/V$  gegen  $1/[S]$   
 Steigung =  $K_m/V_{\max}$   
 y-Achsenabschnitt =  $1/V_{\max}$

Eadie-Hofstee-Diagramm:  $V$  gegen  $V/[S]$   
 Steigung =  $-K_m$   
 y-Achsenabschnitt =  $V_{\max}$

**Tabelle 7:** Vergleich von  $K_m$  und  $V_{\max}$  bestimmt nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee

	1 mmol Ethanol	2,5 mmol Ethanol	5 mmol Ethanol
Lineweaver-Burk	$V_{\max}$ : 6,8 $K_m$ : 1370	$V_{\max}$ : 2,7 $K_m$ : 629	$V_{\max}$ : 1,2 $K_m$ : 249
Eadie-Hofstee	$V_{\max}$ : 6,5 $K_m$ : 1334	$V_{\max}$ : 1,9 $K_m$ : 417	$V_{\max}$ : 1,1 $K_m$ : 222

$K_m$ : mMol

$V_{\max}$ :  $\mu\text{mol}$  Produkt/min/pro mg Enzymmenge.

Die  $K_m$  und  $V_{\max}$ -Werte bestimmt nach den zwei verschiedenen Auftragungsmöglichkeiten stimmen bei 1 mmol und 5 mmol Ethanol sehr gut überein. Differenzen gibt es bei einer Ethanolkonzentration von 2,5 mmol. Hier liegen die Werte für  $V_{\max}$  und  $K_m$  errechnet nach Lineweaver-Burk deutlich höher.

Auffallend bei allen drei Ethanolkonzentrationen sind die sehr hohen  $K_m$ -Werte im Vergleich zu den geringen  $V_{\max}$ -Werten. Sehr hohe  $K_m$ -Werte bedeuten eine geringe Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes. Bei Zunahme der Ethanolkonzentration nimmt die Bindung des Substrats an das Enzym zu. Die höchste Bildung an Produkt entsteht bei 1 mmol Ethanol: 6,5 mmol Produkt werden pro Minute pro mg Lipase gebildet. Die Zunahme der Ethanolkonzentration reduziert, wie aus Tabelle 7 zu erkennen ist, die Bildung von 2-MO.

## 2.4 Hoch-selektive Synthese von 1,3 Dioleoyl-2-palmitoylglycerin (OPO) nach dem Zweischnittverfahren

### 2.4.1 Alkoholyse von Tripalmitin

Zunächst wurde die Alkoholyse in MTBE mit drei unterschiedlichen 1,3-regiospezifischen Lipasen untersucht. Für eine Lipase aus *Rhizopus delemar* betrug die höchste Ausbeute an 2-MP 95% mit einer Reinheit von über 95% an 2-MP. Eine ebenfalls hohe Ausbeute konnte mit Lipozyme IM (Lipase aus *Rhizomucor miehei* immobilisiert auf Anionenaustauscher) erzielt werden. Interessant ist dabei die bei der Reaktion auftretende Acylwanderung. Es bildete sich zu 20% 1-MP. Dieses Ergebnis geht mit Resultaten aus der Literatur konform, die bei Immobilisierung einer Lipase auf Anionenaustauscher Acylwanderung feststellten. Die Verwendung einer Lipase aus *Rhizopus javanicus* ergab nur eine Ausbeute von 50% an 2-MP (Tab. 8)

**Tabelle 8** Einfluß der Lipasen auf Ausbeute und Reinheit von 2-Monopalmitin (2-MP) während der Alkoholyse von Tripalmitin mit Ethanol in MTBE (nach 24 h).

Lipase von	Ausbeute von 2-MP (%)	Reinheit von 2-MP (%)
<i>Rhizomucor miehei</i> <sup>a</sup>	88	80 <sup>c</sup>
<i>Rhizopus delemar</i> <sup>b</sup>	95	> 95
<i>Rhizopus javanicus</i> <sup>b</sup>	50	> 90 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Lipozyme immobilisiert auf Anionenaustauscher; <sup>b</sup>immobilisiert auf Celite; <sup>c</sup>20 % 1-MP; <sup>d</sup>enthält 1-MP und Dipalmitin

Da jedoch OPO in Muttermilchersatz zur Ernährung von Säuglingen eingesetzt werden soll, wurde auf lebensmittelrechtliche Aspekte besonders Wert gelegt. In der Technischen Hilfsstoff-Verordnung (THV) sind die Lösungsmittel aufgeführt, die für die Produktion von Lebensmitteln verwendet werden dürfen. §2 THV regelt die zugelassenen Stoffe. Dabei dürfen für Lebensmittel allgemein folgende Extraktionslösungsmittel eingesetzt werden: Trinkwasser, Ethanol, Aceton, Butylacetat, Ethylacetat, die Gase Propan, Butan, Kohlendioxid und Distickstoffmonoxid. Weiter dürfen die in Anlage 2 genannten Lösungsmittel unter den angegebenen Bedingungen verwendet werden (Abb. 12).

**Anlage 2**

(zu § 2 Abs. 2 Nr. 2 und § 3)

**Beschränkt verwendbare Extraktionslösungsmittel**

1	Stoff	verwendbar für	Restgehalt in extrahierten Lebensmitteln höchstens
1	2	3	4
1.	Hexan <sup>1)</sup>	Herstellung und Fraktionierung von Fetten und Ölen und Herstellung von Kakao-butter Herstellung von Proteinerzeugnissen und entfettetem Mehl Herstellung von entfetteten Getreidekeimen Herstellung von entfetteten Sojaerzeugnissen	5 mg/kg in Fett, Öl und Kakaobutter 10 mg/kg im Lebensmittel, das das Proteinerzeugnis oder das entfettete Mehl enthält 5 mg/kg in entfetteten Getreidekeimen 30 mg/kg im Sojaerzeugnis, wie es an den Endverbraucher abgegeben wird
2.	Methylacetat	Extraktion von Koffein, Reizstoffen und Bitterstoffen aus Kaffee und Tee Herstellung von Zucker aus Melasse	20 mg/kg in Kaffee oder Tee 1 mg/kg in Zucker
3.	Ethylmethylketon <sup>2)</sup>	Fraktionierung von Fetten und Ölen Extraktion von Koffein, Reizstoffen und Bitterstoffen aus Kaffee und Tee	5 mg/kg in Fett und Öl 20 mg/kg in Kaffee und Tee
4.	Dichlormethan	Extraktion von Koffein, Reizstoffen und Bitterstoffen aus Kaffee und Tee	2 mg/kg in geröstetem Kaffee und 5 mg/kg in Tee
5.	Methanol	Lebensmittel allgemein	10 mg/kg
6.	Propan-2-ol	Lebensmittel allgemein	10 mg/kg

**Abbildung 12** Zusammenstellung der erlaubten Extraktionslösungsmittel in Anlage 2 Technische Hilfsstoff-Verordnung vom 8.11.91, zuletzt geändert am 29.1.98

Erlaubte Lösungsmittel wie Aceton oder Ethanol ergaben unter den gleichen Reaktionsbedingungen allerdings unbefriedigende Ergebnisse. In Aceton konnte lediglich eine Ausbeute von 25% erreicht werden; in Ethanol war dagegen kein 2-MP detektierbar (Tab. 9). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Resultaten über die geringe Aktivität von Lipasen in organischen Lösungsmitteln, die einen  $\log P < 2$  haben ( $\log P$  von Aceton: -0.23;  $\log P$  von Ethanol: -0.24) (Laane et al., 1987).

**Tabelle 9** Einfluss des Lösungsmittels auf die Alkoholyse von Tripalmitin

Lipase	Lösungsmittel	Wasseraktivität $a_w$	Ausbeute (%) <sup>a</sup>
RML <sup>b</sup>	MTBE	0,11	88 <sup>c</sup>
	Aceton	0,11	25 <sup>d</sup>
	Ethanol	0,11	-

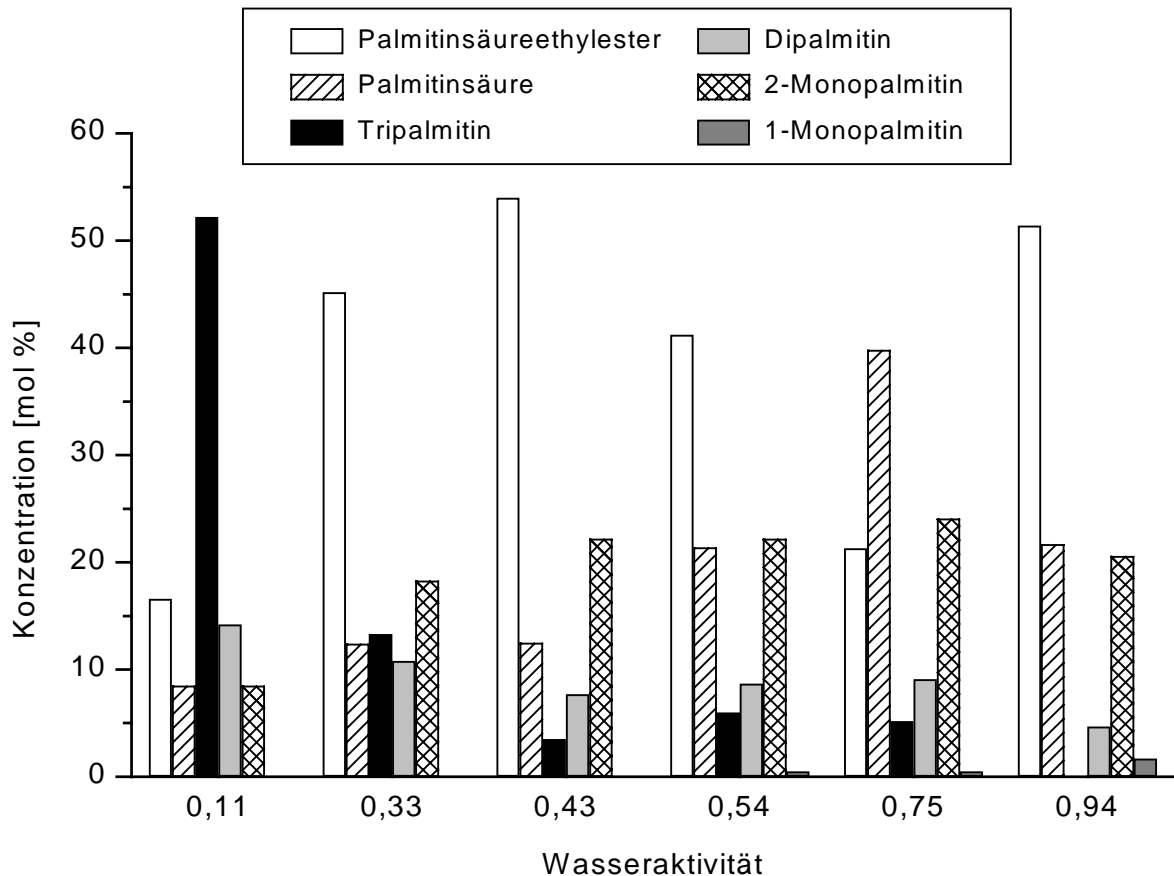
<sup>a</sup>Ausbeute an isoliertem Produkt. <sup>b</sup>immobilisiert auf Anionenaustauscher

<sup>c</sup>enthält neben 2-MP 20% 1-MP. <sup>d</sup>Reinheit an 2-MP > 95%.

Die Ergebnisse der Alkoholyse von Tripalmitin mit Lipozyme in verschiedenen Lösungsmitteln zeigen deutlich einen Zusammenhang zwischen der Wahl des Lösungsmittels bzw. des Trägermaterials und der Acylwanderung. Trägermaterialien wie Anionenaustauscher sind bekannt dafür, eine Acylwanderung zu begünstigen. Wie oben bereits erwähnt, wurde bei Verwendung von Lipozyme IM bei der Alkoholyse von Tripalmitin in MTBE deutliche Acylwanderung beobachtet (Tab.8) Wurde dagegen Aceton als Lösungsmittel verwendet, konnte die Acylwanderung selbst in Gegenwart von Anionenaustauscher unterdrückt werden. Studien zur Beobachtung von Acylwanderung in 2-MO ergaben für Aceton äußerst geringe Acylwanderungsraten von 0.01 mM/h im Gegensatz zu Ethanol, das eine Acylwanderungsrate von 26.8 mM/h aufweist (Fureby et al., 1996). Zudem liegt der Vorteil von Aceton als Lösungsmittel in der guten Eignung für die Lebensmittelproduktion und in der hohen Reinheit des erhaltenen Produkts (2-MP). Die geringe Aktivität des Enzyms in Aceton und die folglich sehr bescheidene Ausbeute an 2-MP sollten nun durch gezielte Untersuchung verschiedener Faktoren gesteigert werden.

### **Einfluss der Wasseraktivität**

Da das Wasser, exakter gesagt die Wasseraktivität, einen starken Effekt auf die Aktivität von Lipasen ausübt, wurde zunächst der Einfluss der Wasseraktivität untersucht. Dabei wurden Tripalmitin, Aceton und Lipase zwei Tage separat mit Hilfe bestimmter Salze auf Wasseraktivitäten von 0.11 bis 0.94 eingestellt. Anschließend wurde die Reaktion durch Mischen von Tripalmitin, Lipase, Aceton und Ethanol gestartet. Nach 24 h Reaktionszeit wurde eine Probe entnommen und mit MSHFBA derivatisiert und gaschromatographisch aufgetrennt. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt einen deutlichen Einfluss der Wasseraktivität auf die Umsetzung von Tripalmitin zu 2-MP (Abb. 13).



**Abbildung 13** Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton mit Lipozyme IM (50 % bezüglich Einwaage Tripalmitin) bei verschiedenen Wasseraktivitäten nach 24 h

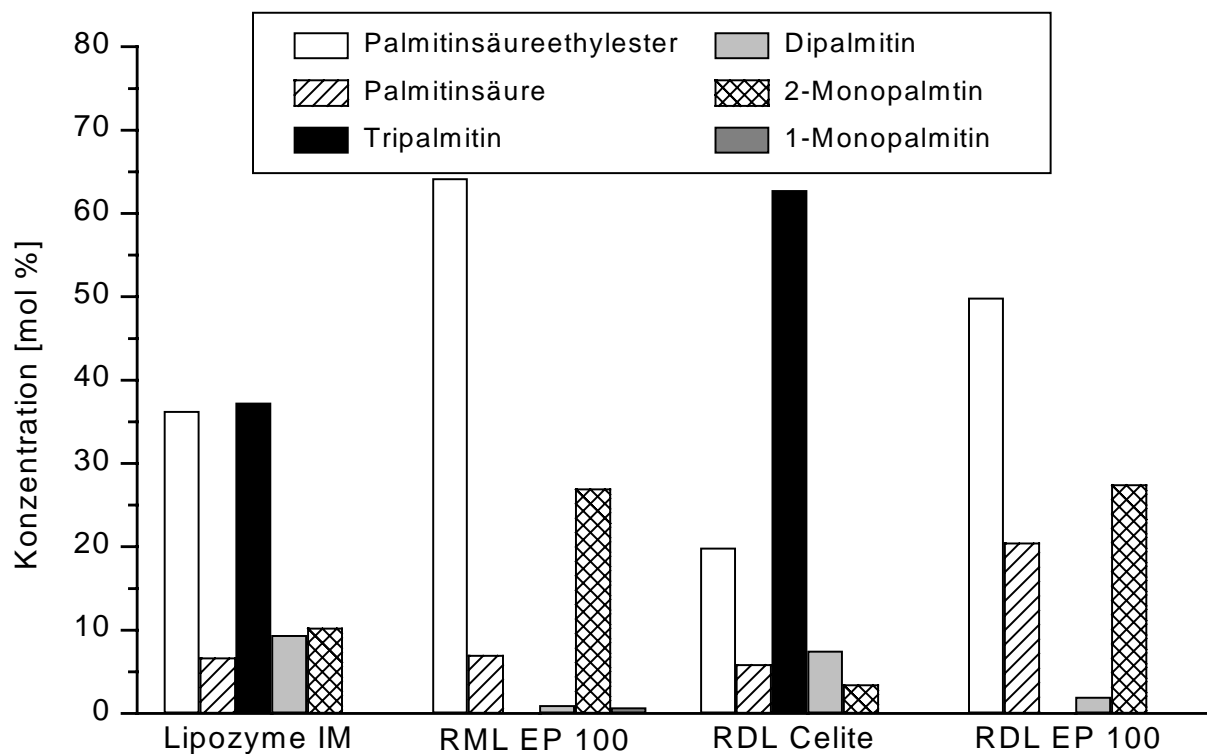
Es wurde ein sehr hoher Anteil an Lipase im Reaktionsgemisch gewählt, um die Reaktionszeit herabzusetzen und mögliche Nebeneffekte wie Acylwanderung oder Inaktivierung der Lipase durch Aceton herabzusetzen.

Bei einer Wasseraktivität von 0,11 wurden über 50 % Tripalmitin überhaupt nicht umgesetzt, 20 % reagierte zu Dipalmitin und nur 10 % zu 2-Monopalmitin. Mit zunehmender Wasseraktivität, nimmt auch die Konzentration an gebildetem 2-MP zu (> 20 %). Bei Wasseraktivitäten > 0,43 wurde allerdings die zunehmende Bildung von 1-MP durch Acylwanderung beobachtet. Aus diesem Grund wurde den folgenden Untersuchungen eine Wasseraktivität von 0,43 zu Grunde gelegt.

### Einfluss des Trägermaterials

Zur Untersuchung des Einflusses des Trägermaterials wurden Lipasen aus *Rhizopus delemar* immobilisiert auf Celite bzw. Polypropylen (EP 100) und *Rhizomucor miehei* immobilisiert auf Anionenaustauscher (Lipozyme IM) bzw. EP 100 eingesetzt. Die Menge an

Lipase wurde dabei bezüglich eingewogenem Tripalmitin auf 10% reduziert, um das Verfahren auch für industrielle Anwendungen interessant zu machen.



**Abbildung 14** Einfluß des Trägermaterials auf die Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton (10% Einwaage an Lipase bezüglich Einwaage Tripalmitin) nach 48 h

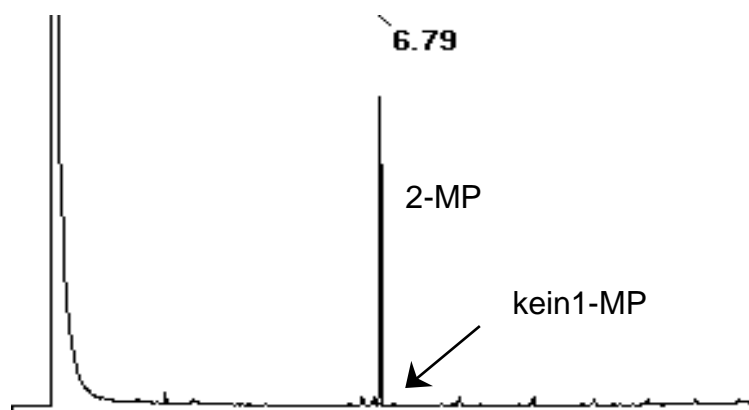
Sowohl RML (immobilisiert auf EP 100) als auch RDL (immobilisiert auf EP 100) zeigten einen quantitativen Umsatz von Tripalmitin zu 2-Monopalmitin. In beiden Fällen blieb nur eine geringe Restmenge an nicht umgesetztem DP zurück. Im Gegensatz zu RDL konnte bei RML eine geringfügige Acylwanderung zu 1-MP beobachtet werden. RDL (immobilisiert auf Celite) erwies sich für die Alkoholyse in Aceton als nicht geeignet. Interessant ist auch der Einfluss der Reduktion der Lipasemenge auf die Aktivität von Lipozyme IM bezüglich Tripalmitin (Abb. 14). Im Vergleich zur Reaktion mit 50 % Lipase wurde nach 48 h Reaktionszeit Tripalmitin nicht vollständig umgesetzt. Tabelle 10 zeigt die Ausbeuten an isoliertem 2-MP und die Reinheit der erhaltenen Produkte.

**Tabelle 10:** Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton mit RDL und RML immobilisiert auf EP 100 bei einer Wasseraktivität von 0.43 (nach 48 h)

Lipase	Lösungsmittel	Ausbeute (%) <sup>a</sup>	Reinheit (%) <sup>b</sup>
RML	Aceton	85	> 95
RDL	Aceton	80	> 95

<sup>a</sup>Ausbeute an isoliertem Produkt. <sup>b</sup>bestätigt durch GC und <sup>13</sup>C-NMR.

Folgendes GC-Chromatogramm zeigt die Reinheit des durch Kristallisation in Hexan/MTBE (96:4) erhaltenen 2-MP nach Derivatisierung mit MSHFBA. Es gelang das Produkt nach zweimaligem Umkristallisieren rein (Ester, Säure und DP konnten abgetrennt werden) und ohne Auftreten von Acylwanderung zu isolieren.



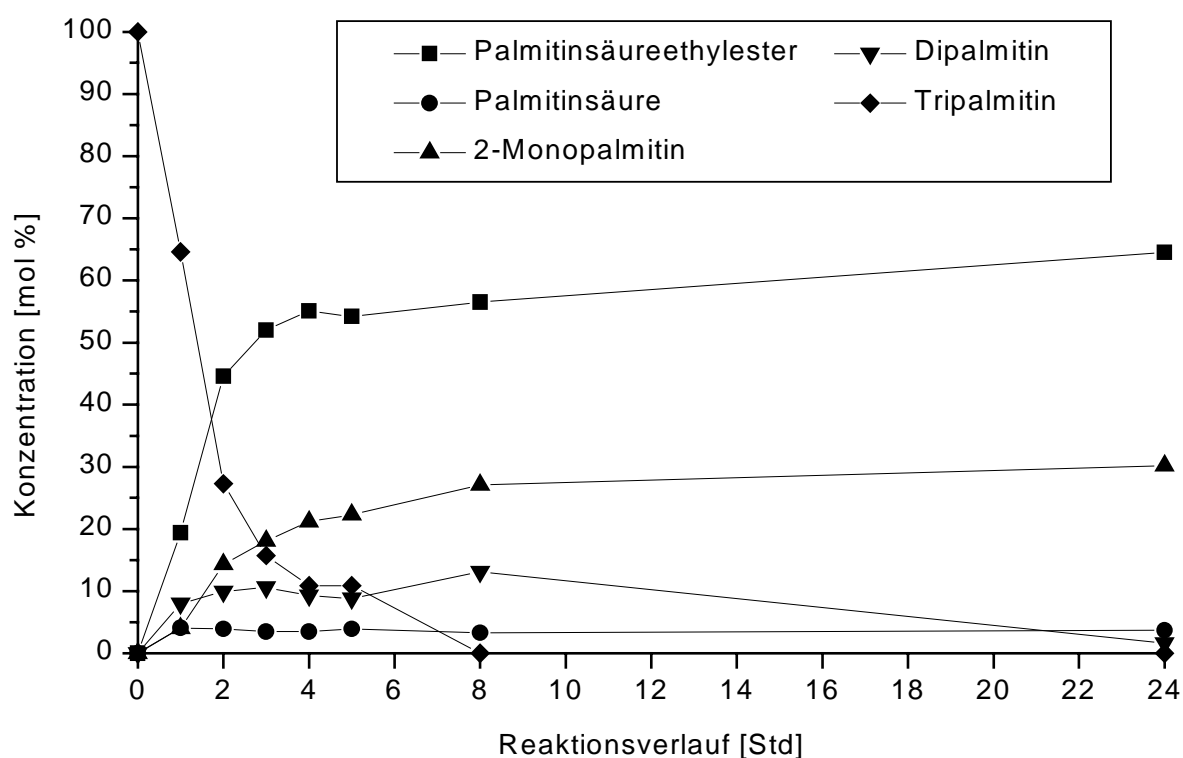
**Abbildung 15** GC-Chromatogramm von 2-MP derivatisiert mit MSHFBA

Eine zusätzliche Bestätigung der Reinheit wurde durch ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ermöglicht. Da es sich bei 2-MP um ein symmetrisches Molekül handelt, bekommt man für die Kohlenstoffe, bei denen sich die Hydroxylgruppen in 1- und 3-Position befinden, nur ein charakteristisches Signal bei 62.79 ppm. Bei Anwesenheit von 1-MP, ein unsymmetrisches Molekül, entsteht für jeden Kohlenstoff mit freier OH-Gruppe ein zusätzliches Signal bei 63.74 ppm und 70.65 ppm. Ebenso ist die chemische Verschiebung bei Kohlenstoffen, die die Esterfunktion in *sn1*-Position tragen verschieden von Kohlenstoffen mit Esterfunktionen in *sn2*-Position.

**Tabelle 11**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von 2-MP erhalten durch Alkohololyse von Tripalmitin in Aceton und 1-MP-Standard (chemische Verschiebung  $\delta$  in ppm)

Monopalmitin	$\delta_{\text{CH}_2\text{OH}}$	$\delta_{\text{CHOH}}$	$\delta_{\text{CH}_2\text{OCOR}}$	$\delta_{\text{CHOCOR}}$	$\delta_{\text{C}_1}$	$\delta_{\text{C}_2}$
1-MP (Standard)	63,74	70,65	65,51	-	174,75	34,52
2-MP (Produkt)	62,79	-	-	75,35	174,49	34,72

Abbildung 16 zeigt einen typischen Reaktionsverlauf einer Alkoholysereaktion von Tripalmitin in Aceton.



**Abbildung 16** Alkohololyse von Tripalmitin in Aceton mit RDL immobilisiert auf Celite (10 % Lipase bezogen auf Tripalmitin)

Aus dem Reaktionsverlauf wird deutlich, dass nach nur acht Stunden Reaktionszeit Tripalmitin vollständig umgesetzt wurde. In den folgenden Stunden reagierte Dipalmitin fast komplett zu 2-MP und Ester bzw. Säure. Ein möglichst geringer Gehalt an Dipalmitin ist aufgrund der nachfolgenden Isolierung durch Kristallisation sehr wichtig, da sich Dipalmitin nicht so einfach von MP durch Kristallisation abtrennen lässt.

Die folgenden Untersuchungen der Alkoholysereaktion von Tripalmitin in Aceton wurden bei einer Wasseraktivität von 0.43 mit RML bzw. RDL immobilisiert auf EP 100 durchgeführt.

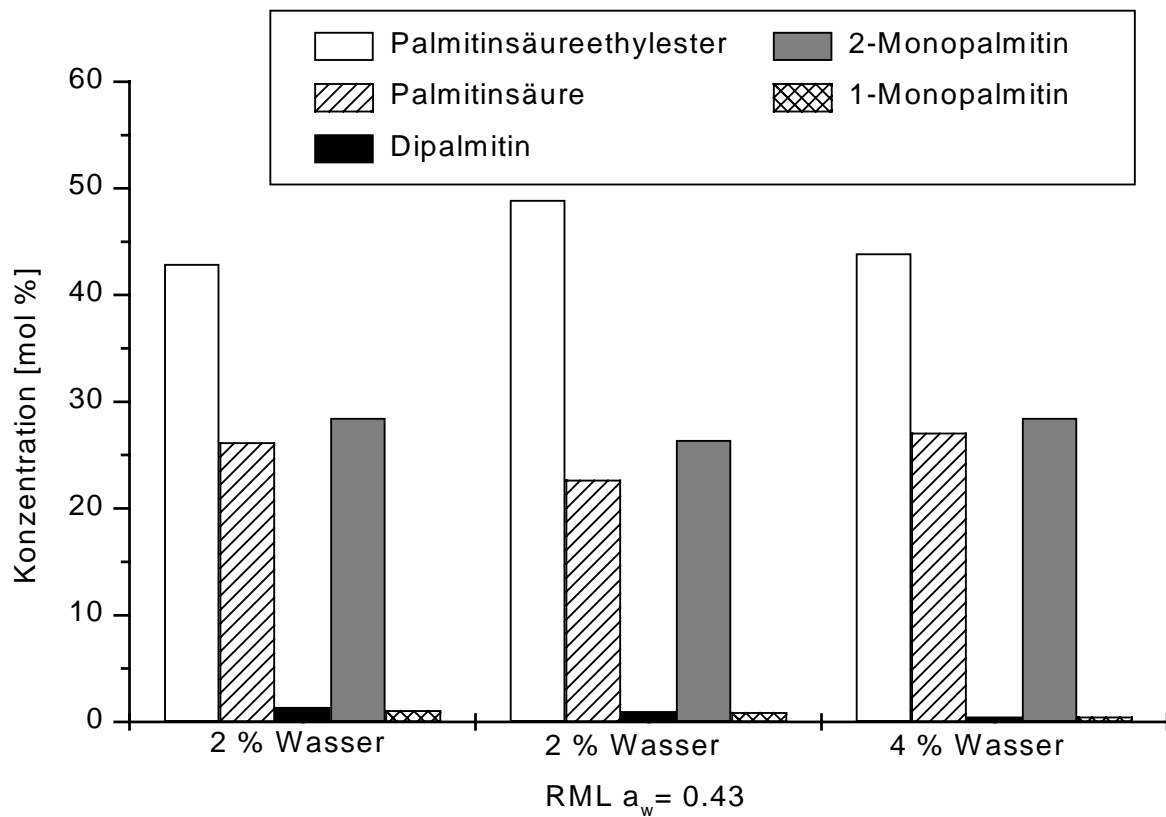
### Bestimmung des Wassergehaltes

Um die Reaktion ohne Äquilibration auf eine Wasseraktivität von 0,43 von Lipase und Aceton durch gesättigte Salzlösungen durchführen zu können, wurde der Wassergehalt von Lipase und Wasser nach Äquilibration mit Karl-Fischer-Titration bestimmt.

**Tabelle 12** Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl-Fischer in Aceton und RML

	Wassergehalt (%)
Aceton ( $a_w= 0,43$ )	1,8
RML immobilisiert auf EP 100 ( $a_w= 0,43$ )	6,0

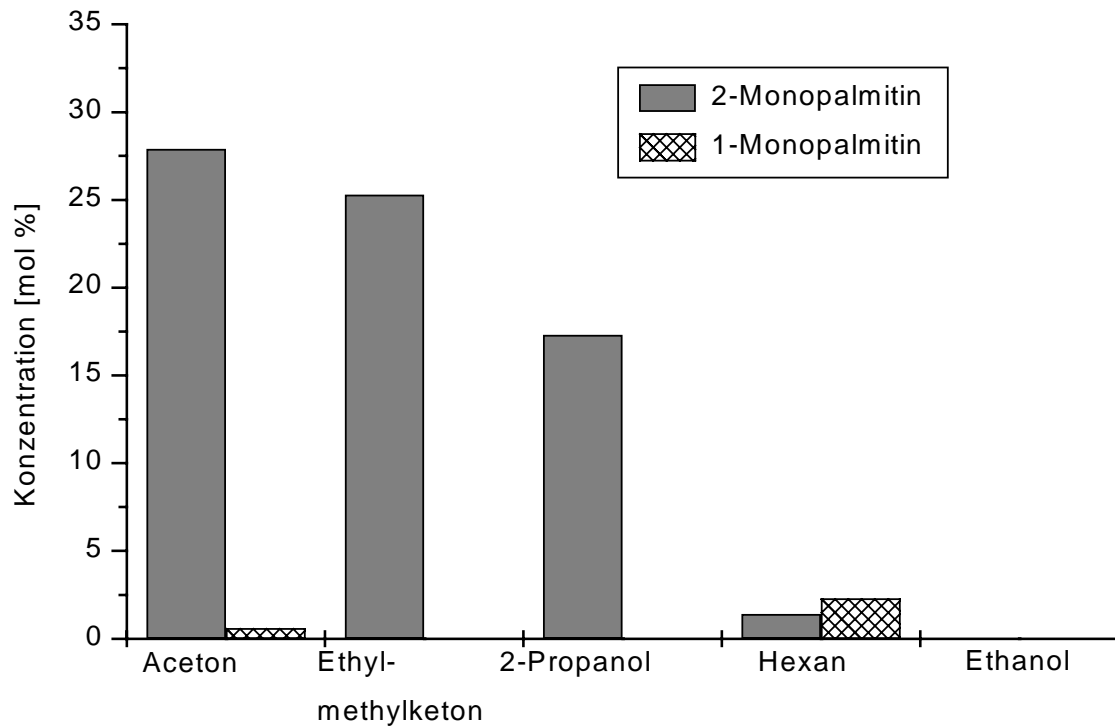
Anschließend wurden drei unterschiedliche Alkoholysereaktionen durchgeführt. Bei Ansatz eins und drei wurden zum Reaktionsgemisch 2% bzw. 4% Wasser hinzugefügt. Aceton und Lipase wurden dabei nicht äquilibriert, sondern lagen wasserfrei vor. Bei Ansatz zwei wurde nur die Lipase äquilibriert, die Wassermenge, die für Aceton nötig ist hingegen direkt zugegeben. In allen drei Reaktionen wurde Tripalmitin vollständig zu 2-MP in ähnlichen Konzentrationen wie bei der Äquilibration umgesetzt. Ein deutlicher Unterschied zur Äquilibration über gesättigten Salzlösungen liegt in der höheren Bildung von Palmitinsäure. Es wurde ca. doppelt so viel Palmitinsäure gebildet. Die Bildung von Palmitinsäure ist allerdings nicht wünschenswert, da sich diese bei Kristallisation schwer vom 2-MP abtrennen lässt und bei zu langem Kontakt mit 2-MP Acylwanderung verursachen kann.



**Abbildung 17** Einfluss der Wassergehaltes auf die Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton

### **Einfluss des Lösungsmittels**

Neben Aceton als Lösungsmittel wurden noch andere für die Produktion von Lebensmitteln zugelassene Lösungsmittel untersucht.

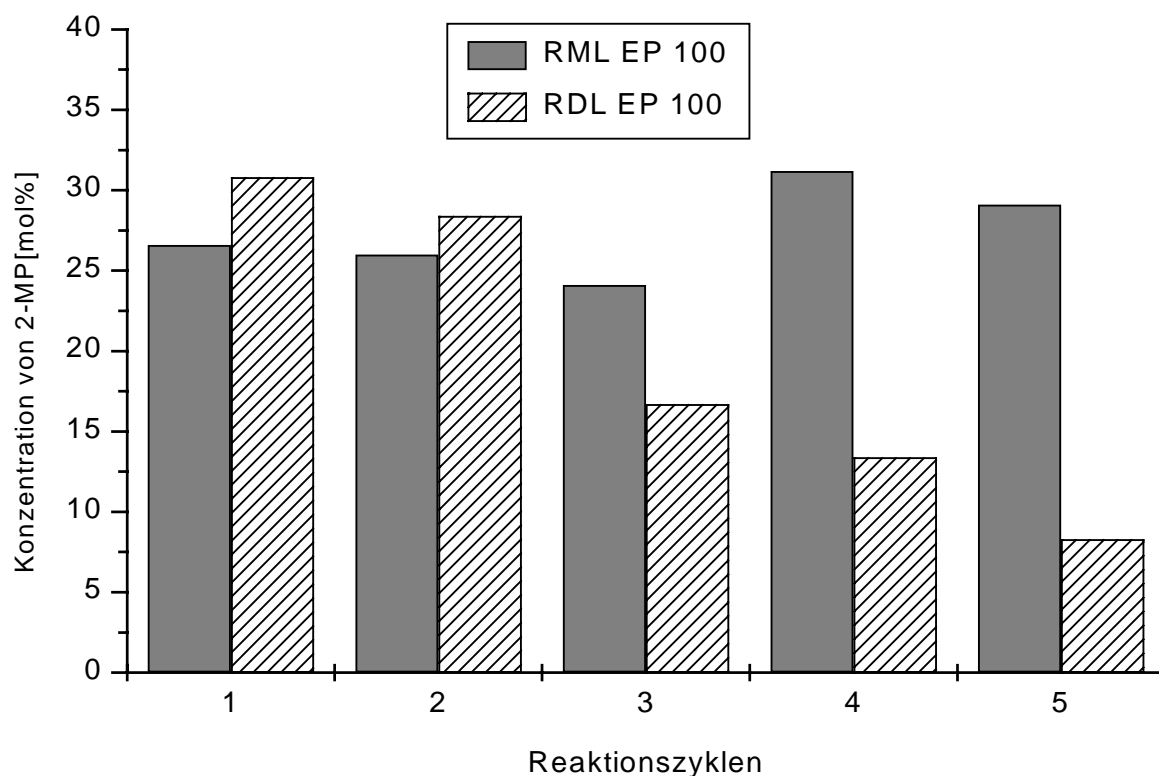


**Abbildung 18** Alkoholyse von Tripalmitin in verschiedenen Lösungsmitteln bei einer Wasseraktivität von 0.43 mit RML immobilisiert auf EP 100

Ähnlich hohe Ausbeuten an 2-MP konnten mit Ethylmethylketon als Lösungsmittel erreicht werden. In 2-Propanol war immerhin im Vergleich zu Ethanol ein deutlicher Umsatz zu 2-MP detektierbar. Hexan erwies sich ebenso wie Ethanol als ungeeignet für die Alkoholyse von Triglyceriden. Bei Verwendung von Hexan konnte darüber hinaus noch eine starke Acylwanderung zu 1-MP beobachtet werden.

### Enzymstabilität

Für eine industrielle Anwendung ist natürlich die Stabilität des Enzyms in organischem Lösungsmittel von besonderem Interesse, da das Enzym über mehrere Reaktionszyklen hinweg aktiv sein sollte. Über fünf Reaktionszyklen wurde die Stabilität von RML und RDL immobilisiert auf EP 100 untersucht. Jeweils nach 48 h Reaktionszeit wurde die Lipase durch Zentrifugation vom Reaktionsgemisch abgetrennt und erneut einer Alkoholyse zugesetzt. Abschließend wurde die Konzentration an 2-MP gaschromatographisch bestimmt (Abb. 19).



**Abbildung 19** Stabilität von RML und RDL während fünf Reaktionszyklen

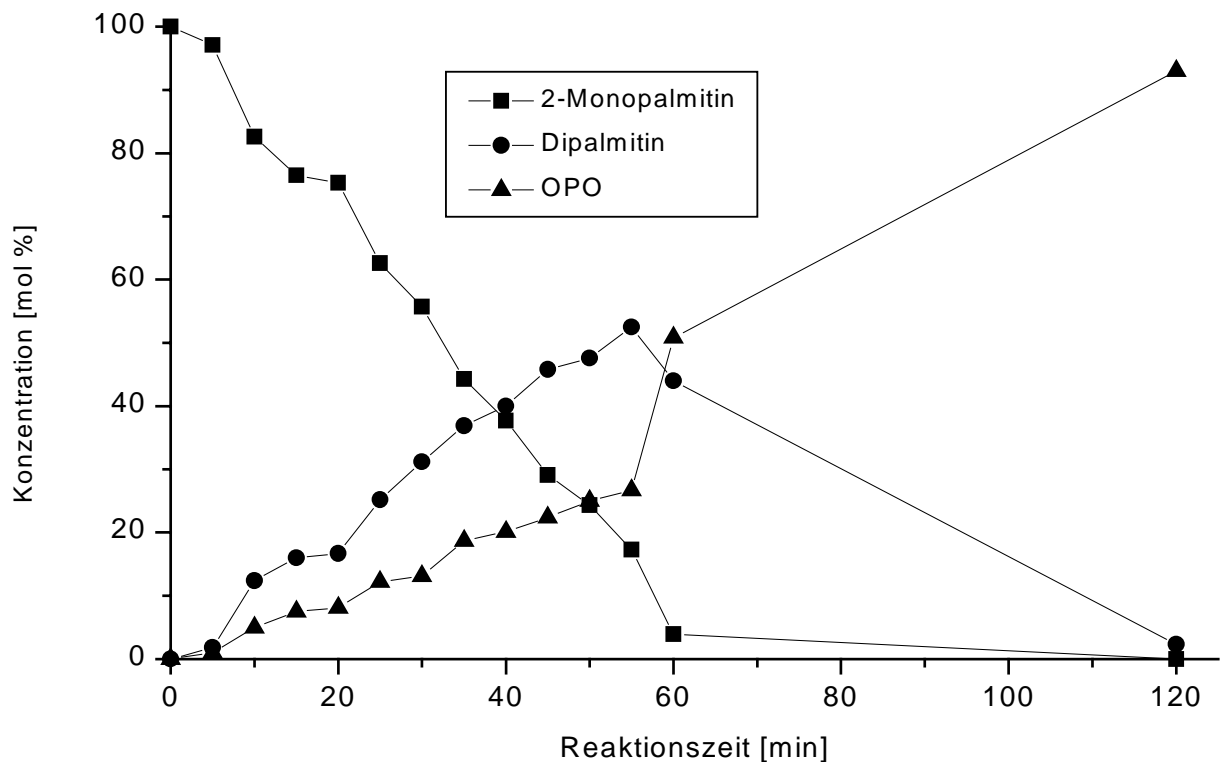
RML zeigte sich über fünf Reaktionszyklen als gleichbleibend aktiv, während RDL nur über zwei Reaktionszyklen aktiv war. Im dritten Reaktionszyklus wurden nur noch ca. 15 Mol% 2-MP gebildet und im fünften Reaktionszyklus sank die Konzentration an 2-MP unter 10 %. Basierend auf diesen Ergebnissen eignet sich RDL immobilisiert auf EP 100 nicht zum wiederholten Einsatz in Aceton.

#### 2.4.2 Veresterung von 2-Monopalmitin mit Ölsäure

Die Veresterung von 2-Monopalmitin mit Ölsäure wurde sowohl in Hexan als Lösungsmittel als auch in einem lösungsmittelfreien System durchgeführt. Das bei der Reaktion gebildete Wasser wurde im lösungsmittelhaltigen System mit aktiviertem Molekularsieb entfernt. Im lösungsmittelfreien System wurde das Wasser durch Anlegen von Vakuum entfernt.

##### Veresterung in *n*-Hexan

Die Reaktionszeit ist stark abhängig von der eingesetzten Menge an Enzym. Bei 50 % Enzymmenge (bezogen auf die Einwaage an 2-MP) betrug die Reaktionsdauer nur 2 h. Nach nur 1 h Reaktionszeit reagierte 2-MP komplett zum Diglycerid. In der nächsten Stunde erfolgte dann die Veresterung des Diglycerides zum Triglycerid.



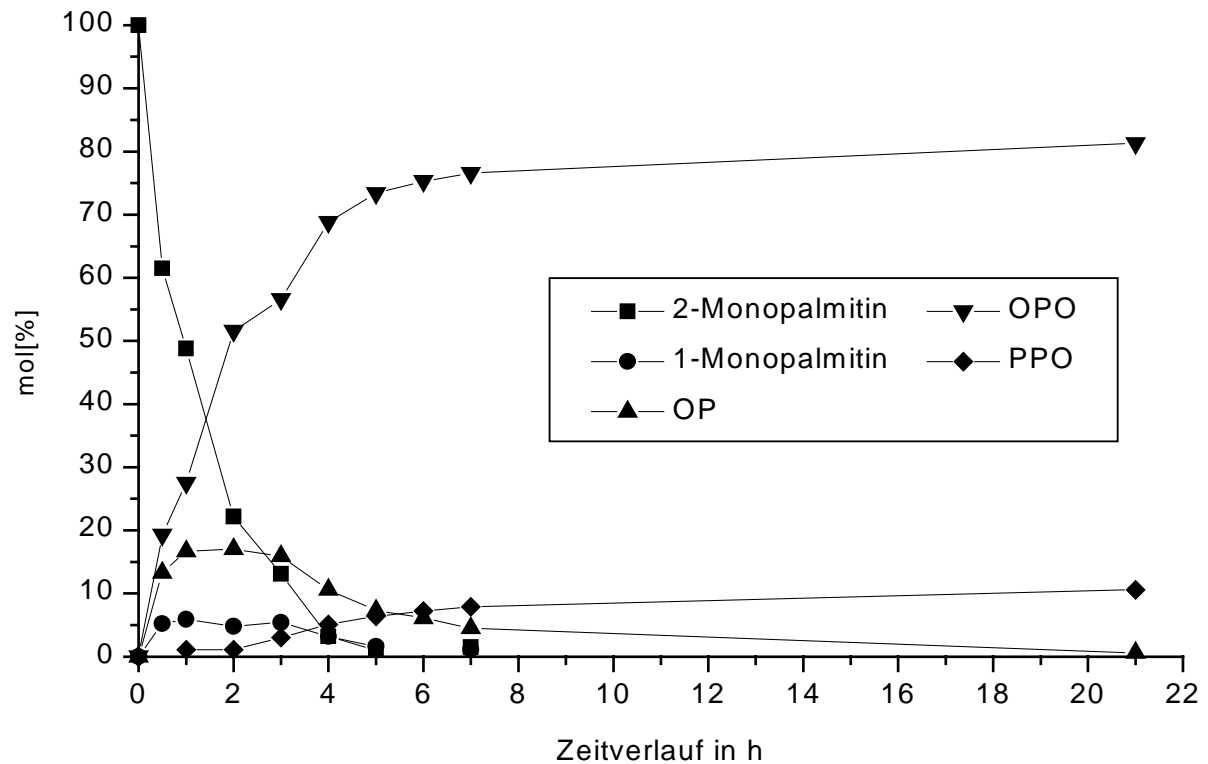
**Abbildung 20** Veresterung von 2-MP mit Ölsäure in Hexan durch Lipozyme IM (50% bezogen auf Einwaage 2-MP)

Wurden dagegen nur 10 % Lipase zugegeben, dauerte die Reaktion sieben Stunden.

### Veresterung im lösungsmittelfreiem System

Bei der Synthese von Produkten, die als Lebensmittel Verwendung finden, wird ein lösungsmittelfreies System bevorzugt. Zusätzliche Vorteile sind die hohe Raum-Zeit-Ausbeute und das Entfallen von Abfallkosten. Das bei der Reaktion gebildete Wasser wurde hierbei durch Anlegen von Vakuum entfernt, so dass auf den Zusatz von Molekularsieb verzichtet werden konnte.

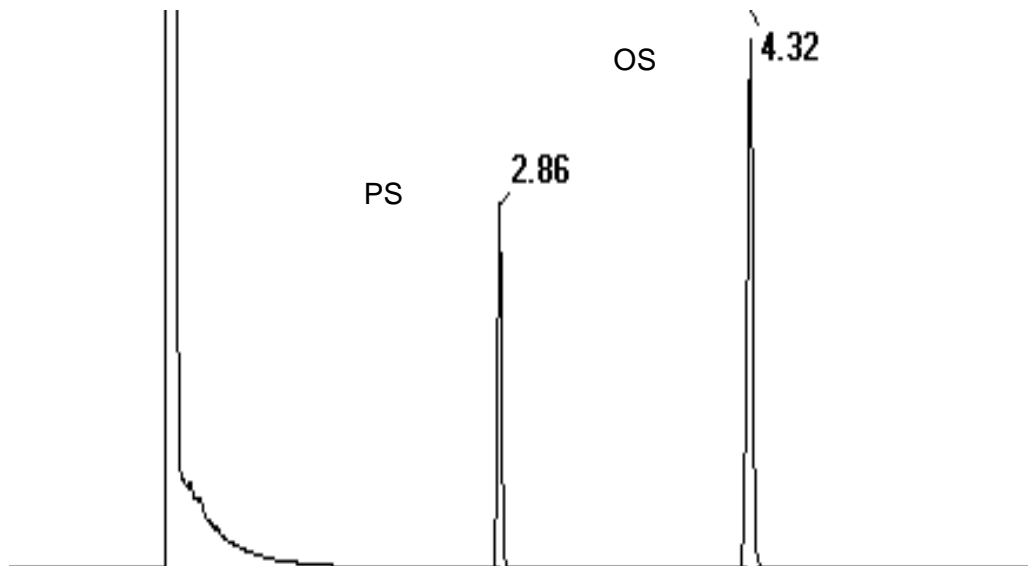
Abbildung 21 zeigt einen typischen Zeitverlauf einer Veresterung im lösungsmittelfreien System. Nach 7 h Reaktionszeit wurden 80 % an gewünschtem OPO gebildet und das Edukt 2-MP vollständig umgesetzt. Danach wurde nur noch ein mäßiger Anstieg an Triglycerid erreicht. Gleichzeitig erhöhte sich allerdings auch der Anteil an PPO. Nach 7 h war das Edukt 2-MP nicht mehr und DP noch zu 7% detektierbar.



**Abbildung 21** Veresterung von 2-MP mit Ölsäure im lösungsmittelfreien System unter Verwendung von RDL immobilisiert auf EP 100

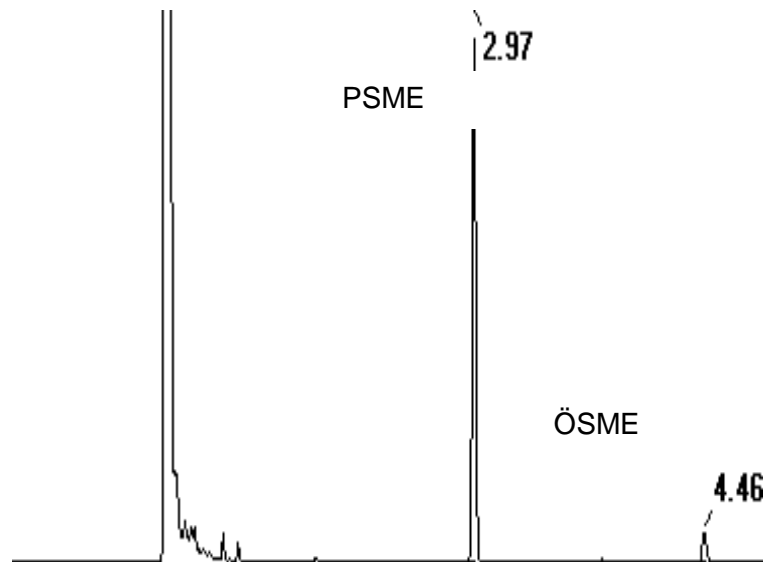
Bei beiden Verfahren wurde das gebildete Triglycerid durch Säulenchromatographie von den gebildeten Diglyceriden und der Fettsäure abgetrennt. Die Trennung erfolgte dabei durch eine Kieselgel-Aluminiumoxidmatrix. Fettsäure, Diglyceride und eventuell noch nicht umgesetztes Monoglycerid blieben an der Matrix haften und die Triglyceride ließen sich problemlos mit einer Mischung aus Hexan/Diethylether (80:20) eluieren. Ein Anteil von mindestens 5 % Diethylether war für eine effiziente Elution von Bedeutung. Eine durch Säulenchromatographie bedingte Acylwanderung konnte nicht beobachtet werden.

Die Überprüfung der Reinheit des erhaltenen OPO erfolgte nach mehreren Verfahren. Zunächst ergab die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung einen ersten Hinweis bezüglich des Anteils an Ölsäure. Bestenfalls beträgt das Verhältnis Ölsäure zu Palmitinsäure genau 2:1 (Abb. 22).



**Abbildung 22** Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von OPO

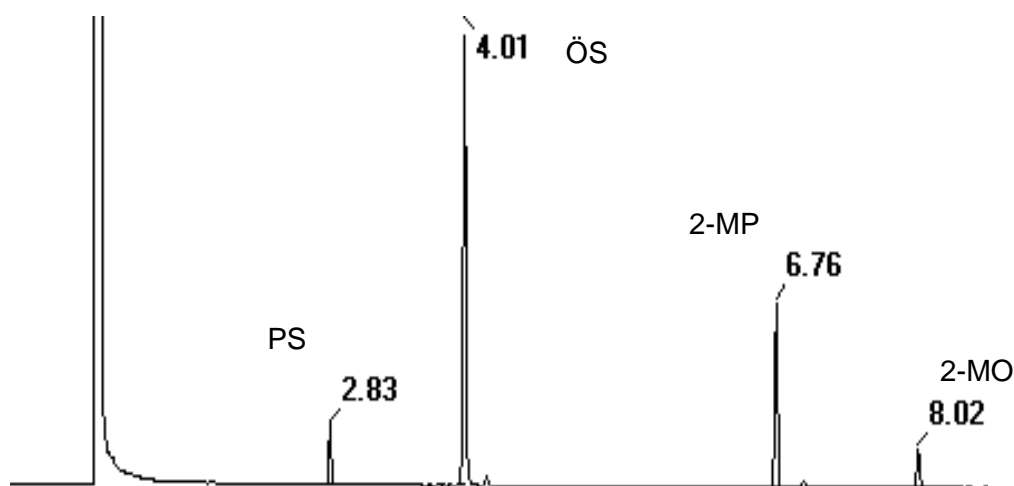
Einen weiteren Hinweis der Reinheit ergab die gaschromatographische Auftrennung der Triglyceride. Triglyceride, die sich in ihrer Anzahl der C-Atome unterscheiden, lassen sich unter Anwendung sehr hoher Säulentemperaturen (360°C) an einer unpolaren Säulenmatrix auftrennen. So war es möglich die Triglyceride PPP, PPO, OPO und OOO voneinander zu trennen. Triglyceride mit gleichem Molekulargewicht wie z.B. OPO oder OOP können weder gaschromatographisch noch mittels HPLC ohne Modifikation an einer unpolaren Säulenmatrix aufgetrennt werden. Um abschließend aussagen zu können, wieviel Palmitinsäure sich in *sn2*-Position bzw. wieviel Ölsäure sich in *sn1,3*-Position befindet, war eine regiospezifische Analyse des Triglycerids notwendig. Die Analyse wurde mit Pankreaslipase durchgeführt, die unter den gewählten Bedingungen streng 1,3-spezifisch reagiert. Das Triglycerid wurde dabei in Fettsäuren und 2-Monoglycerid gespalten. Die Analyse der Produkte erfolgte gaschromatographisch durch Überführung in die Fettsäuremethylester oder durch Derivatisierung mit MSHFBA.



**Abbildung 23** Gaschromatographische Bestimmung der 2-Monoglyceridfraktion (Fettsäuremethylester) nach regiospezifischer Reaktion mit Pankreaslipase

Die Analyse der 2-Monoglycerid-Fraktion im lösungsmittelfreien System unter Verwendung von RDL immobilisiert auf EP 100 ergab 96 % Palmitinsäure in *sn*2-Position und nur 4 % Ölsäure in *sn*1,3-Position (Abb. 23).

Nach Silylierung der Reaktionsprodukte wurden die Säuren gemeinsam mit den 2-Monoglyceriden erhalten. Die Berechnung der einzelnen Produkte erfolgte dann über Responsefaktoren.



**Abbildung 24** Gaschromatographische Bestimmung der Produkte, die durch regiospezifische Analyse mit Pankreaslipase nach Derivatisierung mit MSHFBA erhalten wurden

Tabelle 12 zeigt die erhaltenen Ausbeuten und die Reinheit des erhaltenen OPO.

**Tabelle 13** Veresterung von 2-MP mit Ölsäure mit verschiedenen Lipasen, Trägermaterialien und Reaktionsbedingungen

Lipase	Reaktionsbedingungen	Ausbeute <sup>a</sup> [%]	Regiospezifische Analyse [%]	
			<i>sn</i> 1,3-Position <sup>b</sup>	<i>sn</i> 2-Position <sup>c</sup>
RML <sup>d</sup>	<i>n</i> -Hexan/ Molekularsieb	70 (5h)	89	92
	Vakuum	82 (24h)	89	82
	Vakuum	88 (40h)	85	73
RDL <sup>e</sup>	<i>n</i> -Hexan/ Molekularsieb	72 (5h)	83	94
RDL <sup>e</sup>	Vakuum	78 (16h)	90	96

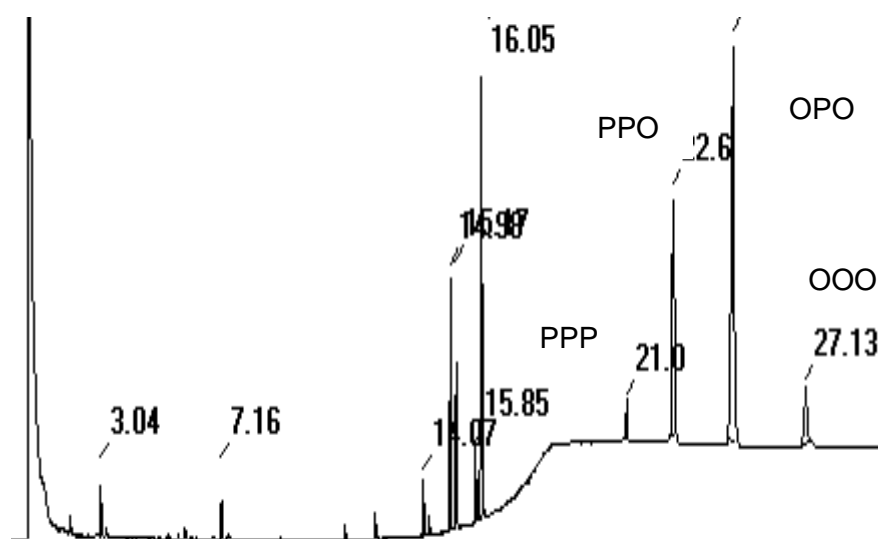
<sup>a</sup>Ausbeute an isoliertem Produkt. <sup>b</sup>Ölsäure. <sup>c</sup>Palmitinsäure. <sup>d</sup>immobilisiert auf Anionenaustauscher. <sup>e</sup>immobilisiert auf Polypropylen (EP 100)

Nach 5 h Reaktionszeit wurden in beiden Reaktionssystemen ca. 70 % an OPO erhalten. Eine Überprüfung der Reinheit ergab in beiden Reaktionen ebenfalls vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit in *sn*2-Position. In *sn*1,3-Position war dagegen mit RML eine höhere Reinheit nachweisbar. Interessant ist die Beziehung zwischen längerer Reaktionszeit und gemessener Reinheit von OPO. Nach 24 h Reaktionszeit konnte die Ausbeute von OPO mit RML auf 82 % und nach 40 h Reaktionszeit sogar auf 88 % gesteigert werden. Ein Blick auf die Konzentration von Palmitinsäure in *sn*2-Position zeigt

allerdings deutlich eine Abnahme um jeweils 10 %, so dass nach 40 h Reaktionszeit nur noch 73 % Palmitinsäure in *sn2*-Position detektiert werden konnten. Die höchste Reinheit an OPO mit einer guten Ausbeute von 78 % konnte mit einer Lipase aus *Rhizopus delemar* immobilisiert auf Polypropylen erhalten werden. Dabei befanden sich 96% Palmitinsäure in *sn2*-Position und 90 % Ölsäure in *sn1,3*-Position.

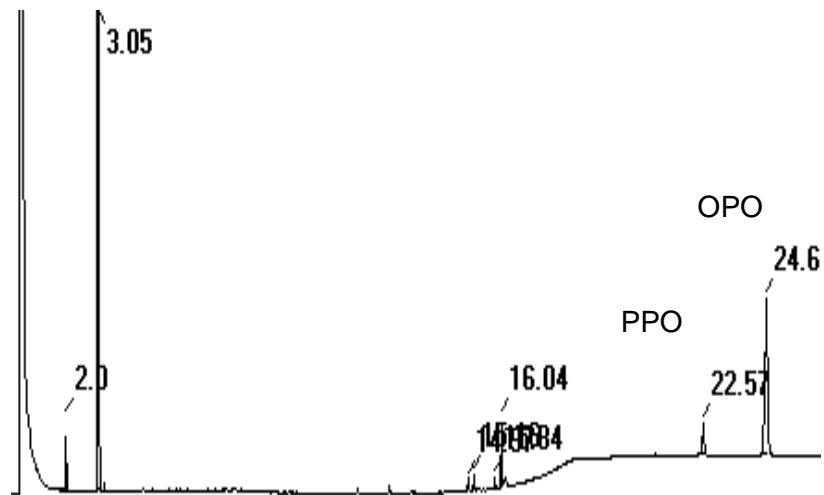
### Einfluß der Reaktionsbedingungen

Als sehr wichtig für die Reinheit des erhaltenen Reaktionsproduktes erwiesen sich die gewählten Reaktionsbedingungen. Abbildung 25 zeigt sehr anschaulich den Einfluss der Reaktionsführung auf die Reinheit des Produktes. 2-Monopalmitin wurde dabei mit drei Äquivalenten Ölsäure eine Stunde bei 55°C inkubiert. Nach vollständigem Lösen von 2-Monopalmitin wurde 10 % RDL immobilisiert auf EP 100 (bezogen auf Einwaage 2-MP) hinzugegeben und die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches nach 7 h Reaktionszeit untersucht. Deutlich ist eine Acylwanderung zu beobachten. Neben dem Hauptprodukt OPO und auch PPO, das bei jeder Veresterung zu einem bestimmten Prozentsatz entsteht, wurden noch weitere Triglyceride wie PPP (Tripalmitin) und OOO (Triolein) gebildet.



**Abbildung 25** GC-Chromatogramm, das Acylwanderung bei Veresterung von 2-MP mit Ölsäure zeigt

Bei Zugabe von Lipase direkt nach Vermischung der Reaktionskomponenten und Überprüfung der Reaktionszusammensetzung wurde nur eine geringe Acylwanderung beobachtet. Es wurden 85 % OPO und 15 % PPO erhalten.



**Abbildung 26** Geringe Acylwanderung bei direkter Zugabe von Lipase zum Reaktionsgemisch

### Vergleich der beiden Reaktionen bezüglich ihrer Raum-Zeit-Ausbeute (RZA)

Von industrieller Sicht ist die Betrachtung der RZA der beiden Reaktionen von großer Bedeutung. Unter RZA wird die Menge an gebildetem Produkt in  $\mu\text{mol}$  pro Stunde pro ml Reaktionsmischung bzw. pro mg Lipase verstanden (Tab.13). Die Betrachtung der RZA pro mg Lipase bringt bei den zwei verschiedenen Systemen keine signifikanten Unterschiede. Markant sind dagegen die Unterschiede, wenn man die RZA pro ml Reaktionsmischung betrachtet. Im lösungsmittelfreien Verfahren wurden  $227 \mu\text{mol}$  Produkt pro h pro ml Reaktionsmischung gebildet. Das ist ungefähr 80 mal mehr als beim lösungsmittelhaltigen Prozess.

$$\text{Raum-Zeit-Ausbeute} = \frac{\text{Produkt}[\mu\text{mol}]}{\text{Zeit}[\text{h}] \cdot \text{Volumen}[\text{ml}]}$$

**Tabelle 14** RZA und Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei der Veresterung von 2-MP mit Ölsäure in *n*-Hexan oder lösungsmittelfreiem System

Lipase	Reaktionsbedingungen	$a_w^a$	RZA <sup>b</sup>	
			pro ml Reaktionsmischung	pro mg Lipase
RDL <sup>c</sup>	<i>n</i> -Hexan	0,11	2,6	6,6
	<i>n</i> -Hexan	0,43	2,4	6,4
	<i>n</i> -Hexan/Molekularsieb	0,11	2,8	7,2
	Vakuum	0,43	227	8,1
RML <sup>d</sup>	<i>n</i> -Hexan/Molekularsieb	0,43	2,3	3,5

<sup>a</sup>Wasseraktivität. <sup>b</sup>μmol gebildetes Produkt/h. <sup>c</sup>immobilisiert auf EP100. <sup>d</sup> immobilisiert auf Anionenaustauscher.

## 2.5 Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Ölen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren

Ernährungsphysiologisch von großer Bedeutung sind strukturierte Triglyceride, die in *sn*2-Position mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten und in *sn*1,3-Position eine mittelkettige Fettsäure. Diese MLM können auch von Patienten mit Fettabsorptionsproblemen aufgenommen werden und gewährleisten dadurch eine Versorgung mit essentiellen Fettsäuren.

Anders als bei der Alkoholyse von Tripalmitin, konnten die 2-MG nicht durch Kristallisation gewonnen werden, da die ungesättigten Fettsäuren ein unterschiedliches Lösungs- und Kristallisationsverhalten aufwiesen. Aus diesem Grund erfolgte die Isolierung mit präparativer HPLC oder Säulenchromatographie. Dabei ist allerdings wichtig, auf die Wahl des Säulenmaterials besondere Sorgfalt zu verwenden. Eine Säulenchromatographie mit Kieselgel führte zu 90 % Acylwanderung. Die Imprägnierung des Kieselgels mit 10% Borsäurelösung konnte zwar die Acylwanderung verhindern, dennoch war die Abtrennung der 2-MG von den Säuren und Diglyceriden nicht zufriedenstellend. Bei der Trennung durch präparative HPLC wurde daher eine RP18-Säule eingesetzt, die aufgrund der unpolaren Säulenoberfläche Acylwanderung verhinderte. Um größere Mengen an Produkt aufzutrennen wurde alternativ eine Säulenchromatographie mit RP18-Kieselgel entwickelt. Als geeigneter Eluent erwies sich eine Mischung aus Methanol/Wasser (96:4), die eine Elutionsfolge beginnend mit den 2-MG, Fettsäuren, Fettsäureethylester, Diglyceride und Triglyceride bewirkte.

### 2.5.1 Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Leinöl

Leinöl ist aufgrund seines hohen Gehaltes an  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3), einer essentiellen  $\omega$ -3-Fettsäure, ernährungsphysiologisch von großem Interesse.  $\alpha$ -Linolensäure bildet die Vorstufe wichtiger Fettsäuren wie EPA und DHA. Leinöl wird vor allem in Nordamerika, Indien und Argentinien erzeugt. Aufgrund seines hohen Anteils an  $\alpha$ -Linolensäure autooxidiert es leicht, wobei z.B. Bitterstoffe und Polymere entstehen, die zu einer Verfestigung führen. Diesen Effekt macht man sich bei der Lack- und Farbenindustrie zu Nutze, die Leinöl als Grundlage für Anstrichfarben, Lacke und Linoleum einsetzen.

**Tabelle 15** Zusammensetzung von Leinöl: Vergleich von Literaturwerten mit gaschromatographisch bestimmten Werten einer Leinölprobe

Fettsäuren	Zusammensetzung [Mol%]	
	Literatur	Probe
C 16:0	6,1	6,7
C 18:0	3,2	2,7
C 18:1	16,6	13,2
C 18:2	14,2	15,0
C 18:3	59	62,6

#### Alkoholyse von Leinöl

Die Alkoholyse von Leinöl dauerte 24 h bis zur vollständigen Umsetzung. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte säulenchromatographisch mit Borsäure imprägniertem Kieselgel und Elution mit Chloroform:Aceton. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung der Fettsäurefraktion und der 2-Monoglyceridfraktion aufgeführt.

**Tabelle 16** Zusammensetzung der Fettsäurefraktion und der 2-Monoglyceridfraktion, erhalten durch Alkoholyse von Leinöl

Fettsäuren	Zusammensetzung [Mol%]	Zusammensetzung [Mol%]
	2-Monoglyceridfraktion	Fettsäurefraktion
C 16:0	n.d.	15,6
C 18:0	n.d.	10,3
C 18:1	16,7	15,8
C 18:2	19,7	11,6
C 18:3	63,6	47,0

n.d. nicht detektierbar

Laut Untersuchung der Zusammensetzung der 2-Monoglyceridfraktion, besteht diese nur aus einfach bzw. mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die gesättigten Fettsäuren wie Palmitinsäure und Stearinsäure befinden sich vollständig in *sn*1,3-Position.

Die Alkoholysereaktion von Leinöl wurde ebenfalls bei einer Wasseraktivität von 0,43 mit RDL immobilisiert auf EP 100 durchgeführt. Nach 24 h Reaktionszeit waren die Triglyceride vollständig umgesetzt. Die Abtrennung der 2-Monoglyceride von den übrigen Reaktionsprodukten erfolgte mittels Säulenchromatographie und lieferte 72,9% isoliertes Produkt.

### Veresterung von 2-Monoglyceriden aus Leinöl mit Caprylsäure

Die Veresterung der 2-MG erfolgte lösungsmittelfrei. Das bei der Reaktion gebildete Wasser wurde durch Vakuum entfernt.

**Tabelle 17** Veresterung von 2-MG aus Leinöl

Ausbeute [%]	Fettsäurezusammensetzung [Mol%]		Regiospezifische Analyse [%]			
			sn1,3-Position	sn2-Position		
35,2	69,3	Caprylsäure	90,7	Caprylsäure	80,1	PUFA
	6,3	Linolsäure	9,2	PUFA	19,9	Caprylsäure
	17,5	$\alpha$ -Linolensäure				
	6,3	Ölsäure				

### 2.5.2 Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Fischöl

Für die Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Fischöl, standen vier verschiedene Fischöle der Firma Lodgers Crocklaan zur Verfügung, die sich in ihrer

Fettsäurezusammensetzung deutlich unterscheiden. Bei Fischöl 2 und 4 konnten neben Triglyceriden noch Diglyceride und Monoglyceride detektiert werden. Diese wurden durch Säulenchromatographie (siehe Kap. 6.1.9) abgetrennt. Fischöl 3 besteht im Gegensatz zu den anderen Fischölen ausschließlich aus freien Fettsäuren.

- Fischöl 1: Enthält ca. 12 % EPA und ca. 13 % DHA  
 Fischöl 2: Raffiniertes Fischöl, das ca. 40 % DHA enthält  
 Fischöl 3: Besteht nur aus freien Fettsäuren mit einem Gehalt an EPA von ca. 30 %  
 Fischöl 4: Freie Fettsäuren von Fischöl 3 wurden wieder mit Glycerin zu Triglyceriden verestert. Enthält ca. 30 % EPA

### Fettsäurezusammensetzung der Fischöle

Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte gaschromatographisch nach Überführung der Fettsäuren in die Fettsäuremethylester. Es wurde dabei nach zwei verschiedenen Methoden gearbeitet. Zum einen wurden sowohl die gebundenen als auch die freien Fettsäuren mit Bortrifluorid methyliert und gemeinsam bestimmt. Zum anderen wurden mit Natriummethanolat nur die gebundenen Fettsäuren und mit methanolischer HCl nur die freien Fettsäuren detektiert. Beide Methoden zeigten in der Fettsäurezusammensetzung Übereinstimmung. Bei Fischöl 4 konnte im Gegensatz zu Fischöl 1 und 2 ein geringer Anteil an freien Fettsäuren detektiert werden (Palmitoleinsäure (C16:1) und EPA).

**Tabelle 17** Fettsäurezusammensetzung der Fischöle in Mol% (aufgeführt sind die wichtigsten Fettsäuren)

Fettsäure	Fischöl 1	Fischöl 2	Fischöl 3	Fischöl 4
C 14:0	15,2	9,3	0,6	1,0
C 16:0	27,6	13,4	0,3	n.d.
C 16:1	11,0	7,3	17,2	26,7
C 18:0	4,2	2,6	n.d.	n.d.
C 18:1	17,0	9,8	n.d.	n.d.
C 20:5	<b>10,5</b>	11,4	37,5	<b>37,4</b>
C 22:6	<b>7,8</b>	<b>34,1</b>	n.d.	n.d.

n.d. nicht detektierbar

### Alkoholyse von Fischöl

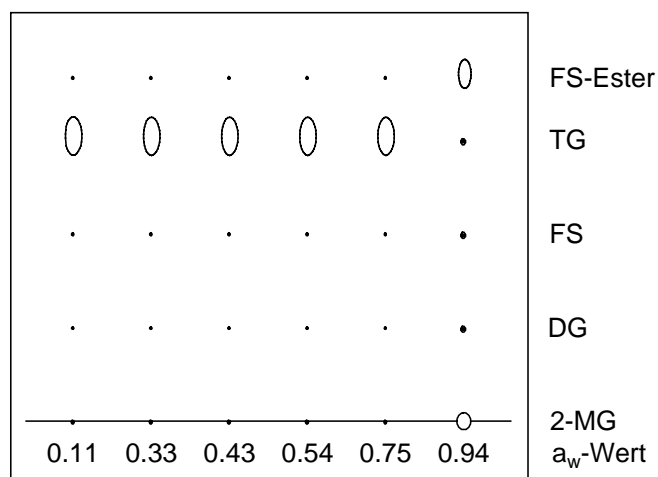
Die Alkoholyse von Fischöl wurde zunächst mit drei 1,3-regiospezifischen Lipasen und einer unspezifischen Lipase aus *Candida rugosa* in Aceton als Lösungsmittel bei einer Wasseraktivität von 0,43 durchgeführt. Alle vier Lipasen waren auf Celite immobilisiert (Tab. 18). Die Isolierung der 2-MG erfolgte entweder durch präparative HPLC oder Säulenchromatographie mit Borsäure imprägniertem Kieselgel oder RP 18 Kieselgel.

**Tabelle 18** Einfluss der Lipasen (immobilisiert auf Celite) auf die Ausbeute an 2-MG durch Alkoholyse von Fischöl 1 in Aceton (nach 24 h).

Lipase	Ausbeute an 2-MG (%)
<i>Rhizopus delemar</i>	20
<i>Rhizopus javanicus</i>	19
<i>Rhizopus niveus</i>	14
<i>Candida rugosa</i>	5,5

In allen vier Reaktionsansätzen war die Ausbeute sehr gering. So konnten mit den 1,3-regiospezifischen Lipasen Ausbeuten zwischen 14 und 20 % und mit CRL nur 5.5 % 2-MG erzielt werden.

Allerdings konnte durch Variation der Wasseraktivität die Ausbeute an 2-MG gesteigert werden. Abbildung 27 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm mit den Reaktionskomponenten der Alkoholyse bei Wasseraktivitäten zwischen 0,11 und 0,94. Bei einer Wasseraktivität von 0,94 wurde am meisten 2-MG gebildet.



**Abbildung 27** Dünnschichtchromatogramm: Alkoholyse von Fischöl 1 bei verschiedenen Wasseraktivitäten

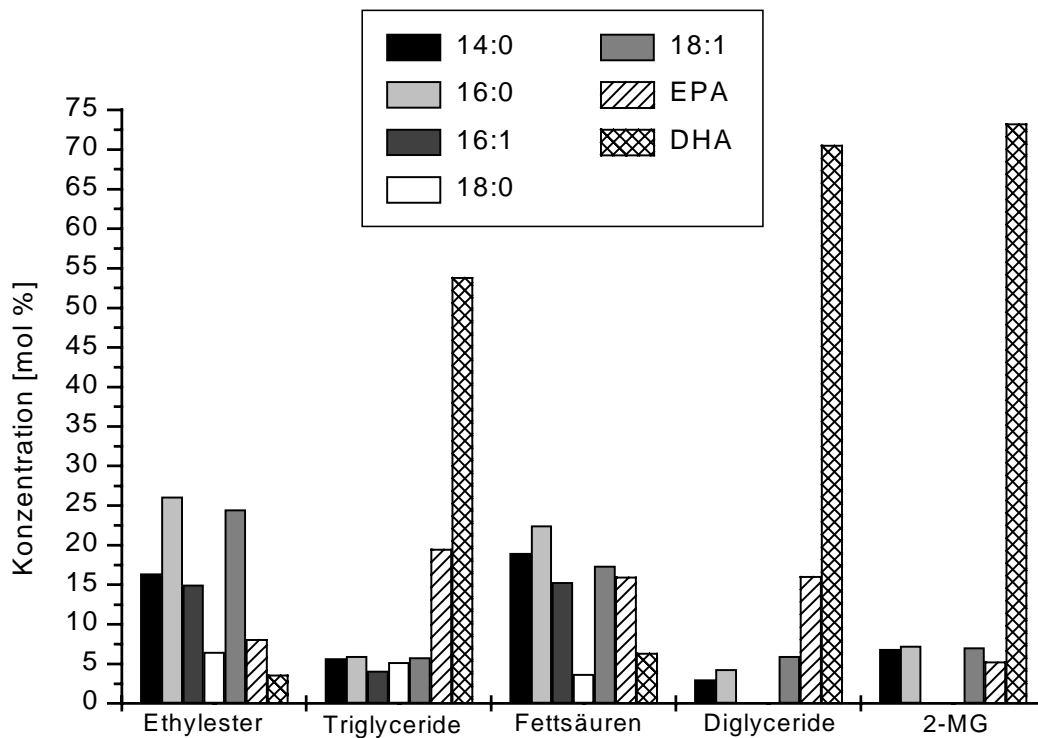
In Tabelle 19 ist der Einfluss der Lösungsmittels und der Wasseraktivität auf die Ausbeute an 2-MG zusammengestellt. Bei einer Wasseraktivität von 0,94 konnte bei allen drei Fischölen die Ausbeute signifikant erhöht werden.

**Tabelle 19** Einfluss des Lösungsmittels und der Wasseraktivität auf die Ausbeute an 2-MG durch Alkoholyse von Fischöl 1 und 4 (nach 24 h).

Substrat	Lipase	Lösungsmittel	Wasseraktivität	Ausbeute an 2-MG (%)
Fischöl 1	RDL <sup>a</sup>	MTBE	0,43	6,5
	RDL <sup>a</sup>	Aceton	0,43	20
	RDL <sup>b</sup>	Aceton	0,94	37
Fischöl 2	RDL <sup>b</sup>	Aceton	0,43	20
	RDL <sup>b</sup>	Aceton	0,43	47
Fischöl 4	RDL <sup>a</sup>	MTBE	0,43	43
	RDL <sup>b</sup>	Aceton	0,94	84

<sup>a</sup>immobilisiert auf Celite; <sup>b</sup>immobilisiert auf EP 100

Die Untersuchung der bei der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen ergab für Fischöl 2 75 % DHA in der 2-MG-Fraktion. Die gesättigten Fettsäuren befinden sich dagegen vorwiegend in der Ethylester- und Fettsäure-Fraktion.



**Abbildung 28** Zusammensetzung der einzelnen Produktfraktionen bei der Alkoholyse von Fischöl 2

### Veresterung von 2-Monoglyceriden aus Fischöl mit Caprylsäure

Die Veresterung der 2-MG aus Fischöl wurde in n-Hexan, Aceton und ohne Lösungsmittel durchgeführt. Als Biokatalysatoren wurden RDL EP100 und Lipozyme IM eingesetzt. In Hexan und ohne Lösungsmittel konnte selbst nach mehreren Tagen Reaktionszeit bei der Umsetzung von 2-MG aus Fischöl 1 und 2 mit Caprylsäure keine Bildung von Triglyceriden beobachtet werden. Bei Verwendung von Aceton als Lösungsmittel konnte mit 2-Monoglyceriden aus Fischöl 2 11,2 % Triglycerid erhalten werden. Im lösungsmittelfreien Prozess hingegen wurde nur eine Ausbeute von 6,1 % erzielt.

### 2.5.3 Darstellung von Kakaobutteräquivalenten

Als Kakaobutter wird das Fett bezeichnet, das in den Speicherkeimblättern der Kakaopflanze lokalisiert ist. Es fällt als Nebenprodukt der Kakaoproduktion an. Der Fettanteil beträgt 50-58 %. Kakaobutter hat eine sehr charakteristische Fettsäurezusammensetzung und besteht hauptsächlich aus drei Triglyceriden (Tab. 22)

**Tabelle 21** Triglycerid- und Fettsäurezusammensetzung von Kakaobutter

Fettsäurezusammensetzung	25 % 16:0	37 % 18:0	34 % 18:1	3 % 18:2 ( $\Delta$ 9,12)
Triglyceridzusammensetzung	22 % POP	46 % POSt	31 % StOSt	

**Alkoholyse von Triolein**

Die Alkoholyse von Triolein konnte ebenfalls wie die Alkoholyse von TP in Aceton erfolgreich durchgeführt werden. Nach 48 h Reaktionszeit mit RDL EP100 wurde 2-MO durch Kristallisation in MTBE/Hexan isoliert. Um reines 2-MO (GC > 95 %) zu erhalten, wurde 5 mal umkristallisiert, was jedoch mit einer Reduktion der Ausbeute verbunden war. Die Ausbeute an isoliertem Produkt betrug daher lediglich 50 %.

**Veresterung von 2-MO mit Palmitinsäure und Stearinsäure**

Die Veresterung von 2-MO mit Palmitinsäure und Stearinsäure wurde in Hexan als Lösungsmittel erfolgreich durchgeführt (Tab. 22). Nach 24 h Reaktionszeit waren die Reaktionen quantitativ abgelaufen und lieferten nach Isolierung durchweg hohe Ausbeuten an Kakaobutteräquivalenten. Veresterungsversuche ohne Lösungsmittel resultierten in einer geringen Produktbildung (Ausbeute an POP 17,2 %). Alternativ wurde die Veresterung von 2-MO auch mit den entsprechenden Fettsäureethylestern versucht. Die Reaktionen verliefen sehr schnell unter Bildung von Triglyceriden. Leider war die Abtrennung der im Überschuss vorhandenen Fettsäureethylestern unter den gewählten Isolierungsbedingungen nicht möglich und POP konnte z.B. nicht rein isoliert werden.

**Tabelle 22** Zusammensetzung der Kakaobutteräquivalente

	Ausbeute [%]	Fettsäurezusammensetzung [Mol%]	Regiospezifische Analyse [Mol%]	
			sn1,3-Position	sn2-Position
POP	78,9	67,3 PS 30,8 ÖS 1,9 StS <sup>a</sup>	87,2 PS 12,8 ÖS	79,4 % ÖS 20,6 PS
POSt	73,1	38,8 PS 29,7 ÖS 31,6 StS	42,6 PS 49,2 StS 8,2 ÖS	75,7 ÖS 11,8 PS 12,6 StS
StOSt	76,0	30,6 ÖS 69,4 St	91,7 StS 8,9 ÖS	91,1 ÖS 8,3 StS

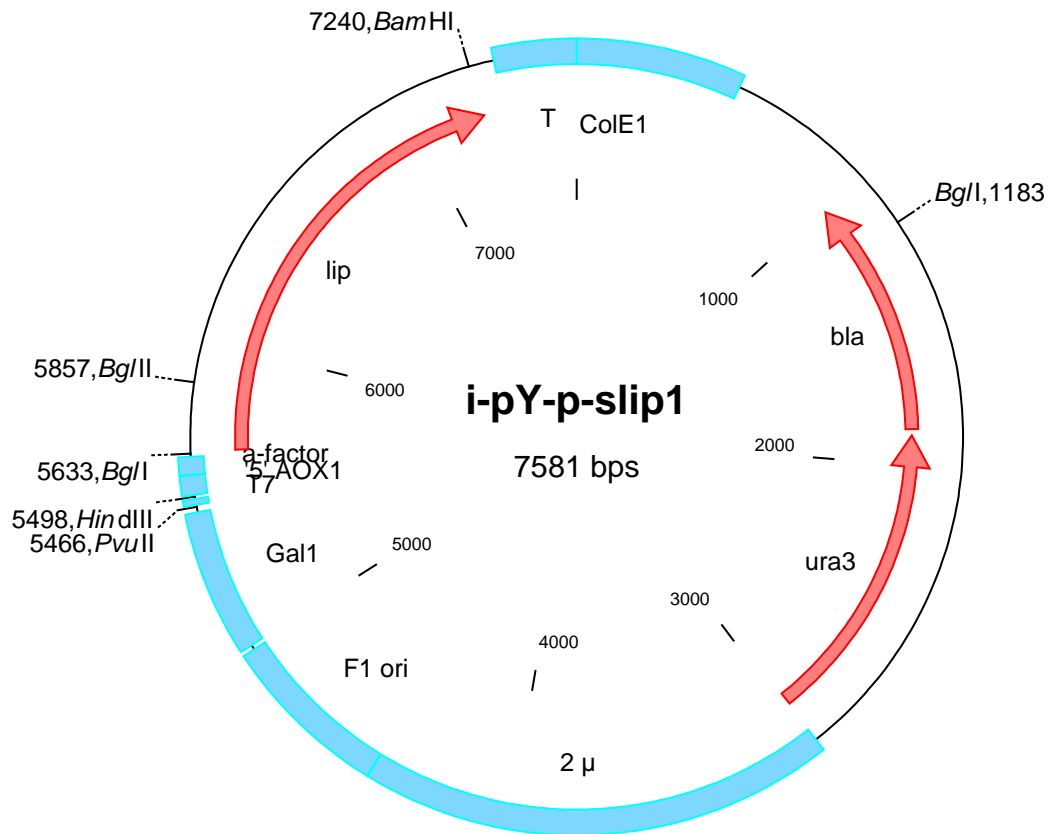
<sup>a</sup>Palmitinsäure war mit Stearinsäure verunreinigt; PS = Palmitinsäure; ÖS = Ölsäure; StS = Stearinsäure

### 3 Ergebnisse Teil II: Gerichtete Evolution des *slip1*-Gens aus *Candida rugosa*

Lipasen aus *C. rugosa* (CRL) finden breite Anwendung bei der Hydrolyse und Synthese von Estern. Kommerzielle CRL enthält einige verschiedene Isoenzyme, wobei die Isoform, die vom *lip1*-Gen codiert wird, die bekannteste ist. Durch die Synthese des *slip1*-Gens (synthetisches *lip1*-Gen aus *Candida rugosa*) am Institut für Technische Biochemie, steht nun ein recombinantes Lipasegen zur Verfügung, das z.B. mit Methoden der gerichteten Evolution verändert werden kann. Leider gehorcht *C. rugosa* einer nicht kanonischen Kodierung, bei der das Triplett CUG, eine übliche Kodierung für Leucin, als Serin gelesen wird. Im *lip1* Gen sind 20 von 47 Serinresten, das katalytische Serin<sub>209</sub> eingeschlossen, durch das Triplett CUG kodiert. Bei der Gensynthese wurden sämtliche CUG-Tripletts durch universale Serin-Kodierungen ausgetauscht. Bei CRL handelt es sich um eine unspezifische Lipase, die eine Hauptaktivität gegenüber mittelkettigen Fettsäuren (C<sub>8</sub> – C<sub>12</sub>) aufweist (Brocca et al., 1998). Gegenüber mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigt sie eine deutliche Diskriminierung, so dass CRL zur Anreicherung dieser Fettsäuren eingesetzt wird (Moore et al. 1996).

Durch error prone PCR (Kap. 3.3) und anschließendes Screening (Kap. 3.6) sollten Varianten des *slip1*-Gens mit veränderter Kettenlängenspezifität erzeugt und charakterisiert werden.

Ausgangspunkt war der das *slip1*-Gen enthaltende pYES-Vektor mit einer Größe von 7,5 kbp (Abb. 29). Der pYES 2 Vektor ist ein Hefeexpressionsvektor, der für eine hohe Expressionsrate heterologer Gene in *Saccharomyces cerevisiae* geeignet ist. Er ist sowohl mit dem *ura3*-Gen zur Selektion in *Saccharomyces cerevisiae* ausgestattet, als auch mit dem Ampicillingen (*bla*) zur Selektion in *E. coli*. Wichtig für die Expression der Lipase ins Medium ist der GAL1-Promotor, der die Sequenzen zur Regulierung der Transkription enthält. Die Transkription des GAL1-Promotors wird in Gegenwart von Glucose unterdrückt. Durch Entfernen von Glucose und Zusetzen von Galactose ins Kultivierungsmedium wird die Lipase sekretiert.



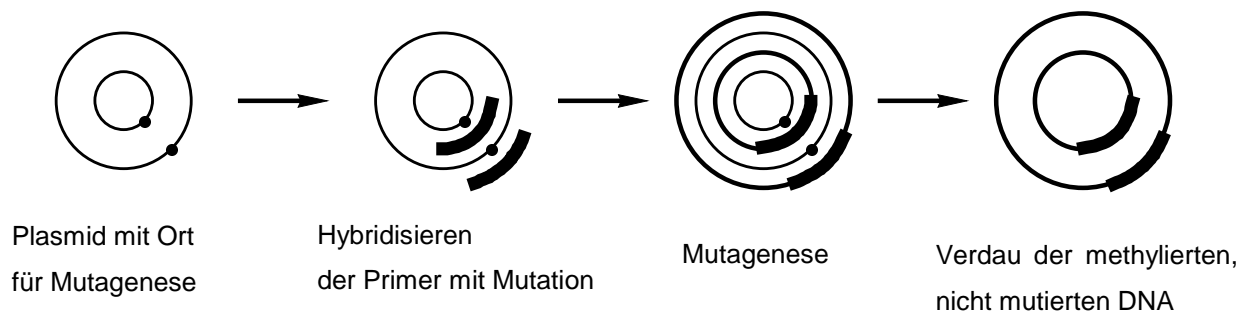
**Abbildung 29** pYES-Vektor mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen, Lipase-Gen (*slip1*), Ampicillin-Gen (*bla*) und Uracilgen (*ura3*)

### 3.1 Ortsspezifische Mutagenese

Für die später notwendige homologe Recombination von *slip1* und Vektor in *Saccharomyces cerevisiae* wurden zunächst geeignete Restriktionsschnittstellen, mit denen das Lipase-Gen nach der error prone PCR aus dem Plasmid ausgeschnitten werden kann, ausgewählt. Als geeignete Restriktionsenzyme erwiesen sich *BglI* und *BamHI*. Da allerdings *BglI* den Vektor sowohl bei 1183 bp als auch bei 5633 bp schneidet, wurde zunächst mittels einer ortsspezifischen Mutagenese die unerwünschte Restriktionsstelle bei 1183 bp entfernt.

Mit einer ortsspezifischen Mutagenese (Quik change PCR) können Punktmutationen erzeugt und einzelne oder mehrere Nucleotide ausgetauscht werden. Ausgehend von einem doppelsträngigen Plasmid wird mit Hilfe von zwei synthetischen Oligonukleotid-Primern, die die gewünschte Mutation tragen, die neue DNA aufgebaut. Die Oligonukleotid-Primer sind komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen des Vektors und werden während eines Temperaturzyklus mit Hilfe einer *Pfu* DNA-Polymerase verlängert. Durch den Einbau der Primer wird ein mutiertes Plasmid mit zwei versetzten Einzelstrangbrüchen erzeugt.

Anschließend wird die ursprüngliche DNA-Probe mit *DpnI* verdaut. Dieses Enzym verdaut nur die methylierte DNA, die aus *E. coli* isoliert wurde. Die durch die *Pfu* Polymerase aufgebaute DNA liegt nicht methyliert vor und wird daher von *DpnI* nicht verdaut. Nach Mikro-Dialyse wird die DNA mit der eingebauten Mutation direkt in *E. coli* transformiert.



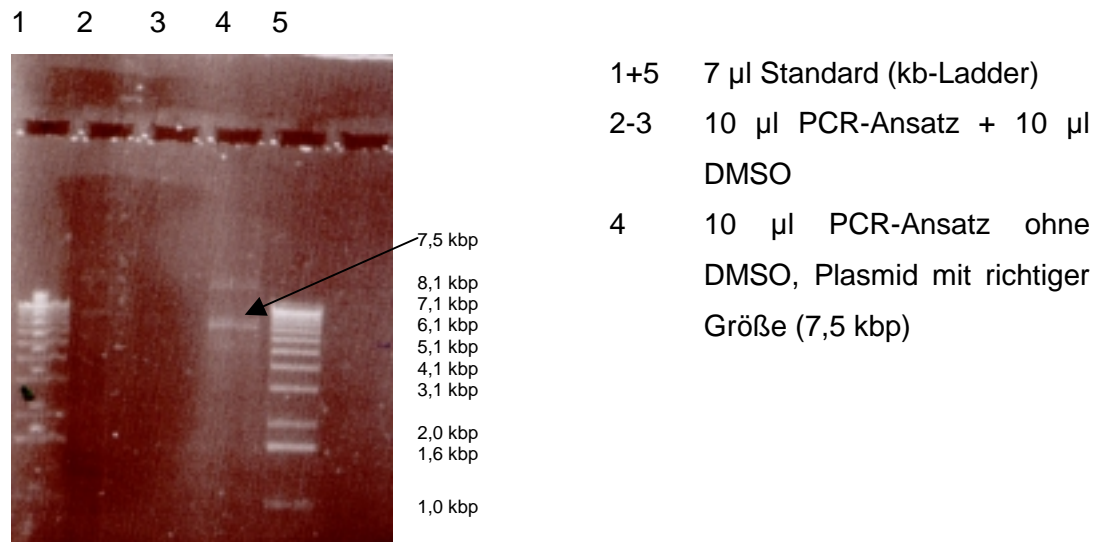
**Abbildung 30** Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese

Die Erkennungssequenz für die *BglI* Restriktionsstelle lautet: ‚**GCC N<sub>4</sub> N GGC**‘ (N = nicht definiertes Nucleotid). Um die Schnittstelle zu entfernen, mußte eines der sechs definierten Nucleotide verändert werden. Da die *BglI*-Schnittstelle in der Ampicillin Erkennungssequenz liegt und daher keine Änderung in der Aminosäuresequenz erwünscht war, gab es nur die Möglichkeit das dritte Nucleotid, das für eine Aminosäure kodiert, zu mutieren. Dazu wurde das letzte C-Nucleotid der *BglI* Erkennungssequenz in ein T-Nucleotid mutiert. Bei der Konstruktion der Primer wurde auf G bzw. C-reiche Enden geachtet, um eine stabile Bindung durch Wasserstoffbrückenbindung zu gewährleisten.

Primer:

Vorwärts      5´ -CCA GCC AGC CGG AAG GG**T** CGA GCG CAG AAG TGG -3´  
 Rückwärts    5´ -CCA CTT CTG CGC TCG **A**CC CTT CCG GCT GGC TGG -3´

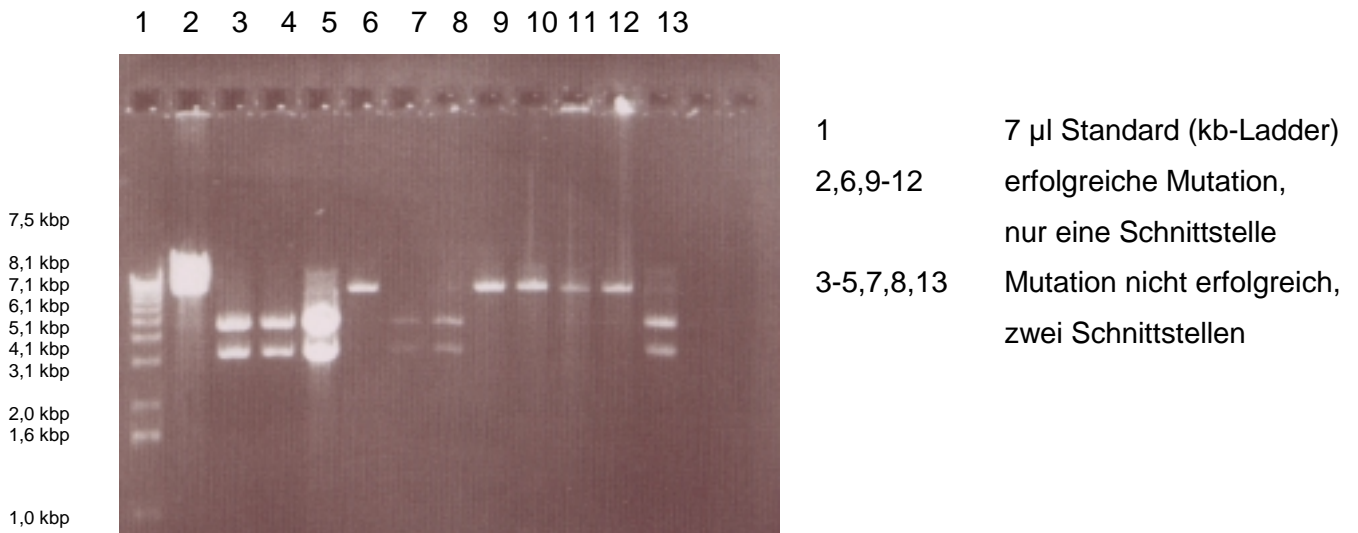
Nach Durchführung der PCR in An- und Abwesenheit von DMSO und Auftragen auf ein Agarosegel wurde nach 40 min Laufzeit eine deutliche Bande bei 7,5 kbp erhalten, die der Größe des Vektors einschließlich *slip1* entspricht (Abb. 31; Spur 4). Bei diesem PCR-Ansatz wurde ohne DMSO gearbeitet. Der Zusatz von DMSO führte bei den Ansätzen 2-3 nicht zum Erfolg.



**Abbildung 31** Agarosegelelektrophorese nach Quik Change

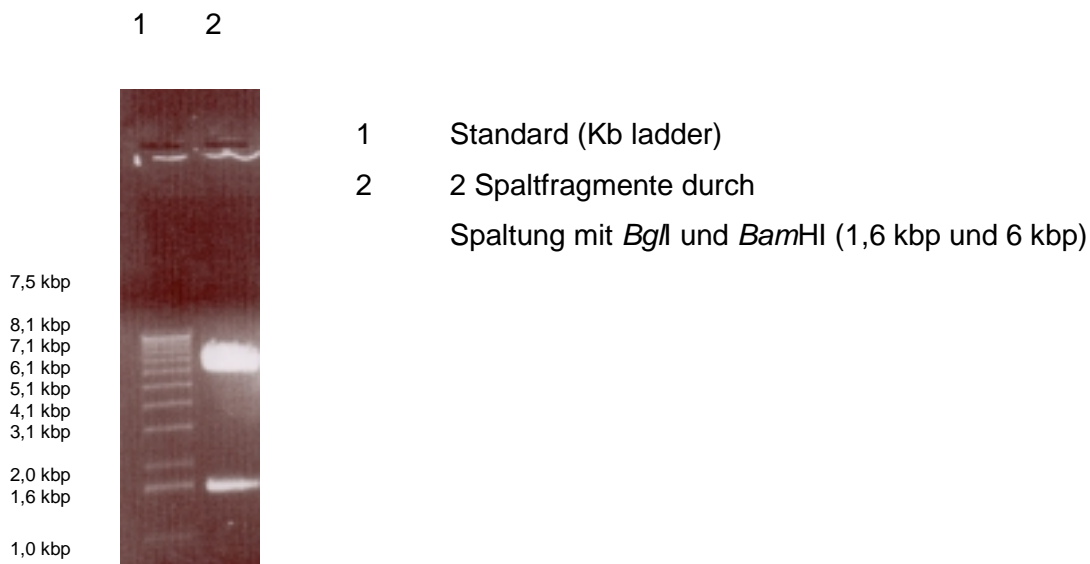
Nach dem Verdau der ursprünglichen, methylierten DNA mit *DpnI* erfolgte die Transformation direkt in XL2-Blue *Epicurian Coli Supercompetente* Zellen. Über Nacht waren 12 Kolonien auf LB/Ampicillin-Platten gewachsen.

Alle 12 Kolonien wurden in LB/Ampicillin-Medium kultiviert und eine Plasmidpräparation mittels Flexipräp durchgeführt. Um den Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese zu überprüfen, erfolgte der Verdau der erhaltenen DNA mit *BglI*. Bei der einen Hälfte der Klone wurde die Mutation erfolgreich eingeführt, was das Auftreten nur einer Bande bei 7,5 kbp auf dem Agarosegel deutlich belegt (Abb. 32; Spuren 2, 6, 9-12). Bei der anderen Hälfte der Klone traten dagegen zwei Banden auf, die der Größe der zu erwartenden Spaltfragmente bei beiden intakten *BglI* Schnittstellen entspricht, d.h. die Restriktionsschnittstelle konnte durch ortsspezifische Mutagenese nicht entfernt werden (Abb. 32; Spuren 3-5, 7, 8, 13).



**Abbildung 32** Überprüfung der Effektivität der ortsspezifischen Mutagenese durch Spaltung mit *Bgl*I mittels Agarosegelelektrophorese

Klon 5 (Spur 6) wurde in LB/Ampicillin-Medium kultiviert und eine Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt (Midipräp) um daraus dann den für die Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* geeigneten Vektor zu erhalten.



**Abbildung 33** Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung mit *Bgl*I und *Bam*HI

### 3.2 Gerichtete Evolution – error-prone PCR

Die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (error-prone PCR) ist neben der Verwendung von Mutationsstämmen die wichtigste Methode zur Durchführung der gerichteten Evolution. Die Error-prone PCR beruht auf der Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen in der PCR. Diese werden durch Verwendung eines der vier Desoxynucleotide im Unterschuss und Variation der Mangan- oder Magnesiumkonzentration erreicht. So kann die Fehlerrate der bei der PCR eingesetzten *taq*-Polymerase von 0,001-0,02% unter Standardbedingungen auf über 1% gesteigert werden. Abbildung 34 zeigt die Strategie für die error prone PCR des *slip1*-Gens. Dazu wurde das *slip1*-Gen aus dem Expressionsvektor i-pY-p-slip1 (Abb. 29) unter mutagenen PCR-Bedingungen mit den Primern MUTCRL1 und MUTCRL2 amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ein überlappender Bereich mit dem Vektor, der mit *Bgl*I und *Bam*HI geschnitten wurde, vorlag. Für die PCR wurden vier verschiedene Reaktionen angesetzt, die zur Transformation in *S. cerevisiae* wieder vereinigt wurden. Bei jedem Ansatz war im Nucleotid-Mix ein anderes Nucleotid im zehnfachen Unterschuss vorhanden. Nach der Amplifizierung des 1,6 kb-Fragments und Auftragen auf ein Agarosegel, waren nur mit dem A-Mix und G-Mix unter den gewählten Reaktionsbedingungen deutliche Banden zu erkennen. Erst durch eine Erhöhung der DNA-Konzentration konnte mit dTTP und dCTP eine ausreichende PCR-Produktausbeute erreicht werden. Das Plasmid aus 3.1 wurde zur Isolierung des Vektors mit *Bgl*I und *Bam*HI verdaut.

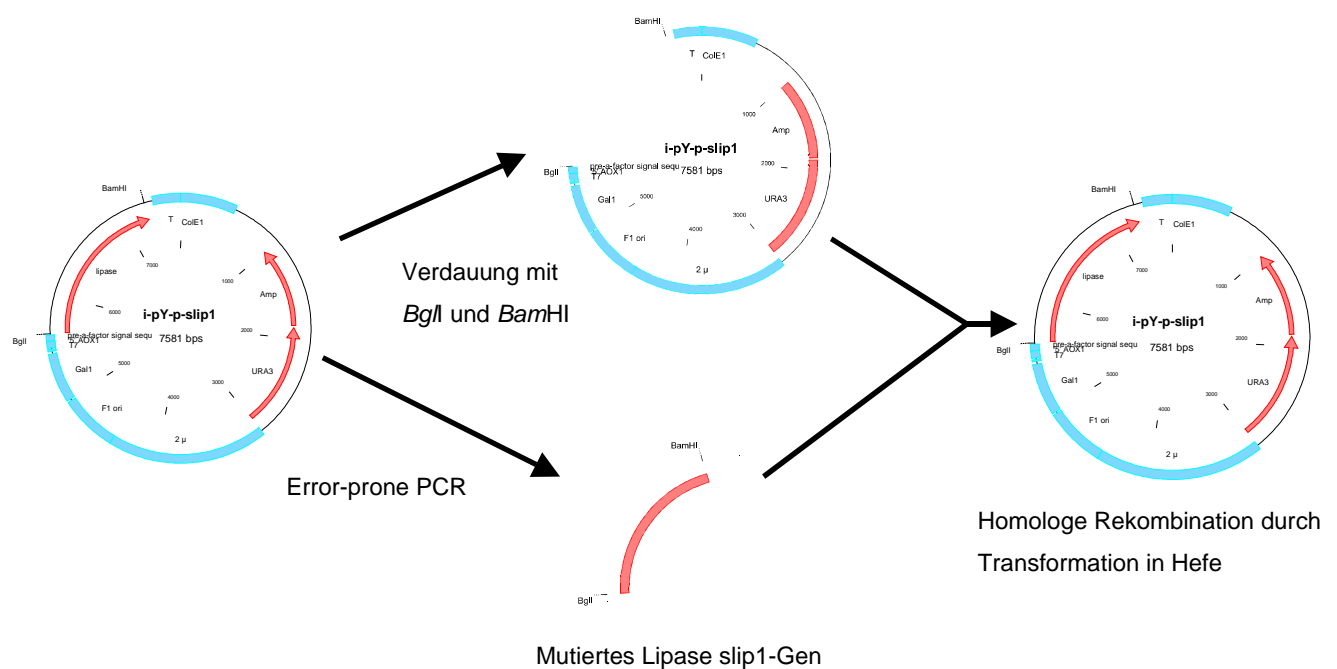


Abbildung 34

Strategie für die Error-prone PCR

Das Agarosegel (Abb. 33) zeigt deutlich die zwei zu erwartenden Spaltfragmente. Das Spaltfragment bei ca. 1,6 kbp entspricht dem *slip1*-Gen, das Spaltfragment bei ca. 6 kbp dem Vektor, der für die Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wurde.

Die aus error-prone PCR und durch ortsspezifische Mutagenese erhaltenen DNA-Proben, wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde die Bande des DNA-Fragments des mutierten Vektors (6 kbp) und die des mutierten Lipasefragments (1,6 kbp) aus dem Gel geschnitten und mittels Gelextraktion die reine DNA erhalten. Die Rekombination der beiden Fragmente erfolgte abschließend *in vivo* nach Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Für die error-prone PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

MUTCRL1 (vorwärts): 5` -CGG ATC GGA CTA GCA GC- 3`  
 MUTCRL2 (rückwärts): 5` -CGG TTA GAG CGG TGG G- 3`

### 3.3 Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Für eine effiziente Transformation in *S. cerevisiae* wurden verschiedene Transformationsprotokolle untersucht. Weder die Transformation in Hefe mit Lithiumacetat und DMSO (Hilt et al., 1991), noch die Elektrotransformation, noch der *Saccharomyces cerevisiae* Easy-comp Transformation-Kit von Invitrogen ermöglichten eine effiziente Transformation. Die Anzahl an Kolonien war für ein aussagekräftiges Screening zu gering. Im Gegensatz dazu war die Transformation in Hefe mit Lithiumacetat nach Gietz und Mitarbeitern sehr erfolgreich (Tab. 23).

Anschließend wurden 3200 Transformanden in Mikrotiterplatten mit Nährmedium übertragen.

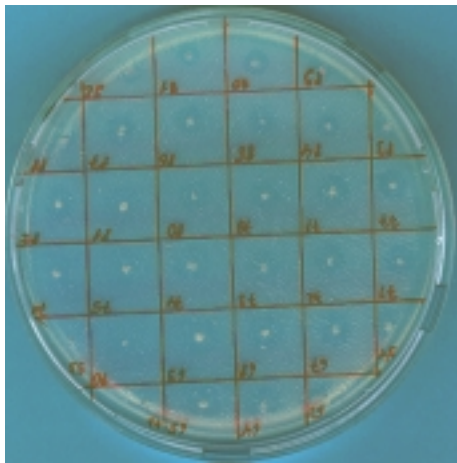
**Tabelle 23** Anzahl der Kolonien nach Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

	Negativkontrolle	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Anzahl an Kolonien	keine Kolonien	>2000	>2000	1000

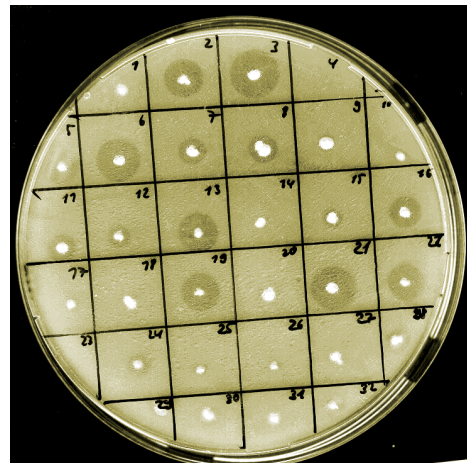
### 3.4 Tributyrinplatten-Assay

Ein Teil der Transformanden wurde zur Überprüfung der Aktivität auf Tributyrinplatten übertragen.

Abbildung 35 zeigt eine Tributyrinplatte, in der nur Transformanden des *slip1*-Gens bezüglich ihrer Aktivität überprüft wurden. Jeder Transformand zeigte eine deutliche Hofbildung, was darauf hinweist, dass die Transformation in *S. cerevisiae* ohne Aktivitätsverlust möglich ist. Abbildung 36 dagegen zeigt ein gemischtes Bild aus aktiven und inaktiven Transformanden. Möglicherweise bewirkten die durch die error-prone PCR eingeführten Mutationen eine Inaktivierung der Klone. Dieses gemischte Auftreten von aktiven bzw. inaktiven Klonen entspricht den Erwartungen, da ein Teil der eingeführten Mutationen mit einem Aktivitätsverlust konform gehen kann.



**Abbildung 35** Transformanden ohne error prone PCR

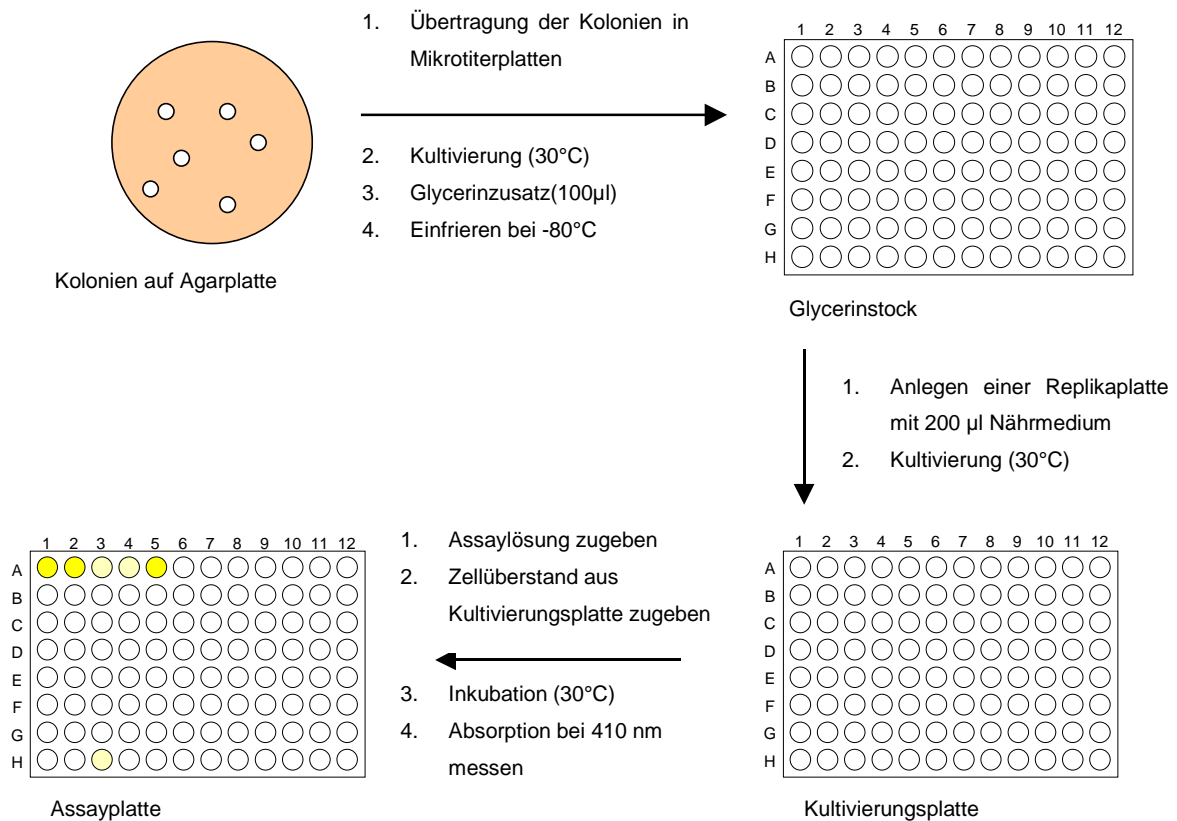


**Abbildung 36** Transformanden nach error-prone PCR

### 3.5 Entwicklung eines Mikrotiterplatten-Assays

Für ein effektives Screening auf veränderte Kettenlängenspezifität wurde ein Mikrotiterplattenassay unter Einbeziehung eines Biomek-Roboters entwickelt. Der Assay sollte möglichst einfach und schnell durchzuführen sein.

Die große Anzahl an Kolonien, die nach der Transformation in *S. cerevisiae* erhalten wurden, wurden in Mikrotiterplatten übertragen. Jedes Well wurde mit 100 µl Nährmedium, das aus YNB, Histidin, Galactose, Puffer und Caseinhydrolysat besteht, gefüllt. Nach zweitägiger Kultivierung bei 30°C wurden 150 µl Glycerin pro Well hinzugefügt und die Platten als Glycerinkultur bei -80°C gelagert. Diese Platten, die nun die Mutantenbank von *C. rugosa* Lipase in *S. cerevisiae* bilden, wurden für das Screening repliziert. Der eigentliche Assay erfolgte in einer dritten Mikrotiterplatte. Zuerst wurde mit Hilfe des Roboters Assaylösung zugegeben, dann der die Lipase enthaltenden Überstand aus der Replikplatte. Vor und nach Inkubation (2 h bei 30 °C) wurde die Absorption bei 410 nm gemessen (Abb. 37).



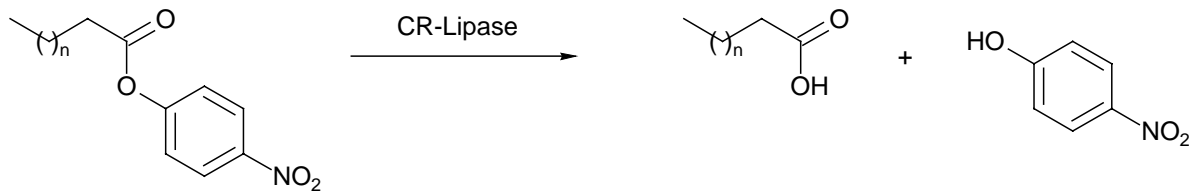
**Abbildung 37** Prinzip der Assayentwicklung in Mikrotiterplatten

### 3.5.1 Mikrotiterplattenassay mit *p*-Nitrophenylestern

Für das Screening auf veränderte Kettenlängenspezifität wurden *p*-Nitrophenylester unterschiedlicher Kettenlängen eingesetzt:

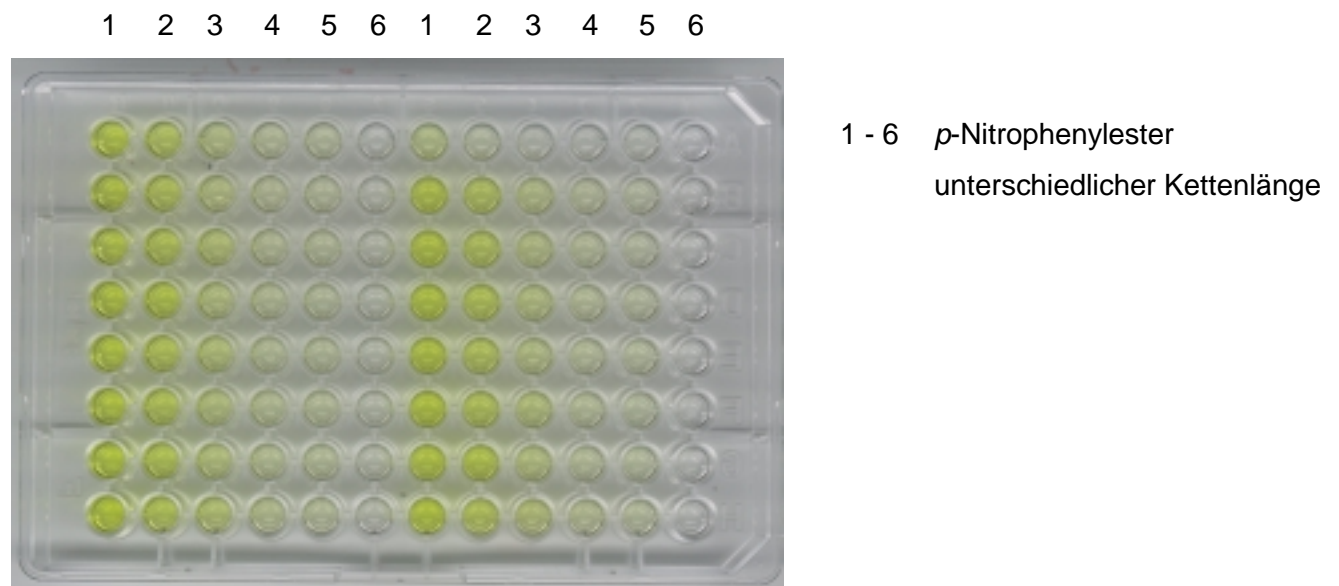
- p*-Nitrophenylbutyrat (pNPB)
- p*-Nitrophenylcaprylat (pNPC)
- p*-Nitrophenyllaurat (pNPL)
- p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP)
- p*-Nitrophenyleicosapentaenoat (pNPE)
- p*-Nitrophenyldocosat (pNPD)

Die Ester 1 bis 4 konnten käuflich erworben werden, die Ester 5 und 6 hingegen wurden synthetisiert (siehe Kap. 6.3). Bei Anwesenheit einer aktiven Lipase wird die Esterbindung gespalten und *p*-Nitrophenol freigesetzt, das durch die gelbe Farbe bei 410 nm photometrisch detektiert werden kann.



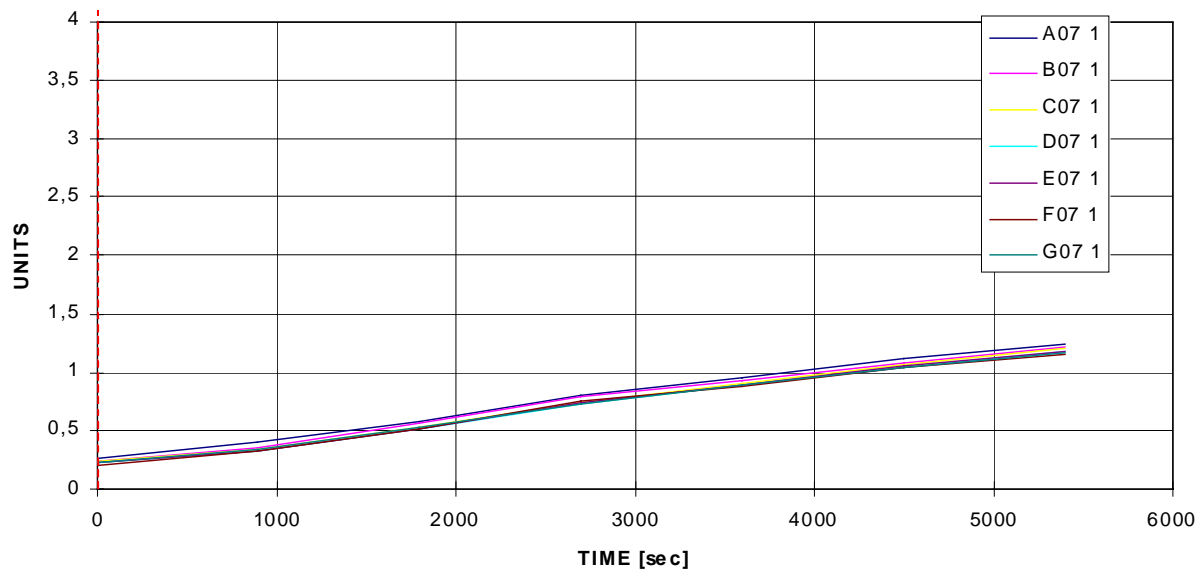
### Schema 6 Enzymatische Hydrolyse der *p*-Nitrophenylester

Abbildung 38 zeigt eine repräsentative Assayplatte mit Wildtyp-Klonen zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit. Von links nach rechts wurden die *p*-Nitrophenylester unterschiedlicher Kettenlänge zugegeben. Die Untersuchung eines Klonen benötigte jeweils sechs Wells. Pro Platte konnten daher 15 verschiedene Klone auf veränderte Kettenlängenspezifität untersucht werden. Auf jeder Platte befindet sich zusätzlich ein Blindwert. Der Wildtyp wurde entweder direkt auf der Assay-Platte gemessen oder parallel in einer anderen Assayplatte, die mehrere Wildtyp-Klone enthielt.



**Abbildung 38** Mikrotiterplatte mit 15 verschiedenen Wildtyp-Klonen

Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Reaktion bei sieben verschiedenen Wildtyp-Klonen. Die Steigung der Geraden verläuft nahezu identisch.



**Abbildung 39** Reproduzierbarkeit der Aktivität verschiedener Wildtyp-Klone gegen Tributyrin

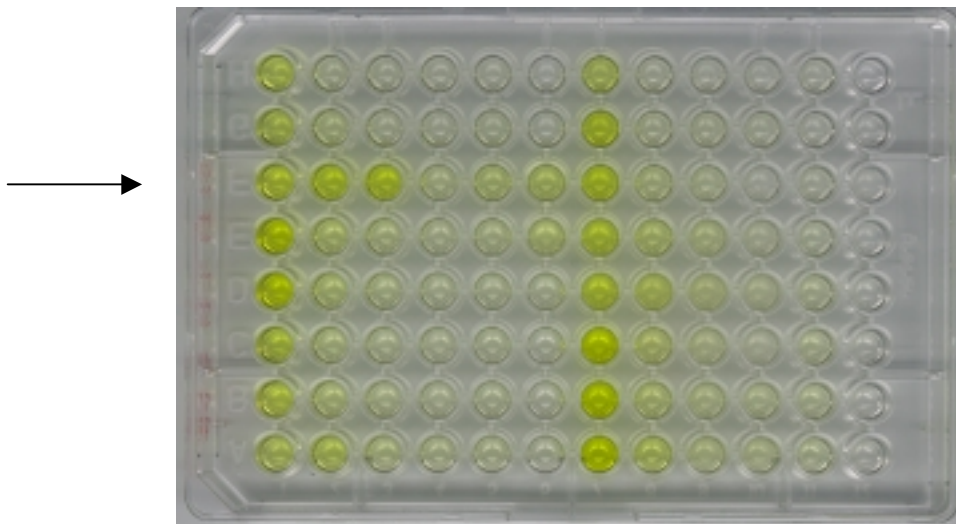
Die Kalkulation der Steigung pro Stunde von den Geraden der sieben Wildtyp-Klone zeigt lediglich eine Abweichung von maximal 3%.

**Tabelle 24** Steigung/Stunde verschiedener Wildtyp-Klone gegenüber Tributyrin

	Steigung/h
A 07	0.675
B 07	0.673
C 07	0.673
D 07	0.669
E 07	0.670
F 07	0.662
G 07	0.656

### 3.5.2 Screening der *slip1* "Mutantenbibliothek" aus *Candida rugosa*

Nach Optimierung der Assaybedingungen, wie Menge an Substrat, Inkubationszeit, Menge an Lipaseüberstand wurde die Mutantenbibliothek *Candida rugosa* Lipase mit dem in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Assay durchmustert. In Abbildung 40 ist durch die kräftigere Gelbfärbung eine "positive Mutante" deutlich zu erkennen.



**Abbildung 40** Aktivitätsscreening verschiedener Klone, die durch error-prone PCR erhalten wurden

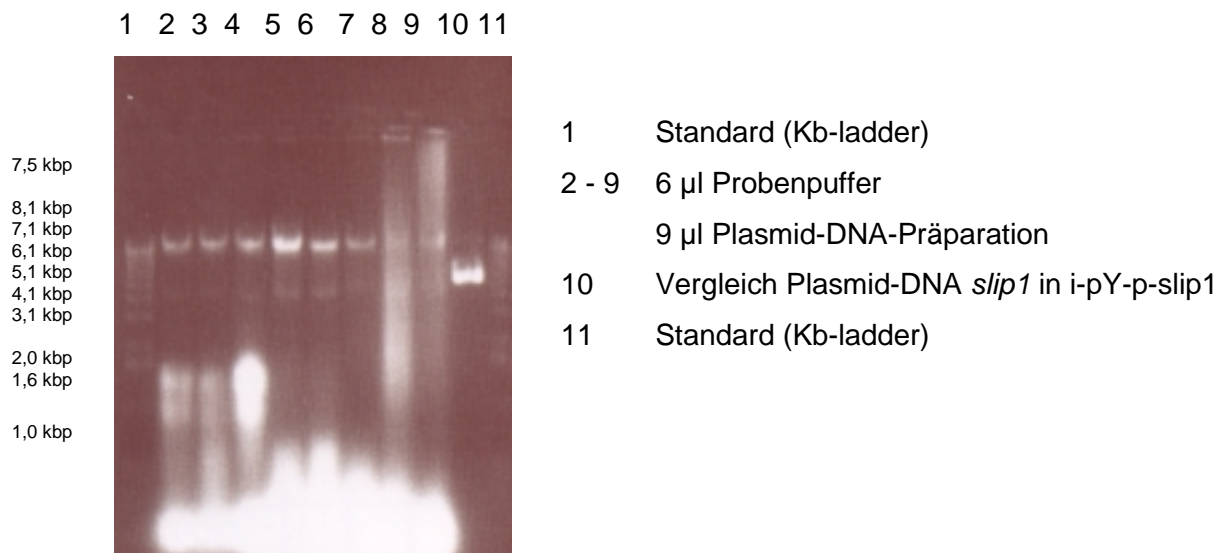
Nach Durchmusterung der Mutantenbibliothek wurden elf Klone gefunden, die sich durch eine erhöhte Aktivität gegenüber gewissen Kettenlängen im Vergleich zur Wildtyp-Lipase auszeichneten. Nach wiederholter Durchführung des Assays, konnten bei sechs von den elf Klonen die von der Wildtyp-Lipase abweichenden Aktivitäten bestätigt werden. Bei den übrigen fünf Klonen war keine Reproduzierbarkeit möglich.

### 3.6 Sequenzierung positiver Klone

Sechs "positive" Klone, die im *p*-Nitrophenylesterassay im Vergleich zum Wildtyp verschiedene Aktivitäten zeigten, wurden nach der Plasmid-DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae* in *E. coli* retransformiert. Nach der Plasmid-DNA-Isolierung wurde jeweils das Lipase-Gen mit geeigneten Primern sequenziert.

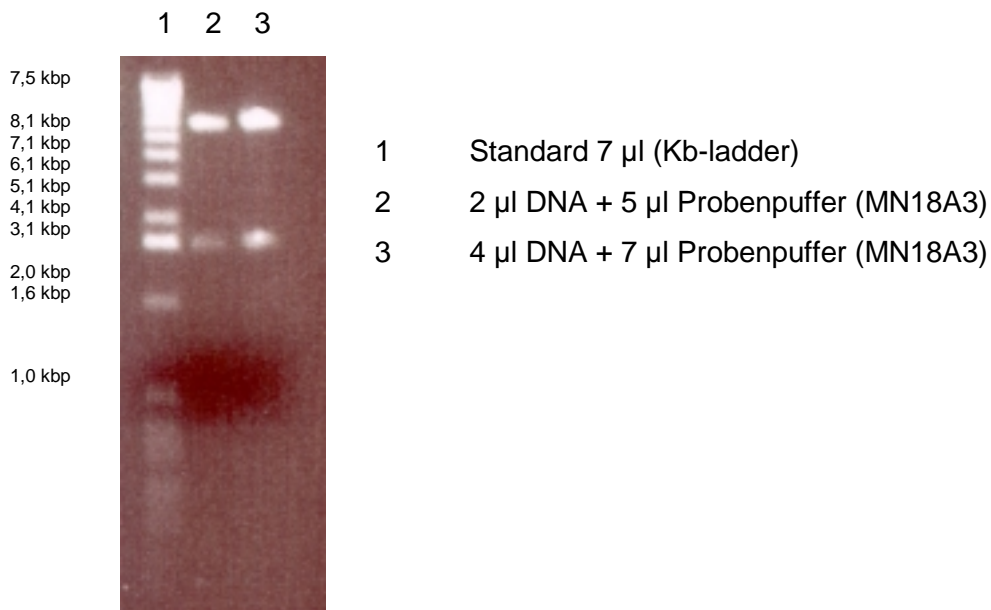
#### 3.6.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Plasmid-DNA-Isolierung gestaltete sich als relativ schwierig. Auch nach dem parallelen Durchführen drei verschiedener Isolierungsprotokolle, konnte kein Protokoll erarbeitet werden, das reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Bei allen drei Protokollen war die Transformationsrate sehr gering. In Abbildung 41 sind in den Spuren zwei bis sieben schwache Banden von Plasmid-DNA zu erkennen.



**Abbildung 41** Agarose-Gel nach Plasmid-DNA-Isolierung

Anschließend wurde ein Testverdau mit *Bam*HI und *Bgl*I durchgeführt. Nach Auftragen auf ein Agarose-Gel wurden die korrekten Spaltfragmente bei 1,6 kbp und 6 kbp erhalten (Abb. 42).



**Abbildung 42** Testverdau mit *Bam*HI und *Bgl*I

### 3.6.2 Ergebnis der Sequenzierung

Die Sequenz des *slip1*-Gens wurde mit der Sequenz der verschiedenen Klone verglichen, um die auftretenden Mutationen zu bestimmen (Tab. 25).

**Tabelle 25** Lokalisierung der Mutationen nach Sequenzierung

Klon	Mutationen
MN9E4	keine Mutationen gefunden
MN9F3	1 stille Mutation: Leucin 515 TTG = Leucin 515 CTG
MN17B11	1 Mutation: Threonin 11 ACC = Alanin 11 GCC
MN17E2	2 stille Mutationen: Aspartat 191 GAC = Aspartat 191 GAT Isoleucin 374 ATC = Isoleucin 374 ATT
MN18A3	keine Plasmid-DNA-Isolierung möglich, Kontamination mit blauen Zellen
MN18H3	1 Mutation: Threonin 201 ACT = Alanin 201 GCT

### 3.7 Charakterisierung der Mutanten

Zur Charakterisierung wurden die Mutanten MN17B11 (Thr11Ala), MN18H3 (Thr201Ala) und *slip1* im Schüttelkolben kultiviert. Die Induktion der Lipase-Expression erfolgte durch Zusatz von Galactose. Der Lipase-haltige Überstand wurde durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt und die Lipase durch Ultrazentrifugation konzentriert. Die Aktivität des Zellüberstandes wurde vor und nach der Konzentrierung gegen *p*-Nitrophenylbutyrat bei 410 nm gemessen (Tab. 26).

**Tabelle 26** Aktivitätsmessung des Überstands nach 20 min gegen *p*-Nitrophenylbutyrat vor und nach der Konzentrierung

	U/ml vor Konzentrierung	U/ml nach Konzentrierung
<i>slip1</i>	0,020	0,137
MN 17 B11	0,025	0,051
MN 18 A3	0,021	0,092
Blindwert	0,007	0,007

Zur Konzentrierung wurde ein 10 kDa Filter verwendet. Zusätzlich wurde die Aktivität im Überstand ohne Induktion der Lipase-Expression gemessen, um sicher zu gehen, dass die gemessene Aktivität tatsächlich durch die Lipase verursacht wird. Dazu wurden *slip1* exprimierende Hefezellen in 20 ml Kulturmedium mit Glucose und im Vergleich mit Galactose kultiviert. 2 ml des Überstands wurden nach drei Tagen Kultivierung abgenommen

und die Aktivität gemessen. Auch nach 40 min Inkubation war die Aktivität im Medium ohne Induktion deutlich geringer als im Medium nach Induktion (Tab. 27).

**Tabelle 27** Vergleich der Aktivität gegen *p*-Nitrophenylbutyrat im Überstand mit und ohne Induktion der Lipase

	U/ml
slip1 ohne Induktion	0,007
slip1 mit Induktion	0,020
Blindwert	0,004

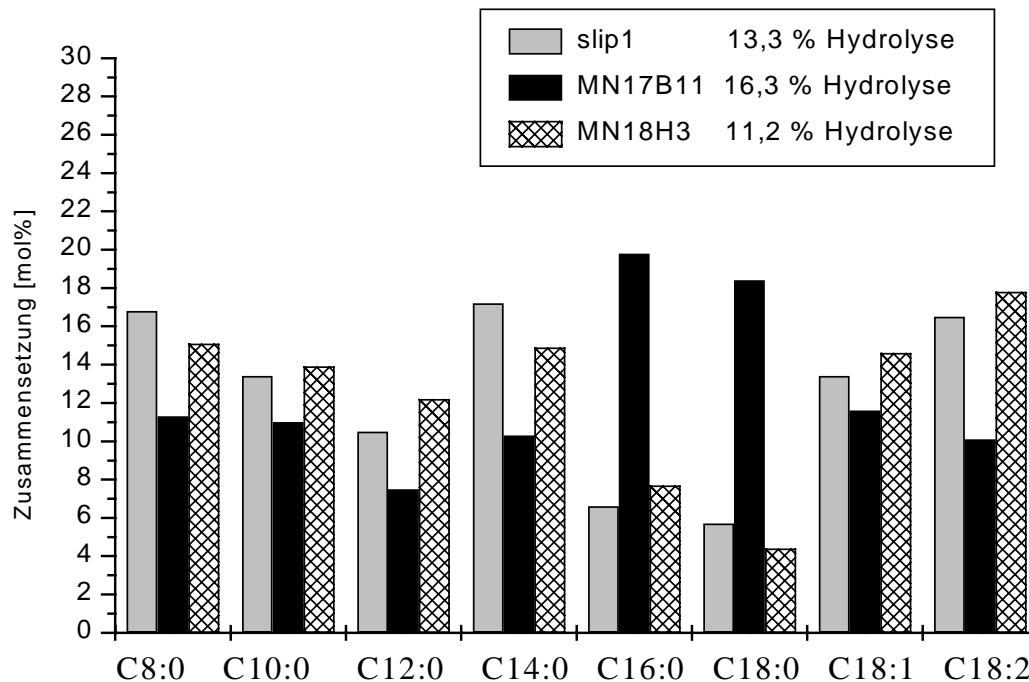
Um Aktivitätsunterschiede zwischen Wildtyp-Lipase und Mutanten an natürlichen Substraten zu verifizieren, wurde eine kompetitiver Assay mit einem "random oil" und anschließender gaschromatographischer Detektion durchgeführt. Unter "random oil" versteht man ein speziell synthetisiertes Öl, das ein Fettsäurespektrum von C 8 bis C 18 mit einer ähnlichen Fettsäurezusammensetzung in allen Positionen aufweist.

**Tabelle 28** Fettsäurezusammensetzung des "random oils"

Fettsäure	Zusammensetzung [Mol%]	Zusammensetzung 2-MG [Mol%]
C 8:0	13,2	9,4
C 10:0	8,9	10,0
C 12:0	15,6	17,1
C 14:0	5,5	5,8
C 16:0	12,9	13,5
C 18:0	10,8	11,3
C 18:1	16,4	16,4
C 18:2	14,6	14,3
C 18:3	1,9	1,8

Eine Emulsion aus "random oil", Gummi arabicum und Wasser wurde mit einer bestimmten Menge an aufkonzentrierter Lipase versetzt. Die bei der Reaktion freigesetzten Fettsäuren wurden bis zu ca. 15% Hydrolyse mit 0.1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7.2 titriert. Nach dem Ausschütteln der Fettsäuren wurden diese nach Derivatisierung mit MSHFBA gaschromatographisch aufgetrennt und der Anteil der einzelnen Fettsäuren mit Hilfe von Response-Faktoren berechnet. Die Lipase der Mutante MN17B11 zeigte dabei vor allem gegenüber Palmitinsäure und Stearinsäure, beides schlecht lösliche, gesättigte Fettsäuren,

eine deutlich höhere Aktivität als der Wildtyp. Mutante MN18H3 dagegen zeigt im kompetitiven Assay keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 43).

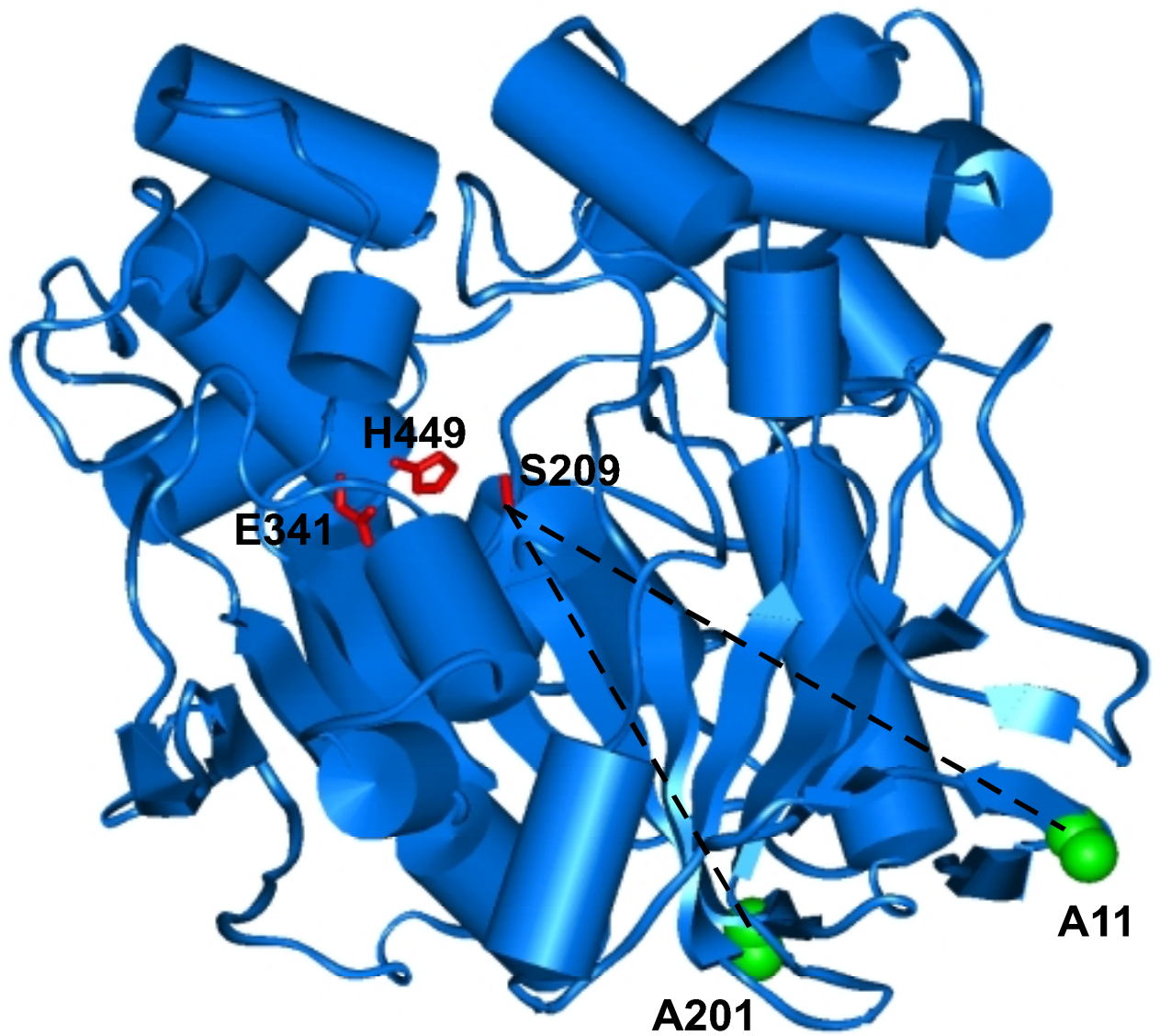


**Abbildung 43** Vergleich der Aktivität der Wildtyp-Lipase (*slip1*) mit Lipasenmutanten MN17B11 und MN18H3 in einem kompetitiven Assay

### 3.8 3-D-Struktur der Lipase aus *Candida rugosa*

Mit Hilfe eines Computermodells konnte die räumliche Anordnung der Mutationen in der *Candida rugosa* Lipase-Struktur bestimmt werden. Bei Mutante MN17B11 wurde die Aminosäure Threonin11 gegen Alanin ausgetauscht. Die Punktmutation von MN18H3 führte zu einem Austausch von Threonin201 durch Alanin. Beide Mutationen liegen in der Peripherie der Enzymstruktur ohne direkten Einfluss auf das aktive Zentrum. Die Entfernung des Alanin11 vom Serin209 der katalytischen Triade beträgt 35,3 Å.

Interessanterweise zeigt die Mutation A11 einen deutlichen Effekt auf die Spezifität der Lipase im Gegensatz zur Mutation A201, die das gleiche Kettenlängenspektrum wie der Wildtyp zeigt.

**Abbildung 44**

3-D-Struktur der Lipase aus *Candida rugosa* mit aktivem Zentrum (rot) und Mutationen (grün)

## 4 Diskussion

### 4.1 Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride

Die Synthese strukturierter Triglyceride des ABA-Typs erfolgte nach einem neuen zweistufigen Lipase-Katalysiertem Verfahren unter Berücksichtigung lebensmittelrechtlicher Aspekte. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen im Vergleich zum bisher beschriebenen Einschrittverfahren in der höheren Ausbeute und Reinheit der isolierten Triglyceride. Die im ersten Reaktionsschritt durch Alkoholyse entstehenden 2-MG sind nicht nur als Zwischenverbindung zur Synthese strukturierter Triglyceride interessant, sondern könnten auch zur Darstellung von Phospholipiden und chiralen Triglyceriden eingesetzt werden.

Die nachfolgende Veresterung gelang ohne Lösungsmittel bei niedrigen Reaktionszeiten durch Entfernung des in der Reaktion gebildeten Wassers. Für den positiven Verlauf beider Reaktionen ist die Minimierung der Acylwanderung von entscheidender Bedeutung. Ebenso ist für jedes neue Substrat, das mit diesem Zweischrittverfahren Lipase-Katalysiert zu ABA-Triglyceriden umgesetzt werden soll, eine detaillierte Untersuchung verschiedener Faktoren wie Wasseraktivität, Trägermaterial und Temperatur unerlässlich.

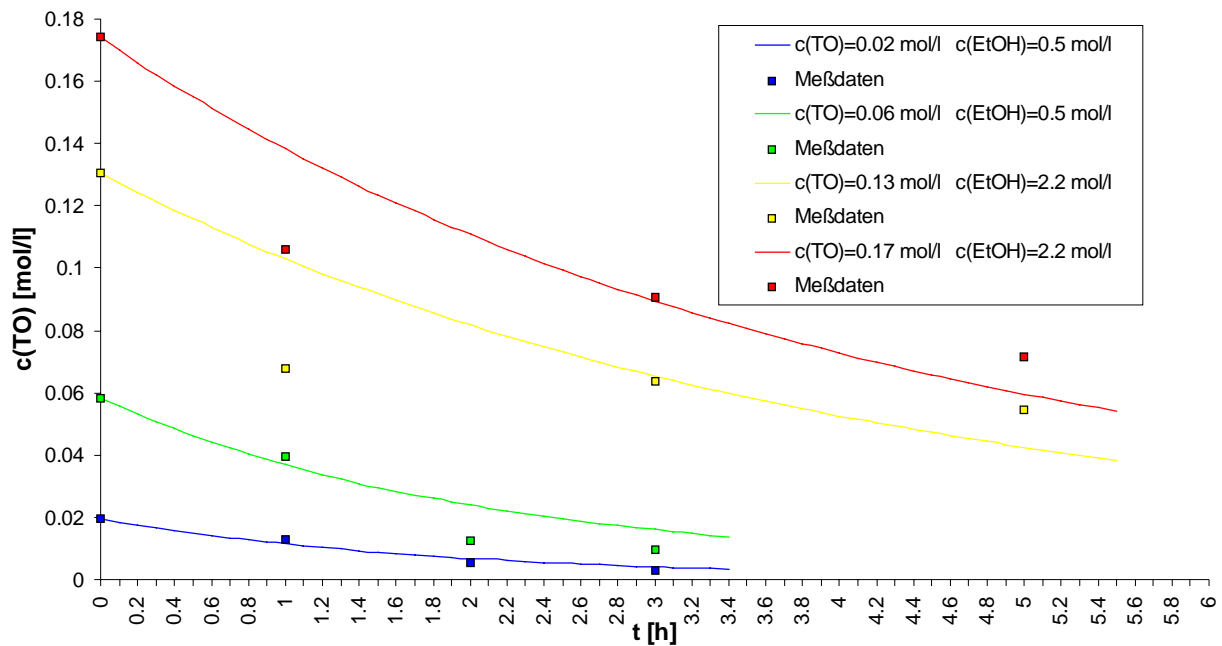
#### 4.1.1 Entwicklung einer effizienten Analytik

Für die Entwicklung einer effizienten Analytik wurde zunächst überlegt, welche Analysengeräte für die Detektion der Reaktionsprodukte nötig sind. Voraussetzung war die Detektion aller Reaktionspartner, die sich allerdings in ihren Eigenschaften erheblich unterscheiden. Darüber hinaus sollte es möglich sein, die verschiedenen Isomere wie 1(3)-MG von 2-MG bzw. 1,2(2,3)-DG voneinander zu trennen. Prinzipiell ist die Reaktionsverfolgung der Alkoholyse als auch der Veresterung mit GC und HPLC möglich. So wurden z.B. die kinetischen Daten (Kap. 2.3) auf der Grundlage von Ergebnissen, die mittels HPLC an einer Umkehrphasenmatrix gemessen wurden, ermittelt. Die Elution erfolgte mit einem Gradientensystem aus Aceton/Dichlormethan und anschließender Detektion mittels Lichtstreuungsdetektor, der sich gut für die Detektion von Fettsäuren und ähnlichen Substanzen eignet. Damit konnten Monoglyceride, Fettsäuren, Fettsäureethylester, Diglyceride und zum Schluss die Triglyceride voneinander getrennt werden. Als Nachteil bei der HPLC-Methode erwies sich abhängig vom Substrat die schlechte Reproduzierbarkeit und die Instabilität des HPLC-Systems insgesamt. Aus diesen Gründen wurde die komplette Analytik mittels GC durchgeführt (Kap. 2.1). Eine Ausnahme blieb die präparative HPLC zur Isolierung der 2-MG aus Fischöl und Leinöl.

Zur gaschromatographischen Charakterisierung aller Produkte und Edukte wurde dabei eine unpolare Säulenmatrix bestehend aus 5 % Phenylsilicon und 95 % Methylsilicon eingesetzt. Durch den Anteil ein Phenylsilicon, wird das Ausbluten der Säule erschwert und erlaubt des Arbeiten bei Temperaturen bis zu 360°C. Dabei darf die Höchsttemperatur ca. 20 min gehalten werden. Wichtig bei der Wahl der Säule war ihre Einsatzmöglichkeit bei sehr hohen Temperaturen. Ansonsten wäre eine Detektion der Triglyceride nicht möglich gewesen. Die Triglycerid-Analytik liegt bereits im Hochtemperaturmessbereich und erlaubt die Auftrennung von Triglyceriden mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Dagegen ist die Trennung von Triglyceriden mit gleichem Molekulargewicht, aber unterschiedlicher Verteilung der Fettsäuren im Glycerin wie z.B. OPO oder OOP an einer unpolaren Säulenmatrix nicht möglich.

#### 4.1.2 Kinetische Untersuchungen

Beispielhaft zur Bestimmung der kinetischen Daten wurde die Alkoholyse von Triolein in Aceton herangezogen. Dabei wurden fünf Konzentrationen an Triolein bei einer fixen Konzentration an Ethanol gewählt. Sowohl die Acetonmenge als auch die Enzymmenge blieben konstant. Die graphische Auftragung der Geraden wurde nach zwei Verfahren durchgeführt: – Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee – um Nachteile der einzelnen Verfahren auszugleichen. Bei 1 mmol Ethanol und 5 mmol Ethanol stimmten die Daten für  $V_{max}$  und  $K_m$  bei beiden Verfahren gut überein. Eine starke Abweichung ist hingegen für eine Konzentration von 2,5 mmol Ethanol zu beobachten. Der große Unterschied lässt sich vielleicht damit begründen, dass bei einer Auftragung nach Lineweaver-Burk bei hohen Substratkonzentrationen aufgenommene Werte gestaucht und Daten für niedrige Konzentrationen höher bewertet werden. Exaktere Ergebnisse werden durch ein nicht-lineares dynamisches Optimierungsverfahren erhalten, das aus den erstellten Meßdaten die kinetischen Daten ermittelt. Diese wurden am Institut für Bioverfahrenstechnik erstellt (Abb. 45). Diese Berechnungen bestätigen, dass bei der Alkoholyse von 2-MP sehr wahrscheinlich ein Pinp-Pong-Bi-Bi-Mechanismus zu Grunde liegt.



**Abbildung 45** Alkoholyse von Triolein mit Ethanol - Vergleich von Simulation und Experiment - Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus mit Inhibition durch die Substrate und Produkte

### 4.1.3 Synthese von OPO

OPO ist anteilmäßig im Milchfett der Muttermilch das bedeutendste Triglycerid. Da die Bekömmlichkeit von Babynahrung als Muttermilchersatz entscheidend von diesem Lipid abhängt, besteht großes Interesse dieses Produkt in hoher Reinheit zu synthetisieren. Der zur Zeit durchgeführte Prozess erlaubt die Synthese von OPO in 40 % Ausbeute mit einer Reinheit von maximal 65 % Palmitinsäure in *sn2*-Position. Dabei wird Palmöl mit Ölsäure in einem einstufigen, enzymatischen Prozess umgesetzt. Die große Bildung an Nebenprodukten lässt sich durch das Vorhandensein einer größeren Vielfalt an Produkten erklären sowie durch die bei der Reaktion auftretende Acylwanderung.

Im Gegensatz dazu liegt der Vorteil des neu entwickelten Zweischrittverfahren darin, dass durch die Alkoholyse im ersten Schritt 2-Monopalmitin sehr rein erhalten werden konnte ohne das Auftreten von unerwünschten Nebenprodukten. Durch die Prozessoptimierung im zweiten Schritt war es nun möglich OPO in einer Gesamtausbeute von 74% mit einer Reinheit von 96 % Palmitinsäure in *sn2*-Position zu synthetisieren.

### **Alkoholyse von Tripalmitin zur Synthese von 2-MP**

Der Erfolg der Alkoholyse zur Synthese von 2-MP hängt entscheidend von der Wahl der Reaktionsbedingungen ab, ansonsten entsteht vorwiegend durch Acylwanderung gebildetes 1(3)-MP. So kann man die Lipase-Katalysierte Alkoholyse von Triglyceriden z.B. in wässrigem (Boutur et al., 1994; Briand et al., 1994) oder nicht wässrigem Medium durchführen (Mittelbach, 1990). In wässrigen Systemen werden aber selbst bei Einsatz von *sn*1,3-regiospezifischen Lipasen hauptsächlich 1,(3)-MG erhalten. Andere Verfahren wie die Glycerolyse von Triglyceriden mit Glycerin führen ebenfalls zu 1,(3)-MG. Es entsteht nur ein Anteil von ca. 10 % 2-MG (Bornscheuer, 1995). Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die Unterdrückung der Acylwanderung während der Alkoholyse. Da die Acylwanderung vom Lösungsmittel, dem Trägermaterial, der Wasseraktivität und der Temperatur abhängt wurden diese Faktoren detailliert untersucht. Da in der Literatur bereits Alkoholyse in MTBE als Lösungsmitteln durchgeführt wurden, wurde zunächst ebenfalls MTBE gewählt, um mehrere 1,3-spezifische Lipasen zu vergleichen. Wie Tabelle 8 zeigt erwies sich eine Lipase aus *Rhizopus delemar* am geeignetsten für die Alkoholyse von Tripalmitin. Es konnten dabei durch Kristallisation 95 % 2-MP ohne Auftreten von Acylwanderung isoliert werden. Sehr interessant ist auch das Ergebnis bei Verwendung von Lipozyme IM, das sehr häufig in der Literatur und in industriellen Prozessen eingesetzt wird. Bei Lipozyme handelt es sich um eine Lipase aus *Rhizomucor miehei* immobilisiert auf Anionenaustauscher. Bei Verwendung dieser Lipase zur Alkoholyse von Tripalmitin konnte 88 % Monopalmitin isoliert werden. Zu bemerken ist allerdings, dass nach Überprüfung der Reinheit 20 % des Produktes als 1-MP vorlagen. Untersuchungen von Millqvist und Mitarbeitern ergaben, dass ein Anionenaustauscher Acylwanderung verursachen kann (Fureby et al., 1996; Fureby et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings festgestellt, dass die Acylwanderung vor allem von der Wahl des Lösungsmittels beeinflusst wurde. So zeigte der Einsatz von Lipozyme in Aceton keine Acylwanderung (Tab. 9). Erst bei einer sehr hohen Wasseraktivität wurde eine geringe Acylwanderung beobachtet (Abb. 13). Da OPO in Babynahrung eingesetzt werden soll, musste natürlich bei der Wahl des Lösungsmittels darauf geachtet werden, dass es für die Produktion von Lebensmitteln laut Lebensmittelrecht erlaubt ist. Prinzipiell möglich ist die Verwendung von Ethanol, Aceton, Butylacetat, Ethylacetat, Hexan, Methanol, Ethylmethylketon und 2-Propanol. Die Ester Butylacetat und Ethylacetat sind als Lösungsmittel ungeeignet, da sie selbst Substrat für die Lipase darstellen. Ein weiteres Problem, das durch das Lösungsmittel verursacht werden kann, ist die mögliche Inhibierung oder Desaktivierung der Enzyme. So erwiesen sich Lösungsmittel wie Aceton, Ethanol oder Methanol für Lipidmodifikationen meist als ungeeignet (Millqvist et al., 1994; Soumanou et al., 1998b). Bei einer Voruntersuchung des Einflusses des Lösungsmittels auf die Alkoholyse von Triolein wurde in Aceton

überraschenderweise eine ebenso hohe Ausbeute wie in MTBE erhalten. Dagegen ergaben die Reaktionen in Ethanol, Methanol und Isopropanol kein Produkt (Tab. 6). Eine zunächst vermutete Deaktivierung des Enzyms in diesen Lösungsmitteln konnte nicht bestätigt werden, da bei anschließendem Aktivitätstest gegen Olivenöl im pH-Stat nach wie vor eine hohe Aktivität bestimmt werden konnte. Denkbar wäre eine vorübergehende Inaktivierung des Enzyms durch Anlagerung des Lösungsmittels an das aktive Zentrum verbunden mit einer Konformationsänderung.

Die bei der Alkohololyse von Triolein in Aceton erhaltenen Ergebnisse waren nicht auf die Alkohololyse von Tripalmitin übertragbar. So konnte in Aceton zunächst nur eine Ausbeute von 25 % an 2-MP erzielt werden. Um allerdings 2-MP in nahezu quantitativer Ausbeute zu erhalten, war die Variation der Wasseraktivität und Immobilisierung der Lipasen auf einen anderen Träger notwendig. RML und RDL wurden dabei in einem Adsorptionsverfahren auf Polypropylen immobilisiert. Im Gegensatz zu Celite handelt es sich bei Polypropylen um eine organische Matrix. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Trägermaterialien können durchaus die Aktivität der Enzyme beeinflussen, wobei zu bemerken ist, dass die verschiedenen Aktivitäten deutlich mit dem Reaktionsmedium in Zusammenhang stehen. Selbst bei einer Wasseraktivität von 0,43 erwies sich RDL immobilisiert auf Celite für die Alkohololyse von Tripalmitin in Aceton als völlig unzureichend. Dieses Ergebnis steht im absoluten Gegensatz zu der Alkohololyse von Tripalmitin in MTBE unter Verwendung des gleichen Lipase-Immobilisats bei einer Wasseraktivität von 0,11. Ebenso zeigte Lipozyme IM nach Reduzierung der Lipasemenge auf 10 % und gleichzeitiger Erhöhung der Reaktionszeit als ungeeignet für eine effiziente Alkohololyse. Circa 40 % Tripalmitin waren nach 48 h Reaktionszeit noch nicht umgesetzt. Durch eine Erhöhung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute an 2-MP möglicherweise erhöht werden. Eine alternative Erklärung wäre eine mögliche Inhibierung von auf Anionenaustauscher oder Celite immobilisierten Enzymen bei längeren Reaktionszeiten.

Da für eine technische Umsetzung die Kontrolle der Wasseraktivität nicht sehr praktikabel ist, wurde der Reaktionsverlauf bei direkter Zugabe von Wasser zur Reaktionsmischung untersucht. Substrat, Lipase und Lösungsmittel wurden zuvor mit Karl-Fischer-Titration auf ihre Wasserfreiheit hin überprüft. Erfreulicherweise lief die Alkohololyse auch bei direktem Wasserzusatz vergleichbar gut ab. Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch im gebildeten Verhältnis von Palmitinsäureethylester zu Palmitinsäure. Bei einem direkten Wasserzusatz war der Palmitinsäureanteil deutlich erhöht. Dies wiederum ist nicht erwünscht, da bei der Kristallisation Probleme mit der Abtrennung der Palmitinsäure von 2-MP auftreten könnten, was andererseits wieder die Gefahr der Acylwanderung erhöhen könnte.

Die Isolierung des 2-MP erfolgte durch Kristallisation in Hexan/MTBE (95:5). Unter den gewählten Kristallisationsbedingungen blieben Ethylpalmitat und Palmitinsäure in Lösung. Optimal wäre eine Kristallisation direkt aus Aceton. Erschwerend wirkte sich dabei das ähnliche Löslichkeitsverhalten von Palmitinsäure (142 mg/ml) und 2-MP (90 mg/ml) aus. Während Palmitinsäureethylester (Löslichkeit in Aceton 1 g/ml) bei den Kristallisationsversuchen in Lösung blieb, fielen Palmitinsäure und 2-MP bei langsamer Absenkung der Temperatur gemeinsam aus.

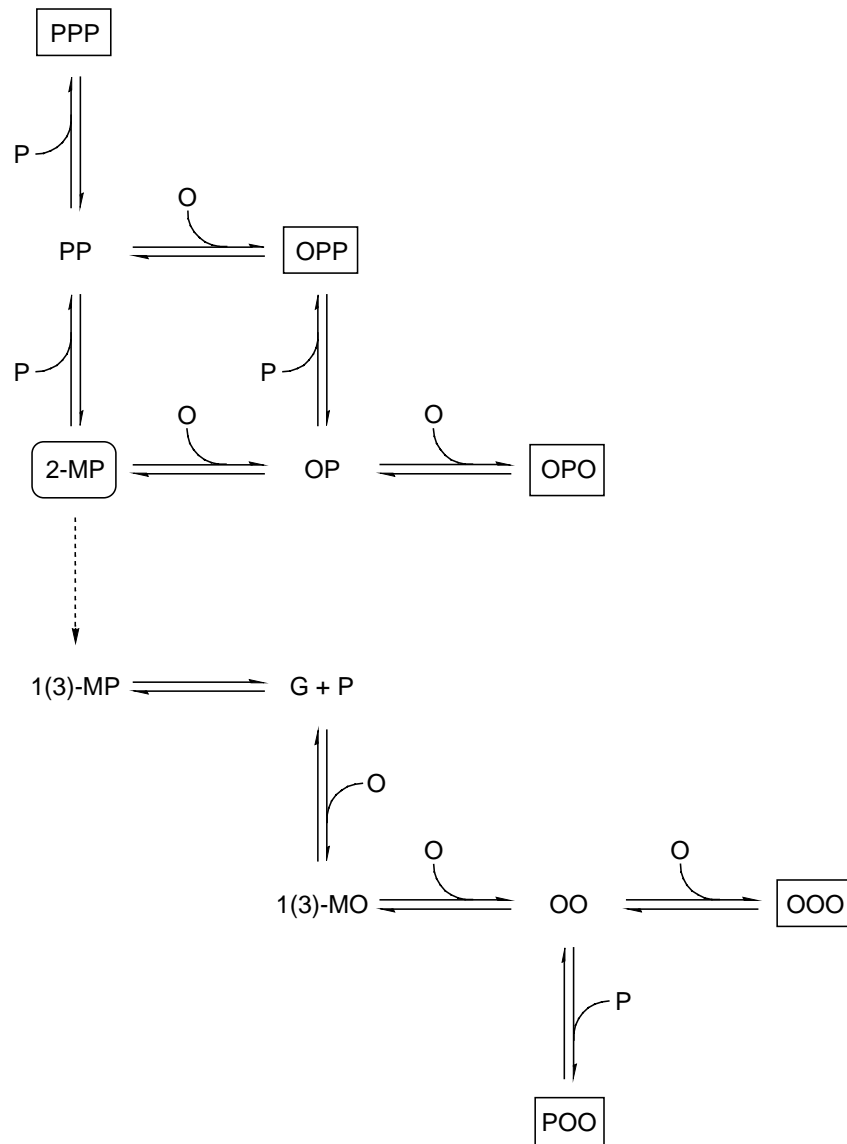
Unter optimierten Reaktionsbedingungen war die Alkohololyse nun neben Aceton auch in akzeptabler Ausbeute in Ethylmethylketon und 2-Propanol möglich. Hexan und Ethanol zeigten sich aber nach wie vor als Lösungsmittel ungeeignet. Die schlechte Umsetzung in Hexan während der Alkohololyse steht in krassem Gegensatz zur Veresterung, wie sie im zweiten Reaktionsschritt bzw. im üblichen Einschrittverfahren durchgeführt wird. Bei beiden Reaktionen läuft die Reaktion sehr gut in Hexan ab.

### **Veresterung von 2-MP mit Ölsäure**

Entscheidend für das Erzielen einer hohen Produktausbeute ist die Entfernung des bei der Reaktion gebildeten Wassers. Anders als bei Umesterungsreaktionen, bei denen eine gewisse Menge an Wasser notwendig ist, verursachen bei der Veresterung bereits geringe Wassermengen Acylwanderung und Hydrolyse der gebildeten Triglyceride. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden zur Entfernung des Wassers vorgeschlagen wie Pervaporation mittels bestimmter Membranen, Vakuum, Einleiten von Stickstoff oder trockener Luft und die Verwendung von aktiviertem Molekularsieb (Ergan et al., 1991; Kwon et al., 1995; van der Padt et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Verfahren zur Wasserentfernung untersucht. Zum einen erfolgte die Veresterung in Hexan als Lösungsmittel. Bei dieser Reaktion wurde das Wasser mit aktiviertem Molekularsieb (3 Å) entfernt. Zum anderen wurde OPO in einem lösungsmittelfreien Prozess unter Entfernung des Wassers durch Vakuum synthetisiert. Damit die Enzyme eine definierte Menge an gebundenem Wasser zur Aufrechterhaltung ihrer Aktivität enthalten, wurden sie vor Reaktionsbeginn über Nacht auf verschiedene Wasseraktivitäten äquilibriert. Denkbar ist zudem, dass die verwendeten Trägermaterialien wie Polypropylen und Anionenaustauscher eine gewisse Menge an Wasser gebunden haben und dadurch eine vollständige Entfernung des Wassers verhindert werden konnte.

Abbildung 46 zeigt sehr anschaulich, welche Vielzahl an Reaktionen bei der Veresterung von 2-MP mit Ölsäure auftreten können. So kann z.B. 2-MP zu 1-MP isomerisieren und wird dann durch die Lipase in Glycerin und Fettsäure gespalten. Vorstellbar ist nun eine Veresterung von Glycerin mit Ölsäure zu 1(3)-MO, weiter zum Diolein und schließlich durch

Veresterung von Palmitinsäure oder Ölsäure zu den Triglyceriden POO und OOO. Weitere mögliche Reaktionsprodukte können OPP und PPP sein.



**Abbildung 46** Einige mögliche Reaktionen bei der Veresterung von 2-MP mit Ölsäure (O: Ölsäure, P: Palmitinsäure, G: Glycerin)

Die Reduzierung der Acylwanderung hängt neben der Kontrolle des Wassergehaltes sehr stark von den sonst gewählten Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Menge an zugesetzter Säure, Zeitpunkt der Zugabe an Enzym etc. ab. Bei einer Veresterungsreaktion, die in Abbildung 25 wiedergegeben ist, entstanden neben dem Hauptprodukt OPO beträchtliche Mengen an den Nebenprodukten PPO, PPP und OOO. Bei dieser Reaktion wurden 2-MP und Ölsäure eine Stunde bei 55°C inkubiert, bevor Lipase addiert wurde. In

dieser relativ kurzen Zeitspanne wurde eine starke Acylwanderung von 2-MP zu 1-MP durch die Ölsäure verursacht. Bei gemeinsamer Zugabe von Lipase, Ölsäure und 2-MP wurde bevorzugt OPO neben einem kleineren Anteil an PPO gebildet. Um Acylwanderung weiter zu minimieren war die zügige Aufarbeitung des Produktes nach der Veresterung notwendig. Überschüssige Fettsäure und Diglyceride wurden durch Säulenchromatographie von OPO abgetrennt. Als Säulenmaterial wurde Kieselgel eingesetzt. Anders als bei der Säulenchromatographie von 2-MG mit Kieselgel, bei der eine starke Acylwanderung auftrat, konnte dies bei Untersuchungen der Triglyceridverteilung vor und nach der Säulenchromatographie von OPO nicht festgestellt werden.

Unter Berücksichtigung der Optimierungsbedingungen konnte OPO sowohl in Hexan als auch im lösungsmittelfreien System in hoher Reinheit und Ausbeute synthetisiert werden (Tab. 13). Das beste Ergebnis wurde mit RDL immobilisiert auf EP100 im lösungsmittelfreien Prozess erhalten (78 % Ausbeute). Die regio-spezifische Analyse ergab 96 % Palmitinsäure in *sn*2-Position und 90 % Ölsäure in *sn*1(3)-Position.

Beim Vergleich der beiden Veresterungsreaktionen muss betont werden, dass von produktionstechnischer Sicht dem lösungsmittelfreien Prozess klar der Vorzug zu geben ist. Durch das Fehlen von Lösungsmittel und Molekularsieb ist die Raumzeitausbeute deutlich höher (Tab. 14) und die Herstellung von potentiellen Lebensmitteln ohne Verwendung von Lösungsmitteln erwünscht. Zudem entfallen für die Entsorgung der Lösungsmittelabfälle zusätzliche Kosten.

#### **4.1.4 Synthese von strukturierten Triglyceriden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren**

Beim Bearbeiten von natürlichen Substraten wie z.B. Fischöl mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren traten einige Probleme auf. Durch das breite Fettsäurespektrum (von C14 bis C22:6) wurde sowohl die Analytik als auch die Isolierung der Produkte erschwert. Durch das unterschiedliche Kristallisationsverhalten konnten die MG aus Fischöl und Leinöl nicht durch Kristallisation, sondern nur durch Säulenchromatographie erhalten werden. Die polaren Sauerstoffgruppen des Kieselgels verursachten dabei in hohem Maße Acylwanderung. Um das Problem der Acylwanderung zu lösen, wurde Borsäure-impregniertes Kieselgel zur Isolierung der reinen 2-MG eingesetzt. Die richtige Wahl des Säulenmaterial und der Eluenten waren für die Abtrennung der 2-MG entscheidend (Kap. 2.5). Bei der Übertragung der optimierten Reaktionsbedingungen der Alkohololyse von Tripalmitin auf Leinöl und Fischöl, verlief lediglich die Reaktion mit Leinöl sehr gut. Innerhalb von 24 Stunden war die Alkohololyse quantitativ abgelaufen. Bei den Fischölen hingegen konnte erst nach Erhöhen der Wasseraktivität und bei sehr langen Reaktionszeiten (4 Tage) eine deutliche Zunahme der 2-MG Konzentration erzielt werden (Tab. 19). Eine mögliche

Erklärung der zum Teil geringen Ausbeute bei der Alkoholyse von Fischöl könnte durch Aktivitätsminderung der Lipase durch Inkorporation von EPA oder DHA in *sn1(3)*-Position sein. Der Einfluss von EPA und DHA wirkte sich sehr wahrscheinlich auch auf die Veresterungsreaktion mit Caprylsäure negativ aus. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen war es nicht möglich, Caprylsäure mit 2-MG aus Fischöl 1 und 4 in einem lösungsmittelfreien Prozess zu verestern. Es bildete sich unabhängig von der Wahl der Temperatur und des Anteils an Caprylsäure eine zähe nicht rührbare Masse ohne nachweisbare Bildung von MLM. Mit 2-MG aus Fischöl 2 gelang es jedoch, 6,1 % Triglycerid zu isolieren. Ebenso verliefen die Reaktionen in Hexan als Lösungsmittel bei allen drei Fischölen ohne Erfolg. Erstaunlicherweise konnte nach vier Tagen Reaktionszeit 11,2 % Triglycerid nach der Veresterung von 2-MG aus Fischöl 2 mit Caprylsäure in Aceton isoliert werden. Aceton erwies sich bei der Veresterung von 2-MP mit Ölsäure als absolut ungeeignet.

#### **4.2 Gerichtete Evolution des *slip1*-Gens aus *Candida rugosa***

Durch verschiedene Methoden des evolutiven Designs von Proteinen ist eine Möglichkeit gegeben, Enzyme innerhalb relativ kurzer Zeit neuen gewünschten Anforderungen anzupassen (Bornscheuer, 1998; Kuchner und Arnold, 1997). Dabei ist die Methode noch relativ neu und birgt in Zukunft sicher noch ein hohes Potential neuer Anwendungsmöglichkeiten in sich. Vom Ansatz her steht sie im Kontrast zur ortsspezifischen Mutagenese und dem Screening nach neuen Biokatalysatoren aus der Natur. Sie stellt daher eine attraktive Ergänzung zu den bestehenden Methoden dar. Der Zeitraum der Evolution wird von Millionen Jahren auf Wochen oder Monate verkürzt. Das Prinzip ist jedoch dasselbe: auftretende Mutationen verändern die Eigenschaften von Biomolekülen; diejenigen, die den Anforderungen am Besten angepasst sind, werden durch ein entsprechendes Screening selektiert. Für die gerichtete Evolution von Biomolekülen gilt daher das Gesetz: "You only get what you screen for" (Arnold and Moore, 1997).

Die *slip1*-Lipase aus *Candida rugosa* weist gegenüber Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C4 und C12 die höchste Aktivität auf. Die gesättigten Fettsäuren wie Palmitinsäure oder Stearinsäure sowie länger-kettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA und DHA werden dagegen nur sehr schlecht bzw. erst nach sehr langer Reaktionsdauer hydrolysiert. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Kettenlängenselektivität durch evolutives Design signifikant zu erhöhen. Durch eine Punktmutation wurde die Aminosäure Threonin an Position 11 durch ein Alanin ersetzt.

#### 4.2.1 Error prone PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die gerichtete Evolution mittels error-prone PCR durchgeführt, da diese Methode sehr einfach und schnell durchführbar ist. Weitere Vorteile dieser Methode sind die Einstellbarkeit der Mutationsrate und die Beschränkung der Mutation auf einen definierten Genabschnitt. Klare Nachteile der error-prone PCR sind allerdings die je nach angewandter Methode variierende Ligationseffizienz und der nicht statistische Austausch der Nucleotide (Bornscheuer, 1998).

Nach der error-prone PCR des *slip1*-Gens erfolgte die Ligation des Genabschnitts mit dem Vektor durch homologe Transformation *in vivo* in *S. cerevisiae*. *S.cerevisiae* ist schon seit einigen Jahren ein viel untersuchter und verwendeter Organismus für die heterologe Expression von Genen (Gellissen und Hollenberg, 1997). Die Vorzüge dieses Organismus liegen in der Sekretion der Lipase ins Medium und der einfacheren Isolierung der Plasmide aus dem Organismus, die nicht wie z.B. bei *P. pastoris* ins Genom integriert werden (Cregg et al., 1993; Screckrishna et al., 1997). Die Proteinexpression hingegen ist in der Regel in *P. pastoris* 10 - 100 mal höher als in *Saccharomyces cerevisiae* (Brocca et al., 1998).

#### 4.2.2 Entwicklung eines *p*-Nitrophenylesterassays in Mikrotiterplatten

Für das Screening einer hohen Anzahl an Mutanten ist ein einfaches und zugleich aussagekräftiges Assaysystem notwendig. In der vorliegen Arbeit wurden deshalb als Hydrolysesubstrate *p*-Nitrophenylester unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt, da aus der Literatur bereits bekannt war, dass sich diese Substrate gut zur Aktivitätsbestimmung von Lipasen eignen und darüber hinaus durch die Gelbfärbung des bei der Reaktion freigesetzten *p*-Nitrophenols leicht detektierbar und quantifizierbar sind. Die Pipettierschritte wurden durch einen Roboter ausgeführt. Probleme, die durch Benutzen eines Roboters auftreten können, sind z.B. hauptsächlich Pipettierfehler bei Verwendung von organischen Lösungsmitteln. Bei wässrigen Lösungen konnten diese Beobachtungen hingegen nicht festgestellt werden. Dadurch können zum Teil erhebliche Messfehler auftreten, die ein Vergleichen der Werte wie es bei der vorliegenden Arbeit notwendig war, erheblich erschweren. Aus diesem Grund wurde Klone, die nach einem ersten Durchlauf eine andere Aktivität als der Wildtyp aufwiesen, wiederholt überprüft. Obwohl, wie die Untersuchung einiger Wildtypklone belegt, das Wachstum der Klone und die Sekretion der Lipase ins Medium vergleichbar war (Kap. 3.6.2), ist ein unterschiedliches Wachstum der Zellen und eine unterschiedliche Lipase-Expressionsmenge nicht auszuschließen, was die zum Teil doch auftretenden Probleme in der Reproduzierbarkeit erklären könnte. Durch den Vergleich der einzelnen Fettsäuren zueinander und mit dem Wildtyp konnten diese Effekte etwas reduziert werden. Zusätzlich wurden die Selektionskriterien sehr hoch gesetzt. Es musste

ein mindestens 50 %iger reproduzierbarer Aktivitätsunterschied zum Wildtyp vorliegen. Durch weitere Mutationszyklen der selektierten Mutanten können die Eigenschaften dieser Mutanten noch erhöht werden bzw. zu Mutanten mit deutlich anderer Kettenlängenspezifität führen, die z.B. dann auch bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA oder EPA in Fischöl hydrolysieren können. Desweiteren kann diese Bibliothek aus *C. rugosa* Mutanten die Grundlage für weitere Screeningmöglichkeiten bieten. Denkbar ist ein Screening auf erhöhte Lösungsmittelstabilität z.B. in Aceton oder Ethanol oder auch die Racematspaltung chemisch schwer zugänglicher Substrate.

Nach der Sequenzierung der sechs Klone konnten bei zwei Klonen eine Punktmutation nachgewiesen werden, die eine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkte. Bei beiden Mutanten fand ein Austausch von Threonin zu Alanin statt, jeweils aber an einer anderen Position. Durch Computermodellierung konnten die Positionen der Mutationen in der *Candida rugosa* Struktur lokalisiert und der Abstand der Mutationen zum aktiven Zentrum bestimmt werden. Die Mutation liegt in der Peripherie (ca. 35 Å von Serin der katalytische Triade entfernt) der *C. rugosa* Struktur und nicht in der Nähe bzw. in direkter Beziehung zur Bindungstasche. Einige Publikationen haben sich mit der Geometrie der Bindungstasche und der Art, wie sich Fettsäuren an die Bindungsstelle anlagern, bei Lipasen beschäftigt. Bei *C. rugosa* wird eine tunnelähnliche Bindungstasche angenommen, die sich von der Bindungstasche anderer Lipasen deutlich abhebt. Die Bindungsstelle der Fettsäure soll sich im Tunnel befinden, der eine Länge von 22 Å und einen Durchmesser von 4 Å aufweist (Pleiss et al., 1998). Das Serin der katalytischen Triade liegt direkt hinter dem Tunnelanfang, der sich in Richtung C<sub>3</sub> verengt und die Fettsäurekette bis zum ω-Ende berührt. Da sich die Mutation weit abseits des aktiven Zentrums befindet, bleibt der Tunnel im aktiven Zentrum unverändert. Die veränderte Substratspezifität ist in diesem Fall nicht durch einen Tunneleffekt zu erklären. Durch die Mutation wurde die Enzymoberfläche an besagter Stelle hydrophober, wodurch entweder direkt die Änderung der Substratspezifität gegenüber gesättigten, langkettigen Fettsäuren bedingt ist oder die Anordnung des Enzyms an die Grenzfläche geändert wurde.

Weitere durch "directed evolution" erhaltene Mutanten können das Verständnis über Struktur-Wirkungsbeziehungen vergrößern.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Lipase-Katalysierte Synthese strukturierter Triglyceride, zum anderen die Veränderung der Kettenlängenselektivität der *slip1*-Lipase aus *C. rugosa* durch gerichtete Evolution untersucht.

Besonderes Interesse galt der Synthese von strukturierten Triglyceriden des ABA-Typs, die aufgrund ihrer symmetrischen Struktur zur Therapie von Fettabsorptionsproblemen wie z.B. Pankreasinsuffizienz eingesetzt werden können. Besonderes Interesse galt dabei der Synthese von 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerin (OPO), das in Säuglingsnahrung als Fettkomponente eingesetzt wird. Entscheidend ist dabei die Position der Palmitinsäure, da palmitinsäurehaltige Triacylglyceride nur dann gut resorbiert werden, wenn diese Fettsäure analog zur Muttermilch in *sn2*-Position des Glycerins gebunden ist. Befindet sich hingegen Palmitinsäure in *sn1* bzw. *sn3*-Position, wird diese bei der Lipolyse gespalten und führt in Gegenwart von Calcium zu schwer löslichen Seifen. Als Folgeerscheinung treten u.a. Verdauungsstörungen und Calciumverlust auf (Lien et al., 1997). Durch die Entwicklung eines Zweischrittverfahrens unter Berücksichtigung lebensmittelrechtlicher Aspekte gelang es, ABA-Triglyceride unter Verwendung von 1,3-regiospezifischen Lipasen in hoher Ausbeute und Reinheit zu synthetisieren. Die Zweischrittsynthese gliedert sich in eine Alkoholyse als ersten Reaktionsschritt, gefolgt von einer Veresterung im zweiten Reaktionsschritt. Dabei war die detaillierte Untersuchung der für Lipase-Katalysierte Reaktionen relevanten Bedingungen wie Wassergehalt, Wasseraktivität, Temperatur, Enzym und Trägermaterial von entscheidender Bedeutung. Erst durch Variation der Wasseraktivität ( $a_w = 0,43$ ) und des Trägermaterials gelang die Alkoholyse von Tripalmitin in Aceton, einem lebensmittelrechtlich erlaubten Lösungsmittel. Das Zielprodukt der Alkoholyse, 2-MP, konnte durch Kristallisation sehr rein ( $> 95\%$ ) mit einer Ausbeute von 82 % isoliert werden. Die anschließende Veresterung von 2-MP mit Ölsäure wurde zum einen in Hexan als Lösungsmittel und zum anderen in einem lösungsmittelfreien Prozess durchgeführt, der durch die höhere Raum-Zeit-Ausbeute und Arbeiten ohne Molekularsieb deutliche Vorteile aufweist. Entscheidend für den Erfolg der Veresterung war die Entfernung des bei der Reaktion gebildeten Wassers, um Acylwanderung während der Reaktion so weit wie möglich zu unterdrücken. Nach weiteren Optimierungen konnte die Acylwanderung weiter minimiert und OPO ausgehend von Tripalmitin in einer Gesamtausbeute von 74,0 % isoliert werden. Die regiospezifische Analyse mit Pankreaslipase ergab hochreines OPO mit 96 % Palmitinsäure in *sn2*-Position und 90 % Ölsäure in *sn1(3)*-Position. Die Übertragung dieses Verfahrens zur Modifikation von Ölen wie Leinöl oder Fischöl mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren war ebenfalls möglich. Auf Grund der komplexeren Zusammensetzung dieser

natürlichen Öle wurden weitere Untersuchungen bezüglich der Reaktionsdurchführung und der Isolierung der Produkte notwendig.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch gerichtete Evolution die Kettenlängenselektivität einer synthetischen Lipase aus *Candida rugosa* verändert. Mittels error prone PCR wurde das *slip1*-Gen mutiert und durch Transformation in *Saccharomyces cerevisiae in vivo* recombiniert. Die große Anzahl an Transformanden wurde in Mikrotiterplatten überführt und dadurch eine Mutantenbibliothek von 3200 Klonen angelegt. Zur Identifizierung von gewünschten Mutanten wurde ein aus *p*-Nitrophenylestern unterschiedlicher Kettenlänge bestehender Assay entwickelt, wobei das durch Lipaseaktivität freigesetzte *p*-Nitrophenol bei 410 nm photometrisch detektiert wurde. Die selektierten sechs Klone wurden sequenziert und die Mutationen ausgewertet. Zwei Klone wiesen jeweils eine Punktmutation auf. Bei Mutante 1 wurde Thr<sub>11</sub> gegen Ala<sub>11</sub> ausgetauscht. Bei Mutante 2 wurde ebenfalls Threonin gegen Alanin ausgetauscht, jedoch an Position 201. Abschließend wurden die erhaltenen Mutanten in einem kompetitiven Assay mit dem synthetischen *lip1*-Gen verglichen. Die Grundlage des Assays bildete eine "random oil", dessen Fettsäurespektrum von C<sub>8</sub> - C<sub>18</sub> reicht. Die bei der Hydrolyse des "random oil" durch die Lipase-Mutanten freigesetzten Fettsäuren wurden gaschromatographisch bestimmt. Mutante Ala<sub>11</sub> zeigte dabei deutlich erhöhte Selektivität gegenüber Palmitinsäure und Stearinsäure im Vergleich zum Wildtyp.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Biotransformation

#### 6.1.1 Bestimmung der hydrolytischen Lipaseaktivität

Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität von nativer bzw. immobilisierter Lipase erfolgte mittels pH-Stat-Assay. Die pH-Stat Apparatur besteht aus einem Impulsomat, Dosimat, pH-Meter und einem Schreiber. Die Messung erfolgte mit einer Standardemulsion: 5 ml Olivenöl und 2 g Gummi arabicum wurden mit 100 ml deionisiertem Wasser versetzt und mittels Ultraturax 5 min emulgiert. 20 ml dieser Emulsion wurden mit 470 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung (22% w/v) in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Natronlauge auf einen vorgegebenen pH-Wert titriert. Anschließend wurde eine bekannte Menge Lipase zugesetzt und die bei der Reaktion freiwerdenden Fettsäuren automatisch mit 0,01 N NaOH auf einen vorgegebenen konstanten pH-Wert titriert.

Die Lipaseaktivität wird in Units pro g Lipase angegeben. Ein Unit entspricht dabei der Enzymmenge, die ein µmol Fettsäure pro Minute hydrolysiert.

Die Hydrolyseaktivität bestimmter Lipasen wurde ebenfalls mit Emulsionen aus Fischöl und Tripalmitin bestimmt.

#### 6.1.2 Adsorptive Immobilisierung von Lipasen

##### Immobilisierung auf Celite

Vor der Immobilisierung wurde Celite mit Wasser und Ethanol (95% v/v) gewaschen und bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das Trägermaterial mit 5% HNO<sub>3</sub> vermischt und 4 h bei 80°C gerührt. Dann wurde das säuregewaschene Trägermaterial mit deionisiertem Wasser so lange gewaschen bis der pH-Wert neutral war und über Nacht bei 80°C getrocknet. Zur Immobilisierung wurden ein Gramm Lipasepulver in 20 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0; 20 mM) gelöst. Diese Lösung wurde zu einem Gramm gewaschenem Celite hinzugegeben und die Mischung dann 30 min bei 5°C (Eisbad) gerührt. Anschließend wurden 10 ml eisgekühltes Aceton hinzugefügt und nochmals 30 min bei 5°C gerührt. Die immobilisierte Lipase wurde durch Filtration abgetrennt, dreimal mit eisgekühltem Aceton gewaschen und 24 h im Gefriertrockner getrocknet.

Die hydrolytische Aktivität sowohl des Immobilisats als auch des Filtrats (Überprüfung der Effizienz der Immobilisierung) wurde anschließend mittels pH-Stat-Assay (6.1.1) bestimmt.

## Immobilisierung auf Polypropylen

Zur Immobilisierung wurde Polypropylen (EP 100) von einer Partikelgröße 200-400 µm eingesetzt. Eine Lösung aus 1 g Lipase in 25 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0; 20 mM) wurde zu einer Mischung aus 1,5 g Polypropylen in 5 ml Ethanol gegeben. Nach 24 h Rühren, wurde das Immobilisat durch Filtration abgetrennt, dreimal mit Kaliumphosphatpuffer (4 ml) gewaschen und im Gefriertrockner über Nacht getrocknet. Die hydrolytische Aktivität sowohl des Immobilisats als auch des Filtrats (Überprüfung der Effizienz der Immobilisierung) wurde anschließend mittels pH-Stat-Assay (6.1.1) bestimmt.

### 6.1.3 Bestimmung des Wassergehaltes nach Karl Fischer

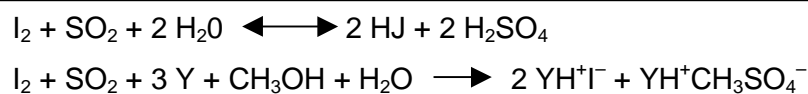
#### Prinzip

Die Bestimmung des Wassergehaltes von Lipasen, Lösungsmitteln, Substraten erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration. Die Bestimmung von Wasser erfolgte in Gegenwart von Schwefeldioxid und Jod. Durch Zusatz einer Base Y (Pyridin) und eines Alkohols (Methanol) wird das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben, wobei beide Stoffe direkt an der Reaktion beteiligt sind und Pyridin sowohl die Edukte als auch die Produkte komplexiert und stabilisiert. Da Pyridin toxische Wirkungen besitzt, versuchte Scholz es durch ein anderes basisches Amin mit ähnlichen Eigenschaften zu ersetzen. Dies gelang durch die Entwicklung eines neuen Zweikomponentensystems (Matissek et al., 1992; Scholz, 1983; Seelze, 1985):

Lösung I: Diethanolamin + Schwefeldioxid + Methanol

Lösung II: Jod + Methanol

Reaktionsgleichung:



Mit der Karl-Fischer Methode kann sowohl „freies“, d.h. oberflächlich adsorbiertes Wasser als auch „gebundenes“, d.h. Kristallwasser bestimmt werden.

Zunächst muß die Titrierzelle konditioniert werden. 20 ml Methanol werden dazu in der Titrierzelle vorgelegt und mit Hydranal-Titrant bis zum Endpunkt titriert. Dabei werden das Arbeitsmedium und das Titriergefäß vorgetrocknet. Anschließend erfolgt die Titerbestimmung. In die konditionierte Titrierzelle wird eine definierte Menge an Wasser hinzugefügt und anschließend titriert. Nach Abschluß der Titration sind am Gerät sowohl die

Menge an verbrauchter Titrierlösung als auch der berechnete Titer angegeben. Die Titerbestimmung wird solange wiederholt bis ein konstanter Titerwert erhalten wird. Der Titerwert wird dann gespeichert und zur Berechnung des Wassergehaltes herangezogen.

Der Wassergehalt der auf 0,1 mg genau gewogenen Probe kann in derselben Lösung bestimmt werden, die zur Titerbestimmung eingesetzt wurde. Die Angabe des Wassergehaltes erfolgt in %.

#### 6.1.4 Einstellung der Wasseraktivität (Goderis et al., 1986)

Die Einstellung der Wasseraktivität erfolgte durch Äquilibration von Lipasen und Lösungsmittel über gesättigten Salzlösungen bekannter Wasseraktivität. Enzym und Lösungsmittel wurden separat über Nacht inkubiert und die Reaktion anschließend durch Mischung der Komponenten gestartet. Tabelle 29 zeigt die verschiedenen Salze und die zur Einstellung einer bestimmten Wasseraktivität notwendige Konzentration.

**Tabelle 29** Einstellung der Wasseraktivität mittels gesättigter Salzlösungen

Salz	Wasseraktivität	g Salz/500 µl Wasser
LiCl	0.11	0.70
KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O	0.23	1.50
MgCl · 6 H <sub>2</sub> O	0.33	1.20
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.43	0.75
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.54	0.80
NaCl	0.75	0.50
KCl	0.85	0.50
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.95	0.65

#### 6.1.5 Bestimmung der freien Fettsäuren mittels GC (Badings und de Jong, 1983)

2 mg Fett oder 50 µl Probe aus Reaktionsansatz (Lösungsmittel zuvor entfernen) wurden mit 500 µl *n*-Hexan und 100 µl 20%HCl in Methanol versetzt. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde gut verschlossen und 15 min bei 85°C geschüttelt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurden nur die freien Fettsäuren in die Methylester überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde 1 µl der Hexanphase zur gaschromatographischen Untersuchung der freien Fettsäuren eingesetzt. Die Analyse wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

150 °C      2 min  
220 °C      4 °C/ min

220 °C	10 min
Injektor:	230 °C
Detektor:	230 °C (FID)

### **6.1.6 Bestimmung der gebundenen Fettsäuren (Badings und de Jong, 1983)**

10 mg Triglycerid wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 ml *n*-Hexan und 60 µl 2 M Natriummethanolatlösung versetzt. Nach 1 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde abzentrifugiert (5 min) und 1 µl der Hexanphase zur gaschromatographischen Untersuchung der gebundenen Fettsäuren eingesetzt. Bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen wurden nur die gebundenen Fettsäuren in die Methylester überführt. Die Auftrennung der Methylester erfolgte nach dem selbem Temperaturprogramm wie unter Kap. 6.1.5.

### **6.1.7 Regiospezifische Analyse von Triglyceriden mit Pankreaslipase (Hendrikse et al., 1994)**

Die Regiospezifische Analyse erfolgte durch Verdauung der Triglyceride mit Pankreaslipase. Dabei ist anzumerken, dass die nach dieser Methode untersuchten Triglyceride keine Fettsäuren mit Kettenlängen  $>C_{20}$  enthalten sollten, da diese durch die Pankreaslipase nicht gespalten werden. 20 mg Triglyceride wurden mit 10 mg Pankreaslipase und 3 ml Tris-HCl-Puffer (pH 8, 1M) versetzt. Nach dem Schütteln wurden 0,5 ml Natriumcholatlösung (1 g/l) und 0,2 ml Calciumchloridlösung (220 g/l) hinzugefügt und geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung für 1 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Reaktionslösung 2 min unter fließendem Wasser abgekühlt. Es wurden 1 ml Salzsäure (6 M) und 1 ml Diethylether zugesetzt und 2 min geschüttelt. Abschließend wurde 5 min bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die Diethyletherphase abgenommen und zur Trennung der einzelnen Fraktionen auf eine Kieselgelsäule (siehe 6.1.6) aufgegeben. Die Fraktionen wurden gesammelt und sowohl die freien Fettsäuren als auch die gebundenen Fettsäuren in die Fettsäuremethylester (siehe 6.1.5 bzw. 6.1.6) überführt und gaschromatographisch bestimmt. Alternativ wurden die Reaktionsprodukte ohne Säulenchromatographie direkt mit MSHFBA derivatisiert und sowohl die Fettsäuren als auch die 2-Monoglyceride über Standardsubstanzen gaschromatographisch bestimmt und zugeordnet.

### 6.1.8 Regiospezifische Analyse von Triglyceriden mit Grignard-Reagenz

10 mg reines Triglycerid wurden in 1 ml abs. Diethylether gelöst. Anschließend wurden 250 µl Allylmagnesiumbromid hinzugefügt und eine Minute geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion wurden nacheinander 5 ml Hexan, 6 µl Eisessig und 2 ml Wasser zugegeben und geschüttelt. Dann wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels der Überstand auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Entwicklung der DC-Platte erfolgte in Hexan/Diethylether/Essigsäure (70:30:1). Anschließend wurde die 1,2(2,3)-Diglyceridbande mit der Dünnschichtplatte abgekratzt und mit Natriummethanolat in die Fettsäuremethylester überführt und gaschromatographisch nach 6.1.6 detektiert. Die Fettsäurezusammensetzung in *sn*2 und *sn*1,3-Position wurden nach der in der Literatur (Myher et al., 1996) bekannten Formel berechnet :

$$\% \text{ Fettsäure}_{sn1,3\text{-Position}} = 3 (\% \text{ Fettsäure}_{TG}) - 2 (\% \text{ Fettsäure}_{1,2\text{-DG}})$$

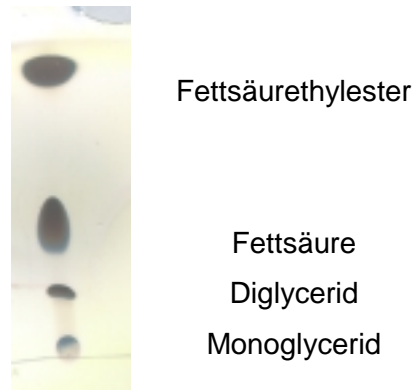
$$\% \text{ Fettsäure}_{sn2\text{-Position}} = 4 (\% \text{ Fettsäure}_{1,2\text{-DG}}) - 3 (\% \text{ Fettsäure}_{TG})$$

### 6.1.9 Trennung von Triglyceriden, Fettsäuren, Di- und Monoglyceriden mittels Säulenchromatographie

#### Borsäure imprägnierte Kieselgelsäule

Die Imprägnierung von Kieselgel mit 10 %iger Borsäurelösung verhindert Isomerisierung der Mono- und Diglyceride (Hendrikse et al., 1994). Die Borsäurebehandlung des Kieselgels erfolgte in Anlehnung an. Dabei wurde das Kieselgel vollständig mit 10 %iger Borsäurelösung getränkt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das imprägnierte Kieselgel bei 120°C im Trockenschrank getrocknet und bis zur Verwendung gelagert.

Für die Säulenchromatographie wurden ca. 12 g imprägniertes Kieselgel pro 200 mg Triglycerid eingesetzt. Die Elution erfolgte entweder mit Petrolether/Ether mit einem Gradienten (95:5 bis 100 % Ethylether) oder Chloroform/Aceton (100 % Chloroform bis 80:20). Dabei wurden die Fraktionen wie folgend eluiert: Fettsäureethylester, Fettsäuren, Diglyceride und zuletzt die Monoglyceride.



**Abbildung:** Dünnschichtchromatogramm entwickelt in Hexan/Diethylether/Essigsäure (70:30:1): Trennung der Reaktionsprodukte nach der Alkoholyse

In beiden Systemen traten bei der Trennung der Reaktionsprodukte Probleme auf. Oft wurde eine Mischfraktion aus Diglyceriden und Monoglyceriden erhalten. Zum Teil wurde auch die Säure zusammen mit den Diglyceriden und Monoglyceriden eluiert.

### Reversed phase RP 18 Kieselgelsäule

Bei der Umkehrphasenchromatographie (reversed phase chromatography) ist die Elution der Substanzen im Vergleich zur normalen Kieselgelchromatographie zum Teil umgekehrt. Durch die Verwendung von mit Octadecyl funktionalisiertem Kieselgel ist die Matrixoberfläche nun unpolar. Zur Trennung von ca. 300 mg Reaktionsmischung wurden in eine Säule mit 2 cm Durchmesser 30 g funktionalisiertes Kieselgel gegeben. Die Elution erfolgte mit Methanol/Wasser (96:4). Unter diesen Elutionsbedingungen wurden die Fraktionen in folgender Reihenfolge eluiert: Monoglyceride, Fettsäuren, Fettsäureethylester, Diglyceride und zuletzt die Triglyceride. Um Acylwanderung nach der Elution zu verhindern wurde Natriumsulfat zum Trocknen ins Eluat zugesetzt und anschließend sofort das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt.

### Reversed phase RP 18 HPLC

Die bei der Alkoholyse von Triolein auftretenden Produkte zur Bestimmung der kinetischen Daten, wurden mittels analytischer HPLC aufgetrennt und durch einen Lichtstreuendetektor detektiert. Die Reaktionsprodukte wurden dabei wie folgt eluiert: 2-MG, Fettsäure, Fettsäureethylester, Diglyceride und zum Abschluss die Triglyceride. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus Acetonitril (A) und Dichlormethan (B): 7 min 100 % A, dann innerhalb 40 min bis zu 65 % B. Die Detektortemperatur betrug 42°C.

Zur Isolierung der 2-MG nach der Alkohololyse von Fischöl bzw. Leinöl wurde diese Methode auf eine präparative HPLC übertragen. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 237 nm. Eluiert wurde zunächst 7 min mit 100 % Acetonitril. Daraufhin wurde innerhalb von 20 min der Dichlormethananteil auf 100 % gesteigert, um eine schnelle Elution der Di- und Triglyceride zu ermöglichen.

### 6.1.10 Lipase-Katalysierte Synthese von OPO

#### Alkohololyse von Tripalmitin

0,35 mmol (283 mg) Tripalmitin wurden in 6 ml Aceton, das auf eine Wasseraktivität von 0,43 eingestellt wurde, vermischt. 3,5 mmol (161 mg) trockenes Ethanol wurden hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 28,3 mg Lipase (10 % bezogen auf die Menge an Tripalmitin) gestartet. Die Lipase wurde zuvor ebenfalls auf eine Wasseraktivität von 0,43 eingestellt. Damit Tripalmitin in Aceton gelöst bleibt, wurde die Reaktion bei 52°C durchgeführt. Nach 48 h wurde die Reaktion durch Entfernen der Lipase gestoppt. Nach Verdampfen des restlichen Acetons, wurde der Rückstand in 50 ml n-Hexan/MTBE (96:4) gelöst. Nach einer Stunde bei -23°C bildeten sich weiße Kristalle, die durch Filtration abgetrennt wurden. Der Überstand enthielt Palmitinsäure, Palmitinsäureethylester und noch eine minimale Restmenge an Dipalmitin. Das erhaltene 2-Monopalmitin wurde so oft umkristallisiert bis mittels GC der Anteil an 2-MP > 95 % war. Zusätzlich wurde die Reinheit des erhaltenen Produktes mit <sup>13</sup>C-NMR bestätigt.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.13 (CH<sub>3</sub>), 22.70, 24.96, 29.12, 29.27, 29.37, 29.47, 29.62, 29.67, 29.71, 31.93, 34.36 (14 CH<sub>2</sub>), 62.31 (2 CH<sub>2</sub>OH), 74.93 (CHOOC), 174.19 (CHOOC).

#### GC-Analytik der Alkohololyseprodukte

10 µl Probe wurden mit MSHFBA (*N*-Methyl-*N*-trimethylsilylheptafluorbutyramid) derivatisiert. MSHFBA überführt alle Hydroxylgruppen der Reaktionspartner in die entsprechenden Trimethylsilylether. Nach Zugabe von MSHFBA wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 100 µl Dichlormethan versetzt. 1 µl dieser Probenlösung wurden für die Gaschromatographie eingesetzt. Diese GC-Methode ermöglichte es Ester, Fettsäuren, Monoglyceride, Diglyceride und Triglyceride so wie die Isomere 2-Monoglycerid und 1-Monoglycerid und 1,2(2,3)- bzw. 1,3-Diglycerid voneinander zu trennen. Als Trägergas wurde Wasserstoff mit einem Druck von 100 KPa verwendet. Die Analyse wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

200°C            2 min

360°C	8°C/min
360°C	8 min
Injektor	370°C
Detektor	370°C

### **Veresterung von 2-Monopalmitin mit Ölsäure**

#### a) Veresterung mit Lösungsmittel

0,3 mmol (100 mg) reines 2-MP und 0,9 mmol Ölsäure (254 mg) wurden in 25 ml n-Hexan gelöst, das zuvor auf eine Wasseraktivität von 0,11 eingestellt wurde, gelöst. Um das während der Reaktion gebildete Wasser zu entfernen, wurden 200 mg aktiviertes Molekularsieb (3 Å) hinzugesetzt. Durch Zugabe von 10% Lipase (bezüglich der Einwaage an 2-MP), eingestellt auf eine Wasseraktivität von 0,11, wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktionsmischung wurde bei 38°C auf dem Ölbad gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Lipase abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. OPO wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe Kap. 6.1.8.4) und charakterisiert (Kap. 6.1.7 bzw. Kap. 6.1.8, Kap. 6.1.10.5, Kap. 6.1.10.6).

#### b) Veresterung im lösungsmittelfreien System

0,3 mmol (100 mg) reines 2-MP und 0,9 mmol Ölsäure (254 mg) wurden vermischt und sofort 10 mg Lipase (10 % bezüglich der Einwaage an 2-Monopalmitin), die zuvor auf eine Wasseraktivität von 0,43 eingestellt wurde, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 50°C auf dem Ölbad gerührt. Das während der Reaktion gebildete Wasser wurde durch Anlegen von Vakuum entfernt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Lipase mittels Filtration abgetrennt. OPO wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe Kap. 6.1.8.4) und charakterisiert (Kap. 6.1.7 bzw. Kap. 6.1.8, Kap. 6.1.10.5, Kap. 6.1.10.6).

### **Isolierung von OPO mittels Säulenchromatographie**

Zur Säulenchromatographie wurde eine Mischung aus neutralem Aluminiumoxid und Kieselgel im Verhältnis 1:1 eingesetzt und auf die Säule aufgetragenes OPO mit einer Mischung aus Petrolether/Ether (90:10) eluiert. Der Eluent wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die vollständige Entfernung des Lösungsmittels erfolgte mittels Gefriertrockner. Durch Verwendung von Aluminiumoxid bleiben überschüssige Säure, sowie nicht umgesetzte Mono- und Diglyceride haften und OPO kann sehr rein eluiert werden.

### Bestimmung der Zusammensetzung von OPO mittels GC

Die Fettsäurezusammensetzung von OPO wurde durch Überführung der gebundenen Fettsäuren in die Fettsäuremethylester gaschromatographisch bestimmt (siehe 6.1.5).

Temperaturprogramm:

200°C	2 min
214°C	1 min
214°C	4°C/min
Injektor	230°C
Detektor	230°C

### Trennung der Triglyceride mittels GC

Die Auftrennung der Triglyceride, die bei der Veresterung von 2-MP mit Ölsäure entstanden sind und durch Säulenchromatographie isoliert wurden, erfolgte gaschromatographisch mit folgendem Temperaturprogramm: 200°C (2 min) wurden in 8°C/min auf 360°C (8 min) geheizt.

## 6.1.11 Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Leinöl

### Berechnung des Molekulargewichts des Leinöls

Die Berechnung des Molekulargewichts erfolgte über die Fettsäurezusammensetzung des Leinöls, die zuvor gaschromatographisch bestimmt wurde.

**Tabelle 30** Berechnung des Molekulargewichts

Fettsäure	Molmasse FS (g/mol)	Fettsäurezusammensetzung (Mol%)	Massenanteil (g)
C 16:0	256,43	6,7	17,2
C 18:0	284,49	2,7	7,7
C 18:1	282,47	13,2	37,3
C 18:2	280,45	15,0	42,1
C 18:3	278,44	62,6	174,3
Summe			<b>278,6</b>

Molmasse -OH: 17 g

Molmasse Glycerin: 92,0 g

Berechnungsformel

$3 \cdot \text{Molmasse (Fettsäure)} - 3 \cdot \text{Molmasse (OH)} + \text{Molmasse (Glycerin)} - 3 \cdot \text{Molmasse (H)}$

$$= 3 \cdot 278,0 - 3 \cdot 17 + 92 - 3 \cdot 1 = \mathbf{873,8 \text{ g/mol}}$$

### Alkoholyse von Leinöl

Zu 0,5 mmol Leinöl (0,4369 g) wurden 4,15 mmol (0,1912 g) Ethanol und 8,3 ml Aceton hinzugefügt. Zum Starten der Reaktion wurden 10 % RDL bezüglich der Einwaage an Leinöl immobilisiert auf EP 100 zugesetzt. Sowohl Aceton als auch die Lipase wurde durch gesättigte Salzlösungen auf eine Wasseraktivität von 0,43 äquilibriert. Nach 24 h Reaktionszeit war die Reaktion quantitativ abgelaufen. Die Isolierung der 2-MG erfolgte wie unter 6.1.9 beschrieben. Die Reinheit des Produktes wurde gaschromatographisch (siehe 6.1.10.2) überprüft und das Molekulargewicht der 2-MG berechnet (Tab. 31)

**Tabelle 31** Berechnung des Molekulargewichts der 2-MG-Fraktion

Fettsäure	Molmasse FS (g/mol)	Fettsäurezusammensetzung (Mol%)	Massenanteil (g)
C 16:0	256,43	n.d.	-
C 18:0	284,49	n.d.	-
C 18:1	282,47	16,7	47,2
C 18:2	280,45	19,7	55,2
C 18:3	278,44	63,6	177,1
Summe			<b>279,5</b>

Molmasse -OH: 17 g

Molmasse Glycerin: 92,0 g

#### Berechnungsformel

1 · Molmasse (Fettsäure) - 1 · Molmasse (OH) + Molmasse (Glycerin) - 1 · Molmasse (H)

$$= 1 \cdot 279,5 - 1 \cdot 17 + 92 - 1 \cdot 1 = \mathbf{353,5 \text{ g/mol}}$$

### Veresterung von 2-MG aus Leinöl mit Caprylsäure

Durch Säulenchromatographie gereinigte 2-MG (0,1 mmol; 0,035 g) wurden mit 0,3 mmol (0,0433 g) Caprylsäure versetzt. Durch Zusatz von 3,5 mg Lipase (10 % bezüglich Einwaage 2-MG), die zuvor auf eine Wasseraktivität von 0,43 eingestellt wurde, wurde die Reaktion gestartet. Das bei der Reaktion gebildete Wasser wurde durch Vakuum direkt aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Nach 24 h Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch in Hexan gelöst und von der Lipase abgetrennt. Die Isolierung der Triglyceride erfolgte wie unter Kap. 6.1.10.4.

### 6.1.12 Darstellung von strukturierten Triglyceriden aus Fischöl

Die Berechnung des Molekulargewichts erfolgte gaschromatographisch über die Fettsäurezusammensetzung der Fischöle.

#### Berechnung der Molekulargewichte der einzelnen Fischöle

**Tabelle 32** Berechnung des Molekulargewichts von Fischöl 1

Fettsäure	Molmasse FS [g/mol]	Fettsäurezusammensetzung [Mol%]	Massenanteil [g]
C 14:0	228,38	14,9	33,9
C 16:0	256,43	29,2	74,9
C 16:1	254,42	12,0	30,6
C 18:0	284,49	6,1	17,4
C 18:1	282,47	14,8	41,7
C 20:5	302,46	11,3	34,1
C 22:6	328,50	11,7	38,8
Summe			<b>271,4</b>

Mittelwert: 271,0 g/mol

Molmasse -OH: 17 g

Molmasse Glycerin: 92,0 g

#### Berechnungsformel

$$3 \cdot \text{Molmasse (Fettsäure)} - 3 \cdot \text{Molmasse (OH)} + \text{Molmasse (Glycerin)} - 3 \cdot \text{Molmasse (H)}$$

$$= 3 \cdot 271,4 - 3 \cdot 17 + 92 - 3 \cdot 1 = \mathbf{852,2 \text{ g/mol}}$$

**Tabelle 33** Berechnung des Molekulargewichts von Fischöl 2

Fettsäure	Molmasse FS [g/mol]	Fettsäurezusammensetzung [Mol%]	Massenanteil [g]
C 14:0	228,38	10,9	24,9
C 16:0	256,43	8,6	21,9
C 16:1	254,42	15,7	40,2
C 18:1	282,47	11,5	32,5
C 20:5	302,46	13,3	40,4
C 22:6	328,50	40,0	129,3
Summe			289,1

Molmasse -OH: 17 g

Molmasse Glycerin: 92.0 g

Berechnungsformel

$$3 \cdot \text{Molmasse (Fettsäure)} - 3 \cdot \text{Molmasse (OH)} + \text{Molmasse (Glycerin)} - 3 \cdot \text{Molmasse (H)}$$

$$= 3 \cdot 289.1 - 3 \cdot 17 + 92 - 3 \cdot 1 = \mathbf{905.4 \text{ g/mol}}$$

**Tabelle 34** Berechnung des Molekulargewichts von Fischöl 4

Fettsäure	Molmasse FS [g/mol]	Fettsäurezusammensetzung [Mol%]	Massenanteil [g]
C 14:0	228.38	1.43	3.27
C 16:1	254.42	36.68	93.32
C 18:1	282.47	6.29	17.77
C 20:5	302.46	51.4	155.46
C 22:6	328.50	4.18	13.73
Summe			283.55

Molmasse -OH: 17 g

Molmasse Glycerin: 92.0 g

Berechnungsformel

$$3 \cdot \text{Molmasse (Fettsäure)} - 3 \cdot \text{Molmasse (OH)} + \text{Molmasse (Glycerin)} - 3 \cdot \text{Molmasse (H)}$$

$$= 3 \cdot 283.55 - 3 \cdot 17 + 92 - 3 \cdot 1 = \mathbf{888.65 \text{ g/mol}}$$

### Alkoholyse der Fischöle

Zu 0,5 mmol Fischöl wurden 4.15 mmol (0,1912 g) Ethanol und 8,3 ml Aceton hinzugefügt. Zum Starten der Reaktion wurden 10 % RDL bezüglich der Einwaage an Fischöl immobilisiert auf EP 100 zugesetzt. Sowohl Aceton als auch die Lipase wurde durch gesättigte Salzlösungen auf eine Wasseraktivität von 0,94 äquilibriert. Nach vier Tagen wurde die Reaktion abgebrochen. Die Isolierung der 2-MG erfolgte wie unter 6.1.9 beschrieben. Die Reinheit der Produkte wurde gaschromatographisch (siehe 6.1.10.2) und mittels <sup>13</sup>C-NMR überprüft und das Molekulargewicht der 2-MG berechnet (Tab.)

### Molekulargewichte der Monoglyceride:

Monomyristin	302,5
Monopalmitolein	328,5
Monopalmitin	330,5
Monoolein	356,7
Monostearin	358,7

Mono-EPA	376,5
Mono-DHA	402,6
andere C22	406,6

**Tabelle 35** Berechnung der 2-MG-Fraktion von Fischöl 1

2-MG	2-Monoglyceridzusammensetzung [Mol %]	Massenanteil [g]
C 14 : 0	3,3	10,0
C 16 : 1	4,7	15,4
C 16/17	2,6	8,6
C 16 : 0	4,3	14,2
C 18: 1	6,8	7,8
C 18 : 0	5,6	20,1
EPA	18,0	67,8
DHA	50,7	204,1
Andere C 22	3,8	15,2
Ergebnis: Das Molekulargewicht beträgt 363,2 g/mol		

**Tabelle 36** Berechnung der 2-MG-Fraktion von Fischöl 2

2-MG	2-Monoglyceridzusammensetzung [Mol %]	Massenanteil [g]
C 14 : 0	0,84	2,42
C 16 : 1	1,0	3,29
C 16 : 0	1,9	6,28
C 18: 1	2,7	9,63
C 18 : 0	1,0	3,59
EPA	15,8	59,49
DHA	75,5	303,96
Andere C 22	1,3	5,29
Ergebnis: Das Molekulargewicht beträgt 394,0 g/mol		

**Tabelle 37** Berechnung der 2-MG-Fraktion von Fischöl 4

2-MG	2-Monoglyceridzusammensetzung [Mol %]	Massenanteil [g]
C 16 : 1	14,7	48,3
C 16 : 0	5,9	19,5
C 18: 1	8,9	31,8
C 18 : 0	5,0	17,9
EPA	65,5	246,6
Ergebnis: Das Molekulargewicht beträgt 364,1 g/mol		

### Veresterung der 2-MG aus Fischöl mit Caprylsäure

Die Veresterung der Fischöle wurde sowohl in Hexan, Aceton als auch in einem lösungsmittelfreien System durchgeführt. 0,1 mmol 2-MG aus Fischöl wurden mit 0,3 mmol Caprylsäure versetzt. Nach Zugabe von Lipozyme IM bzw. RDL immobilisiert auf eine Wasseraktivität von 0,11 oder 0,43 wurde die Reaktion gestartet. Nach mehreren Tagen Reaktionszeit wurde die Reaktion abgebrochen und die Isolierung der Produkte erfolgte nach 6.1.10.4.

### 6.1.13 Darstellung von Kakaobutteräquivalenten

#### Alkoholyse von Triolein

Die Alkoholyse wurde nach 6.1.10.1 mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Die Isolierung von 2-MO erfolgte durch Kristallisation in Hexan/MTBE (95:5). Nach circa einer Stunde bildeten sich bei -23°C weiße Kristalle aus 2-MO, die durch Zentrifugation (4 min bei 400 rpm bei 4°C) gewonnen wurden. Danach wurde der Überstand entfernt und die Kristalle erneut umkristallisiert, bis im Gaschromatograph nur noch ein 2-MO-Peak zu detektieren war.

#### Veresterung von 2-MO mit Palmitinsäure bzw. Stearinsäure

Die Veresterung wurde sowohl in Hexan als auch in einem lösungsmittelfreien System durchgeführt (Kap. 6.1.10.3). Abweichend von Kap. 6.1.10.3 wurde neben der Veresterung von 2-MO mit Fettsäuren auch die Veresterung mit den entsprechenden Ethylestern durchgeführt.

## **6.2 Molekulargenetische und mikrobiologische Techniken und Methoden**

### **6.2.1 Übernachtkultur für kompetente Zellen**

5 ml LB-Medium wurden mit einer DH5 $\alpha$ -Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **6.2.2 Herstellung von kompetenten Zellen (Chung et al., 1989)**

50 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtkultur angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) zwischen 0.4 und 0.7 (ca. 2-3 Std.). Anschließend wurde das Medium in ein 50 ml Falcontube überführt und 10 min bei 3000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das auf Eis gekühlte Pellet wurde in 2 ml TSS-Medium resuspendiert und in aliquote Portionen à 200  $\mu$ l auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 5 min auf Eis gestellt und durch Tauchen in flüssigen Stickstoff gefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung der kompetenten Zellen bei -70 °C.

### **6.2.3 Transformation in DH5 $\alpha$**

1  $\mu$ l Plasmidlösung wurde zu 200  $\mu$ l kompetenten Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin 20 min auf Eis gekühlt, bevor sie 30 – 45 s zur Aufnahme der Plasmide auf 42 °C erwärmt wurden. Anschließend wurden 800  $\mu$ l LB-Medium dazugegeben und 1h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen 7 s bei 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen resuspendiert und auf eine LB/Amp-Agarplatte ausplattiert. Die Kultivierung der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht.

Alternativ wurde der gesamte Ansatz in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht kultiviert. Daran anschließend folgte eine Midipräparation wie unter Kap. 6.2.4 beschrieben.

### **6.2.4 Plasmid Midipräparation mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit**

50 ml Übernachtkultur wurden in ein Falcontube überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 15 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll der Firma Qiagen für High Copy Plasmide mit einem entsprechenden Kit der Firma.

Das Pellet wurde in RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert, zur Zell-Lyse mit Puffer P2 versetzt und zur Neutralisation Puffer P3 hinzugefügt. Das weiße ausfallende Präzipitat wurde abzentrifugiert, der klare Überstand, der u.a. die Plasmid-DNA enthält, auf eine QIAprep Membransäule überführt. Mit Hilfe des Elutionspuffers QF wurde die DNA von der Säule eluiert. Zum Präzipitieren der DNA wurde zum Eluat 2-Propanol zugesetzt und für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in TE oder Tris-Puffer aufgenommen und bei -23°C gelagert. Der Erfolg der Plasmidpräparation wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 6.2.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese zu Analyse- und Präparationszwecken getrennt. Zur Trennung der Fragmente wurden 1%ige Gele verwendet, die 0,01% Ethidiumbromid enthalten. Der Zusatz von Ethidiumbromid ermöglicht die Sichtbarmachung der DNA-Banden, da Ethidiumbromid, wenn es in doppelsträngiger DNA interkaliert, im UV-Licht intensiv fluoresziert. Die Größe von einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekülen wurde durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard bestimmt (1 Kb-DNA-Ladder). Zum Auftragen wurden die DNA-Proben mit einem Glycerin-haltigen Puffer versetzt, der sie besser in die Probenaschen hineinsinken ließ. Der im Puffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau wanderte ebenfalls im elektrischen Feld und ermöglichte es, den Verlauf der Elektrophorese verfolgen zu können.

30 ml 1%ige Agarose-Lösung wurden mit 3 µl Ethidiumbromid vermischt und auf einen Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Nach 20 Minuten war das Gel erstarrt und der Probenaschenkamm konnte entfernt werden. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einem Drittel des Volumens mit DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Probenaschen eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V für 40 min. Die DNA-Banden im Gel wurden auf einem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und photographisch dokumentiert.

### 6.2.6 Quik-change zur Durchführung einer ortsspezifischen Mutagenese

#### PCR für Quik-change

Pipettierschema:	10 µl	10 x <i>Pfu</i> (Puffer)
	2 µl	DNA aus Midipräp. (1:10 verd.)
	2,5 µl	Primer 1 (5 pmol/µl)
	2,5 µl	Primer 2 (5 pmol/µl)

2 $\mu$ l	dNTP-Mix (2,5 mM jedes Nucleotid)
82 $\mu$ l	Wasser
3 $\mu$ l	<i>Pfu</i> Polymerase

Reaktionsprogramm für die PCR:	4 min	95 °C	
	1 min	95 °C	} 20 x
	1,5 min	54 °C	
	16 min	72 °C	
	1 min	95 °C	
	1,5 min	54 °C	
	20 min	72 °C	
		4 °C	

Zur Überprüfung der PCR wurden 10  $\mu$ l Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei 7,5 kbp ist auf dem Agarosegel eine deutliche Bande zu erkennen, die der Größe des pYes + Lip 1-Vektors entspricht. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit 2  $\mu$ l *DpnI* 3 h verdaut. Die Transformation erfolgte mit XL2-Blue superkompetenten Zellen.

### 6.2.7 Transformation mit *Epicurian coli* superkompetenten Zellen

Die superkompetenten Zellen müssen auf Eis gelagert werden. 100  $\mu$ l der superkompetenten Zellen wurden in ein eisgekühltes Falcontube pipettiert. Dann wurden 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde alle zwei min geschüttelt. Danach wurden 20  $\mu$ l DNA zu den Zellen pipettiert, leicht geschüttelt und 30 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurde LB-Medium auf 42 °C erwärmt. Die eisgekühlten Zellen wurden 30 sec bei 42 °C geschockt und dann für zwei min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 0,9 ml erwärmtes LB-Medium hinzugefügt und für eine Stunde unter Schütteln (225-250 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und auf eine LB/Amp-Agarplatte ausplattiert. 12 Kolonien sind über Nacht gewachsen.

### 6.2.8 Übernachtkultur für *E. coli*

5 ml LB-Medium mit 5  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) wurden mit einer *E. coli* Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### 6.2.9 Hauptkultur für *E. coli*

50 ml LB-Medium mit 50 µl Ampicillin (100 mg/ml) wurden mit 100 µl Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler kultiviert.

### 6.2.10 Plasmid Flexipräparation

1,5 ml Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 s) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert, zur Zell-Lyse mit Puffer P2 versetzt und zur Neutralisation Puffer P3 hinzugefügt. Das weiße ausfallende Präzipitat wurde abzentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zum Fällen der DNA mit Isopropanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (14000rpm, 10 min) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet (56 °C, 15 min). Abschließend wurde das Pellet in 30 µl TE-Puffer gelöst und bei -23 °C gelagert.

### 6.2.11 Verdau mit *Bgl*

Pipettierschema:	10 µl	DNA aus Flexipräparation
	2 µl	Puffer H
	0,5 µl	<i>Bgl</i>
	7,5 µl	H <sub>2</sub> O

Der Verdau wird bei 37 °C 1,5 h inkubiert und durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 6.2.12 Verdau mit *Bgl* und *Bam*HI

Pipettierschema:	20 µl	DNA aus Midipräparation (pY-mut-slip1)
	10 µl	Puffer 2
	2 µl	<i>Bgl</i>
	3 µl	<i>Bam</i> HI
	1 µl	BSA
	<u>64 µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>
	100 µl	

Dieser Verdau lieferte einen korrekten Vektor, bei dem durch ortsspezifische Mutagenese eine zusätzliche *Bgl* Schnittstelle entfernt wurde.

### 6.2.13 Error prone PCR

Pipettierschema:	2 µl	DNA aus Midipräparation (pY-p-slip1)(Verd. 1:500)
	1 µl	Primer 1 (50 pmol/µl)
	1 µl	Primer 2 (50 pmol/µl)
	8 µl	dNTP Mix
	10 µl	<i>Taq</i> Puffer
	8 µl	MgCl <sub>2</sub>
	66 µl	H <sub>2</sub> O
	<u>4 µl</u>	<u><i>Taq</i>-Polymerase</u>
	100 µl	

Reaktionsprogramm für die error-prone PCR:	4 min	95 °C	
	1,5 min	95 °C	} 25 x
	1,5 min	50 °C	
	1,5 min	72 °C	
		4°C	

Die error-prone PCR wurde in einem Eppendorfcycler durchgeführt, was das Arbeiten ohne Immersionsöl ermöglichte.

### 6.2.14 Agarosegel-Extraktion

Die durch den Verdau mit *Bam*HI und *Bgl*I erhaltenen unterschiedlichen DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen gemäß dem mitgelieferten Standardprotokoll. Der Gelstreifen wurde mit drei Äquivalenten (v/w) Solubilisierungspuffer QB versetzt und 5 bis 10 min bei 50 °C in einem Thermoschüttler erwärmt, bis das Gel vollständig gelöst war. Die Lösung wurde auf eine Qiaprep Membransäule gegeben und zentrifugiert (14000 rpm, 1 min), das Filtrat verworfen. Gewaschen wurde mit der Puffer/Ethanol-Mischung PE und anschließend die Pufferreste durch Zentrifugation (14000 rpm, 1min) entfernt. Die Elution erfolgte mit 30 bis 50 µl Wasser durch Zentrifugation.

### 6.2.15 Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

#### Prinzip

Für die Transformation wurde der Hefestamm WCG 4 verwendet. Dieser *S. cerevisiae* Stamm erlaubt die Selektion von Plasmiden mit *HIS*, *LEU*, *URA*-Genen. Als Vektor diente der pYes-Vektor von Invitrogen. Der pYes-Vektor ist ein hocheffizienter Hefeexpressionsvektor mit einem GAL1-Promotor. Der GAL1-Promotor enthält die Sequenzen, die er zur Regelung der Transskriptionseinleitung braucht. In *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämmen wird die Transkription des GAL1-Promotors durch Anwesenheit von Glucose unterdrückt. Bei Zugabe von Galactose anstatt von Glucose als C-Quelle wird die Transkription induziert. Zur Selektion enthält der Vektor unter anderem des *URA3*-Gen und das Ampicillin-Gen.

Vier verschiedene Transformationsprotokolle wurden untersucht:

- 1 Transformation in Hefe mit Lithiumacetat und DMSO (Hilt et al., 1991)
- 2 Elektrotransformation in Hefe
- 3 *Saccharomyces cerevisiae* Easy-comp Transformation-Kit von Invitrogen
- 4 Transformation in Hefe mit Lithiumacetat (Gietz et al., 1996)

Zunächst wurde eine Übernachtkultur aus 5 ml YEPD-Medium und 10 µl Hefekultur bei 30 °C hergestellt. Aus dieser Übernachtkultur wurde eine Hauptkultur bestehend aus 50 ml YEPD-Medium, angeimpft mit 20 µl Übernachtkultur, kultiviert. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei Hefen bei 30 °C. Die Wachstumsdichte der Zellen sollte zwischen einer OD von 1-2 liegen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei 600 nm. Anschließend wurden 50 ml der Hauptkultur in ein Falcontube gegeben und 5 min bei 3600 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zuerst mit 50 ml sterilem Wasser, dann mit 5 ml sterilem Wasser gewaschen (jeweils Zentrifugation bei 3600 rpm, 5 min). Pro ursprünglich 10 ml Hauptkultur wurden zum Resuspendieren des Pellets 50 µl TE/LiAC-Lösung dazugegeben und 50 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäß aliquotiert.

**Tabelle 38** Pipettierschema für Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Negativkontrolle	Negativkontrolle	Aliquot 1	Aliquot 2	Aliquot 3
kein Vektor	kein Vektor	1 µl Vektor (Verd. 1:10)	2 µl Vektor (Verd. 1:10)	1 µl Vektor (Verd. 1:10)
kein Insert	kein Insert	5 µl Insert	10 µl Insert	5 µl Insert
3µl	3µl	3 µl	3µl	3µl
Heringssperma, gekocht	Heringssperma, nicht gekocht	Heringssperma, gekocht	Heringssperma, gekocht	Heringssperma, nicht gekocht

Zu jeder Probe wurden 300 µl PEG/TE/LiAc-Lösung zugegeben und gemischt (nicht vortexen!). Anschließend wurden die Proben zunächst 30 min bei 30 °C inkubiert, dann 20 min bei 42 °C unter leichtem Schütteln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben 7-8 s bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Transformanden wurden auf YNBaa-Platten ausplattiert und drei Tage bei 30 °C inkubiert.

### 6.2.16 Glycerinstock

Zur längerfristigen Lagerung wurden die bei der Transformation in *Saccharomyces* erhaltenen Mutanten einzeln in Mikrotiterplatten überführt. Pro Well wurden 100 µl Medium vorgelegt und nach einer Wachstumszeit von drei Tagen 100 µl einer sterilen Glycerin/Wasser-Mischung dazugegeben und sofort bei –80 °C eingefroren.

### 6.2.17 Tributyrinplatten-Assay

10 ml Tributyrin wurden mit 800 ml Wasser versetzt und mittels Ultraturrax 10 min emulgiert. Anschließend wurden 14 g Agar hinzugefügt und autoklaviert. Zur Vervollständigung des Mediums wurden 100 ml autoklavierte Galactose und 100 ml sterilfiltrierte YNB-Lösung hinzugefügt. Die Agarlösung wurde in Petrischalen gegossen und nach dem Erhitzen wurden Transformanden aus der Mikrotiterplatte auf die Tributyrinplatte gegeben. Eine nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C auftretende Hofbildung zeigte die Aktivität der Mutanten an.

### 6.2.18 *p*-Nitrophenylester –Assay in Mikrotiterplatten

Um die große Anzahl an Mutanten schnell und aussagekräftig auf verschiedene Eigenschaften zu überprüfen ist ein effektives Assaysystem notwendig. Zur Durchführung des Assays wurde zuerst die Glycerinkultur der Mutantenbibliothek in Nährmedium repliziert. Dazu wurde die Replikplatte zunächst unter Zuhilfenahme eines Biomek 2000 Roboters mit Nährmedium gefüllt. Dann erfolgte die Replizierung durch Eintauchen eines in Ethanol sterilisierten Stempels in die Glycerinkultur und anschließendem Übertragen in die Nährmediumplatte. Die Kultivierung erfolgte 2-3 Tage bei 30°C im Schüttler

Der *p*-Nitrophenylester-Assay wird in einer neuen Mikrotiterplatte durchgeführt, die 120 µl Pufferlösung und 10 µl *p*-Nitrophenylester enthält. Durch Zugabe von 20 µl Zellüberstand wurde die Reaktion gestartet und das dabei freigesetzte *p*-Nitrophenol sofort und nach definierter Inkubationszeit photometrisch bei 410 nm detektiert.

Durch die Lipaseaktivität wird die Esterbindung der wasserunlöslichen *p*-Nitrophenylester gespalten. Das entstehende *p*-Nitrophenol weist eine Gelbfärbung auf und kann bei 410 nm photometrisch detektiert werden.

### Lösung A

0,2 mmol *p*-Nitrophenylester werden in 40 ml *n*-Propanol durch 5-10 min Ultraschallbehandlung gelöst. Diese Lösung wird bei 4°C gelagert. Vor jedem Gebrauch muß der *p*-Nitrophenylester erneut durch Ultraschallbehandlung gelöst werden.

Konzentration der Lösung: 5 mM

### Lösung B

1 g Triton X-100 und 0,2 g Gummi arabicum werden in 200 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 gelöst

### Lösung C

Lösung C wird unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und ist ca. 2 Stunden bei RT unter ständigem Rühren verwendbar. Zu 9 Teilen der Lösung B wird 1 Teil der Lösung A tropfenweise unter ständigem Rühren zugegeben.

Nach Inkubation (20 min oder 2 h) bei 30°C wird die Absorption erneut gemessen und aus der Differenz mit der Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die spezifische Enzymaktivität in U ( $\mu\text{mol}$  umgesetzt/ Substrat/min) bestimmt. Dazu wurde die Änderung der Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$\Delta c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} = \frac{\Delta E}{14500 \cdot 0,5} \cdot \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Die Konzentrationsänderung wurde dann noch auf den Reaktionsansatz von 150  $\mu\text{l}$  umgerechnet, durch die Inkubationszeit geteilt und auf die eingesetzte Probemenge bezogen.

## 6.2.19 Plasmid-DNA-Isolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden drei verschiedene Protokolle getestet.

**Plasmid-DNA-Isolierung nach Prof. Wolf (Biochemie, Uni Stuttgart)**

1,5 ml Medium einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 20 s bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 200 µl Lysepuffer resuspendiert, 200 mg Glasperlen, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt und durch 2 minütiges Vortexen die Zellen aufgebrochen. Nach 5 min Zentrifugieren bei 12000 rpm wurden 100 µl des wässrigen Überstands in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt. Anschließend wurden zur DNA-Fällung 280 µl 100% Ethanol zugegeben und 5 min bei -80°C inkubiert. Danach wurde bei 12000 rpm zentrifugiert, die Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen (2 min zentrifugieren). Zum Abschluß wird das Pellet bei 56°C 10 min getrocknet und in 25 TE resuspendiert.

**Plasmid-DNA-Isolierung nach Vorschrift der Technischen Uni Berlin**

Der das Plasmid tragende Hefeklon wurde in 1,5 ml YEPD-Medium drei Tage bei 30°C kultiviert. Nach 5 min Zentrifugieren bei 12000rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer, 200 µl Phenol-Chloroform und 300 mg Glasperlen hinzugefügt und 2 min gevortext. Nach 5 min Zentrifugieren wurde die wässrige, obere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und ohne weitere DNA-Aufreinigung direkt zur Transformation in *E. coli* eingesetzt.

**Plasmid-DNA-Isolierung nach Biotechnology Handbook**

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 20 s bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Lyse-Puffer resuspendiert mit 100 µl Phenol-Chloroform und 200 mg Glasperlen versetzt und für 3 min gevortext. Nach 1 min zentrifugieren wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt mit 500 µl eisgekühltem Ethanol versetzt, gevortext und 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet im Stickstoffstrom getrocknet und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

**6.2.20 Plasmid Minipräparation mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit**

50 ml Hauptkultur wurden in ein 50 ml Falcontube überführt und die Zellen durch zehnminütiges Zentrifugieren pelletiert. Die weitere Aufarbeitung des Zellpellets erfolgte gemäß Standardprotokoll von QIAGEN für High Copy Plasmide (QIAprep Miniprep Handbuch 1998)

Das Pellet wurde zur alkalischen Zell-Lyse in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 versetzt und vorsichtig gemischt. Nach spätestens 5 min wurde die alkalische Lyse

durch Neutralisation mit 350 µl Puffer N3 gestoppt. Das weiße Präzipitat wurde abzentrifugiert (10 min) und der klare, die Vektor-DNA enthaltende Überstand, auf QIAprep spin Säulen überführt. Die Adsorption der Vektor-DNA an die QIAprep Membran erfolgt in Gegenwart einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen durch Wasserentzug. Der Durchlauf nach 1minütiger Zentrifugation wurde verworfen, die Membran zur Entfernung verbliebener Salze mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und nochmals für 1 min zentrifugiert. Durch Aufgabe von 50 µl Puffer EB auf die Mitte der Säule, einminütiges Einwirken bei Raumtemperatur und nachfolgender Zentrifugation für 1 min wurde die Plasmid-DNA unter Niedrigsalzbedingungen von der Säule in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert und bei -23°C gelagert.

### 6.2.21 DNA-Sequenzierung

#### Prinzip

Die Sequenzierung von DNA erfolgt nach der von Fred Sanger 1977 entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Dabei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Replikation mittels spezifischer Terminatoren (2', 3'-Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden, erzeugt. Da die ddNTPs an ihrer 3'-Position keine OH-Gruppe besitzen, kann ein entstehendes DNA-Fragment nach dem statistischen Einbau dieses Terminators nicht mehr durch Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'-Desoxynukleotid verlängert werden und es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden vier separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte dNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann von der Sequenzleiter direkt die DNA-Sequenz abgelesen werden. Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem DNA-Sequenzier von Perkin Elmer werden die vier dNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch zwei Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 nm und 514 nm angeregt und zusammen in einer Spur des Gels aufgetragen werden. Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während de Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt. Die Verwendung thermostabiler Polymerasen erlaubt die zur PCR analoge zyklische Sequenzierung, bei der die enzymatischen Sequenzreaktionen mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt werden, was geringere Mengen Ausgangs-DNA erfordert, die Automatisierung vereinfacht und die Sequenzierung doppelsträngiger DNA ermöglicht.

### Gießen des Polyacrylamid-Gels

Um die exakte Erfassung der Fluoreszenzsignale während des Gellaufs zu gewährleisten, werden die Glasplatten vor dem Gießen des Gels möglichst gründlich mit dem Detergenz Alkanos und Wasser gereinigt und danach mit Isopropanol poliert. Nach Zugabe von APS und TEMED wird die Lösung rasch zwischen die durch Abstandhalter (Spacer) getrennten Glasplatten gegossen, der Vorkamm eingesetzt und die Platten mit Klammern während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend werden die Klammern entfernt, der Vorkamm durch einen Haifisch-Kamm ersetzt und das Gel in den Sequenzer eingebaut. Nach Kontrolle des Basissignals erfolgt ein einstündiger Vorlauf.

### PCR für Sequenzierung

Pipettierschema:    4 µl    dye  
                           5 µl    Primer 1pmol/µl  
                           6 µl    DNA  
                           5 µl    H<sub>2</sub>O

Reaktionsprogramm für die PCR:    Denaturierung:    1 min    96°C  
     Denaturierung:    40 s    95°C    }    25 x  
     Annealing:        40 s    55°C    }

Nach der PCR-Reaktion wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zum Reaktionsansatz wurden 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl 100% Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde 20 min inkubiert und 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und nach vollständigem Entfernen des Überstands getrocknet.

Folgende sechs Klone wurden sequenziert:

MN17 E2, MN17 B11, MN18 A3, MN18 H3, MN9 F3, MN9 E4, slip1 E1, slip1 C2

MN    Replikaplatte gefüllt mit Nährmedium

Zahl    gibt die Nummer von Mikrotiterplatte an, die Glycerinkultur enthält

Buchstaben/Zahlenkombination    Well auf der Mikrotiterplatte

### **6.2.22 Kultivierung von Hefeklonen im 2l Maßstab**

Bevor die Klone im 2l-Maßstab kultiviert wurden, wurde eine Vorkultur (20 ml) angelegt und die Aktivität des Überstands gegen *p*-Nitrophenylbutyrat gemessen. Dazu wurden 100 µl Pufferlösung und 10 µl *p*-Nitrophenylbutyrat pro Well einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach

Addition von 20 µl Lipaseüberstand wurde die Aktivität sofort und nach 20 min Reaktionszeit bei 410 nm gemessen.

Die 2 l Erlenmeyerkolben wurden mit 200 ml Glucose-Medium versetzt und mit einer Hefevorkultur beimpft. Die Zellen wurden 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Induktion der Lipaseexpression durch Zusatz von Galactose-Medium. Nach drei Tagen Kultivierungen wurden optische Dichte und pH-Wert kontrolliert. Bei einem konstanten OD-Wert wurde die Kultivierung abgebrochen, die Zellen abzentrifugiert und bei -23°C gelagert.

### **6.2.23 Konzentrierung der Lipase durch Ultrazentrifugation**

Zur Konzentrierung der Lipasen wurden für die slip-Lipase ein 30 kDa und für die Lipasen von MN18H3 und MN17B11 ein 10 kDa-Filter verwendet. Zunächst wurden die Filter mit destilliertem Wasser zweimal gewaschen. Anschließend wurde der die Lipase enthaltende Überstand mit einem Druck von 4,7 bar bis 5 ml ultrafiltriert. Nach der Ultrazentrifugation wurde sowohl das Filtrat als auch das Konzentrat auf seine Aktivität überprüft. Das Konzentrat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bis zur Untersuchung bei -23°C tiefgefroren.

Nach Reinigung der Filter mit destilliertem Wasser, wurden sie in 1 %iger Natronlauge gelagert.

### **6.2.24 SDS-Polyamidacrylgelelektrophorese**

#### **Prinzip**

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativen Maßstab ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren des Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des Proteins, der Porengröße des Gels, der Ladung und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert.

#### **Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese**

Zunächst wurde zwischen die beiden gründlich gereinigten, durch Abstandhalter getrennten, zusammengeklammerten Glasplatten luftblasenfrei die Trennlösung bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit ca. 200 µl Isobutanol überschichtet. nach Polymerisation des

Trenngels (20 min bei RT) wird das Isobutanol abgegossen, die Sammelgellösung auf das mit dH<sub>2</sub>O gespülte Trenngel gegossen und der Probentaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probentaschen gründlich mit dH<sub>2</sub>O gespült. Das so vorbereitete Gel wird zur Durchführung der Elektrophorese in die bereits mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass am unteren Gelrand keine Luftblasen zwischen den Glasplatten eingeschlossen werden.

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Als Molekulargewichtsstandard werden 5 - 10 µl LMW-Standard (siehe Tabelle) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgt bei 25 mA pro Gel bis die blaue Bande das Ende des Gels erreicht hat, bzw. bereits aus dem Gel in den Elektrophoresepuffer gewandert ist. Die Dauer der Elektrophorese kann in Abhängigkeit der zu trennenden Proteine variiert werden. Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Gel gefärbt.

### **Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen**

Nach beendeter Elektrophorese werden die Glasplatten und der Abstandhalter entfernt, das Gel mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mindestens so lange in der Entfärbelösung entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind bzw. das Gel klar ist. zur Aufbewahrung wird das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und 2 h im Geltrockner bei 80°C getrocknet.

**Tabelle 39**

Marker	Protein	Molekulargewicht (kDa)
Low	Phosphorylase B	97,4
	BSA	66,3
	Ovalbumin	45,0
	Carboanhydrase	31,0
	Trypsininhibitor	21,5
	Lysozym	14,1

### **6.2.25 Kompetitiver Assay zur Bestimmung der Kettenlängenselektivität der Mutanten**

Zunächst wurde eine Emulsion aus 1 g "random oil", 1 g Gummi arabicum und 20 ml Wasser durch Mischen im Utraturrax (5 min) hergestellt. 20 ml dieser Lösung wurden in das Reaktionsgefäß einer pH-Stat-Apparatur gegeben, 470 µl Calciumchloridlösung hinzugefügt

und den pH-Wert mit 0,1 N Natronlauge auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurden 500 µl bzw. 1 ml konzentrierte Lipaselösung (6.2.24) zugegeben. Die freigesetzten Fettsäuren wurden mit 0,1 N Natronlauge bis zu einer Hydrolyse von ca. 10 - 15 % bei einer Temperatur von 30°C titriert, was einem Verbrauch von 4 - 6 ml Natronlauge entspricht.

Für den Blindwert wurden ebenfalls 20 ml Emulsion auf einen pH-Wert von 7,2 titriert. Dann wurde die Lösung in ein Schraubdeckelglas gegeben und in einem Inkubator bei 30°C so lange geschüttelt, wie die Probe zur Hydrolyse benötigt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz ebenfalls in ein pH-Stat Reaktionsgefäß gegeben, um die Menge an frei gewordenen Fettsäuren zu titrieren.

Sowohl von Probe als auch Blindprobe wurden zur Weiteruntersuchung 2 ml Reaktionslösung abpipettiert und mit 200 µl 85 %iger Phosphorsäure zum Ansäuern der Fettsäuren versetzt. Dann wurden die Fettsäuren mit 1 ml einer Mischung aus Hexan und Diethylether (1:1) dreimal ausgeschüttelt, die Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Untersuchung der Fraktionen erfolgt gaschromatographisch entweder durch Silylierung (6.1.10.2) oder durch Methylierung der freien Fettsäuren (6.1.5) unter Verwendung von folgendem Temperaturprogramm:

100°C	2 min
230°C	6°C/min
360°C	12°C/min
360°C	5 min
Injektor	370°C
Detektor	360°C

Die Berechnung der einzelnen Fettsäuren erfolgte über Responsefaktoren (Tab.). Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des "random oils" wurde Ölsäure als 1 angenommen und die Faktoren für die übrigen Fettsäuren berechnet und mit dem erhaltenen Flächenwert multipliziert (Tab.)

**Tabelle 40** Zusammenstellung von Zusammensetzung und Berechnungsfaktoren des "random oils"

Fettsäure	Gewichts%	Mol%	Molgewicht FSME [g/mol]	Molgewicht Säure [g/mol]	Faktor TMSHFBA	Faktor Standard
C 8:0	8.3	13.2	156.24	144.22	0.82	1.24
C 10:0	6.6	8.9	186.3	172.27	0.78	1.84
C 12:0	13.2	15.6	214.35	200.32	0.83	1.05
C 14:0	5.3	5.5	242.41	228.38	0.82	2.98
C 16:0	13.8	12.9	270.46	256.42	0.78	1.27
C 18:0	12.7	10.8	298.51	284.49	1	1.52
C 18:1	19.3	16.4	296.5	282.47	0.95	1
C 18:2	17.1	14.6	294.48	280.45	0.99	1.12

## 6.3 Chemische Synthesen

### 6.3.1 Synthese von *p*-Nitrophenyldocosanat

3 mmol (1,0218 g) Behensäure wurden zu 150 ml Dichlormethan (p.a.) gegeben. Anschließend wurden 3.3 mmol (0,6326 g) *N*-Ethyl-*N*-[3-(Dimethylamin)propyl]carbodiimid und 0,3 mmol (0,0445g) 4-Pyrrolidino-Pyridin dazugegeben. Zuletzt wurden 3 mmol (0,4173g) *p*-Nitrophenol hinzugefügt und zunächst bei 0°C 15 min gerührt, dann 18 Std. bei RT. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit gesättigter NaCl gewaschen und die organische Phase über wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde die Probe auf eine Kieselgelsäule (70 g) überführt und mit reinem Chloroform eluiert. Das Produkt wurde als weißer, kristalliner Feststoff isoliert (0.7403g) (Ausbeute 59 %).

#### NMR-Daten:

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ [ppm] = 14.14, 22.71, 24.75, 29.07, 29.24, 29.45, 29.60, 29.67, 29.70 (2 C-Atome), 29.73 (8 C-Atome), 31.95, 34.34, 122.44, 125.19, 145,25, 155.54, 171.31 (COO).

### 6.3.2 Synthese von *p*-Nitrophenyleicosapentanoat

Dieser *p*-Nitrophenylester wurde aus Fettsäuren, die durch Hydrolyse von Fischöl erhalten wurden, synthetisiert. Die Zusammensetzung dieser freien Fettsäuren besteht zu 37% aus EPA und zu 17% aus Palmitoleinsäure. Der Rest ist eine Mischung verschiedenster Fettsäuren. Der so synthetisierte Ester besteht gemäß NMR-Spektroskopie zu ca. 50% aus *p*-Nitrophenyleicosapentanoat.

Die Synthese erfolgte wie unter 6.3.1 (Ausbeute 55 %).

**NMR-Daten:** gleiche Signale wie unter 6.3.1 + zusätzlich zwei Signalsätze für die Nebenverbindungen.

## 6.4 Materialien

### 6.4.1 Lipasen

Lipase von	Regiospezifität	Anbieter	Form
Aspergillus niger	1,3-regiospezifisch	Amano, Japan	Pulver
Candida rugosa	unspezifisch	Amano, Japan	Pulver
Hog Pankreas Lipase	1,3-regiospezifisch	Fluka, Buchs, Schweiz	Pulver
Penicillium roquefortii	1,3-regiospezifisch	Amano, Japan	Pulver
Pseudomonas sp.	1,3-regiospezifisch	Amano, Japan	Pulver
Rhizomucor miehei	1,3-regiospezifisch	Boehringer, Mannheim	Pulver
Rhizopus delemar	1,3-regiospezifisch	Amano, Japan	Pulver
Rhizopus javanicus	1,3-regiospezifisch	Fluka, Buchs, Schweiz	Pulver
Rhizopus niveus	1,3-regiospezifisch	Fluka, Buchs, Schweiz	Pulver
Rhizopus oryzae	1,3-regiospezifisch	ITB	Pulver

### 6.4.2 Chemikalien

Chemikalien	Herkunft
Aceton	Baker
Acetonitril	Fisher Scientific International Company
Agar	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Aluminiumoxid 90 activ, neutral	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Benzophenon	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Borsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Buttersäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Buttersäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Capronsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Capronsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Caprylsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Caprylsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Caprinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Caprinsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Celite 545	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Cersulfat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Chloroform	Fisher Scientific International Company

---

Dichlormethan	Fisher Scientific International Company
Diethylether	Riedel de Haen
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Dipalmitin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Essigsäure	Riedel de Haen
EP 100	Akzo
Ethanol absolut	Riedel de Haen
Ethylmagnesiumchlorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethylmethylketon	Fisher Scientific International Company
Fischöl I, II, III, IV	Loders Croklaan, Wormerveer, Niederlande
Geextraktions-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Gummi arabicum	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
<i>n</i> -Hexan	Fisher Scientific International Company
Kaliumcarbonat, wasserfrei	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumsulfat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kieselgel 60	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kieselgel 60, RP 18	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Laurinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Laurinsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Leinöl	Neuköllner Reformwaren
Linolensäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Linolensäuremethylester	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Linolsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Linolsäuremethylester	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lithiumchloride, wasserfrei	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid, wasserfrei	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Magnesiumnitrat Hexahydrat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Methanol	Fisher Scientific International Company
Midi-Plasmid-Präparations-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
1-Monopalmitin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MTBE	Fisher Scientific International Company
Myristinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Myristinsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

---

---

Natrium	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumsulfat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
<i>p</i> -Nitrophenylester	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ölsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ölsäureethylester	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ölsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Olivenöl	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Palmitinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Palmitinsäureethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Palmitinsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Petrolether	Riederl de Haen
Pfu-Polymerase	Stratagene
Pfu-Polymerase Puffer	Stratagene
Polyethylenglykol 6000	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Phosphormolybdänsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Primer für PCR	ARK Scientefic Biosystems, Düsseldorf
Sauerstoff	Messer, Kornwestheim
SDS	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Spin-prep Mini-Plasmid Präparations-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Stearinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Stearinsäureethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Stearinsäuremethylester	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Stickstoff, flüssig	Messer, Kornwestheim
Tributyrin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Triolein	TCI, Japan
Tripalmitin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Triton X - 100	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Trypton	DIFCO-Laboratories, Detroit, USA

---

### **6.4.3 Medien, Puffer und Lösungen**

Soweit nicht anders vermerkt, können alle Medien, Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### **Für Biotransformation und chemische Synthesen**

##### **Reagenz zur Bestimmung der gebundenen Fettsäuren**

2 M Natriummethanolat in Methanol

4,6 g Natrium in kleine Stücke schneiden und vorsichtig zu 100 ml wasserfreiem Methanol hinzufügen

##### **Reagenz zur Bestimmung der freien Fettsäuren**

20% HCl in Methanol

Zu 80 g wasserfreiem Methanol werden 20 g Chlorwasserstoffgas eingeleitet

##### **Reagentien zur regiospezifischen Analyse von Triglyceriden mit Pankreaslipase**

1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0

0,1%ige (w/v) Natriumcholatlösung

22%ige (w/v) Calciumchloridlösung

6 M Salzsäure

##### **DC-Tauchreagen**

25 g Molybdänphosphorsäure, 10 g Cer (IV)-sulfat, 80 ml konz. Schwefelsäure, mit Wasser auf einen Liter auffüllen

##### **Fließmittelgemisch zur DC-Entwicklung**

*n*-Hexan/Diethylether/Essigsäure im Verhältnis: 70: 30 : 1

## Für mikrobiologische und molekulargenetische Techniken

### Medien für *E. coli*

Luria-Bertani Flüssigkeitsmedium (LB)

1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, autoklaviert

Luria-Bertani/Ampicillin Flüssigmedium (LB/AMP)

100 µg/ml Ampicillin in autoklaviertes LB-Flüssigmedium zusetzen

Ampicillinstammlösung

100 mg/ml Ampicillin, Lagerung bei -18 °C

Luria-Bertani/Ampicillin Agarplatten

1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 1,7 (w/v) Agar, autoklaviert, anschließend 100 µg Ampicillin/ml zu autoklaviertem LB-Flüssigmedium hinzufügen

### Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YEPD-Flüssigmedium

2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, autoklaviert  
wichtig: Glucosestammlösung: 20% (w/v) extra autoklavieren

### Flüssigmedium für Mikrotiterplatten

YNB: 6,7% (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,05% (w/v) Histidin, 0,05% (w/v) Leucin, sterilfiltriert

20% (m/v) Galactose, autoklaviert

Puffer: Phosphatpuffer 0,1 M, pH 6

Konzentration für 1 M Puffer: 132 g 1 M  $K_2HPO_4$  + 868 ml 1 M  $KH_2PO_4$ , verdünnen, autoklaviert

Caseinhydrolysat: 0,2% (w/v), autoklaviert

Medium: 100 ml YNB, 100 ml Galactose, 100 ml Puffer, 500 ml Caseinhydrolysat, 200 ml Wasser

wichtig: YNB erst zum Medium dazugeben, wenn die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt ist

**Medium für Agarplatten nach der Transformation**

YNB: 6,7 (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,05% (w/v) Histidin, 0,05% (w/v) Leucin, sterilfiltriert

Agar: 1,5% (w/v), autoklaviert

Glucose: 20% (w/v), autoklaviert

Medium: 800 ml Agarlösung, 100 ml Glucose, 100 ml YNB

wichtig: YNB erst zur Agarlösung dazugeben, wenn diese auf ca. 50°C abgekühlt ist, in Petrischalen erhärten lassen und bei 4°C lagern

**Medium für Tributyrinplatten nach der Transformation**

YNB: 6,7 (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,05% (w/v) Histidin, 0,05% (w/v) Leucin, sterilfiltriert

Agar: 1,5% (w/v), 1% (v/v) Tributyrin, zuvor mit Ultraturax homogenisiert, autoklaviert

Galactose: 20% (m/v), autoklaviert

Medium: 800 ml Agarlösung + Tributyrin, 100 ml Glucose, 100 ml YNB

wichtig: YNB erst zur Agarlösung dazugeben, wenn diese auf ca. 50°C abgekühlt ist, in Petrischalen erhärten lassen und bei 4°C lagern

**Lösungen für Transformation in *E. coli*****TSS-Lösung**

10% (w/v) PEG 6000, 5% (w/v) DMSO, 50 mM Magnesiumchlorid in LB-Medium, autoklaviert, Lagerung bei 4°C

**Lösungen für Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*****LiAc-Lösung**

1 M LiAc-Lösung, pH 7,5, sterilfiltriert

**TE-Lösung**

100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5, sterilfiltriert

50% (w/v) Polyethylenglykol 4000, sterilfiltriert

Lösungen erst frisch vor Gebrauch mischen:

TE/LiAc-Lösung: 1 VT TE + 1 VT LiAc + 8 VT sterilen Wasser

PEG/TE/LiAc-Lösung: 8 VT PEG + 1 VT TE + 1 VT LiAc

**Error-prone PCR**

dNTP-Mix

Endkonzentration der nicht limitierten dNTPs: je 2,5 mM; des limitierten dNTP: 25  $\mu$ M,  
Lagerung bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

**Puffer und Lösungen für Agarose-Gel-Elektrophorese**

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris-Base, 57 ml 100% Essigsäure, 0,5 M EDTA (pH 8), mit Wasser auf 1 l

DNA-Auftragspuffer

30% (w/v) Glycerin, 25 mM EDTA, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 7,5

1%ige Agarose-Lösung

4 g Agarose, 400 ml TAE-Puffer, lösen durch Aufkochen im Mikrowellenherd,  
Aufbewahrung bei  $80^{\circ}\text{C}$

1kb-Ladder (Biorad)

25  $\mu$ l Stammlösung (Biorad), 352  $\mu$ l TE-Puffer (1x), 150  $\mu$ l Auftragspuffer

**Puffer und Lösungen für Spinprep Mini-Plasmidpräparation (Qiagen)****Puffer und Lösungen für Midi-Plasmidpräparation (Qiagen)**

Resuspensionspuffer P1

50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A, nach Zusatz von RNase  
A bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern

Lysepuffer P2

200 mM NaOH, 1% SDS

Neutralisationspuffer P3

3,0 M Kaliumacetatlösung, pH 5,5

Äquilibrierungspuffer QBT

750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100

**Waschpuffer QC**

1,0 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% Isopropanol

**Elutionspuffer QF**

1,25 M NaCl, 50 mM Tris, Tris-Cl (pH 8,5), 15% Isopropanol

**TE-Lösung**

10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1mM EDTA

**Lösungen und Puffer für Flexi-Plasmidpräparation****Resuspensionspuffer**

100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 400 µg/ml Rnase A

**Lysepuffer**

188 mM NaOH, 1% SDS

**Neutralisationspuffer**

Für 100 ml Lösung: 60 ml 5 M Kaliumacetatlösung, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml Wasser

**Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese****4x-Sammelgel-Puffer**

12,11 g Tris, 0,8 g SDS, mit Wasser auf 200 ml, mit HCL auf pH 6,8 einstellen

**4x-Trenngel-Puffer**

36,46 g Tris, 0,8 g SDS, mit Wasser auf 200 ml, mit HCl auf pH 8,8 einstellen

**Sammelgel (4%)**

0,52 ml Acrylamidlösung 30% (w/v), 1 ml 4x-Sammelgel-Puffer, 2,47 ml Wasser, 4 µl TEMED, 40 µl APS 10% (w/v)

**Trenngel (12,5%)**

3,33 ml Acrylamidlösung 30% (w/v), 2 ml 4x-Trenngelpuffer, 2,67 ml Wasser, 4 µl TEMED, 40 µl APS 10% (w/v)

**2x-SDS-Proben-Puffer**

100 mM Tris, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% BPB, 20% Glycerin, mit Wasser auf 10 ml

**Elektrophorese-Puffer**

6 g Tris, 28,8 g Glycin, 2 g SDS, mit Wasser auf 2 l, mit HCl auf pH 8,3 einstellen

**Coomassie-Färbelösung**

1 g Coomassie-Brilliant Blue R-250, 300 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 600 ml Wasser

**Entfärbelösung**

300 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 600 ml Wasser

**Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae*****"Breaking buffer" (Wolf und Berlin)**

2% (w/v) Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

**Lysepuffer (Biotechnologie)**

2,5 M LiCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 4% Triton X-100, 63 mM EDTA

**3 M Natriumacetatlösung****6.4.4 Geräte****Für Biotransformation und chemische Synthesen**

Dünnschichtchromatographie	Silica gel 60 F <sub>254</sub> -Platte (Merck), DC-Kammer (Migge)
Gaschromatographie	GC 8000 Series (Fisons Instruments), Optima 5-Säule, 25 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke, säulenmaterial 95 % Methylsilicon und 5 % Phenylsilicon (Machery & Nagel), Integrator Chrom-card (Fisons Instruments)
Gefriertrockner	Lyovac GT2 (Finn-Aqua)
Homogenisator	Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel)
HPLC (analytisch)	Säule: Nucleosil C <sub>18</sub> 5 µm, 250 x 4 mm (Crom), HPLC-Controller S 2000 (Sykam), Gradientenmischer S 8110 (Sykam), Solvent delivery system S 1100 (Sykam), Lichtstreuendetektor

	(S.E.D.E.R.E), Schreiber Chromatopac C-R 6A (Shimadzu)
HPLC (präparativ)	Säule: Nucleosil 100 C18, 5 $\mu$ , 250 x 20 mm (Crom), Solvent delivery system S1100 (Sykam), Low pressure gradient mixer (Sykam), UV-VIS-Detektor UVIS 200 (Linear), Auswertung: Commodore PC 40-III
Hydrolyseaktivität	Dosimat 665 (Metrohm), Impulsomat 614 (Metrohm), pH-Meter 632 (Metrohm), Rührer 649 (Metrohm), Schreiber L 200 E (Linseis), Thermostat RMS (Lauda)
Karl-Fischer-Titration	Dosimat 665 (Metrohm), KF-Titrina 701 (Metrohm), Rührer Tri Stand 703 (Metrohm)
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 525 (WTW)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134 (Büchi), Wasserbad B-480 (Büchi), Vacuum System B-172 (Büchi)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 514 H (Bandelin)
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D (Sartorius), C-600-SX (Cobos)

### Für mikrobiologische und molekulargenetische Techniken

Agarosegelelektrophorese	DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell (Biorad); Video Copy Processor P66E (Mitsubishi); BWM 9X Monitor (Javelin Electronics); UV-Leuchttisch (MWG-Biotech)
Inkubatoren	HT-Schüttelinkubator (Infors AG) für (37°C, 30°C)
Mikroskop	Axiolab E (Zeiss)
Mikrotiterplattenwaschgerät	Titertek Mikroplate Washer M96V (ICN)
PCR-Geräte	Master Cycler Gradient (Eppendorf) RoboCycler Gradient 40 (Stragene)
Photometer	UV/Vis-Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia) TitertekPlus (ICN); für Mikrotiterplatten
Roboter	Biomek 2000 (Beckmann), Biomek SL (Beckmann), Fluostar-Photometer (bMG)
Sequenzier	Procise <sup>TM</sup> Sequenzier, Auswertung: Power PC G3 (Macintosh)

## Zentrifugen

Centrifuge 5417 C, Centrifuge R (Eppendorf)  
Sorvall RC – 5B, Rotor: SA-600, SLA-3000 (Du  
Pont Instruments), Centrifuge 5810 R  
(Eppendorf)

## 7 Anhang

### 7.1 Sequenz des synthetischen *lip1*-Gens aus *Candida rugosa*

In die folgende Sequenz wurden die für die error prone PCR und Sequenzierung verwendeten Primer eingetragen. Die auftretenden Mutationen wurden mit blau und rot gekennzeichnet.

```
5450  cgg atc gga cta cta gca gct gta ata cga ctc act ata ggg aat att aag
      gcc tag cct gat gat cgt cga cat tat gct gag tga tat ccc tta taa ttc

5501  ctt ttg att tta acg act ttt aac gac aac ttg aga aga tca aaa aac aac
      gaa aac taa aat tgc tga aaa ttg ctg ttg aac tct tct agt ttt ttg ttg

5552  taa tta ttc gaa acg atg aga ttt cct tca att ttt act gct gtt tta ttc
      att aat aag ctt tgc tac tct aaa gga agt taa aaa tga cga caa aat aag

5603  gca gca tcc tcc gca tta gct gcc cca acc gcc act ttg gct aac ggt gac
      cgt cgt agg agg cgt aat cga cgg ggt tgg cgg tga aac cga ttg cca ctg

5654  acc atc acc ggt ttg aac gcc atc atc aac gaa gcc ttc ttg ggt att cca
      tgg tag tgg cca aac ttg cgg tag tag ttg ctt cgg aag aac cca taa ggt

5705  ttt gcc gaa cca cca gtt ggt aac ttg aga ttc aag gac cca gtt cca tac
      aaa cgg ctt ggt ggt caa cca ttg aac tct aag ttc ctg ggt caa ggt atg

5756  tcc ggt tcc ttg gat ggt caa aag ttc act tct tac ggt cca tct tgt atg
      agg cca agg aac cta cca gtt ttc aag tga aga atg cca ggt aga aca tac

5807  caa caa aac cca gaa ggt acc tac gaa gaa aac ttg cca aag gca gct tta
      gtt gtt ttg ggt ctt cca tgg atg ctt ctt ttg aac ggt ttc cgt cga aat

5858  gat ctg gtt atg caa tcc aaa gtt ttc gaa gct gtt tct cca tct tct gaa
      cta gac caa tac gtt agg ttt caa aag ctt cga caa aga ggt aga aga ctt

5909  gac tgt ttg acc att aat gtt gtt aga cca ccc ggg aca aag gct ggt gcc
      ctg aca aac tgg taa tta caa caa tct ggt ggg ccc tgt ttc cga cca cgg

5960  aac ttg cca gtt atg ttg tgg atc ttt ggt ggt ggt ttt gaa gtt ggt ggt
      ttg aac ggt caa tac aac acc tag aaa cca cca cca aaa ctt caa cca cca

6011  act agt acc ttc cct cca gcc caa atg att acc aag tct att gct atg ggt
      tga tca tgg aag gga ggt cgg gtt tac taa tgg ttc aga taa cga tac cca

6062  aag cca atc atc cac gtt tct gtc aac tac aga gtc tcg agc tgg ggt ttc
```

ttc ggt tag tag gtg caa aga cag ttg atg tct cag agc tcg acc cca aag

6113 ttg gct ggt gac gaa atc aag gcc gaa ggt tct gcc aac gcc ggt ttg aag  
aac cga cca ctg ctt tag ttc cgg ctt cca aga cgg ttg cgg cca aac ttc

6164 gac caa aga ttg ggt atg caa tgg gtg gct gac aac att gct gct ttt ggt  
ctg gtt tct aac cca tac gtt acc cac cga ctg ttg taa cga cga aaa cca

6215 ggt gat cca act aag gtt act atc ttt ggt gaa tct gct ggt tct atg tcc  
cca cta ggt tga ttc caa tga tag aaa cca ctt aga cga cca aga tac agg

6266 gtc atg tgt cac att ttg tgg aac gac ggt gac aac act tac aag ggt aag  
cag tac aca gtg taa aac acc ttg ctg cca ctg ttg tga atg ttc cca ttc

6317 cca ttg ttc aga gct ggt atc atg caa tct ggt gct atg gtt cca tct gac  
ggt aac aag tct cga cca tag tac gtt aga cca cga tac caa ggt aga ctg

6368 gcc gtc gac ggt atc tac ggt aac gaa att ttt gac ttg ttg gct tcc aac  
cgg cag ctg cca tag atg cca ttg ctt taa aaa ctg aac aac cga agg ttg

6419 gct ggt tgt ggt tct gcc tct gac aag ttg gct tgt ttg aga ggt gtt tct  
cga cca aca cca aga cgg aga ctg ttc aac cga aca aac tct cca caa aga

6470 tct gac act ttg gaa gac gcc acc aac aac acc cct ggt ttc ttg gct tac  
aga ctg tga aac ctt ctg cgg tgg ttg ttg tgg gga cca aag aac cga atg

6521 tcc tcc tta aga ttg tct tac ttg cca aga cca gac ggt gtt aac atc acc  
agg agg aat tct aac aga atg aac ggt tct ggt ctg cca caa ttg tag tgg

6572 gac gac atg tac gct ttg gtt aga gaa ggt aag tat gcc aac atc cct gtt  
ctg ctg tac atg cga aac caa tct ctt cca ttc ata cgg ttg tag gga caa

6623 atc atc ggt gac caa aac gac gaa ggt acc ttc ttt ggt act tct tct ttg  
tag tag cca ctg gtt ttg ctg ctt cca tgg aag aaa cca tga aga aga aac

6674 aac gtt acc act gat gcc caa gcc aga gaa tat ttc aag caa tct ttt gtc  
ttg caa tgg tga cta cgg gtt cgg tct ctt ata aag ttc gtt aga aaa cag

6725 cac gct agc gac gct gaa atc gac act ttg atg act gct tac cca ggt gac  
gtg cga tcg ctg cga ctt tag ctg tga aac tac tga cga atg ggt cca ctg

6776 atc act caa ggt tct cca ttt gac act gga att cta aac gcc ttg acc cca  
tag tga gtt cca aga ggt aaa ctg tga cct taa gat ttg cgg aac tgg ggt<sup>o</sup>

6827 caa ttc aag aga atc tct gct gtt ttg ggt gac ttg ggt ttt act ttg gct  
gtt aag ttc tct tag aga cga caa aac cca ctg aac cca aaa tga aac cga

6878 cgt aga tac ttc ttg aac cac tac acc ggt ggt acc aag tac tct ttc ttg  
gca tct atg aag aac ttg gtg atg tgg cca cca tgg ttc atg aga aag aac

6929 tct aag caa ttg tct ggt ttg cca gtt ttg ggt act ttc cac tcc aac gat  
aga ttc gtt aac aga cca aac ggt caa aac cca tga aag gtg agg ttg cta

6980 atc gtc ttc caa gac tac ttg ttg ggt tct ggt tcc ttg atc tac aac aac  
tag cag aag gtt ctg atg aac aac cca aga cca agg aac tag atg ttg ttg

7031 gct ttc att gct ttt gcc act gac ttg gac cca aac acc gcc ggt ttg ttg  
cga aag taa cga aaa cgg tga ctg aac ctg ggt ttg tgg cgg cca aac aac

7082 gtt aag tgg cca gaa tac acc tct tct tct caa tct ggt aac aac ttg atg  
caa ttc acc ggt ctt atg tgg aga aga aga gtt aga cca ttg ttg aac tac

7133 atg atc aac gct ttg ggt ttg tac acc ggt aag gac aac ttc aga acc gcc  
tac tag ttg cga aac cca aac atg tgg cca ttc ctg ttg aag tct tgg cgg

7184 ggt tac gac gct **ttg** ttc tcc aac cca cca tct ttc ttt gtt **tga** taa taa  
cca atg ctg cga aac aag agg ttg ggt ggt aga aag aaa caa **act** att att

7235 ggc ctg gat cca cta gta acg gcc gcc agt gtg ctg gaa ttc tgc aga tat  
ccg gac cta ggt gat cat tgc cgg cgg tca cac gac ctt aag acg tct ata

7286 cca tca cac tgg cgg ccg ctc gag cat gca tct aga ggg ccg cat cat gta  
ggt agt gtg acc gcc ggc gag ctc gta cgt aga tct ccc ggc gta gta cat

7337 att agt tat gtc acg ctt aca ttc acg ccc tcc ccc cac atc cgc tct aac  
taa tca ata **cag tgc gaa tgt aag tgc** ggg agg **ggg gtg tag gcg aga ttg**

7388 cga aaa gga agg  
**gct** ttt cct tcc

## Start und Ende des Lipasegens

### Primer für error-prone PCR

Primer mutCRL1 5' cggatcggactactagcagc 3'

Primer mutCRL2 cggtagagcggatgtggg

### Sequenzierprimer:

Primer PYES 2 gcagctgtaatacgactc (vorwärts)

Primer C ttgaccaccgggacaaaggctgg (vorwärts)

Primer D atctgacccgtcgacggtatctacgg (vorwärts)

Primer PYES 1 cgtgaatgtaagcgtgac (rückwärts)

## 8 Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

### Referierte Arbeiten

Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P., Schmid, R. D. 1999. Highly-selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoyl-glycerol by lipase-catalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 64: 678-684.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U., Schmid, R. D. 1999 Crucial role of support and water activity on the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. *Biocatal. Biotransform.* 16: 443-459.

Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., McNeill, G. P., Schmid, R. D. 1998. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1527-1531.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U., Schmid, R. D. 1998. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. *Fett/Lipid* 100: 156-160.

Soumanou, M. M., Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. 1997. Lipasekatalysierte Synthese von strukturierten Triglyceriden. *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe.* Landwirtschaftsverlag. Münster. 184-190.

### Kongresse

Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Schmid, R. D. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. 52nd international congress and expo, DGF. Magdeburg, Germany. 13-15 Sept. 1998. Vortrag.

U. Schmid, U. T. Bornscheuer, M. M. Soumanou, G. P. McNeill, R. D. Schmid. Lipase-catalysed Synthesis of OPO. DECHEMA Jahrestagung in Wiesbaden. 26-28 Mai 1998. Poster

Schmid, U., Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. Lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. Lipases and lipids meeting: Structure, Specificity and Application in Biocatalysis. Como, Italy. 17-20 Sept. 1997. Poster.

Soumanou, M. M., Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. Lipasekatalysierte Synthese von strukturierten Triglyceriden. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe. Detmold, Germany. 30. June-1. July 1997. Poster.

### **Patent**

Schmid, U., Schmitt, J., Pleiss, J., Brocca, S., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. 2000. *Candida rugosa* mutants, eingereicht.

Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Schmid, R. D., Schmid, U. 1999. Preparation of symmetrical triglycerides ABA. Eur. Pat. Appl., EP 882797A2 to Unilever.

## 9 Lebenslauf

Name	Ulrike Schmid
Adresse	Krimp 5 NL-1506 AA Zaandam
Geburtstag	14 November 1967
Geburtsort	Nürtingen
Nationalität	deutsch
Status	verheiratet

### Schule

1974 – 1978	Grundschule in Nürtingen
1978 – 1987	Hölderlin-Gymnasium in Nürtingen (Abitur)

### Ausbildung

1987 – 1989	Ausbildung zur staatlich geprüften Chemisch-technischen Assistentin am Otto-Johannsen-Technikum in Reutlingen
-------------	---

### Universität

Sept. 1989 – Dez. 1994	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Stuttgart: Abschluss: Erstes Staatsexamen
März 1995 – Juli 1995	Lehrervertretung an der Berufsschule in Metzingen in den Fächern Analytische Chemie und Mikrobiologie
Juni 1995 – Juli 1996	Chemische Landesuntersuchungsanstalt in Sigmaringen, Abschluss: Zweites Staatsexamen
Nov. 1996 – Aug. 1999	Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie (Universität Stuttgart) bei Prof. Dr. Rolf D. Schmid Thema: Lipase-Katalysierte Synthese von strukturierten Triglyceriden: Verfahrensoptimierung und Erzeugung selektiver Lipasemutanten durch gerichtete Evolution
seit September 1999	Product Development Manager bei der Firma Lodders Croklaan (Unilever) in den Niederlanden

### Interessen

Tier- und Pflanzenbeobachtungen, Wandern, Fotografieren, klassische Musik

## 10 Literatur

- Adlercreutz, P. 1991. On the importance of the support material for enzyme synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. *Eur. J. Biochem.* **199**: 609-614.
- Adlercreutz, P. 1994. Enzyme-catalysed lipid modification. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **12**: 231-254.
- Akoh, C. C. 1995. Structured lipids - enzymatic approach. *Inform* **6**: 1055-1961.
- Akoh, C. C., Fomuso, L. B. 1997. Enzymatic modification of triolein: incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 269-272.
- Akoh, C. C., Jennings, B. H., Lillard, D. A. 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation on n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 1059-1062.
- Arnold, F. H., Moore, J. C. 1997. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.* **58**: 1-14.
- Arnold, F. H., Volkov, A. A. 1999. Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 54-59.
- Atomi, H., Bornscheuer, U., Soumanou, M. M., D., B. H., Wohlfahrt, G., Schmid, R. D. 1995. Microbial lipases - from screening to design. Proceedings of the 21st world congress of the international society for fat research. P. J. Barnes & Associates. Bridgwater. 49-50.
- Babayan, V. K. 1986. Structured Lipids and their use in Clinical Nutrition. Workshop at the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. *Am J Clin Nutr* **43**: 320-324.
- Babayan, V. K. 1987. Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* **22**: 417-420.
- Bach, A. C., Babayan, V. K. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* **36**: 950-962.
- Badings, H. T., de Jong, C. 1983. Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of conditions for the quantitative analysis of short- and long-chain fatty acids in lipids. *J. Chromatogr.* **279**: 493-506.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. 1992. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 157.

- Benjamin, S., Panday, A. 1998. *Candida rugosa* and its lipases - a retrospect. J. Sci. Ind. Res. **57**: 1-9.
- Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. Yeast **14**: 1069-1087.
- Benzonana, G., Esposito, S. 1971. On the positional and chain specificities of *Candida rugosa* lipase. Biochim. Biophys. Acta **231**: 15-22.
- Black, M. E., Newcomb, T. G., Wilson, H. M., Loeb, L. A. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**: 3525 - 3529.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1990. Triglyceride by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc. **67**: 519-524.
- Bornscheuer 1998. Gerichtete Evolution von Enzymen. Angew. Chemie **110**: 3285-3288.
- Bornscheuer, U. 1995. Lipase-catalyzed synthesis of monoglycerides. Fat Sci. Technol. **97**: 241-249.
- Bornscheuer, U. 1999. Neue Strategien zum Einsatz von Lipasen und Esterasen in der organischen Synthese. Shaker Verlag. Aachen.
- Bornscheuer, U., Reif, O.-W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., Menge, U. 1994. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. Biochim, Biophys. Acta **1201**: 55-60.
- Bornscheuer, U. T., Altenbuchner, J., Meyer, H. H. 1998. Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. Biotechnol Bioeng **58**: 554-559.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. 1999. Hydrolases in Organic Synthesis. Wiley-VCH. Weinheim.
- Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Schmid, R. D., Schmid, U. 1999. Preparation of symmetrical triglycerides ABA. 130:51410 CA. Eur. Pat. Appl. Unilever N. V., Neth.; Unilever PLC.
- Boutur, O., Dubreucq, E., Galzy, P. 1994. Methyl ester production in aqueous medium by an enzymatic extract from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. Biotechnol. Lett. **16**: 1179-1182.
- Bracco, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. Am.J.Clin.Nutr. **60**: 1002S-1009S.
- Braden, L. M., Carroll, K. K. 1986. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rat. Lipids **21**: 285-288.

- Brady, L. et al. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770.
- Briand, D., Dubreucq, E., Galzy, P. 1994. Enzymatic fatty esters synthesis in aqueous medium with lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice. *Biotechnol. Lett.* **16**: 813-818.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L., Schmid, R. D. 1998. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* **7**: 1415-1422.
- Brockhoff, H., Jensen, R. G. 1974. Lipolytic enzymes. Academic Press, N Y
- Brzozowski, A. M. et al. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex [see comments]. *Nature* **351**: 491-494.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Meth. Appl.* **2**: 28-33.
- Cambillau, C., van Tilbeurgh, H. 1993. Structure of hydrolases - lipases and cellulases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 885-895.
- Carlson, S. E. 1995. The role of PUFA in infant nutrition. *Inform* **6**: 940-946.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **262**: 802-805.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175.
- Coleman, M. H., Macrae, A. R. 1977. 87:166366 CA. Unilever N.V.
- Crameri, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., Stemmer, W. P. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**: 315-319.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., Raschke, W. C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **11**: 905-910.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K., Doctor, B. P. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* **2**: 366-382.
- De Greyt, W., Huyghebaert, A., Kellens, M. 1989. Chemical and Physicochemical Modification of Lipids. Christophe, A. B. *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use.* AOCS Press. Champaign. 1-19.

- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. 1992. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**: 1532-1541.
- Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J., Derewenda, Z. S. 1994. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* **12**: 551-557.
- Derewenda, Z. S., Derewenda, U., Dodson, G. G. 1992. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **227**: 818-839.
- Dodson, G. G., Lawson, D. M., Winkler, F. K. 1992. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss* **95-105**:
- el Hawrani, A. S., Sessions, R. B., Moreton, K. M., Holbrook, J. J. 1996. Guided evolution of enzymes with new substrate specificities. *J Mol Biol* **264**: 97-110.
- Ergan, F., Tani, M., André, G. 1991. Use of lipases in multiphasic systems solely composed of substrates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**: 412-417.
- Fritsche, J., Steinhart, H. 1997. Contents of trans fatty acids (TFA) in German foods and estimation of daily intake. *Fett/Lipid* **99**: 314-318.
- Fritsche, J., Steinhart, H. 1998. Analysis, occurrence, and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) - a review. *Fett/Lipid* **100**: 190-210.
- Fureby, A. M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1996. Acyl migration and its implications in lipid modifications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **799**: 231-237.
- Fureby, A. M., Virto, C., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1996. Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatal. Biotransform.* **14**: 89-111.
- Gellissen, G., Hollenberg, C. P. 1997. Application of yeast in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene* **190**: 87-97.
- Goderis, H. L., Fouwe, B. L., van Cauwenbergh, S. M., Tobback, P. P. 1986. Measurement and control of water content of organic solvents. *Anal. Chem.* **58**: 1561-1563.
- Goto, M., Noda, S., Kamiya, N., Nakashio, F. 1996. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant coated lipase in organic media. *Biotechnol. Lett.* **18**: 839-844.
- Greener, A., Callahan, M., Jerpseth, B. 1996. An efficient random mutagenesis technique using *E. coli* mutator strain. *Methods Mol. Biol.* **57**: 375-385.

- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cygler, M. 1993. Insight into interfacial activation from an open 'structure' of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847.
- Haines, A. P., Sanders, T. A. B., Imeson, J. D., Mahler, R. F., Martin, J., Mistry, M., Vickers, M., Wallace, P. G. 1986. Effects of a fish oil supplement on platelet function, haemostatic variables and albuminuria in insulin-dependent diabetics. *Thromb. Res.* **43**: 643-655.
- Halling, P. 1996. Is random mutation more rational? [news; comment]. *Nat Biotechnol* **14**: 432-436.
- Halling, P. J. 1992. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnol. Lett.* **6**: 271-276.
- Harayama, S. 1998. Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnology* **16**: 76-82.
- Hendrikse, P. W., Harwood, J. L., Kates, M. 1994. Analytical methods. Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F. B. *The Lipid Handbook*. Chapman&Hall. 337-338.
- Huang, K., Akoh, C. C. 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 1277-1280.
- Huang, K., -H., C., A. C. 1996. Enzymatic synthesis of structured lipids: transesterification of triolein and caprylic acid ethyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 245-250.
- Hughes, D. E. 1995. Fish oil and the immune system. *Nut. Food. Sci.* **2**: 12-16.
- Janssen, A. E., Vaidya, A. M., Halling, P. J. 1996. Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media. *Ann N Y Acad Sci* **799**: 257-261.
- Jensen, R. G., Dejong, F. A., Clarck, R. M., Palmgren, L., Liao, T. H., Hamosh, M. 1982. Stereospecificity of premature human infant lingual lipase. *Lipids* **17**: 570-572.
- Jensen, R. G., Dejong, F. A., Clark, R. M. 1983. Determination of lipase selectivity. *Lipids* **18**: 239-252.
- Joerger, R. D., Haas, M. J. 1994. Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis. *Lipids* **29**: 377-384.
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, H., Iwasaki, S. 1989. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature* **341**: 164-166.
- Khan, S. A., Halling, P. J., Bell, G. 1990. Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymic catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 453-458.

- Köttig, J., Eibl, H. 1994. Lipases and phospholipases in organic synthesis. Wooley, P. , Petersen, S. B. Lipases-Their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press. Cambridge. 289-313.
- Kuchner, O., Arnold, F. H. 1997. Directed evolution of enzyme catalysts. Trends Biotechnol **15**: 523-530.
- Kvittingen, L., Sjørsnes, B. J., Anthonsen, T., Halling, P. 1992. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. Tetrahedron **48**: 2793-2802.
- Kwon, S. J., Song, W. H., Rhee, J. S. 1995. Removal of water product from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. Biotechnol. Bioeng. **46**: 393-395.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. **30**: 81-87.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Liao, H., McKenzie, T., Hageman, R. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **83**: 576-580.
- Lien, E. L., Boyle, F. G., Yuhas, R., Tomarelli, R. M., Quinlan, P. 1997. The effect of triglyceride positional distribution on fatty acid absorption in rats. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. **25**: 167-174.
- Lortie, R., Trani, M., Ergon, F. 1993. Kinetic Study of the lipase-catalyzed synthesis of triolein. Biotech. Bioeng. **41**: 1021-1026.
- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocca, S., Tramontano, A., Alberghina, L. 1993. Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. Gene **124**: 45-55.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F., Lafuente, J. 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. Chem Phys Lipids **93**: 143-148.
- Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., Fusetti, F., Brocca, S., Pizzi, E., Alberghina, L. 1994. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. Protein Eng **7**: 531-535.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. J. Am. Oil Chem. Soc. **60**: 291-294.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G. J., Amundson, C. H. 1990. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. J. Am. Oil Chem. Soc. **67**: 890-910
- Margolin, A. L. 1996. Novel crystalline catalysts. Trends Biotechnol. **14**: 223-230.

- Mase, T., Matsumiya, Y., Matsuura, A. 1995. Purification and characterization of *Penicillium roquefortii* 7268 lipase. Biosci. Biotech. Biochem. **59**: 329-330.
- Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G. 1992. Allgemeine Bestimmungen in Lebensmitteln. Lebensmittelanalytik. Springer-Verlag. Berlin/Heidelberg. 4-8.
- Matsuo, T., Sawamura, N., Hashimoto, Y., Hashida, W. 1982. 96:4958y. Fuji Oil Co.
- McNeill, G. P. 1996. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. J. Am. Oil Chem. Soc. **73**: 1409-1414.
- McNeill, G. P., Ackman, R. G., Moore, S. R. 1996. Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc. **73**: 1403-1407.
- Millqvist, A., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. 1994. Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides. Enzyme Microb. Technol. **16**: 1042-1047.
- Mittelbach, M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc. **67**: 168-170.
- Moore, J. C., Arnold, F. H. 1996. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents [see comments]. Nat Biotechnol **14**: 458-467.
- Myher, J. J., Kuksis, A., Geher, K., Park, P. W., Diersen-Schade, D. A. 1996. Stereospecific analysis of triacylglycerol rich in long-chain polyunsaturated fatty acids. Lipids **31**: 207-215.
- Ollis, D. L., Cheah, D., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S., Silman, I. 1992. The a/b hydrolase fold. Protein Eng. **5**: 197-211.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R. D. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. Chem Phys Lipids **93**: 67-80.
- Prasher, D. C. 1995. Using GFP to see the light. Trends in Genetics **11**: 320-323.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. 1992. Gene **111**: 229-233.
- Quinlan, P., Moore, S. 1993. Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. Inform **4**: 5-9.
- Reetz, M., Zonta, A., Simpelkamp, J. 1995. Efficient heterogenous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials. Angew. Chemie., Int. Ed. Engl. **34**: 301-303.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Verger, R. 1993. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. Chirality **5**: 24-30.

- Rúa, M. L., Diaz-Maurino, T., Fernandez, V. M., Otero, C., Ballesteros, A. 1993. Purification and characterisation of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys Acta* **1156**: 181-189.
- Rupley, J. A., Gratton, E., Careri, G. 1983. Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 18-22.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schmid, R. D., Verger, R. 1998. Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen. *Angew. Chem.* **110**: 1694-1720.
- Schmidt-Dannert, C., Arnold, F. H. 1999. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol* **17**: 135-136.
- Scholz, E. 1983. Wasserbestimmung in Lebensmitteln: Karl-Fischer-Reagentien ohne Pyridin. *Deut. Lebensm.-Rdsch.* **79**: 302.
- Screckrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J.-T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., Birkenberger, L. A. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methlotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.
- Seelze 1985. Hydranal-Wasser-Reagentien nach Eugen Scholz für die Karl-Fischer-Titration. Informationsschrift Fa. Riedel-de Haën
- Segel, I. H. 1975. *Biochemical Calculations*. 2nd Edition. Wiley & Sons. New York.
- Sharp, P. M., Cowe, E., Higgins, D. G., Shields, D. C., Wolfe, K. H., Wright, F. 1988. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, und *Homo sapiens*: A review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* **16**: 8207-8211.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., Tominga, Y. 1996. Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 299-303.
- Small, D. M. 1991. The effect of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **11**: 413-434.
- Soumanou, M. M. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides containing medium-chain fatty acids in *sn1* and *sn3*-position and a long-chain fatty acid in *sn2*-position. Dissertation.

- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Menge, U., Schmid, R. D. 1997. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 427-433.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. 1998b. Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 703-710.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, U., Schmid, R. D. 1998a. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. *Fett/Lipid* **100**: 156-160.
- St. Clair, N. L., Navia, M. A. 1992. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 7314-7316.
- Stemmer, W. P. C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Stryer, L. 1991. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg. 235-237.
- Svendsen, A. 1994. Sequence comparisons within the lipase family. Wooley, P. , Peterson, S. B. *Lipases*. Cambridge University Press. Cambridge. 1-21.
- Terano, T., Salmon, J. A., Higgs, G. A., Moncada, S. 1986. Eicosapentaenoic acid as a modulator of inflammation. Effect on Prostaglandin and leukotriene synthesis. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 779-785.
- Uauy-Dagach, R., Valenzuela, A. 1992. Marine oils as a source of omega-3-fatty acids in the diet. *Prog. Fod Nutr. Sci.* **16**: 199-243.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Macrae, A. R. 1992b. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. **1118**: 218-222.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Macrae, A. R. 1992c. *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. *FEBS Lett.* **301**: 258-260.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D., Macrae, A. R. 1992a. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1122**: 143-146.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., Peilow, A. D., Macrae, A. R. 1994. Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. *J. Biochem* **222**: 461-466.
- van der Padt, R. H., Sewalt, J. J. W., van't Riet, K. 1993. On-line water removal during enzymatic triacylglycerol synthesis by means of pervaporation. *J. Membr. Sci.* **80**: 199-208.

- van Tol, J. B. A., Odenthal, J. B., Jongejan, J. A., Duine, J. A. 1992. Relation of enzymatic reaction rate and hydrophobicity of the solvent. Tramper, J., Beftink, M. H. , von Stockar, U. Biocatalysis. Elsevier. Amsterdam. 137-144.
- Villeneuve, P., Foglia, T. A. 1997. Lipase specificities: Potential application in lipid bioconversions. Inform **8**: 640-650.
- Vulfson, E. N. 1994. Lipases and phospholipases in organic synthesis. Wooley, P. , Petersen, S. B. Lipases-Their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press. Cambridge. 271-288.
- Weyland, M. 1992. Cacao butter fractions: a novel way of optimizing chocolate performance. 46th P. M. C. A. Production Conference 51-55.
- Willett, W. C., Stampfer, M. J., Manson, M. J., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Rosner, B. A., Sampson, L. A., Hennekens, C. H. 1993. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. Lancet **341**: 581-585.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. Nature **343**: 771-774.
- Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D. 1984. Enzymatic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase. Enzyme Microb. Technol. **6**: 443-446
- Wisont, K. 1999. Lipids and cancer. Inform **10**: 380 - 397.
- Yamagushi, S., Mase, T. 1991. Purification and characterization of mono and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. Appl. Microbial Biotechnol. **34**: 720-725.
- Yoon, S.-H., Miyawaki, O., Park, K.-H., Nakamura, K. 1996. Transesterification between triolein and ethylbehenate by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide. J. Ferment. Bioeng. **4**: 334-340.
- You, L., Arnold, F. H. 1994. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. Protein Engineering **9**: 77-84.
- Zhang, J.-H., Dawes, G., Stemmer, W. P. C. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**: 4504-4509.