

Heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten
in *Pichia pastoris*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Sebastian Kelle

geboren am 16.06.1986 in Magdeburg

2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. Ralf Günter Berger

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 08.12.2015

Danksagung

Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger gab mir die Möglichkeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut zu forschen. Für die wissenschaftliche Betreuung, die stets konstruktive Diskussionsbereitschaft, das entgegengebrachte Vertrauen und den eingeräumten Freiraum zur Bearbeitung meines Themas möchte ich ihm herzlich danken.

Weiterhin danke ich besonders Frau Dr. Katerina Zelena für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die vielen fachlichen Diskussionen und ihren unermüdlichen Optimismus.

Frau Dr. Diana Linke danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche und wertvollen Tipps. Darüber hinaus gebührt mein Dank Herrn PD Dr. Ulrich Krings für seinen fachlichen Rat bezüglich der LC-MS-Analysen.

Frau Prof. Dr. Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu führen.

Dem BMBF Cluster BIODIVERSITY2021 und der Firma Henkel danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Projekte.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die hilfsbereite und freundliche Zusammenarbeit, sowie die zusammen verbrachte Zeit.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern Bärbel und Michael Kelle, die mir mein Studium ermöglichten und mich stets unterstützten. Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Marina und allen weiteren Verwandten für ihr Vertrauen und die moralische Unterstützung während der letzten Jahre danken.

Vorbemerkung

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

- Kelle, S., Zelena, K., Linke, D., Berger, R.G., (2014) Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification 95, 233-239.
- Kelle, S., Nieter, A., Krings, U., Zelena, K., Linke, D., Berger, R.G., (2015) Heterologous production of a feruloyl esterase from *Pleurotus sapidus* synthesizing feruloyl-saccharide esters. Biotechnology and Applied Biochemistry (*in press*; DOI: 10.1002/bab.1430)

Nachfolgend gelistete Veröffentlichungen und Poster wurden im Rahmen dieser Dissertationsschrift erarbeitet, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

- Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Kelle, S., Linke, D., Krings, U., Popper, L., Berger, R.G., (2015) A chlorogenic acid esterase with a unique substrate specificity from *Ustilago maydis*. Applied and Environmental Microbiology 81, Issue 5, 1679–1688.

Posterpräsentation:

- Kelle, S., Leonhardt, Robin-H, Berger, R.G. Recombinant expression of lipoxygenases in different *Pleurotus* spp. Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Hamburg, 24. - 25. März 2014.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Basidiomycota als Enzymquelle für die Biotechnologie	1
1.1.1 Lipoxygenasen (LOX)	2
1.1.1.1 LOX in Pilzen	4
1.1.1.2 3D-Struktur und katalytischer Mechanismus von LOX	4
1.1.1.3 Biotechnologische Applikationen von LOX	7
1.1.2 Ferulasäure-Esterasen (FAE)	8
1.1.2.1 FAE in Pilzen	9
1.1.2.2 3D-Struktur und katalytischer Mechanismus von FAE	10
1.1.2.3 Biotechnologische Applikationen von FAE	11
1.2 Heterologe Produktion von Enzymen aus Basidiomycota	12
1.3 <i>Pichia pastoris</i> als Expressionswirt	14
2. Vorwort zur Publikation „Expression of soluble recombinant lipoxygenase from <i>Pleurotus sapidus</i> in <i>Pichia pastoris</i>“	26
3. Expression of soluble recombinant lipoxygenase from <i>Pleurotus sapidus</i> in <i>Pichia pastoris</i>	27
3.1 Introduction	28
3.2 Methods	29
3.2.1 Materials	29
3.2.2 Strains and culture media	29
3.2.3 Construction of the lipoxygenase expression vector and transformation of <i>P. pastoris</i>	29
3.2.4 Culture conditions for Lox1 expression	32
3.2.5 SDS-PAGE analysis	32

3.2.6	Protein concentration	32
3.2.7	Purification of recombinant Lox1	32
3.2.8	Enzyme activity.....	33
3.2.8.1	Effect of pH and temperature on enzyme activity	33
3.2.9	ESI tandem MS of tryptic peptides	34
3.2.10	Analysis of amino acid sequences	34
3.3	Results and discussion.....	34
3.3.1	Cloning of the <i>LOX1</i> gene into the pPIC9K expression vectors and expression in <i>P. pastoris</i>	34
3.3.2	Lox expression in <i>P. pastoris</i> pPIC9K-KHIS-LOX1 under different culture conditions.....	36
3.3.3	Purification of the Lox1	38
3.3.4	Characterization of purified Lox1	39
3.3.5	Transformation of a pPICZ α A- <i>HIS-LOX1</i> and pPIC9K- <i>HIS-LOX1</i> Δ 1_459	40
3.4	Conclusion	41
	Acknowledgements	41
	Appendix. Supplementary data.	42
4.	Vorwort zur Publikation „Heterologous production of a feruloyl esterase from <i>Pleurotus sapidus</i> synthesizing feruloyl-saccharide esters”	43
5.	Heterologous production of a feruloyl esterase from <i>Pleurotus sapidus</i> synthesizing feruloyl-saccharide esters	44
5.1	Introduction	44
5.2	Methods	46
5.2.1	Chemicals and primers	46
5.2.2	Strains and culture media.....	46
5.2.3	Isolation and cloning of the <i>EST1</i> gene in pUC57.....	46
5.2.4	Cloning of esterase expression vectors, transformation, and screening	47
5.2.5	Culture conditions for <i>EST1</i> expression in <i>P. pastoris</i>	50
5.2.6	Purification of recombinant Est1.....	51
5.2.7	SDS-PAGE analysis	51
5.2.8	ESI–tandem MS of tryptic peptides	52
5.2.9	Activity assay	52
5.2.10	Biochemical characterization of Est1	52

5.3	Results and Discussion.....	54
5.3.1	Expression of the <i>EST1</i> encoding gene in <i>E. coli</i> and <i>P. pastoris</i>	54
5.3.2	Purification of recombinant Est1.....	56
5.3.3	Characterization of purified Est1.....	58
5.3.4	Substrate specificity and kinetic parameters	60
5.3.5	Release of phenolic acids from the natural substrates DSWB.....	62
5.3.6	Enzymatic synthesis of feruloyl-saccharide esters.....	62
5.4	Conclusions.....	65
5.5	Acknowledgements	65
6.	Ausblick.....	66
7.	Literaturverzeichnis	68
	Lebenslauf	78

Abkürzungsverzeichnis

AOX1	Alkoholoxidase 1-codierendes Gen
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSWB	<i>destarched wheat bran</i> (entstärkte Weizenkleie)
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
Est1, <i>EST1</i>	Ferulasäure-Esterase 1 (Est1) bzw. das Ferulasäure-Esterase 1-codierende Gen (<i>EST1</i>) aus <i>Pleurotus sapidus</i>
F-A	5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-arabinofuranose
FAE	<i>ferulic acid esterase</i> (Ferulasäure-Esterase)
F-AX	β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O- <i>trans</i> -feruloyl-L-arabinofuranose
F-AXG	α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O- <i>trans</i> -feruloyl-L-arabinofuranose
FA-EE	<i>ferulic acid ethyl ester</i> (Ferulasäureethylester)
FA-ME	<i>ferulic acid methyl ester</i> (Ferulasäuremethylester)
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-codierendes Gen
GRAS	<i>generally recognized as safe</i> (allgemein als sicher anerkannt; Zulassungsbezeichnung der <i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k_{cat}	Katalytische Produktivität (<i>turnover number</i>)
K_m	Michaeliskonstante
LB	<i>lysogeny broth</i> (Komplexmedium für Bakterien)
LC-MS	<i>liquid chromatography–mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LOX	Lipoxygenase

Lox1, <i>LOX1</i>	Lipoxygenase 1 (Lox1) bzw. das Lipoxygenase 1-codierende Gen (<i>LOX1</i>) aus <i>Pleurotus sapidus</i>
M	Molar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
ND	<i>not detected</i> (nicht detektiert)
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> (Nitrilotriessigsäure)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P _{AOX1}	Promotor des <i>AOX1</i> -Gens
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
P _{GAP}	Promotor des <i>GAP</i> -Gens
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
STREP	Streptavidin
SNL	Standardnährlösung
TRX	Thioredoxin
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
Vis	<i>visible</i> (sichtbar)
v _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	<i>volume by volume</i> (Volumenanteil)
YEPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> (Komplexmedium für Hefen)

Aminosäuren werden nach dem internationalen Dreibuchstabencode abgekürzt.

Zusammenfassung

Basidiomyceten synthetisieren ein breites Spektrum von bisher unerforschten Enzymen mit hohem Potential für die biotechnologische Anwendung. Auf Grund oft niedriger Produktionslevel dieser Enzyme in Pilzen ist die heterologe Expression der protein-codierenden Gene in geeigneten Wirtsorganismen erforderlich.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der heterologen Produktion verschiedener basidiomycetischer Enzyme im Expressionswirt *Pichia pastoris*. In einer ersten Arbeit wurde das für die Lipoxygenase Lox1 codierende Gen aus *Pleurotus sapidus* erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert. Eine Sekretion des aktiven Enzyms ins Kulturmedium war trotz Nutzung verschiedener Expressionsvektor-Konstrukte, einschließlich einer N-terminalen *LOX1*-Deletionsmutante, nicht möglich. Die Expression erfolgte schließlich unter Einbringung einer zweiten Kozak-Sequenz in den Expressionsvektor pPIC9K. Das rekombinante Protein wurde über eine Affinitätschromatografie aus dem Zellysate gereinigt und biochemisch charakterisiert. Zudem wurden die Kulturbedingungen optimiert. Es handelt sich bei dieser Arbeit um die erste Beschreibung der heterologen Produktion einer basidiomycetischen Lipoxygenase in *P. pastoris*. In der biotechnologischen Anwendung bieten sich für dieses Enzym Applikationsmöglichkeiten zur Herstellung von Aromastoffen sowie zur enzymatischen Bleichung.

In einer zweiten Arbeit gelang es, die Ferulasäure-Esterase Est1 aus *P. sapidus* ebenfalls in *P. pastoris* zu produzieren und dabei ins Kulturmedium zu sekretieren. Est1 bietet großes Potential für die Anwendung in der Lebensmittel-, pharmazeutischen- und Kosmetikindustrie, sowie zur Produktion von Biokraftstoffen. Das rekombinante Enzym war in der Lage, verschiedene natürliche und synthetische Zimtsäureester zu hydrolysieren und Ferulasäure aus dem natürlichen Substrat Weizenkleie freizusetzen. Das ermittelte Substratspektrum sowie Sequenzvergleiche zeigten, dass Est1 nicht in das aktuellen Klassifikationsschemata für Ferulasäure-Esterasen passt und somit möglicherweise einer neuen Unterklasse von Ferulasäure-Esterasen angehört. Neben der Hydrolyse von Zimtsäureestern war auch die Est1-katalysierte Synthese verschiedener Ferulasäure-Saccharide durch Umesterung möglich. Im Zuge dessen wurde zum ersten Mal die enzymatische Synthese von Feruloyl-Maltose beschrieben. Des Weiteren wurde das natürliche Substrat Feruloyl-Arabinose erstmals durch eine basidiomycetische Ferulasäure-Esterase synthetisiert.

Schlagwörter: Basidiomycota, Ferulasäure-Esterase, feruloylierte Saccharide, heterologe Expression, Lipoxygenase, *Pichia pastoris*, *Pleurotus sapidus*

Abstract

Basidiomycota possess a broad spectrum of undiscovered enzymes with high potential for biotechnological applications. As a result of low production levels of these enzymes in fungi, the heterologous expression of the protein coding genes in appropriate host organisms is required.

The present work dealt with the heterologous production of different basidiomycetous enzymes in the expression host *Pichia pastoris*. In a first work, the gene coding for the lipoxygenase Lox1 from *Pleurotus sapidus* was successfully expressed in *P. pastoris*. Secretion of active enzyme in the culture medium was pursued but not possible, although different expression vector constructs, including N-terminal *LOX1* deletion mutants, were used. The expression finally succeeded by insertion of a second Kozak-sequence into the expression vector pPIC9K. The recombinant enzyme was purified from cell lysate using affinity chromatography and biochemically characterized. In addition, culture conditions were optimized. This work is the first report on the heterologous production of a basidiomycetous lipoxygenase in *P. pastoris*. The enzyme offers the opportunity for utilization in biotechnological applications, such as production flavourings or enzymatic bleaching.

In a second approach the feruloyl esterase Est1 from *P. sapidus* was expressed in *P. pastoris* and secreted into the culture medium. Est1 offers a high potential for applications in the food, pharmaceutical and cosmetics industry, or for the production of biofuels. The recombinant enzyme hydrolyzed natural and synthetic cinnamates, and released ferulic acid from the natural substrate wheat bran. The determined substrate spectrum and sequence analysis revealed that Est1 cannot be categorized according to the current classification scheme for feruloyl esterases. Hence, the enzyme may belong to a new subclass of feruloyl esterases. In addition to the hydrolysis of cinnamates, Est1 catalyzed the synthesis of different feruloyl saccharides through transesterification. Thereby, the first enzymatic synthesis of feruloyl maltose was described. Furthermore, the natural substrate feruloyl arabinose was synthesized for the first time using this basidiomycetous feruloyl esterase.

Key words: Basidiomycota, feruloyl esterase, feruloylated saccharides, heterologous expression, lipoxygenase, *Pichia pastoris*, *Pleurotus sapidus*

1. Einleitung

1.1 Basidiomycota als Enzymquelle für die Biotechnologie

Die Basidiomycota (Ständerpilze) sind eine Abteilung im Reich der Fungi (Pilze), die zusammen mit den Ascomycota (Schlauchpilzen) das Unterreich der Dikarya bilden. Etwa 32 % der rund 100.000 beschriebenen Pilzarten gehören zu den Basidiomycota, welche nach den Ascomycota (ca. 64.000 Arten) die zweitgrößte Gruppe innerhalb der Pilze darstellen [1]. Zur Fortpflanzung bilden Basidiomycota die namensgebenden säulenförmigen Sporangien (Basidien) aus, an deren Enden die Sporen reifen. Bekannte Arten umfassen insbesondere Großpilze, die makroskopische Fruchtkörper ausbilden und zu denen auch die meisten Speisepilze gehören. Neben parasitären Vertretern, wie den Brand- und Rostpilzen, sowie den symbiontisch als Flechten oder Mykorrhiza lebenden Arten, ist vor allem die saprobiontische Lebensweise bei Basidiomycota weit verbreitet.

Xylotrrophe Basidiomycota sind in der Lage, Lignocellulose pflanzlicher Biomasse abzubauen und die enthaltenen Polymere Cellulose, Hemicellulose und Lignin als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Hierfür sekretieren die Pilze eine beeindruckende Vielfalt unterschiedlicher Enzyme. Im Sekretom von Holzfäulepilzen finden sich unter anderem Lignin-degradierende Oxidoreduktasen wie Lignin-Peroxidasen (EC 1.11.1.14), Mangan-Peroxidasen (EC 1.11.1.13), polyvalente Peroxidasen (EC 1.11.1.16) und Phenol-Oxidasen (EC 1.10.3.2) sowie weitere Enzyme wie Glycosidasen (EC 3.2.1), Esterasen (EC 3.1) und Amidasen (EC 3.5.1.4) [2]. Lignocellulose stellt als heterogenes, komplexes und widerstandsfähiges Biopolymer ein Substrat dar, das chemisch nur unter harschen Bedingungen aufzuschließen ist. Im Zuge der nachhaltigen Produktion von Rohstoffen und der schrittweisen Substitution fossiler Energieträger, bieten Lignin-degradierende Enzyme aus Basidiomycota daher ein großes Potential für die umweltfreundliche, biotechnologische Herstellung von Biokraftstoffen und weiteren Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen [3]. Peroxidasen (EC 1.11.1) aus Weißfäulepilzen sind zudem in der Lage, zahlreiche Abfall- und Schadstoffe wie organische Halogene (z. B. Pentachlorphenol und polychlorierte Biphenyle) sowie natürliche und synthetische Farbstoffe (z. B. Xanthophylle und Azofarbstoffe) abzubauen, die unter anderem in industriellen Abwässern vorkommen [4].

Basidiomycetische Hydrolasen wie Amylasen (EC 3.2.1.x) [5] oder Peptidasen (EC 3.4) können in der Wasch- und Lebensmitteltechnologie eingesetzt werden. Einige Peptidasen katalysieren die Hydrolyse von Weizengluten, das bei disponierten Menschen Zöliakie auslösen kann [6]. Zudem sind bestimmte Asparagin-Peptidasen imstande, Casein abzubauen und somit Lab aus den Mägen von Milchkälbern sowie *Mucor*-Peptidasen bei der Käseherstellung zu substituieren [7].

Auf Grund ihrer Lebensweise produzieren Basidiomycota eine Vielfalt einzigartiger Metabolite, die unter anderem zahlreiche pharmazeutisch wirksame Substanzen sowie Farb- und Aromastoffe einschließen und zudem in der Feinchemie von Interesse sind [8]. Durch Aufklärung von entsprechenden basidiomycetischen Stoffwechselwegen, Identifizierung der beteiligten Enzyme und anschließende heterologe Gen-Expression, könnten diese Metabolite in Zukunft im industriellen Maßstab produziert werden. Von Vorteil ist in diesem Zusammenhang die oftmals für basidiomycetische Enzyme beschriebene gute Prozessstabilität, die sich beispielsweise in hohen Temperatur- und pH-Stabilitäten zeigt.

Im Folgenden wird näher auf Eigenschaften und Anwendungsgebiete von Lipoxygenasen und Ferulasäure-Esterasen eingegangen. Aus Basidiomyceten stammende Vertreter dieser Enzyme wurden bisher kaum erforscht und waren Gegenstand dieser Arbeit.

1.1.1 Lipoxygenasen (LOX)

Lipoxygenasen (LOX, EC 1.13.11.x) sind Enzyme, welche die regio- und stereoselektive Insertion von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einem 1Z,4Z-Pentadiensystem katalysieren. Sie gehören innerhalb der Klasse der Oxidoreduktasen zu den Nicht-Häm-Eisen-haltigen Dioxygenasen (EC 1.13). LOX sind ubiquitär verbreitet und wurden in zahlreichen Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien nachgewiesen [9, 10]. Die Klassifizierung von LOX erfolgt auf Basis der Regiospezifität ihres Sauerstoffeinbaus. Dementsprechend werden pflanzliche LOX, welche das Modellsubstrat Linolsäure bevorzugt zu 9- oder 13-Hydroperoxiden umsetzen, als 9-LOX beziehungsweise 13-LOX bezeichnet. Basierend auf dem Substrat Arachidonsäure wurden in tierischen Organismen 5-, 8-, 12- und 15-LOX gefunden. LOX katalysieren häufig den ersten Schritt der Biogenese verschiedener oxidierter Fettsäurederivate, sogenannten Oxilipinen, die vielseitige biologische Funktionen ausüben. In

Tieren können 5-LOX durch Oxygenierung von Arachidonsäure den ersten Schritt der Synthese von Leukotrienen katalysieren, während 12- und 15-LOX für die Biosynthese von Lipoxinen mitverantwortlich sind. Beide Stoffklassen spielen bei allergischen und entzündlichen Reaktionen eine wichtige Rolle [11]. In Pflanzen und Pilzen dienen vorwiegend ungesättigte C18-Fettsäuren, wie Linolsäure und α -Linolensäure, als Hauptsubstrat für LOX. Die entsprechenden Hydroperoxide werden durch verschiedene Enzyme zu zahlreichen Metaboliten weiter verstoffwechselt (Fig. 1-1). Als Endprodukte können in Pflanzen unter anderem Jasmonate, C6- und C9-Aldehyde, Alkohole sowie deren Ester entstehen, deren biologische Funktion die Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen, Stressantworten und die Pathogenabwehr einschließt [12, 13].

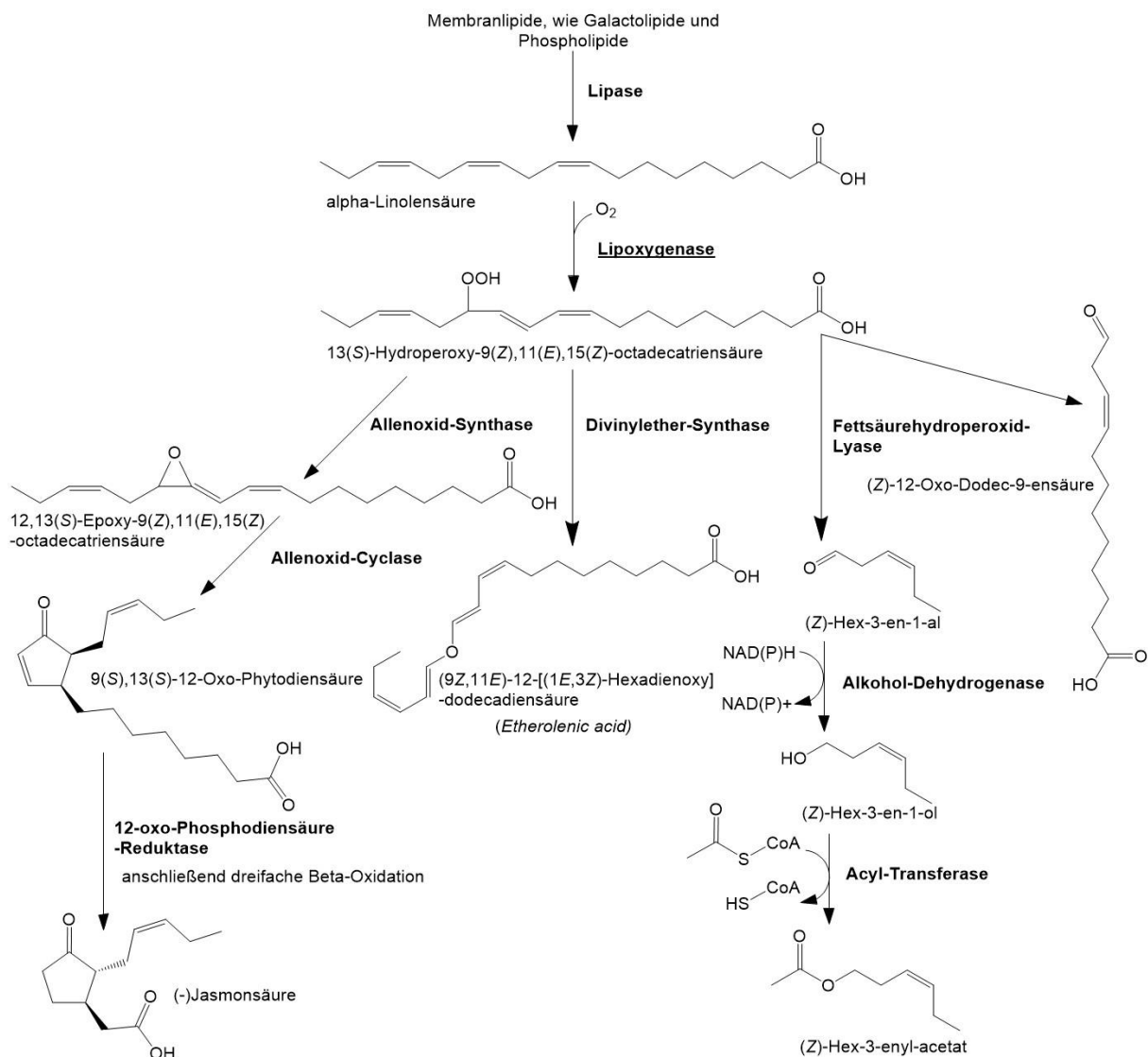


Fig. 1-1 | Biosyntheseweg von Oxilipinen in Pflanzen am Beispiel der α -Linolensäure [12, 13].

Ausgehend von einem Umsatz der α -Linolensäure mit einer 13S-Lipoxygenase, ist die Synthese von Jasmonsäure, der „Grünen Blattduftstoffe“ (C6-Alkohole und -Aldehyde) und einer Divinylether-Fettsäure dargestellt.

1.1.1.1 LOX in Pilzen

Über LOX aus Pilzen und ihre biologische Funktion ist bisher sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, dass LOX an der Biosynthese von Oxilipinen beteiligt sind, die beim programmierten Zelltod, dem *quorum sensing*, sowie der Steuerung des Wechsels von der Mycel- zur Hefe-Phase bei dimorphen Arten eine Rolle spielen [14]. Als ein wichtiges Produkt des Lipoxygenasemetabolismus in Pilzen galt lange Zeit das 1-Octen-3-ol, der Hauptaromastoff in Pilzen [15]. Aktuelle Studien belegen jedoch, dass am Entstehen dieses Aromastoffes Psi-Faktor produzierende Oxygenasen mitwirken, die nicht zu den LOX gehören [14].

Die Analysen sequenzierter Pilze zeigen, dass in diesen, ähnlich wie bei Tieren und Pflanzen, häufig mehrere LOX-Isoformen in einem Genom zu finden sind [16]. Die wenigen aus Pilzen gereinigten, charakterisierten und zum Teil heterolog produzierten LOX stammen vorwiegend von Arten aus der Abteilung Ascomycota [17]. Von besonderem Interesse sind hierbei unter anderem die LOX der pathogenen Ascomyceten *Gaeumannomyces graminis*, *Magnaporthe salvinii* und *Aspergillus fumigatus*, die ein Mangan-Kation anstelle des Eisens im katalytischen Zentrum tragen und daher als Mangan-Lipoxygenasen klassifiziert werden [18].

Isolierungen und Charakterisierungen von LOX aus Basidiomycota wurden bisher nur für *Pleurotus ostreatus* [19] und *Pleurotus sapidus* [20] durchgeführt. Bei beiden handelt es sich um intrazelluläre LOX mit sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften und einer hohen Homologie auf Aminosäureebene (77 % Identität) [16]. Die als Lox1 bezeichnete LOX aus *P. sapidus* wurde im Zuge der Untersuchungen biochemisch charakterisiert und als 13S-Lipoxygenase klassifiziert [21].

1.1.1.2 3D-Struktur und katalytischer Mechanismus von LOX

Eine Röntgenstrukturanalyse wurde bisher nur von kristallisierten pflanzlichen, tierischen und bakteriellen LOX durchgeführt. Obwohl sich die verschiedenen eukaryotischen LOX auf Aminosäureebene stark unterscheiden, gleicht sich der strukturelle Aufbau der Enzyme. Eukaryotische LOX sind Monomere, die in Tieren 75 bis 80 kDa und in Pflanzen 90 bis 104 kDa groß sind. Die Enzyme bestehen aus zwei Domänen.

Die kleinere N-terminale Domäne bildet eine als PLAT-Domäne (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin) bezeichnete β -barrel-Struktur aus. Die Funktion dieser strukturell konservierten Domäne ist bisher unklar. Deletionsstudien lassen vermuten, dass die PLAT-Domäne an der Membranbindung des Proteins beteiligt ist. Zudem zeigen PLAT-Deletionsmutanten geringere Enzym-Stabilitäten und Reaktionsraten [22]. Eine Ausnahme stellt eine PLAT-Deletionsmutante in Soja-LOX dar, bei der sich eine Aktivitätssteigerung zeigte [23].

Die große, vorwiegend aus α -Helices bestehende, C-terminale LOX-Domäne enthält die Substratbindetasche sowie das katalytische Nicht-Häm-Eisenion. Ausnahmen bilden hier Mangan-Lipoxygenasen, die stattdessen Mangan im aktiven Zentrum tragen. Das prosthetische Eisen liegt von fünf Aminosäuren und einem Hydroxidligand koordiniert in einer oktaedrischen Koordinationsphäre vor (Fig. 1-2). Bei pflanzlichen und pilzlichen LOX handelt es sich hierbei um ein Asparagin, die Carboxylatgruppe des C-terminalen Isoleucins und drei Histidine. Bei tierischen LOX ist Asparagin durch ein weiteres Histidin substituiert [24].

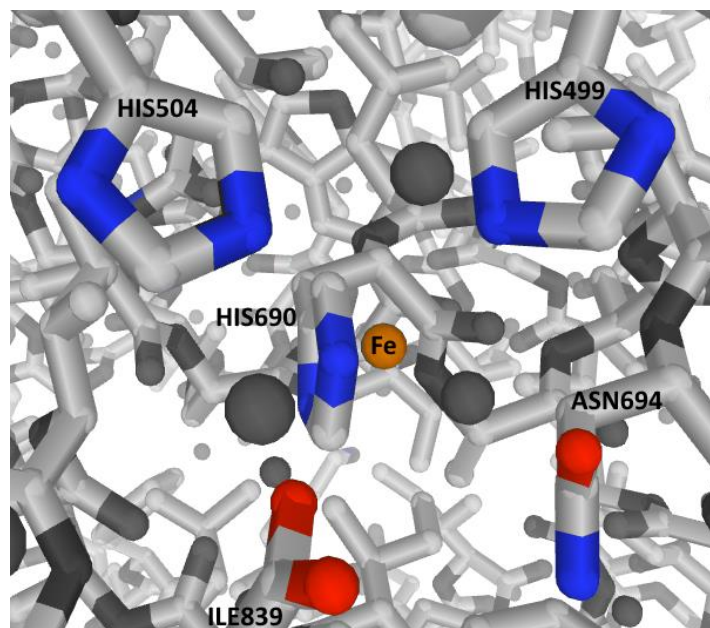


Fig. 1-2 | Aktives Zentrum der Lipoxygenase aus *Glycine max*.

Das prosthetische Fe(III)-Ion wird von drei Histidinen, einem Asparagin und der Carboxylgruppe des C-terminalen Isoleucins koordiniert. Die Abbildung wurde auf Basis der auf RCSB PDB [26] hinterlegten LOX-Kristallstruktur [27] erstellt.

Zum katalytischen Zentrum erstreckt sich von der Proteinoberfläche aus eine hydrophobe Substratbindetasche. Sauerstoff gelangt vermutlich über spezielle Kanäle ins aktive Zentrum des Enzyms. Beim Eindringen in die Substratbindetasche wird die Carboxylatfunktion der Fettsäure über eine ionische Bindung von einem Argininrest koordiniert, der an der

Proteinoberfläche oder im aktiven Zentrum der LOX vorhanden ist. Die Orientierung (*head first* bzw. *tail first*) sowie die Eindringtiefe der Fettsäure in die LOX entscheiden dabei über die Regiospezifität der Reaktion [22, 25].

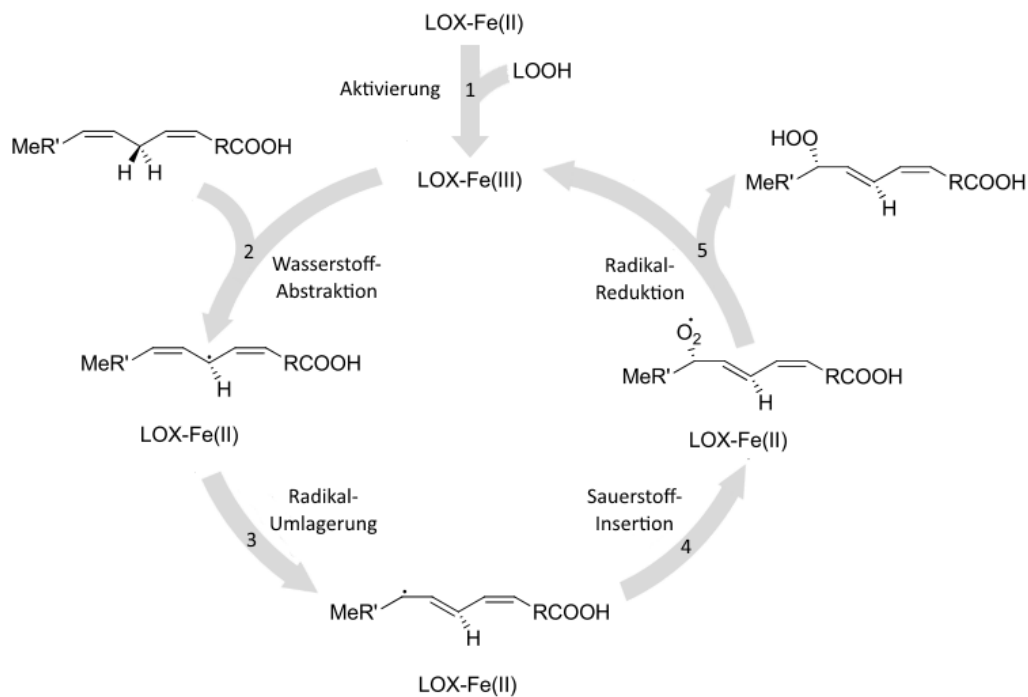


Fig. 1-3 |Schematische Darstellung der Lipoxygenase-Reaktion [25].

Die LOX-katalysierte Oxygenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in der Substratbindetasche setzt sich aus fünf Teilschritten zusammen (Fig. 1-3). Der Initialschritt ist gekennzeichnet durch eine katalytische *Lag*-Phase (1), in der das prosthetische Eisen des inaktiven Enzyms autokatalytisch aktiviert wird. Dies geschieht durch die Oxidation des Fe(II) zu Fe(III) durch bereits vorhandene Hydroperoxide [24]. In der folgenden *steady-state*-Katalyse wird zuerst ein Proton der Fettsäure aus bisallylischer Position durch den Hydroxidliganden des Eisenions abstrahiert. Hierbei wird ein Elektron frei, welches Fe(III) zu Fe(II) reduziert (2). Durch die C-H-Spaltung kommt es zur Bildung eines Mesomerie-stabilisierten Pentadienylradikals, welches sich unter Ausbildung eines konjugierten *Z,E*-Diensystems um zwei Positionen in Richtung des Methyl- oder Carboxylatendes umlagert (3). Es erfolgt die Insertion von molekularem Sauerstoff auf der gegenüberliegenden Seite zur Wasserstoffabstraktion unter Ausbildung eines Peroxyradikals (4). Das Radikal wird zum korrespondierenden Anion unter Rückgewinnung des aktiven Enzyms reduziert und anschließend zum Fettsäurehydroperoxid protoniert (5). Während der Oxidation von Fettsäuren unterliegen LOX dem Mechanismus der sogenannten suizidalen Inaktivierung,

deren Ursachen noch nicht endgültig geklärt sind. Vermutet wird einerseits eine Oxidation von Aminosäuren des aktiven Zentrums durch Reaktionsprodukte [28]; andererseits erscheint auch eine kovalente Wechselwirkung reaktiver Reaktionsintermediate mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms denkbar [29].

1.1.1.3 Biotechnologische Applikationen von LOX

Industriell werden Lipoxygenasen bisher nur in der Backindustrie eingesetzt. Die Fähigkeit von Soja-LOX, Carotinoid- und Xanthophyll-haltige Lebensmittel wie Teige zu bleichen, ist bereits seit mehr als 70 Jahren bekannt [30]. Durch die Supplementierung von Teigen mit Soja-LOX-haltigem Soja-Mehl kann sowohl eine Teigentfärbung erzielt als auch die Teig rheologie verbessert werden. Die Verbesserung der Teig rheologie basiert vermutlich auf der Vernetzung von co-oxidiertem Weizengluten durch die intermolekulare Ausbildung von Disulfidbrücken [31]. Die Teig entfärbung ist insbesondere bei Weißbrot erwünscht und resultiert aus der Co-Oxidation von Carotinoiden und anderen Pigmenten durch die LOX-katalysierte Freisetzung von Peroxyradikalen aus den Acyllipiden des Weizens [32]. Der mögliche Einsatz von LOX zur enzymatischen Bleichung wurde auch für andere Lebensmittel untersucht. Vor wenigen Jahren wurde ein Patent auf die Nutzung von LOX zur Entfärbung von Milchprodukten, wie Molke und Käse, angemeldet [33]. Die zurzeit beschränkte Anwendung der LOX in der Lebensmittelproduktion resultiert insbesondere daraus, dass LOX-katalysierte Lipidoxidationen auch nachteilige Effekte erzielen. So können beispielsweise die durch pflanze-eigene LOX katalysierten Reaktionen zu der Entstehung von Fehl aromen in Bier [34] oder Soja-Produkten führen [35]. Weiterhin ist die enzymatische Bleichung durch LOX in vielen Lebensmitteln, wie Obst und Gemüse, unerwünscht [36].

Neben einer direkten Anwendung in Lebensmitteln bieten LOX auch Potential für die Herstellung von Aromastoffen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie. Durch enzymatischen und radikalischen Abbau von Fettsäurehydroperoxiden können zahlreiche flüchtige Geruchsstoffe entstehen. Zu nennen sind hier insbesondere C6- und C9-Alkohole und Aldehyde, die für die typischerweise grasig-grünen Geruchseindrücke verschiedener Obst- und Gemüsesorten verantwortlich sind [37]. Durch LOX-vermittelte Co-Oxidation können weiterhin direkt Aromastoffe aus Präkursor-Verbindungen synthetisiert werden. Ein Beispiel

hierfür ist die Herstellung des Grapefruitaromastoffes Nootkaton aus dem Präkursor Valencen [38].

1.1.2 Ferulasäure-Esterasen (FAE)

Ferulasäure-Esterasen (FAE, auch Feruloyl-Esterasen, Zimtsäure-Esterasen, EC 3.1.1.73) sind Enzyme, die das Hydrolysegleichgewicht von Estern der Ferulasäure katalysieren. Sie gehören innerhalb der Gruppe der Hydrolasen zu den Carboxylesterasen (EC 3.1.1).

FAE sind in der Natur am Abbau pflanzlicher Zellwände beteiligt. In diesen liegt Ferulasäure zumeist verestert an den Polysacchariden Arabinoxylan und Pektin vor (Fig. 1-4). Durch enzymatische Oxidation mit Hilfe von Peroxidasen oder photochemisch kann die Dimerisierung und Oligomerisierung der Ferulasäure-Monomere erfolgen [39]. Dabei kommt es zur Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Hetero-Polysaccharidketten beziehungsweise zwischen Hetero-Polysacchariden und Lignin. Die ausgebildeten Quervernetzungen tragen wesentlich zur Stabilität der Zellwand und zur Abwehr gegen Insekten und Pathogene bei [39].

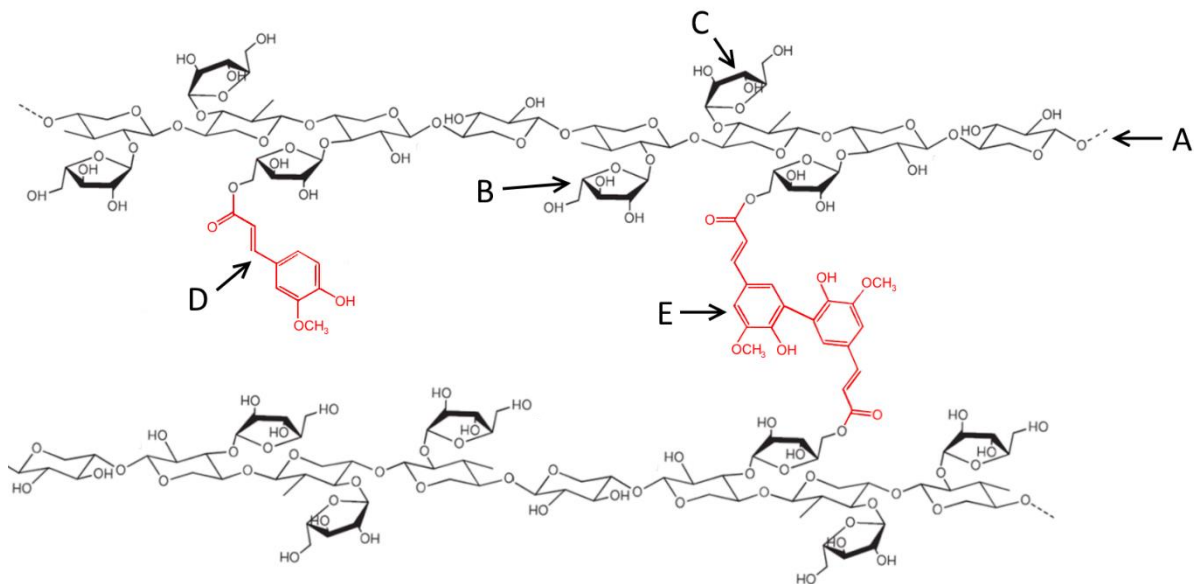


Fig. 1-4 | Vernetzung von Arabinoxylanen pflanzlicher Hemicellulose.

Arabinoxylane sind aus β-1,4-glykosidisch verknüpften D-Xylopyranose-Einheiten (A) aufgebaut. Die Seitenketten bestehen aus α-1,2-glykosidisch (B) und α-1,3-glykosidisch (C) gebundenen L-Arabinose-Einheiten. Die O-5-Position der Arabinose-Seitenkette kann durch Ferulasäuren (D, rot) verestert vorliegen [42]. Quervernetzungen zwischen den Arabinoxylanketten können durch verschiedene Di-, Tri- und Tetramere der Ferulasäure erfolgen [39]. Im Bild gezeigt ist das 5-5-Dehydrodimer der FA (E, rot).

Erst durch die FAE-katalysierte Hydrolyse der veresterten Ferulasäure und Ferulasäure-Dimere können diese quervernetzten Hetero-Polysaccharidketten für andere Zellwand-degradierende Enzyme, wie Xylanasen und Cellulasen, zugänglich gemacht werden, sodass ein effektiver Zellwandabbau möglich ist [40, 41].

1.1.2.1 FAE in Pilzen

FAE sind in der Natur weit verbreitet und wurden in Bakterien, Pilzen sowie in einigen wenigen Pflanzen und Tieren identifiziert [43, 44]. Am besten untersucht sind hierbei FAE aus Ascomycota, insbesondere aus *Aspergillus*-Arten.

Auf Grundlage der bis dato charakterisierten FAE, welche vorwiegend aus Ascomycota stammten, postulierten Crepin *et al.* 2004 ein erstes Klassifizierungsmodell für FAE. Dieses teilt FAE, basierend auf Sequenzhomologien sowie der Spezifität gegenüber den vier synthetischen Substraten Ferulasäure-Methylester, *p*-Cumarsäure-Methylester, Kaffeesäure-Methylester und Sinapinsäure-Methylester, in die vier Unterklassen A bis D ein [45]. Das Klassifikationssystem wurde in den folgenden Jahren stetig erweitert [46]. Aktuell werden FAE auf der Grundlage Deskriptor-basierter Sequenzanalysen von 356 FAE-Sequenzen in Verbindung mit pharmakophoren Modellen in zwölf Familien mit 32 Unterklassen eingeteilt [47].

Aus Basidiomycota wurden bisher erst sechs FAE isoliert und näher charakterisiert [48-53]. Interessanterweise lassen sich mit der Est1 aus *P. sapidus*, der PeFAE aus *P. eryngii* und der UmChIE aus *Ustilago maydis* gleich drei dieser FAE auf Grund von Unterschieden im Substratspektrum sowie im aktiven Zentrum (vgl. Kapitel 1.1.2.2) nicht mit den aktuellen FAE-Klassifikationssystemen beschreiben. Es ist somit offensichtlich, dass diese charakterisierten Enzyme eine neue Klassifizierung von FAE nötig machen. Grundlage hierfür ist jedoch die Charakterisierung weiterer FAE aus Basidiomycota, welche eine bisher viel zu wenig berücksichtigte Quelle für FAE darstellen. Wie verbreitet FAE in diesen Organismen sind, zeigt ein Screening von Haase-Aschoff *et al.*, in welchem 25 von 41 kultivierten Basidiomycota FAE-Aktivität zeigten [54].

1.1.2.2 3D-Struktur und katalytischer Mechanismus von FAE

FAE-Strukturmodelle stützen sich bisher im Wesentlichen auf die wenigen Röntgenstrukturanalysen von FAE aus *Aspergillus*-Arten [55, 56] sowie einiger Bakterien [57, 58]. Die Strukturen dieser bisher untersuchten FAE zeigen eine typische α/β -Hydrolase-Faltung mit der hochkonservierten katalytischen Triade. Diese Triade besteht üblicherweise aus dem Nukleophil Serin, dem Säurerest Asparaginsäure und Histidin. Bekannte Ausnahmen bilden hier die basidiomycetischen FAE Est1, PeFAE und UmChIE aus *P. sapidus*, *P. eryngii* und *U. maydis*, die als Säurerest Glutaminsäure tragen (Fig. 1-5) [48-50].

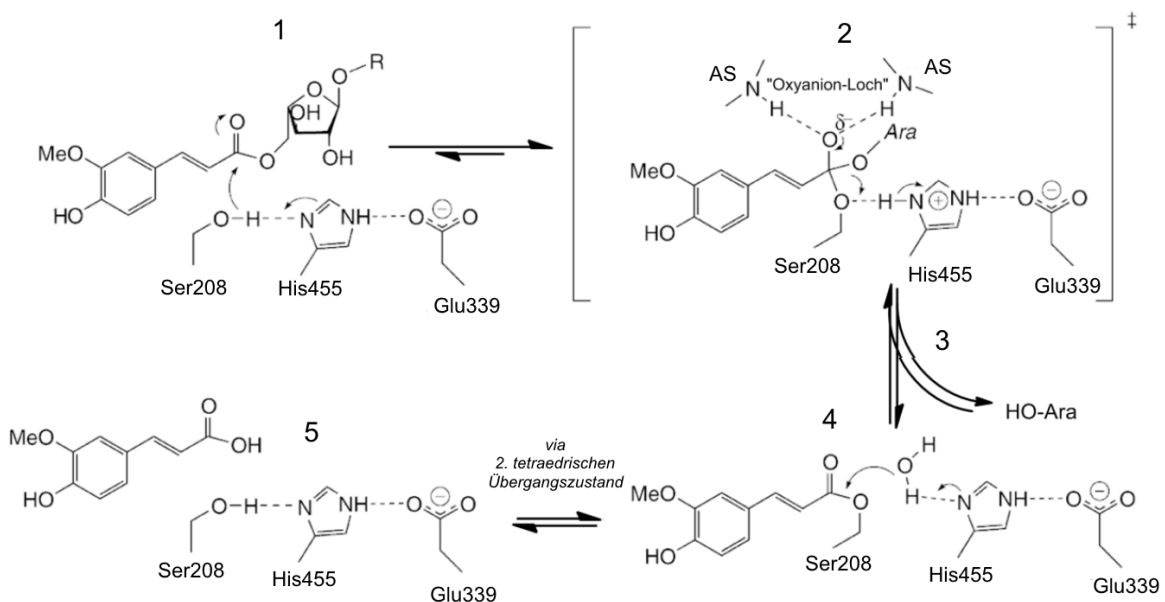


Fig. 1-5 |Schematische Darstellung der Esterase-Reaktion am Beispiel der Est1 aus *P. sapidus* (nach Prates et al., 2001).

Das Serin liegt in dem stark konservierten Pentapeptid G-X-S-X-G (X: beliebige Aminosäure) vor, das auf Grund seiner starken Drehung in Richtung des Lösungsmittels als „nukleophiler Ellenbogen“ bezeichnet wird [59]. Über das Serin erfolgt der nukleophile Angriff an den Carbonylkohlenstoff des Substrates (1). Die Substratspezifität des Enzyms ist hierbei vorwiegend von der Zimtsäuregruppe des Esters abhängig, während der Kohlenhydratanteil keine große Rolle spielt [60]. Durch den nukleophilen Angriff kommt es zur Ausbildung eines kovalenten tetraedrischen Übergangszustandes, der durch die katalytischen Reste Histidin und Asparaginsäure beziehungsweise Histidin und Glutaminsäure stabilisiert wird. Gleichzeitig wird ein „Oxyanion-Loch“ zwischen zwei NH-Gruppen des Aminosäure-Hauptstranges und

dem negativ geladenen Sauerstoff ausgebildet, welches den tetraedrischen Übergangszustand zusätzlich stabilisiert (2). Beim anschließenden Zerfall des Übergangszustandes kommt es zur Freisetzung eines Alkohols und des acylierten Serins (3). Der anschließende nukleophile Angriff am Carbonylkohlenstoff verläuft über einen weiteren tetraedrischen Übergangszustand und wird durch die Basenreaktion des katalytischen Histidins unterstützt (4). Als Nukleophil dient hierbei im Fall der Esterhydrolyse Wasser. Im Fall einer Ver- oder Umesterung reagiert ein Alkohol oder Ester mit dem Carbonylkohlenstoff. Unter Rückgewinnung des aktiven Enzyms erfolgt die Freisetzung des Produktes (5) [59, 61].

1.1.2.3 Biotechnologische Applikationen von FAE

Potentielle Anwendungen von FAE lassen sich in vier Kategorien einteilen:

1. Gewinnung von Ferulasäuren und anderen Hydroxyzimtsäuren;
2. Veresterung von Hydroxyzimtsäuren;
3. Abbau pflanzlicher Biomasse in Synergie mit anderen Enzymen;
4. Modifikation von Heteropolysacchariden durch partielle FA-Freisetzung.

Ferulasäure und verwandte Hydroxyzimtsäuren sind auf Grund ihrer beschriebenen antioxidativen, antimikrobiellen, anti-inflammatorischen Eigenschaften von hohem Interesse für die Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutische Industrie [44]. Gehalte von in pflanzlichen Zellwänden vernetzter Ferulasäure sind unter anderem in Poaceae (Süßgräser) und Rüben besonders hoch und liegen, bezogen auf das Trockengewicht, bei 0,5 bis 2 % [62]. Obwohl in pflanzlicher Biomasse vorkommende Ferulasäure die häufigste Hydroxyzimtsäure ist, sind natürlich gewonnene Ferulasäuren nur zu sehr hohen Preisen erhältlich. Insbesondere die Biotransformation von Ferulasäure zu „natürlichen Aromastoffen“, wie Vanillin und 4-Vinylgujacol [63], erfordert eine preiswerte und nach der Aromaverordnung (EG) Nr. 1334/2008 „natürliche“ Herstellung dieser Hydroxyzimtsäure. Durch eine FAE-katalysierte Freisetzung von Ferulasäure aus pflanzlicher Biomasse ist es möglich, natürliche Ferulasäure in großem Maßstab zu gewinnen. In der Industrie könnte dieser Prozess beispielsweise in Bioraffinieren im Zusammenspiel mit anderen weiter unten beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten stattfinden, um so deren Wirtschaftlichkeit zu erhöhen [64]. Da es sich bei der FAE-katalysierten Hin- und Rückreaktion um ein chemisches Gleichgewicht handelt, ist es unter bestimmten Bedingungen möglich, das Reaktionsgleichgewicht von der

Hydrolyse in Richtung der Um- beziehungsweise Veresterung zu verschieben. Durch die Veresterung von Ferulasäure und anderer Hydroxyzimtsäuren mit hydrophilen Sacchariden kann die Wasserlöslichkeit deutlich erhöht werden, sodass eine bessere Bioverfügbarkeit dieser bioaktiven Hydroxyzimtsäuren gewährleistet wird [44]. Die wenigen kommerziell erhältlichen feruloylierten Saccharide sind bisher nur zu sehr hohen Preisen erhältlich, sodass die Synthese mittels enzymatischer Veresterung insbesondere für die Feinchemie Anwendung finden könnte.

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ist ein effizienter enzymatischer Abbau pflanzlicher Biomasse zu Mono- und Disacchariden erst unter Zuhilfenahme von FAE möglich, da diese Quervernetzungen innerhalb der Lignocellulose abbauen und so den Zugang für andere Polysaccharid-abbauende Enzyme ermöglichen. Eine wichtige Anwendungsmöglichkeit von FAE besteht folglich bei der Produktion von Biokraftstoffen. Als Substrate stehen dabei insbesondere Reststoffe und Seitenströme der Industrie wie Getreidekleie, Stroh oder Holzabfälle im Vordergrund, welche bisher unzureichend genutzt werden [64].

Ein Hauptproblem bei der Papier- und Zellstoffherstellung stellt die Bleichung des dunklen Lignins dar, welche momentan chemisch unter Nutzung von abwassergefährdenden Chlorverbindungen erfolgt. Eine alternative, umweltschonendere Methode zu diesem Prozess stellt der enzymatische Abbau von Lignin und Hemicellulose dar. So konnte eine FAE aus *Aspergillus niger*, in Kombination mit Laccase und Xylanase, zur effektiven Bleichung von Weizenstrohzellstoff genutzt werden [65]. Die Backindustrie bietet für FAE ebenfalls potentielle Einsatzmöglichkeiten. Ein partieller FAE-katalysierter Abbau von Quervernetzungen zwischen Arabinoxylanen kann die Wasserbindekapazität von Teigen erhöhen und somit möglicherweise die rheologischen Eigenschaften von Teigen verbessern [40].

1.2 Heterologe Produktion von Enzymen aus Basidiomycota

Bei vielen Basidiomycota ist eine Kultivierung in Flüssigkomplexmedien möglich. Zielproteine können somit aus Kulturüberständen oder aufgeschlossenem Mycel isoliert werden. Bedingt durch das langsame Wachstum, teilweise geringe natürliche Enzym-Produktionslevel sowie der nötigen Etablierung einer Reinigungsmethode für das Zielprotein ist eine Nutzung von

Basidiomycota-Kulturen im industriellen Maßstab allerdings meist nicht wirtschaftlich [66]. Im Rahmen der modernen Biotechnologie können Protein-codierende Gene aus Basidiomycota in bestimmten Wirtsorganismen heterolog exprimiert werden. Hierbei bietet sich die Möglichkeit, das Zielprotein zu modifizieren, um strukturelle oder katalytische Eigenschaften zu ändern sowie durch Anfügen von Protein-*tags* eine einfache Aufreinigung zu ermöglichen. Die Wahl des richtigen Expressionssystems ist dabei entscheidend für hohe Ausbeuten von katalytisch aktivem Enzym sowie für die Rentabilität des Systems [67].

Prokaryotische Expressionssysteme wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* sind oft die erste Wahl bei der heterologen Expression, da sie leicht genetisch modifiziert und sehr kostengünstig kultiviert werden können. Insbesondere *E. coli* ist hierbei ein häufig genutzter Expressionswirt zur heterologen Produktion diverser Enzyme wie Oxidoreduktasen und Hydrolasen aus Basidiomyceten [68].

Strukturell komplexe eukaryotische Enzyme, bei denen posttranslationale Modifizierungen wie die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen, proteolytische Prozessierung, Glykosylierungen, Phosphorylierungen, Acetylierungen sowie Acylierung essentiell für die korrekte Proteinfaltung und katalytische Aktivität sind, können in den meisten Fällen nicht in prokaryotischen Organismen produziert werden. Bei diesen Enzymen ist die Nutzung eukaryotischer Expressionssysteme wie Hefen, filamentösen Pilzen, Insekten- oder Säugerzellkulturen notwendig [67].

Auf Grund hoher Kosten, komplexer Kultivierungsbedingungen, langer Kultivierungszeiten und relativ geringer Proteinausbeuten, sind Insekten- und Säugerzellen für die Produktion von Proteinen aus Basidiomycota nur dann geeignet, wenn eine Nutzung als therapeutisches Protein angestrebt wird und somit komplexe Glykosylierungsmuster benötigt werden [66].

Hefen und filamentöse Pilze sind die am häufigsten genutzten eukaryotischen Expressionssysteme für die Produktion pilzlicher Proteine. Diese Expressionssysteme zeichnen sich durch schnelles Zellwachstum, einfache Kultivierungsbedingungen und Wachstum auf kostengünstigen Medien aus. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die üblichen Expressionsstämme zu den GRAS-Organismen (*generally recognized as safe*) gehören und somit in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden können. Kommerzielle Systeme auf der Basis filamentöser Pilze sind bisher wenig etabliert und zeigen bei der Produktion heterologer

Proteine häufig geringe Ausbeuten [69]. Mit verschiedenen *Aspergillus*-Arten wie *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* sowie *Trichoderma reesei* konnten insbesondere lignolytische Enzyme wie Laccasen [70] und Peroxidasen [71] heterolog produziert werden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde erfolgreich für die intrazelluläre Expression eines LZ-8 Proteins [72] und eines CGL2 Lectins [73] eingesetzt, während *Pichia pastoris* vor allem für die extrazelluläre Produktion von Laccasen und ascomycetischer Phytasen genutzt wurde [66].

1.3 *Pichia pastoris* als Expressionswirt

Ein sehr gut erforschtes und weit verbreitetes eukaryotisches Expressionssystem stellt „*Pichia pastoris*“ dar. *P. pastoris*, nach aktueller taxonomischer Klassifikation *Komagataella pastoris*, ist eine Hefe aus der Abteilung der Ascomycota [74]. Nach neueren Erkenntnissen, basierend auf rRNA-Sequenzanalysen, handelt es sich bei den kommerziell vertriebenen Stämmen allerdings nicht um *Komagataella (Pichia) pastoris*, sondern um die nah verwandte und mit Standard-Hefetests nicht unterscheidbare Art *Komagataella phaffii* [75]. Trotz

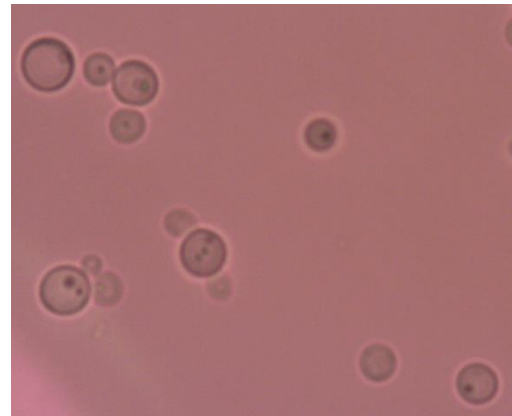


Fig. 1-5 | *P. pastoris* GS115 in Flüssigkultur; 1000x Vergrößerung

der guten Charakterisierung von Laborstämmen ist über die natürliche Verbreitung und Ökologie beider *Komagataella*-Arten relativ wenig bekannt. Da die Mehrheit der Stämme aus dem Schleimfluss beziehungsweise dem Exsudat verschiedener amerikanischer und europäischer Baumarten isoliert wurde, wird vermutet, dass es sich hierbei um das natürliche Habitat von *K. pastoris* und *K. phaffii* handelt [76]. Auf Grund der Etablierung des Namens „*Pichia pastoris*“ für das Expressionssystem wird diese Bezeichnung, entgegen der taxonomischen Klassifikation, auch im Folgenden verwendet.

Seit dem Jahr 2009 ist das Genom von *P. pastoris* komplett sequenziert. Es umfasst 9,43 Mega-Basenpaare mit einem GC-Gehalt von 41,6 %. Von den 5313 protein-codierenden Genen, die verteilt auf vier Chromosomen vorliegen, besitzen 9 % ein vorhergesagtes Sekretionssignal [77].

P. pastoris gehört zu den methylotrophen Hefen und kann somit Methanol als einzige Kohlenstoffquelle nutzen. Ein wichtiges Schlüsselenzym zur Metabolisierung des Methanols in den Peroxisomen ist die Alkoholoxidase, die in *P. pastoris* von den zwei Genloci *AOX1* und *AOX2* codiert wird. Die beiden Gene besitzen streng regulierte und unterschiedlich stark induzierbare Promotoren, wobei *AOX1* für etwa 85 % des Methanolumsatzes verantwortlich ist [78]. In Anwesenheit von Methanol kann die Alkoholoxidase bis zu 5 % der Gesamt-mRNA und 30 % des Gesamtzellproteins darstellen [79]. Das Vorhandensein eines leicht zu regulierenden und zugleich sehr stark induzierbaren Promotors ist die wesentliche Voraussetzung für die Expression von Fremdgenen. Der *AOX1*-Promotor ist aus diesem Grund bis heute der meist genutzte Promotor für die heterologe Expression in *P. pastoris*.

Wie andere Hefen kann *P. pastoris* auf einfachen, kostengünstigen Medien kultiviert werden und ist leicht genetisch zu modifizieren. Im Vergleich zum ebenfalls etablierten Hefe-Expressionswirt *S. cerevisiae* ergeben sich bei der Nutzung von *P. pastoris* einige wesentliche Vorteile. *P. pastoris* kann mit sehr hohen Zelldichten von mehr als 150 g Trockenmasse pro Liter Kulturmedium kultiviert werden, wobei die Hefe in der Lage ist, heterolog produzierte Proteine effektiv zu sekretieren und eine höhere Produktivität als *S. cerevisiae* zu erreichen. Da *P. pastoris* selbst nur wenige Proteine sekretiert, wird die Aufreinigung von Expressionsprodukten aus dem Kulturüberstand wesentlich erleichtert [80, 81]. Einen weiteren Vorteil von *P. pastoris* gegenüber *S. cerevisiae* stellt die geringere Ausprägung von Protein-Hypermannosylierungen dar, welche insbesondere bei der Produktion von Biopharmazeutika zu Problemen führen können [82].

Im Allgemeinen erfolgt die heterologe Expression von Genen in *P. pastoris* in drei Schritten:

1. Klonierung des Zielgens in einen Expressionsvektor;
2. Integration des Expressionsvektors in das *P. pastoris*-Genom;
3. Untersuchung der Transformanten auf Fremdgen-Expression.

Bezüglich des Zielgens ist vor der Klonierung eine vorhergehende Untersuchung und eventuelle Anpassung der Nukleotidsequenz ratsam. AT-reiche Regionen (*AT-cluster*) in der codierenden Sequenz können zu vorzeitigen Transkriptionsabbrüchen führen [83]. Zudem kann eine Anpassung der Nukleotidverteilung an *P. pastoris*-typische GC-Gehalte die Transkriptionseffizienz steigern. Eine unterschiedliche *Codon-usage* scheint hingegen bei *P.*

pastoris nur eine geringe Rolle bei der Expression zu spielen [84, 85]. Möglich ist, dass beschriebene höhere Zielproteinlevel im Zuge einer *Codon-usage*-Optimierung in Wirklichkeit auf einer gleichzeitigen Anpassung des GC-Gehaltes beruhen [86].

Zur Nutzung von *P. pastoris* als Expressionswirt stehen verschiedene kommerzielle Expressionssysteme mit unterschiedlichen Expressionsvektoren und *Pichia*-Stämmen zur Verfügung.

Expressionsstämme

Alle kommerziellen *Pichia*-Stämme sind Derivate des Ursprungsstammes NRRL-Y 11430, bei welchem es sich, wie bereits beschrieben, eigentlich um *K. phaffii* handelt. Es stehen zahlreiche auxotrophe Mutanten (z.B. *his4*, *ade2*, *arg4*, *lys2*) zur Verfügung (Tabelle 3-1), welche durch Transformation mit Expressionsvektoren, die sowohl den entsprechenden Selektionsmarker als auch das Zielgen tragen, komplementiert werden können.

Tab. 3-1 | Auswahl einiger *P. pastoris*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle	Erläuterung
CBS7435	WT	CBS-KNAW, Niederlande	Wildtyp-Stamm (NRRL-Y 11430)
X-33	WT	Life Technologies™	Wildtyp-Stamm (rekonstruiert aus GS115)
GS115	<i>his4</i>	Life Technologies™	Histidin-auxotroph
KM71	<i>his4, aox1::ARG4, arg4</i>	Life Technologies™	Histidin-auxotroph, Mut ^S -Phänotyp
BG09	<i>arg4::nourseo^R, Δlys2::hyg^R</i>	BioGrammatics	Arginin- und Lysin-auxotroph
PichiaPink™	<i>ade2</i>	Life Technologies™	Purin-Stoffwechselmutante, Akkumulation eines roten Farbstoffes in den Zellen
SMD1163	<i>his4 pep4 prb1</i>	Gleeson <i>et al.</i> 1998 [87]	Histidin-auxotroph, Proteinase A- und Proteinase B-defizient
SMD1165	<i>his4 prb1</i>	Gleeson <i>et al.</i> 1998 [83]	Histidin-auxotroph, Proteinase B-defizient
SMD1168	<i>his4 pep4::URA3 ura3</i>	Life Technologies™	Histidin-auxotroph, Proteinase A-defizient
SMD1168H	<i>pep4</i>	Life Technologies™	Proteinase A-defizient
SuperMan5	<i>och1::pGAPTr α 1,2-mannosidase</i>	BioGrammatics	Mannosyltransferase-defizient, Insertion einer α-1,2-Mannosidase

Insbesondere im Kulturmedium von Fermenter-Kulturen können hohe Peptidaseaktivitäten vorherrschen, welche aus der Zellyse eines kleinen Teils der unter hohen Zelldichten kultivierten *P. pastoris*-Kulturen resultieren. Durch den Einsatz Peptidase-defizienter Stämme kann die Peptidaseaktivität im Kulturmedium verringert und somit die Degradation einiger heterolog exprimierter, sekretierter Proteine reduziert werden. Meist fehlt in diesen Stämmen die vakuoläre Aspartatpeptidase Pep4 (Proteinase A), die weitere vakuoläre Peptidasen wie die Carboxypeptidase Prc1 (Carboxypeptidase Y) und die Serinpeptidase Prb1 (Proteinase B) aktivieren kann. Nachteile Peptidase-defizienter Stämme können schwächeres Wachstum, geringere Vitalität und niedrigere Transformationseffizienz sein [88].

Pichia-Stämme mit Disruptionen im *AOX1*-Gen sind allein auf die Nutzung des schwächeren *AOX2*-Gens zur Produktion der Alkoholoxidase angewiesen und zeichnen sich durch ein langsames Wachstum auf Methanol aus (Mut^S-Phänotyp). Bei der Expression einiger Gene, wie beispielsweise einem A33 scFv Antikörperfragment oder dem humanen Wachstumshormon, konnte mit diesen Mut^S-Stämmen eine höhere Genexpression erzielt werden [89, 90].

Seit wenigen Jahren sind kommerzielle *Pichia*-Stämme erhältlich, bei denen der Glykosylierungs-Biosyntheseweg so verändert wurde, dass die synthetisierten Proteine Säugetier-ähnlichere N-Glykosylierungsmuster tragen. Hierfür wurde der Hefe-spezifische Glykosylierungsweg durch Ausknocken von Mannosyltransferasen und gleichzeitigem Einbringen verschiedener Säuger-spezifischen Mannosidasen und Glykosyltransferasen verändert [81]. Diese Stämme sind insbesondere bei der Produktion von Biopharmazeutika relevant, bei denen nicht-humane Glykosylierungsmuster wie die hefe-typischen Hypermannosylierungen, zur mangelnden Wirksamkeit oder Immunogenität des heterolog produzierten, therapeutischen Proteins führen können [82].

Basidiomycetische Gene wurden bisher vorwiegend in den Stämmen GS115, KM71, X33 und dem Peptidase-defizienten Stamm SMD1168 exprimiert. Welcher Expressionsstamm sich bei der Expression am besten eignet, ist vom zu exprimierenden Gen abhängig. Beispielsweise waren die Enzymlevel einer im Peptidase-defizienten Stamm SMD1168 produzierten, extrazellulären Acetylxylan-Esterase aus *Phanerochaete chrysosporium* höher als in den Expressionstämmen X33 und GS115 [91]. Im Gegensatz dazu konnten Zhang *et al.* unter

Nutzung des Stammes GS115 etwa 25 bis 30 % höhere Produktionslevel einer extrazellulären Laccase aus *P. ostreatus*, im Vergleich zu den Stämmen SMD1168 und KM71, erzielen [92].

Promotoren

Zur Steuerung der heterologen Genexpression in *P. pastoris* können sowohl konstitutive als auch induzierbare Promotoren genutzt werden. Induzierbare Promotoren wie der Methanol-induzierbare Alkoholoxidase-Promotor (P_{AOX1}) werden unter anderem dann genutzt, wenn das Genprodukt potentiell schädlich für den Wirtsorganismus ist. Hierbei erfolgt die Kultivierung meist in zwei Stufen. Bei Verwendung des P_{AOX1} werden die Zellen in einer ersten Kultivierungsphase zu hohen Zelldichten herangezogen. Dabei werden den P_{AOX1} reprimierende Kohlenstoffquellen wie Glucose oder Glycerol genutzt, um eine Produktion des heterologen Proteins zu verhindern. In der zweiten Phase erfolgt der Wechsel auf methanolhaltiges Medium, um die Genexpression zu starten. Üblicherweise werden Methanolkonzentrationen zwischen einem halben und zwei Volumenprozent verwendet. Wichtig ist in dieser Phase eine ausreichende Luftzufuhr durch Nutzung von Schikanekolben oder Fermentern, da es bei der Verstoffwechslung des Methanol leicht zu einer Limitierung von Sauerstoff kommen kann [93].

Konstitutive Promotoren, wie der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Promotor (P_{GAP}), können genutzt werden, wenn das Genprodukt weniger kritisch für den Wirtszellstoffwechsel ist. Einen Vorteil bietet in diesem Fall die erleichterte Kulturführung, da auf einen Wechsel des Mediums verzichtet werden kann. Unter Nutzung des P_{GAP} konnten im Vergleich zum P_{AOX1} häufig ähnliche Expressionslevel erreicht werden [94]. Dennoch wurden die höchsten heterologen Produktionsraten in *P. pastoris* für intrazelluläre (Hydroxynitril-Lyase aus *Hevea brasiliensis*; 22 g L⁻¹) und sekretierte (Kollagen aus *Rattus norvegicus*; 14,8 g L⁻¹) Proteine mit dem P_{AOX1} erzielt [95, 96]. Auch für die Produktion rekombinanter Enzyme aus Basidiomyceten wurden bisher ausschließlich P_{AOX1} und P_{GAP} verwendet (vgl. Kapitel 1.4). Umfassende Vergleichsstudien zur Nutzung verschiedener Promotoren für die Expression eines basidiomycetischen Gens wurden allerdings bis *dato* noch nicht durchgeführt.

Neben den beiden etablierten Promotoren P_{AOX1} und P_{GAP} gibt es zahlreiche weitere Promotoren, die in einigen Fällen erfolgreich für die heterologe Produktion von Proteinen

genutzt wurden. Beispiele hierfür sind der Methanol- oder Methylamin-induzierbare Formaldehyd-Dehydrogenase-Promotor (P_{FLD1}), der Methanol-induzierbare peroxisomale Matrixprotein-Promotor (P_{PEX8}), der konstitutive Enolase-Promotor (P_{ENO1}) oder der konstitutive GTPase-Promotor (P_{YPT1}) [97].

In Ergänzung zur Verwendung natürlich vorkommender Promotoren gibt es Versuche, die Transkriptionseffizienz durch Nutzung synthetischer Promotoren zu steigern. Als Ausgangspunkt für die Konstruktion synthetischer Promotoren dienen meist der P_{AOX1} sowie der P_{GAP} , welche sowohl durch ungerichtete Mutationen als auch durch gezielte Insertionen und Deletionen modifiziert werden. Neben einer höheren Proteinexpression sind weitere Ziele der Konstruktion dieser Promotoren unter anderem eine bessere Proteinfaltung, sowie eine angepasste Genregulation [80]. Beispielsweise verwendeten Ruth *et al.* modifizierte P_{AOX1} -Varianten zur Expression von Trypsinogen aus *Sus scrofa* in *P. pastoris*. Die Trypsinogen-Produktion konnte mit einer Promotor-Variante auf 218 % im Vergleich zum Wildtyppromotor gesteigert werden, während eine andere P_{AOX1} -Variante auch ohne Methanolinduktion 75 % Proteinausbeute im Vergleich zum Methanol-induzierten Wildtyp-Promotor zeigte [98].

Sekretionssignale

Der große Vorteil der erleichterten Protein-Aufreinigung macht die Sekretion von heterolog produzierten Proteinen in *P. pastoris* erstrebenswert. Der Transport über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat im Zuge der Proteinsekretion ist zudem unabdingbar für die Durchführung von posttranslationalen Protein-Modifikationen. Dementsprechend ist die gezielte Sekretion vor allem dann essentiell, wenn das native Protein ebenfalls den ER-Golgi-Transportweg durchläuft und posttranslationale Modifikationen wichtig für die Proteinfunktion sind.

Die von *S. cerevisiae* abstammende α -Faktor-Signalsequenz ist die meistgenutzte Signalsequenz bei der heterologen Expression in *P. pastoris*. Die Sequenz codiert für ein 89 Aminosäuren langes Präpro-Peptid, welches am N-Terminus des heterolog produzierten Proteins liegt [99]. Nach der postrationalen Translokation des Fusionsproteins in das ER erfolgt die schrittweise Abspaltung des Präpro-Peptides. Zuerst wird das Prä-Peptid (19 Aminosäuren) von Signalpeptidasen im ER entfernt. Im Golgi-Apparat erfolgt anschließend die

Abspaltung des Pro-Peptides (66 Aminosäuren) durch die membrangebundene Kex2 Serin-Endopeptidase [100] sowie die Abtrennung verbleibender Glutamin-Alanin-Repeats (4 AS) durch die membranständige Dipeptidyl-Aminopeptidase Ste13 [101]. Nach der proteolytischen Prozessierung wird das heterolog produzierte Protein über sekretorische Vesikel aus der Zelle transportiert.

Trotz weiterer Optimierungsmöglichkeiten wie Nutzung von *Spacer*-Sequenzen zur besseren Prozessierung der Signalpeptide [102] oder Modifikationen der Signalsequenz [103] ist die Sekretion mit Hilfe der α -Faktor-Signalsequenz nicht immer erfolgreich [104]. In einigen Fällen war es unter Nutzung anderer Signalsequenzen dennoch möglich, das Zielprotein zu sekretieren. Als alternative Sekretionssignale wurden unter anderem die aus *P. pastoris* stammende Signalsequenz der sauren Phosphatase (*PHO1*), die von *S. cerevisiae* stammenden Signalsequenz der Invertase (*SUC2*) sowie die Signalsequenz des Phytohämagglutinin (*PHA-E*) aus *Phaseolus vulgaris* genutzt [97]. Weiterhin war es in einigen Fällen möglich, das native Sekretionssignal des Zielgens erfolgreich als Sekretionssignal zu verwenden [105, 106]. Ein Beispiel hierfür ist die basidiomycetische Laccase lac4 aus *P. sajor-caju*, welche in *P. pastoris* mit Hilfe ihrer nativen Signalsequenz, nicht aber mit der α -Faktor-Signalsequenz sekretiert werden konnte [107].

Da die Effektivität einzelner Signalsequenzen für bestimmte Proteine nicht vorhergesagt werden kann, sind oft *trial-and-error*-Experimente unter Nutzung unterschiedlicher Signalpeptide nötig. Dennoch ist die extrazelluläre Produktion von Enzymen nicht in jedem Fall möglich. Dies betrifft insbesondere Enzyme, die in ihrem nativen Wirt ebenfalls intrazellulär vorliegen [104]. Die bis dato heterolog produzierten basidiomycetischen Enzyme werden in ihren Ursprungswirt fast ausnahmslos sekretiert und können in den meisten Fällen problemlos mit Hilfe der α -Faktor-Signalsequenz oder der nativen Signalsequenz von *P. pastoris* sekretiert werden. Eines der wenigen Beispiele für ein intrazelluläres basidiomycetisches Enzym, welches erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert wurde, ist die X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase aus *Flammulina velutipes*. Trotz Verwendung der α -Faktor-Signalsequenz konnte diese rekombinante Peptidase nicht sekretiert werden und lag in *P. pastoris* intrazellulär vor [108].

Ein Faktor, der ebenfalls großen Einfluss auf die Sekretion haben kann, ist die Kultivierungstemperatur. Im Falle einer erfolgreichen Sekretion wurde oftmals gezeigt, dass eine Reduzierung der Kultivierungstemperatur von 28 ° bis 30 ° C auf 15 ° bis 20 °C, zusätzlich zu verringertem Proteinfaltungstress [109, 110], zu einer erhöhten Stabilität der sekretierten Enzyme und somit zu einer deutlich höheren Proteinausbeute führen kann [111].

Expressionsvektoren

Pichia-Expressionsvektoren sind üblicherweise *Shuttle*-Vektoren, die in *E. coli* vermehrt und anschließend über homologe Rekombination in das Genom von *P. pastoris* integriert werden. Neben verschiedenen Promotoren, Signalsequenzen und Selektionsmarkern (Tabelle 3-2) unterscheiden sich die Expressionsvektoren in den Restriktionsschnittstellen ihrer *multiple cloning sites* (MCS), in welche die Klonierung des Zielgens erfolgt. Die anschließende Integration der linearisierten Expressionsvektoren in das *Pichia*-Genom erfolgt gerichtet über homologe Rekombination.

Tab. 3-2 | Übersicht über die am häufigsten verwendeten *P. pastoris*-Expressionsvektoren.

Vektor	Promotor	Signalsequenz	Hefe-Selektionsmarker	Quelle
pAO815	<i>P_{AOX1}</i>	-	<i>HIS4</i>	Life Technologies™
pHIL-D2	<i>P_{AOX1}</i>	-	<i>HIS4</i>	Life Technologies™
pPIC3.5	<i>P_{AOX1}</i>	-	<i>HIS4</i>	Life Technologies™
pPIC3.5K	<i>P_{AOX1}</i>	-	<i>HIS4</i> , Geneticin-Resistenzgen	Life Technologies™
pPIC9	<i>P_{AOX1}</i>	α-Faktor	<i>HIS4</i>	Life Technologies™
pPIC9K	<i>P_{AOX1}</i>	α-Faktor	<i>HIS4</i> , Geneticin-Resistenzgen	Life Technologies™
pPICZα A, B, & C	<i>P_{AOX1}</i>	α-Faktor	Zeocin-Resistenzgen	Life Technologies™
pGAPZα A, B, & C	<i>P_{GAP}</i>	α-Faktor	Zeocin-Resistenzgen	Life Technologies™
pHIL-S1	<i>P_{AOX1}</i>	<i>PHO1</i>	<i>HIS4</i>	Life Technologies™

Einige Vektoren verfügen über Antibiotika-Resistenzgene (z.B. Geneticin-Resistenzgen), mit deren Hilfe, über Plattentests mit steigenden Antibiotika-Konzentrationen, eine einfache

Selektion auf multiple Expressionsvektor-Insertionen in das Genom möglich ist. Diese multiplen Insertionen führen zu einer entsprechend erhöhten Kopienzahl des Zielgens im *Pichia*-Genom und resultieren oftmals in einer höheren Zielprotein-Produktion [112]. In einigen Fällen war auch die Steigerung der Enzymausbeute durch die Co-Expression von Chaperon-codierenden Vektoren möglich [113, 114].

1.4 Industrielle Anwendung von *Pichia pastoris* und Potentiale zur Nutzung basidiomycetischer Enzyme

Auf Grund der Fähigkeit Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen, wurde *P. pastoris* bereits in den 1970er Jahren zur Produktion von Tierfutter großtechnisch in Fermentern kultiviert. Als Ausgangsmaterial diente dabei Methan aus der Erdölindustrie, das kostengünstig zu Methanol umgesetzt werden konnte. Infolge der Einführung kommerzieller Expressions-Kits Anfang der 1990er Jahre und der daraus resultierenden Etablierung von *P. pastoris* als Expressionswirt in der Forschung wurden zunehmend biotechnologisch relevante Proteine kommerziell produziert [115].

Unter den bislang mehr als 1000 verschiedenen in *P. pastoris* heterolog produzierten Enzymen [116], finden sich laut dem *National Center for Biotechnology Information* (Stand August 2015; exklusive der in dieser Arbeit bearbeiteten Enzyme) auch 75 Enzyme basidiomycetischen Ursprungs. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Oxidoreduktasen (EC 1) und Hydrolasen (EC 3). Neben 51 Laccasen (EC 1.10.3.2) und elf Glycosidasen (EC 3.2.1), wurden vier Esterasen (EC 3.1), drei Cellobiose-Dehydrogenasen (1.1.99.18), zwei Peptidasen (EC 3.4) sowie je eine Mangan-Peroxidase (EC 1.11.1.13), Pyranose-Dehydrogenase (EC 1.1.99.29), Transferase (EC 2) und Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4) heterolog produziert. In 69 Fällen wurden die Enzyme dabei unter Nutzung des methanol-induzierbaren P_{AOX1} exprimiert, während der P_{GAP} nur sechsmal eingesetzt wurde. Trotz seiner Vorteile bezüglich der Expression birgt der P_{AOX1} im Hinblick auf die industrielle Anwendung allerdings einige Nachteile. Zum einen geht durch Lagerung größerer Mengen Methanol eine nicht unerhebliche Brandgefahr aus. Zum anderen sind Methanol-Kontaminationen wegen dessen Humantoxizität für Anwendungen in der Lebensmittelindustrie unerwünscht [104, 117]. Bei der Nutzung von heterolog produzierten Enzymen muss somit entweder deren Reinheit sichergestellt sein oder bei der Expression auf

Promotoren (vgl. Kapitel 1.3) zurückgegriffen werden, die nicht methanol-induziert sind. Eine interessante Alternative für industrielle Anwendungen wird in einem US-Patent von Takagi *et al.* beschrieben [118]. Dabei wird das Zielgen zusammen mit einem für den Transkriptionsfaktor Prm1 codierenden Gen co-exprimiert. Prm1 ist ein *Enhancer* und bewirkt die Aktivierung des P_{AOX1} auch ohne die Induktion durch Methanol. Somit ist auf diesem Weg eine methanolfreie Zielgen-Expression in *P. pastoris* möglich.

Wie anhand der oben genannten Statistik ersichtlich ist, hat sich *P. pastoris* zu einem Standard-Expressionswirt für Laccasen entwickelt. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die starke Glycosylierung sekretierter Laccasen, bei welchen der Kohlenhydratanteil in Pilzen bis zu 30 % des Molekulargewichtes betragen kann [119]. Bei der Produktion von rekombinanten Laccasen in *P. pastoris* werden oft sehr hohe Enzymausbeuten erzielt. So wies der Kulturüberstand einer von Hong *et al.* produzierten Laccase aus *Trametes* sp. eine Aktivität von $8,3 \times 10^4 \text{ U l}^{-1}$ auf [120]. Ebenfalls hohe Produktionsmengen von 8000 U l^{-1} erreichten Wang *et al.* bei der Produktion einer Laccase aus *Coprinopsis cinerea* [52]. Für Laccasen bietet sich ein sehr breites Anwendungsspektrum, das unterer anderem die Bleichung von Textilien, die Degradation von Umweltkontaminanten, die Oxidation von Polyphenolen in Korken zur Verhinderung des Korkgeschmackes sowie die Beeinflussung der Teig rheologie durch Modifikation von Polysacchariden beinhaltet [119, 121]. Untersuchungen der in *P. pastoris* heterolog produzierten basidiomycetischen Laccasen bezüglich ihrer industriellen Anwendung richten sich bisher hauptsächlich auf den Abbau verschiedener synthetischer Farbstoffe. Als gesundheitsschädlich und umweltgefährdend eingestufte Azo-, Alizarin- und Triphenylmethanfarbstoffe werden beispielsweise beim Färben von Wachsen, in der Drucktechnik, sowie bei der Textilfärbung von Nylon, Wolle und Seide genutzt. In diversen Versuchen konnte gezeigt werden, dass zahlreiche dieser Farbstoffe mittels rekombinanter Laccasen abgebaut werden können [122, 123]. Eine mögliche Anwendungsmöglichkeit dieser Laccasen ergibt sich somit bei der Reinigung farbstoffbelasteter Abwässer der zuvor genannten Industrien. Neben der Reinigung von Abwässern können Laccasen bei der Delignifizierung zur Bleichung von Zellstoff eingesetzt werden. Ein Vorteil von *P. pastoris* gegenüber filamentösen Pilzen ist diesbezüglich, dass die Hefe selbst keine Cellulose-abbauenden Enzyme produziert, sodass rekombinante Laccasen ohne weitere Reinigungsschritte genutzt werden können [124].

Der Abbau pflanzlicher Biomasse zu fermentierbaren Kohlenstoffen für die Biokraftstoffproduktion verläuft, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, über synergistische Reaktionen verschiedener Enzymklassen. In *P. pastoris* synthetisierte basidiomycetische Glycosidasen, wie Xylanasen [125, 126], Arabinanasen [127], Arabinofuranosidasen [128] und β -Glucosidasen [129], können Polysaccharide pflanzlicher Zellwände abbauen. Unterstützend können hierbei rekombinante hydrolysierende Esterasen wirken. Ferulasäure-Esterasen (vgl. Kapitel 1.1.2.3) können Quervernetzungen zwischen dem Lignocellulose-Netzwerk hydrolysieren, während Acetylxylan-Esterasen [91, 130] die Zugänglichkeit von Xylanasen erhöhen. Auch den in *P. pastoris* heterolog produzierten Cellobiose-Dehydrogenasen [131, 132] und Pyranose-Dehydrogenasen [133] wird eine Rolle am Lignocellulose-Abbau zugeschrieben. Im Zusammenhang mit der Nutzung erneuerbarer Ressourcen ist eine zukünftige Applikation dieser Enzyme in Bioraffinerien denkbar.

Wie *P. pastoris* gelten auch alle Speisepilze per Definition als GRAS-Organismen, was grundsätzlich eine Anwendung entsprechender rekombinant produzierter Enzyme im Lebensmittelbereich ermöglicht. Zahlreiche potentielle Applikationen der in *P. pastoris* heterolog produzierte Proteine in diversen Bereichen der Lebensmittelindustrie, wie der Milch-, Käse- und Getränkeherstellung, Backindustrie, Aromastoffproduktion sowie stärkeverarbeitenden Industrie, wurden von Spohner *et al.* aufgelistet [117]. Viele der beschriebenen Enzyme wurden bereits aus Basidiomycota charakterisiert. Allerdings wurden mit Ausnahme der oben genannten Laccasen, Glycosidasen, Peptidasen und Ferulasäure-Esterasen bisher keine lebensmitteltechnisch relevanten rekombinanten basidiomycetischen Enzyme publiziert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Basidiomycota stellen eine bisher unzureichend genutzte Enzymquelle mit großem Potential für die medizinische und industrielle Biotechnologie dar. Geringe natürliche Enzym-Produktionslevel, langsames Wachstum von Basidiomycota-Kulturen sowie das Fehlen einfacher und schneller Enzym-Reinigungsmethoden erfordern die heterologe Produktion dieser Enzyme in geeigneten Wirtsorganismen. Im Hinblick darauf, dass basidiomycetische Enzyme häufig sekretiert werden und zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterliegen, ist die heterologe Produktion in einem eukaryotischen Expressionswirt besonders erfolgsversprechend.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene biotechnologisch relevante Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* heterolog produziert werden. Untersucht werden sollte dabei, ob sich die Hefe *P. pastoris* als Expressionswirt eignet. Zielenzyme waren mit der Lipoxygenase (Lox1) sowie der Ferulasäure-Esterase (Est1), Vertreter aus Enzymfamilien, welche bisher nicht oder selten heterolog in *P. pastoris* produziert wurden. Neben der heterologen Produktion, Aufreinigung und Charakterisierung der Enzyme sollten weiterhin Kultivierungsparameter optimiert werden, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Zudem sollten in Applikationstests potentielle Anwendungen der heterologen Enzyme getestet werden.

2. Vorwort zur Publikation „Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*“

Auf der Suche nach Biokatalysatoren, die bei der Gewinnung natürlicher Aromastoffe genutzt werden können, zeigte sich in Vorarbeiten, dass das Sesquiterpen Valencen unter Verwendung von Lyophilisat des Pilzes *P. sapidus* zum wertvollen Grapefruit-Aromastoff Nootkaton umgewandelt wird. Das verantwortliche Enzym wurde isoliert und als Lipoxygenase (Lox1) identifiziert (vgl. Kapitel 1.1.1.1). Über die gefischte Gensequenz war schließlich die Expression und teilweise Charakterisierung der Lox1 in *E. coli* möglich [134]. Trotz der Nutzung von Chaperonen lag ein großer Teil des in *E. coli* synthetisierten, rekombinanten Enzyms in *inclusion bodies* vor. Zudem ist eine aufreinigungserleichternde Sekretion mit Hilfe dieses Wirtsorganismus nicht möglich.

Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Publikationen zur Produktion von basidiomycetischen Lipoxygenasen in *P. pastoris* vorlagen, galt es in der vorliegenden Arbeit zu klären, ob sich *P. pastoris* als Eukaryot für die Expression von Lox1 eignet (vgl. Kapitel 1.2). Eine Rolle bei der Wahl des Expresssystems spielte zudem, dass *E. coli* als Wirt für die heterologe Enzymproduktion, insbesondere im Lebensmittelbereich, Vorbehalten unterliegt und somit eine geringere Akzeptanz im Vergleich zur Hefe erfährt.

Ziel der Arbeit war es, die Lox1 heterolog zu produzieren, das rekombinante Enzym biochemisch zu charakterisieren und mit dem in *E. coli* produzierten Analogon zu vergleichen. Zur Erleichterung der Aufreinigung wurde, wenn möglich, eine Sekretion der rekombinanten Lox1 angestrebt. Auf Grund eines möglicherweise negativen Einflusses der N-terminalen β -*barrel*-Strukturen (vgl. Kapitel 1.1.1.2) auf die Proteinsekretion sollte zudem eine N-terminale Deletionsmutante konstruiert werden.

3. Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*

Reproduced from *Protein Expression and Purification*, **2014**, 95, 233-239 with permission
from Elsevier.

Highlights

- Functional expression of *Pleurotus sapidus* lipoxygenase (Lox1) in *Pichia pastoris*
- Secretion of Lox1 using different well-proven expression vector constructs failed
- Replacing the α -factor signal sequence by a second Kozak sequence resulted in protein expression
- Wild-type and recombinant enzyme showed similar v_{\max} (111 U mg⁻¹)

Abstract

The first heterologous expression of an iron-containing lipoxygenase from a basidiomycete in *Pichia pastoris* is reported. Five different expression constructs of the lipoxygenase gene *LOX1* from *Pleurotus sapidus* were cloned and successfully transferred into *P. pastoris* SMD1168, but only one pPIC9K vector construct was functionally expressed. In this construct the vector-provided α -factor signal sequence was replaced by insertion of a second Kozak sequence between the signal sequence and the *LOX1* gene. His⁺ transformants were screened for their level of resistance to geneticin (G418). Lox1 was expressed under different culture conditions and purified using the N-terminal His-tag. Relative enzyme activity increased significantly 48 hours after methanol induction and was highest with 2 ml l⁻¹ inducer. The recombinant enzyme showed an optimal lipoxygenase activity at pH 7 and 30 °C to 35 °C and a v_{\max} like the wild-type enzyme.

Keywords:

Lipoxygenase; Functional expression; Kozak sequence; *Pleurotus sapidus*; *Pichia pastoris*

3.1. Introduction

Saprobiotic basidiomycetes attract increasing interest for biotechnological applications, as they secrete a broad spectrum of different enzymes, such as peroxidases, laccases [135], esterases [54] and peptidases [6], capable of digesting complex organic matter. Among the promising enzymes that have been characterised in basidiomycetes are lipoxygenases, a family of non-heme iron-containing enzymes found ubiquitously in eukaryotic organisms. These enzymes catalyse the regio- and stereo-specific introduction of oxygen into the 1,4-pentadiene moiety of (Z)-polyunsaturated fatty acids [9]. In food applications lipoxygenases have been suggested for the bleaching of dough [136] and whey [33] or for improving the rheologic properties of dough [137-139].

Recently, we described the cloning and functional expression of a lipoxygenase (Lox1) from *Pleurotus sapidus* in *E. coli* [134]. This enzyme surprisingly accepted mono- and sesquiterpenes as substrates too [21]. However, most of the heterologous Lox1 formed inclusion bodies in the bacterial expression system. As an alternative, the expression by *Pichia pastoris*, a yeast frequently used as heterologous host for a wide variety of recombinant proteins [79], was pursued. Beside its advantage of simple genetic modification, easy cultivation and growth to high-cell densities, *P. pastoris* is able to perform eukaryotic post-translational modifications such as proteolytic processing, folding, disulfide bond formation and glycosylation [79, 140]. Although heterologous expression of lipoxygenases from potato [141], tomato [142], pig [143], rat [144] and ascomycetes [145, 146] have been described in *P. pastoris*, no functional expression of a iron-containing lipoxygenase from a basidiomycete in *Pichia* has become known.

To learn more about the reasons for the numerous failures to functionally express basidiomycete genes in *Pichia* systems, the present study combined sequences coding for His-tagged and non-tagged proteins with and without the α -factor signal peptide. One out of several approaches to heterologously express the lipoxygenase Lox1 from *P. sapidus* in *P. pastoris* using the expression vector pPIC9K was eventually successful. To our knowledge, this is the first report on the functional expression of an iron-containing lipoxygenase from a basidiomycete in *P. pastoris*.

3.2. Methods

3.2.1. Materials

Chemicals used were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Steinheim, Germany), and Merck (Darmstadt, Germany). PCR primers were from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). The *P. pastoris* expression vectors were from Invitrogen (Karlsruhe, Germany).

3.2.2. Strains and culture media

Escherichia coli bacterial strain TOP10 (Invitrogen) was used as host for vector propagation and cultured in Luria-Bertani broth (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 10 g l⁻¹ sodium chloride) supplemented with ampicillin (50 µg ml⁻¹) or zeocin (25 µg ml⁻¹) (Invitrogen) when appropriate. *P. pastoris* yeast strain SMD1168 (Invitrogen) was propagated on YPD medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 20 g l⁻¹ glucose).

3.2.3. Construction of the lipoxygenase expression vector and transformation of *P. pastoris*

The *LOX1* gene was amplified by PCR using pColdValOx vector [134] as a template for the forward and reverse primers (Table 3-1). In this study two common expression vectors, *i. e.* pPIC9K and pPICZαA (for further information, including vector maps, see the Invitrogen *Multi-Copy Pichia Expression Kit* and Invitrogen *EasySelect™ Pichia Expression Kit* manuals), containing an *AOX1* promoter were used to generate five different expression constructs with and without an α -factor prepro signal sequence and with or without His-tag (Table 3-2). The PCR was carried out using *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) and the Master Cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR program was performed as follows: 95 °C 3 min; 35x – 95 °C 30 sec; 54 °C 30 sec; 72 °C 90 sec; 72 °C 10 min; storage at 4 °C. After electrophoretic separation of the PCR amplification products and extraction from agarose gel (1.5 %) using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), the PCR amplification products and the plasmids were digested with appropriate restriction enzymes (Thermo Scientific), according to Table 3-2. The following ligation using T4 ligase (Thermo Scientific) resulted in the expression vectors pPIC9K-*LOX1*, pPIC9K-*HIS-LOX1*,

pPIC9K-KHIS-LOX1, pPIC9K-HIS-LOX1 Δ 1_459 and pPICZ α A-HIS-LOX1 which were transformed in *E. coli* TOP10 using a standard protocol [147].

Tab. 3-1 | Nucleotide sequence of primers used for PCR amplification

Primers	Orientation	Sequence (5'-3')
PsLOX1-F1	sense	TTTCCTAGGGTCCACAACATATCG
PsLOX1-F2	sense	TTTCCTAGGCATCATCATCATCATCATGTCCACAACATATCG
PsLOX1-F3	sense	TTTCCTAGGACCATGGCGCATCATCATCATCATCATGTCCACAACATATCG
PsLOX1-F4	sense	TTTCCTAGGCATCATCATCATCATCATATAAAGACCAGGGATGG
PsLOX1-F5	sense	TTTCTGAGAAAAGACATCATCATCATCATCATGTCCACAACATATCG
PsLOX1-R1	antisense	TTTGCGGCCGCTCAAATTACAATCGCATTGCG

Tab. 3-2 | Vector constructs used for transformation of *P. pastoris* SMD1168

Construct	Primer pairs for amplification	Vector site	α -factor signal sequence	N-terminal 6 x His-tag
pPIC9K-LOX1	PsLOX1-F1/PsLOX1-R1	<i>AvrII/NotI</i>	+	-
pPIC9K-HIS-LOX1	PsLOX1-F2/PsLOX1-R1	<i>AvrII/NotI</i>	+	+
pPIC9K-KHIS-LOX1	PsLOX1-F3/PsLOX1-R1	<i>AvrII/NotI</i>	-	+
pPIC9K-HIS-LOX1 Δ 1_459	PsLOX1-F4/PsLOX1-R1	<i>AvrII/NotI</i>	+	+
pPICZ α A-HIS-LOX1	PsLOX1-F5/PsLOX1-R1	<i>XhoI/NotI</i>	+	+

“+”: sequence included

“-”: sequence absent

After propagation of the vectors in *E. coli* TOP10, the vectors were isolated, and extended hot shot DNA sequencing (SeqLab, Göttingen) was performed to verify the plasmid constructs. *P. pastoris* SMD1168 was transformed with *SacI* linearised vectors by electroporation (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad, Munich, Germany) according to Lin-Cereghino [148].

The linearised empty vector was transformed likewise and served as a negative control for Lox1 expression. The selection of transformants was performed according to the Invitrogen manual. Transformants containing the pPIC9K vector constructs were screened in a two-step selection process. Selection of His⁺ transformants was done on histidine deficient MD plates (20 g l⁻¹ glucose, 20 g l⁻¹ agar, 13.4 g l⁻¹ YNB, 400 µg l⁻¹ biotin, 50 mg l⁻¹ each of L-glutamic acid, L-lysine, L-leucine and L isoleucin). His⁺ transformants were screened in a second selection step for their level of resistance to different geneticin (G418) concentrations (1 mg ml⁻¹, 2 mg ml⁻¹, 4 mg ml⁻¹) on YPD-G418 plates. Transformants containing pPICZαA vector constructs were selected on MD plates containing 100 mg ml⁻¹ zeocin. The positive transformants were confirmed by PCR and extended hot shot DNA sequencing.

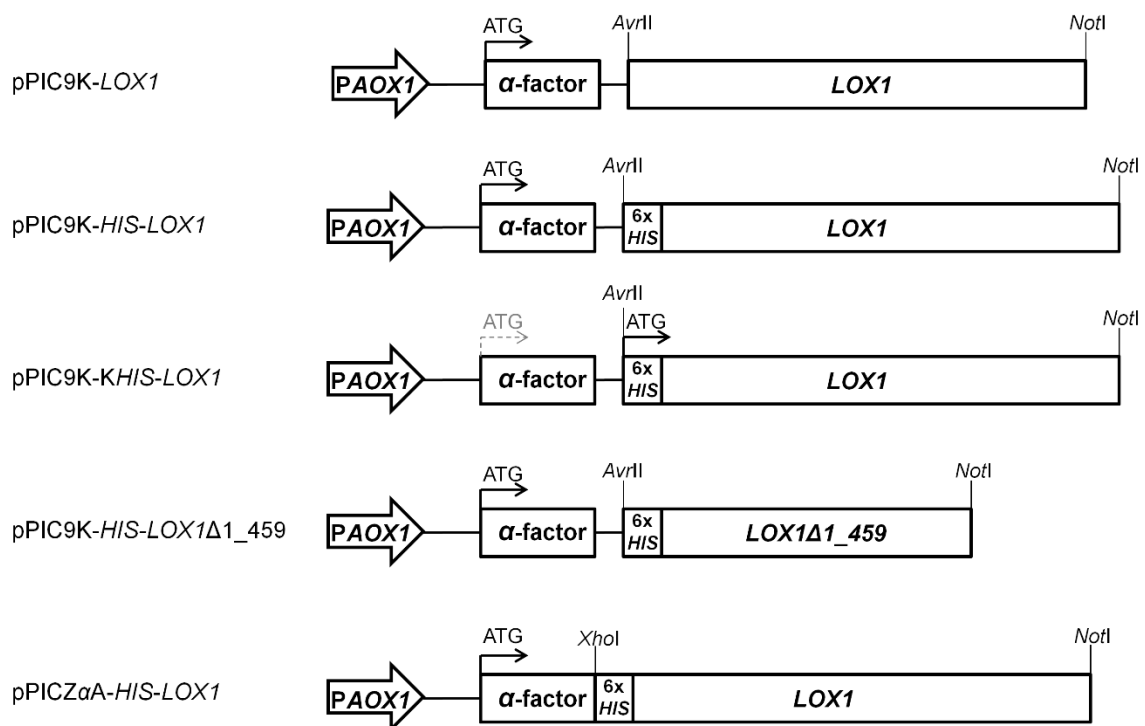


Fig. 3-1 | Schematic diagram of the expression vector constructs.

The vectors pPIC9K and pPICZαA were used to construct five different expression plasmids. The restriction enzymes used for cloning are indicated above each construct. PAOX1, alcohol oxidase 1 promoter; a-factor, a-factor signal sequence; 6x HIS, hexahistidine-tag sequence; ATG, translation start site.

3.2.4. Culture conditions for Lox1 expression

P. pastoris pre-cultures were conducted in 250 ml baffled Erlenmeyer flasks with 100 ml YPD complex medium. Pre-cultures were incubated in an orbital shaker at a rate of 220 rpm at 30 °C. At the late log phase (OD₆₀₀ 4 to 6), the cells were harvested by centrifugation at 2,000 x g for five minutes. The pellets were resuspended in 5 ml BMMY medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 13.4 g l⁻¹ YNB, 400 µg l⁻¹ biotin, 50 mg l⁻¹ each of L-glutamic acid, L-lysine, L-leucine and L-isoleucin, 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.0, 5 ml l⁻¹ methanol) and used for inoculation of 50 ml BMMY main culture to an OD₆₀₀ of 1. The main culture was incubated at 220 rpm and 30 °C for 48 hours, to a final OD₆₀₀ of approximately 11 to 13. The temperature of 30°C was chosen after comparing three different cultivation temperatures, as described in Results and Discussion.

3.2.5. SDS-PAGE analysis

For SDS-PAGE analysis the samples were diluted 1:1 with SDS loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and denatured for ten minutes at 95 °C. The SDS-PAGE was performed according to Laemmli [149] using 12 % (w/v) polyacrylamide gels. After electrophoresis at 15 mA per gel, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Germany). For molecular mass determination, marker proteins from 250 to 10 kDa (Bio-Rad) were used.

3.2.6. Protein concentration

The protein concentration was determined by the method of Lowry [150] using DC-Protein-Assay (BioRad) and bovine serum albumin (concentration range 0.2 mg ml⁻¹ to 1.2 mg ml⁻¹) as a standard.

3.2.7. Purification of recombinant Lox1

For purification of the His-tag labeled recombinant Lox1 under native conditions, Protino Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) was employed. After centrifugation of 50 ml cell culture, the cells were resuspended in 2 ml of equilibration/loading buffer (50 mM sodium phosphate

buffer pH 7.5) and lysed by treatment with the Precellys Homogeniser (PeqLab). After centrifugation (10 min at 12.000 x g and 4 °C) the soluble lysis fraction was loaded on a Ni-NTA Agarose-packed column (1 ml bed volume) pre-equilibrated with equilibration/loading buffer. The Ni-NTA Agarose was washed three times with 10 ml of equilibration/loading buffer, followed by an additional wash step with 15 ml of equilibration/loading buffer containing 25 mM imidazole. After a final wash step with 5 ml of equilibration buffer containing 50 mM imidazole, the recombinant Lox1 was eluted in 5 ml of equilibration buffer containing 250 mM imidazole. To remove excess imidazole, protein samples were run over PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Munich, Germany) according to the manufacturer's manual and exchanged into buffer containing 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5. The purified protein was stored at -20 °C.

3.2.8. Enzyme activity

Lipoxygenase activity was determined spectrophotometrically as described [21]. The assay was performed in a UV-transparent 96-well microtiter plate (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria) containing 5 µl enzyme solution and 175 µl sodium phosphate buffer pH 7.5 (except for the determination of pH optimum). After the addition of 40 µl substrate solution (2 mM linoleic acid), absorbance at 234 nm was recorded every 30 s and monitored for 30 min using a microplate reader (Synergy2, Biotek, Bad Friedrichshall, Germany), which was kept at 30 °C (except determination of temperature optimum). Blanks were carried out using 5 µl buffer instead of enzyme solution. All experiments were performed in triplicate.

3.2.8.1. Effect of pH and temperature on enzyme activity

The pH optimum was determined at 30 °C using Britton-Robinson buffer (mixtures of 0.04 M H₃BO₃, 0.04 M H₃PO₄ and 0.04 M CH₃COOH) [151] pH 4 to 9.5. Determination of the optimal temperature was performed in the range of 20 to 45 °C using sodium phosphate buffer pH 7.5. The addition of the enzyme was carried out after the substrate-buffer mixture was kept at the appropriate temperature for five minutes.

3.2.9. ESI tandem MS of tryptic peptides

The amino acid sequences of tryptic peptides were deduced from high resolution ($R > 30,000$) MS and MS² mass spectra using a maXis QTOF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) and the Mascot search algorithm together with NCBI in-house database. The procedure was described in detail elsewhere [152]. The entire hexahistidine-tag sequence was detected in two unassigned peptides using *de novo* sequencing with an accurate mass determination of ± 0.01 or better for the daughter ions.

3.2.10 Analysis of amino acid sequences

Identification of an N-terminal signal sequence was carried out by analysis with Signal P 4.1 [153].

3.3 Results and discussion

3.3.1 Cloning of the *LOX1* gene into the pPIC9K expression vectors and expression in *P. pastoris*

To express the Lox1 in *P. pastoris* three different constructs of the expression vector pPIC9K, in which the gene is under the control of an inducible alcohol oxidase 1 promoter (*PAOX1*), were prepared. The constructs pPIC9K-*LOX1*, pPIC9K-*HIS-LOX1* and pPIC9K-*KHIS-LOX1* contained the *LOX1* gene in frame with the well-proven yeast α -factor signal sequence. This signal sequence was used to pursue secretion of Lox1 in *P. pastoris*, as sequence analysis using the SignalP 4.1 Server does not predict the existence of a native signal peptide, and the wild type enzyme is expressed intracellularly in *P. sapidus*. In contrast to the pPIC9K-*LOX1*, the expression vector pPIC9K-*HIS-LOX1* contained an additional N-terminal hexahistidine-tag coding sequence in front of the *LOX1* gene, which allowed protein purification of the subsequent expressed His-tagged Lox fusion protein using nickel affinity chromatography. The N-terminal hexahistidine-tag was preferred over a C-terminal hexahistidine-tag, as the C-terminus participates in the catalytic centre of the enzyme. The expression vector pPIC9K-*KHIS-LOX1* incorporated a second Kozak sequence (5'-ACCATGGCG-3'; start codon underlined) [154, 155] directly in front of the hexahistidine-tag coding sequence, acting as a start signal for translation in addition to the start signal of the yeast α -factor. Hence, beside extracellular

expression, the His-tagged Lox fusion protein was expected to be expressed intracellularly in *P. pastoris* transformed with this construct.

After DNA-sequencing, the *SacI*-linearised expression vectors were transferred into the peptidase deficient *P. pastoris* strain SMD1168 (*mut⁺ pep4 his4*) via electroporation and selected for His⁺ transformants. The second selection step took place on YPD-G418 plates with different G418 concentrations (1 mg ml⁻¹, 2 mg ml⁻¹, 4 mg ml⁻¹). It is known that the ability to grow in the presence of elevated concentrations of G418 indicates that multiple copies of the vector incorporated aminoglycoside resistance gene and the gene of interest were integrated into the genome [156]. Integration of multiple expression plasmid copies was shown to increase heterologous protein expression for a number of different recombinant genes via the gene dosage effect [157, 158]. Therefore, colonies growing on plates with 2 mg ml⁻¹ and 4 mg ml⁻¹ G418 were preferred for further experiments. Gene integration at the *AOX1* loci was confirmed by PCR using a genomic DNA template and DNA sequencing. To avoid false positive results, *P. pastoris* SMD1168 was also transformed with the linearised empty pPIC9K vectors, and the obtained transformants served as a negative control in the further expression experiments.

Positive colonies were incubated in 20 ml YPD shake flask cultures at 30 °C and 220 rpm for 24 hours, and subsequently the cultures were centrifuged and resuspended in 50 ml BMMY to induce lipoxygenase expression for 48 hours as described in Materials and Methods. Lipoxygenase activity was detected in the soluble lysate and cell debris fraction of all selected *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1, but not in the culture supernatant, indicating the exclusive intracellular production of the target protein. *P. pastoris* with integrated pPIC9K-LOX1 and pPIC9K-HIS-LOX1 as well as the negative control did not show lipoxygenase activity in any fraction. Considering these results, it is most likely that transcripts starting at the second Kozak sequence were successfully used for cytoplasmic translation of Lox1 in the strain *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1, while usage of the first translation start incorporating the α -factor signal sequence did not lead to functional expression.

3.3.2 Lox expression in *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 under different culture conditions

To characterize Lox1-production in *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 under different culture conditions, the productivity of Lox1 by transformants resistant to 2 mg ml⁻¹ and 4 mg ml⁻¹ G418 was tested in baffled shake-flask cultures containing BMMY medium. The Lox1 production in the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strains resistant to 2 mg ml⁻¹ G418 and 4 mg ml⁻¹ G418 was assayed for four consecutive days at 30 °C and 5 ml l⁻¹ methanol. Both strains showed a strong increase of Lox1 production between 24 and 48 hours of induction (Fig. 3-2a). Longer induction for 72 and 96 hours resulted just in a slight additional increase of Lox1 compared to cultures harvested after 48 hours.

Several studies have shown that lower cultivation temperature may improve the production of heterologous protein in *P. pastoris* [111, 159]. Thus, the effect of growth temperature on Lox1 production was assayed at 22 °C, 26 °C and 30 °C for 48 hours. During cultivation of the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strains resistant to 2 mg ml⁻¹ G418 and to 4 mg ml⁻¹ G418 optical cell density measurements showed similar growth behaviour of both strains (data not shown). Unexpectedly, different profiles of Lox1 production were obtained. Whereas the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strain resistant to 2 mg ml⁻¹ G418 did not show significant differences of Lox1 activities at different temperatures, increased growth temperature led to an enhancement of Lox1 activity in the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strain resistant to 4 mg ml⁻¹ G418 (Fig. 3-2b). The activity of the culture kept at 30 °C was about six times higher than in the one kept at 22 °C after two days of cultivation. Subsequent tests were performed at a cultivation temperature of 30 °C. Variation of methanol concentrations between 5 and 40 ml l⁻¹ was used to induce the expression of Lox1. In both strains a methanol concentration of 20 ml l⁻¹ affected the highest level of Lox1 activity within 48 hours (Fig. 3-2c). Higher methanol concentrations resulted in a lower production of recombinant protein, as well as lower cell densities (data not shown). Methanol concentrations above 30 ml l⁻¹ most likely inhibit the host cells growth, as described earlier [160].

In addition to its higher antibiotic resistance, the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strain resistant to 4 mg ml⁻¹ G418 showed a higher protein yield in comparison to the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strain resistant to 2 mg ml⁻¹ G418 indicating multiple *LOX1* inserts. Hence, the *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strain resistant to 4 mg ml⁻¹ was chosen for further experiments.

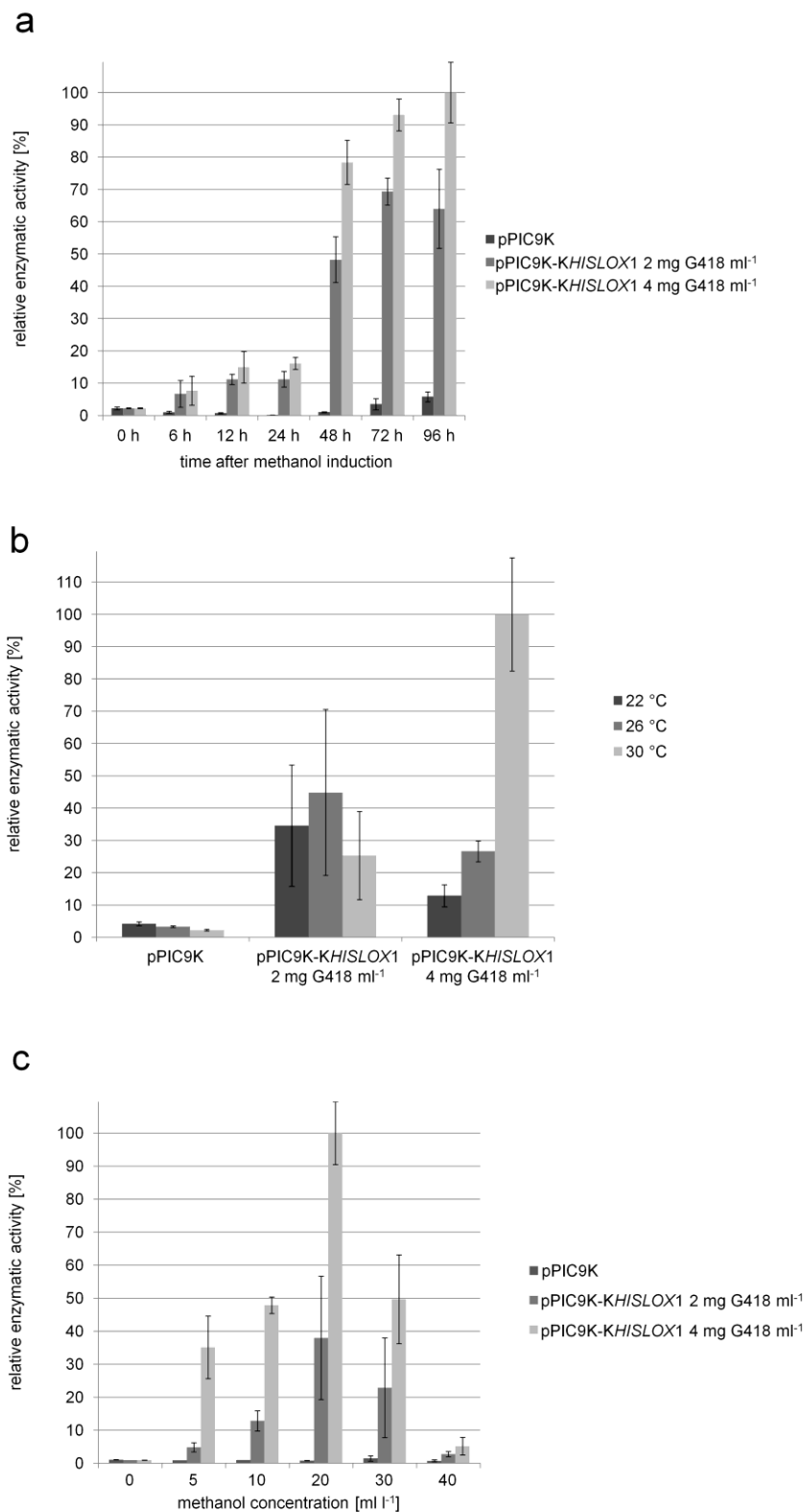


Fig. 3-2. | Expression of Lox1 by *P. pastoris* under different conditions of cultivation.

P. pastoris pPIC9K and *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 strains resistant to 2 mg and 4 mg G418 per ml media were cultured. Lox1-activities of cell lysate supernatants were determined using the linoleic acid assay, in 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.5. (a) Effect of induction time on Lox1-production. Strains were cultured in BMMY containing 5 ml l⁻¹ methanol at 30 °C. (b) Effect of cultivation temperature on Lox1-production. Strains were

cultured in BMMY containing 5 ml l⁻¹ methanol for 48 hours. (c) Effect of methanol concentration on Lox1-production. Strains were cultured for 48 hours at 30 °C. Values represent the mean of three separate assays done in triplicate. Error bars indicate standard deviations.

3.3.3 Purification of the Lox1

The purification of the His-tag containing Lox1 was achieved by immobilised metal affinity chromatography yielding between 1 mg ml⁻¹ and 1.5 mg ml⁻¹ in the eluted fractions corresponding to a typical protein yield between 5 mg ml⁻¹ and 7.5 mg ml⁻¹ from a 50 ml culture. Thereby the major part of unwanted proteins was successfully removed (Fig. 3-3). Sequence analysis of tryptic peptides of the 73.2 kDa SDS gel band using the Mascot search algorithm identified undoubtedly Lox1 (66 % sequence coverage, supplement 1) and did not contain any peptide sequences related to the α -factor. After removal of imidazole, the elution fraction containing active recombinant Lox1 was used for further biochemical characterization.

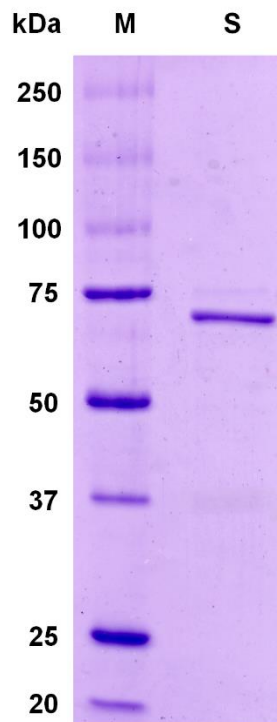


Fig. 3-3 | Purification of Lox1 containing the N-terminal HIS-tag with a Ni-NTA column.

Coomassie blue stained SDS-PAGE gel. Lane S: Lox1 (900 ng) after Ni-NTA purification; Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). The expected size for His-tagged Lox1 is 73.2 kDa.

3.3.4 Characterization of purified Lox1

The effects of temperature and pH on the lipoxygenase activity of the partially purified Lox1 preparation were measured using linoleic acid as the substrate.

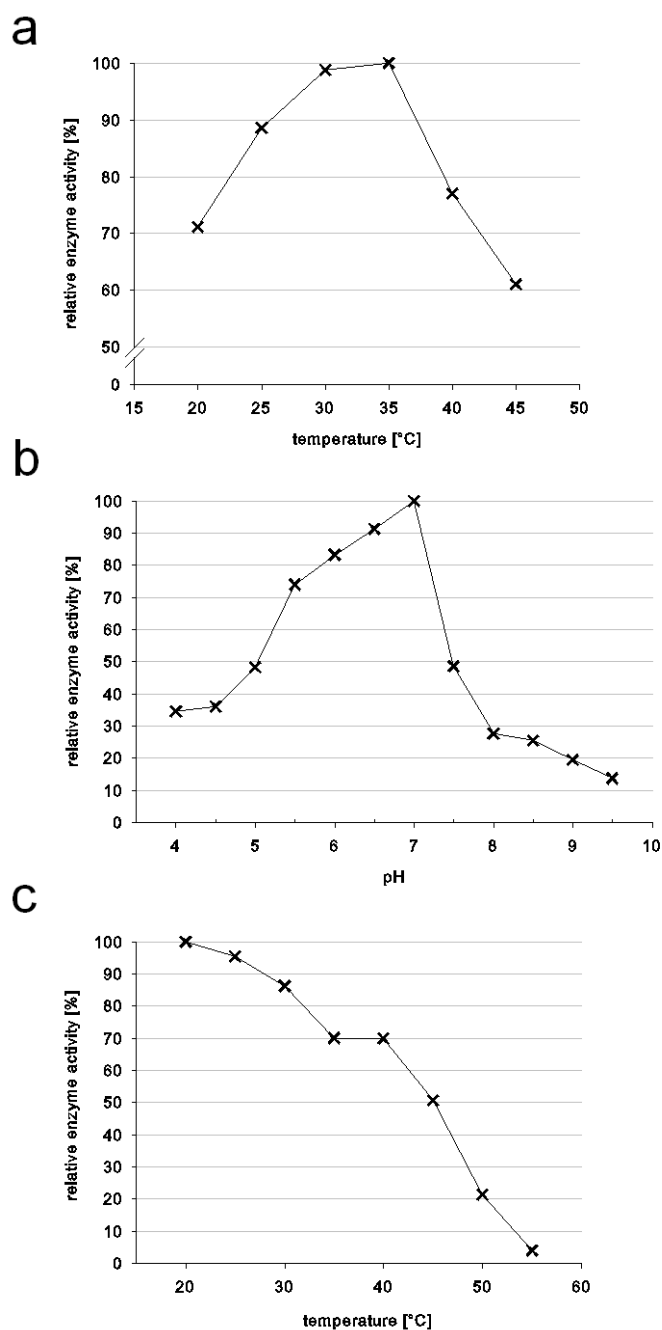


Fig. 3-4 | Effects of temperature and pH on the enzyme activity of purified Lox1 from *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1.

(A) Effect of temperature on Lox1 activity. Purified Lox1 was assayed at different temperatures (20–45 °C) in sodium phosphate buffer pH 7.5. (B) Effect of pH on Lox1 activity. Activity was determined at pH range of 4–9.5 with Britton–Robinson buffer (0.04 M H₃BO₃, 0.04 M H₃PO₄ and 0.04 M CH₃COOH) at 30 °C. (C) Effect of temperature on the stability of Lox1. Lox1 was incubated for 1 h at different temperatures (20–55 °C). Enzyme

activity was afterwards measured at sodium phosphate buffer pH 7.5. Values represent the mean of separate assays in triplicate.

The optimal temperature for Lox1 activity at pH 7 was determined to be 35 °C, and within the range of 20 – 45 °C, the enzyme maintained > 60 % of the maximal activity (Fig. 3-4a). The optimal pH for Lox1 activity was pH 7, and it maintained an enzymatic activity of over 80 % between pH 6 and 7 (Fig. 3-4b). Catalytic Lox1-activity rapidly decreased below pH 6 and above pH 7. These results, including the determined v_{\max} of 111 U mg⁻¹, agreed with temperature and pH-optimum reported for the wild-type enzyme [20]. Pretreatment of the enzyme at various temperatures for one hour showed that Lox1 was relatively stable at temperatures below 40 °C but rapidly lost the activity above this threshold (Fig. 3-4c).

3.3.5 Transformation of a pPICZ α A-HIS-LOX1 and pPIC9K-HIS-LOX1 Δ 1_459

As the *P. pastoris* pPIC9K-LOX1 and pPIC9K-HIS-LOX1 did not show Lox1 activity, and the strain *P. pastoris* pPIC9K-KHIS-LOX1 produced Lox1 intracellularly, the expression plasmid pPICZ α A was used as an alternative for the cloning of LOX1. Like the expression vector pPIC9K, the vector pPICZ α A includes a methanol inducible AOX1-promotor, but, in contrast, the selection of pPICZ α A transformants is based on zeocin instead of G418. Unlike pPIC9K the expression plasmid pPICZ α A allows cloning of the LOX1-gene flush with the Kex2 cleavage site of the α -factor signal sequence. After intracellular cleavage of the α -factor the additional eight amino acids will not be incorporated at the N-terminus of the recombinant protein.

In the current work the expression plasmid pPICZ α A-HIS-LOX1 was constructed and transformed into *P. pastoris* SMD1168. The correct gene integration was confirmed by PCR using genomic DNA template and DNA sequencing. After cultivation of *P. pastoris* pPICZ α A-HIS-LOX1 for 48 hours on BMMY media containing 5 ml l⁻¹ methanol, no lipoxygenase activity was detected either in the culture supernatant, or in soluble lysate and cell debris fractions. Considering the lack of Lox1 expression with pPIC9K and pPICZ α A vector constructs using the α -factor signal sequence, it seems likely that protein secretion of recombinant Lox1 is hindered. Various reasons affecting the secretory pathway could have impaired Lox1 expression. Partially misfolded protein can trigger the ER associated protein degradation, as was shown by Mattanovich et al. [161]. Incomplete Kex2p endopeptidase maturation as well as other reasons yet not understood can result in an accumulation of recombinant protein in

the ER or Golgi [162]. Pechan et al. [163] described that insoluble inactive enzyme was found in the membrane fraction, when they tried to express Mir1 peptidase in *P. pastoris*. Modelling of the PoLOX from *Pleurotus ostreatus* by Tasaki et al. showing 79 % protein identity with the Lox1 from *P. sapidus* suggested that the Lox1 contained N-terminal β -sheets [16]. This barrel might play a role in the interaction of the enzyme with biological membranes [164]. It is possible that Lox1, taking the pathway through the endoplasmatic reticulum, is sequestered into the membrane.

To investigate if the N-terminal β -sheet domain had an influence on Lox1 expression, the expression vector pPIC9K-HIS-LOX1 Δ 1_459 was constructed containing a truncated Lox1 without the N-terminal 153 amino acids including the β -sheet domain. A similar approach can be found for a lipoxygenase from *Anabaena spec.* [165]. However, the resulting strain *P. pastoris* pPIC9K-HIS-LOX1 Δ 1_459 did not show lipoxygenase-activity in the culture supernatant, soluble lysate and cell debris fractions.

Further analysis is required to investigate, if the N-terminal β -sheet domain hinders Lox1 secretion, as the lack of activity also might originate from a general loss of lipoxygenase activity due to the N-terminal deletion, as described for mammalian lipoxygenases [72, 166].

3.4 Conclusion

The heterologous expression and purification of the *P. sapidus* lipoxygenase (Lox1) was successfully attained in *P. pastoris*. The purified enzyme was biochemically characterised and showed an activity of 111 U mg⁻¹. Different expression vector constructs using the α -factor signal sequence were tested for expression, but secreted Lox1 was not obtained. Therefore, we speculate that Lox1-secretion is hindered in the ER-Golgi-pathway or that the α -factor signal sequence is not suitable for secretion of Lox1 in *P. pastoris*. Other approaches, such as the use of different signal sequences [116] or expression of a Lox1 fusion protein [167] could be considered for an over-expression of recombinant Lox1 in *P. pastoris*.

Acknowledgements

Support of the work by the BMBF cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) is gratefully acknowledged.

Appendix. Supplementary data.

ESI-MS/MS sequencing results of heterologously expressed Lox1 in *Pichia pastoris*

```

1   M A H H H H H H V H N I S L S S R K A L H N V H L P Y M V Q 30
31  L P K P T G Y N V A L K N A A E G Y D K A R R M V A W L Y D 60
61  I A D Y E S S I P Q T F T L Q Q K T D K Y T W E L S D N F P 90
91  P H L A V V P P D Q S V S A P S I F S P V R L A Q T L L I M 120
121 S S L W Y D D H T D L A P G P E Q N T M Q K L T Q W N Q E R 150
151 H K D Q G W L I K D M F N A P N I G L R N D W Y T D E V F A 180
181 Q Q F F T G P N S T T I T L A S D V W L T A F T S E A K A Q 210
211 G K D K V I A L F E S A P P N S F Y V Q D F S D F R R R M G 240
241 A K P D E E L F N D S D G A M R Y G C A A V A L F Y L T A M 270
271 G K L H P L A I I P D Y K G S M A A S V T I F N K R T N P L 300
301 D I S V N Q A N D W P W R Y A K T C V L S S D W A L H E M I 330
331 I H L N N T H L V E E A V I V A A Q R K L S P S H I V F R L 360
361 L E P H W V V T L S L N A L A R S V L I P E V I V P I A G F 390
391 S A P H I F Q F I R E S F T N F D W K S L Y V P A D L E S R 420
421 G F P V D Q L N S P K F H N Y A Y A R D I N D M W T T L K K 450
451 F V S S V L Q D A Q Y Y P D D A S V A G D T Q I Q A W C D E 480
481 M R S G M G A G M T N F P E S I T T V D D L V N M V T M C I 510
511 H I A A P Q H T A V N Y L Q Q Y Y Q T F V P N K P S A L F S 540
541 P L P T S I A Q L Q K Y T E S D L M A A L P L N A K R Q W L 570
571 L M A Q I P Y L L S M Q V Q E D E N I V T Y A A N A S T D K 600
601 D P I I A S A G R Q L A A D L K K L A A V F L V N S A Q L D 630
631 D Q N T P Y D V L A P E Q L A N A I V I * 650

```

Fig. 3-5 | Amino acid sequence of heterologously expressed Lox1 in *Pichia pastoris*.

In bold underlined: Amino acid sequences of tryptic peptides determined by ESI-MS/MS. Grey shadowed peptides (AHHHHHHV and HVHNIS) were deduced via de novo sequencing. Sequence coverage is 66 %.

4. Vorwort zur Publikation „Heterologous production of a feruloyl esterase from *Pleurotus sapidus* synthesizing feruloyl-saccharide esters“

Wie in Kapitel 1.1.2.3 erläutert, gehören FAE zu den wertvollsten pilzlichen Enzymen. In Vorarbeiten wurde durch Substratscreenings festgestellt, dass *P. sapidus* in Kulturüberständen FAE-Aktivität aufweist. Das hierfür verantwortliche Enzym Est1 konnte gereinigt und teilweise biochemisch charakterisiert werden. Sequenzanalysen der identifizierten Gen-Sequenz und erste Substratscreenings ließen trotz der ungewöhnlichen katalytischen Triade (vgl. Kapitel 1.1.2.1 und 1.1.2.2) zuerst vermuten, dass es sich nach Crepin *et al.* [45] um den FAE-Typ A handelt. Neben einer geringen Enzymkonzentration erschwerte insbesondere die Anwesenheit von Laccasen in der gereinigten Proteinfraction eine genauere Charakterisierung des Enzyms. Laccasen sind in der Lage, die durch FAE freigesetzte Ferulasäure zu oligomerisieren und somit nicht nur Aktivitätsassays zu stören, sondern zusätzlich weitere Anwendungen, wie die Veresterung von Ferulasäure, zu verhindern. Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit die heterologe Expression des Est1-codierenden Gens angestrebt. Als Expressionswirte sollten hierbei *P. pastoris* sowie *E. coli* dienen, welche keine Laccase-Produktion aufweisen. Ziele waren neben dem Erreichen höheren Enzymausbeuten und einer besseren Charakterisierung des Enzyms auch die Untersuchung der möglichen biotechnologischen Anwendungen.

In den letzten Jahren wurden einige Arbeiten publiziert, die sich mit der Fähigkeit von FAE zur enzymatischen Veresterung von Alkoholen und Glycosiden mit Ferulasäure beschäftigten. Meist kamen dabei ternäre Lösungsmittelgemische zum Einsatz. Einen anderen Ansatz verfolgten Tsuchiyama *et al.* [168], die über die FAE-katalysierte Synthese von Feruloyl-Sacchariden in gesättigten Zuckerlösungen berichteten. Auf Grund des hohen biotechnologischen Nutzens von Feruloyl-Sacchariden (vgl. Kapitel 1.1.2.3) sollte geklärt werden, ob eine Synthese dieser Stoffe durch reverse Hydrolyse auch mit der rekombinanten Est1 möglich ist.

5. Heterologous production of a feruloyl esterase from *Pleurotus sapidus* synthesizing feruloyl-saccharide esters

Reproduced from Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, with permission from John Wiley and Sons

Abstract

The feruloyl esterase (FAE) gene EST1 from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* was heterologously expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. Catalytically active recombinant Est1 was secreted using *P. pastoris* as a host. For expression in *P. pastoris*, the expression vector pPIC9K was applied. The EST1 gene was cloned with an N-terminal α -mating factor pre-pro sequence and expressed under the control of a methanol inducible alcohol oxidase 1 promoter. Est1 was purified to homogeneity using ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. The recombinant Est1 showed optima at pH 5.0 and 50 °C, and released ferulic acid from saccharide esters and from the natural substrate destarched wheat bran. Substrate specificity profile and descriptor-based analysis demonstrated unique properties, showing that Est1 did not fit into the current FAE classification model. Transferuloylation synthesis of feruloyl-saccharide esters was proven for mono- and disaccharides.

Keywords: basidiomycete, esterification, feruloyl esterase, functional expression, *Pichia pastoris*, *Pleurotus sapidus*

5.1 Introduction

Feruloyl esterases (FAEs, EC 3.1.1.73), a subclass of carboxylic-ester hydrolases capable of catalyzing the hydrolysis of the ester bonds between hydroxycinnamates and sugars in plant cell walls, have been characterized from various fungi, some prokaryotes, and plants [43, 44]. Breaking the cross-links of plant cell wall polysaccharides in synergy with other hemicellulose-degrading enzymes, FAEs can increase the accessibility of plant biomass, therefore bearing a

high potential for industrial applications. Multienzymatic preparations containing FAEs have been proposed for bioethanol production [169], and for bleaching in the pulp and paper industry [65]. Hydroxycinnamic acids, such as ferulic acids, released during the FAEs-catalyzed hydrolysis, are of interest for food, health, cosmetic, and pharmaceutical industries because of their reported antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and cholesterol lowering properties [44, 170]. However, the low solubility of ferulic acid in water limits its applications. Esterification of ferulic acid linking it to hydrophilic compounds, such as saccharides, would present a solution. However, only a limited number of reports about feruloylation of saccharides using FAEs in organic microemulsions [171-174] or aqueous solutions [168] have been published.

The FAE Est1 from *Pleurotus sapidus* with a pronounced activity against feruloyl saccharides was previously purified from the *P. sapidus* supernatant, biochemically characterized, and the corresponding coding sequence was identified [48]. Apart from an orthologous FAE from *Pleurotus eryngii* (PeFaeA, 87% amino acid identity) published recently by our group [49], Est1 showed no significant sequence homology to other microbial FAEs indicating a novel type within this class of enzymes. In the current work, we report the feruloylation of different mono- and disaccharides using the FAE Est1, heterologously produced in *P. pastoris*. To date, only two FAEs from basidiomycetes were recombinantly synthesized in *P. pastoris*. Hashimoto *et al.* reported the heterologous production of an esterase from *Coprinopsis cinerea* releasing ferulic acid from methyl hydroxycinnamates and wheat arabinoxylan [53]. More recently, heterologous production of an esterase from *Ustilago maydis*, hydrolyzing hydroxycinnamate esters, chlorogenic acid, and releasing phenolic acids from natural substrates such as destarched wheat bran (DSWB) and coffee pulp, was published by Nieter *et al.* [50]. The recombinant *P. sapidus* Est1 produced in the present study was biochemically characterized, and its substrate specificity toward a comprehensive set of synthetic and natural substrates was analyzed. To our knowledge, it is the first study presenting the enzymatic synthesis of feruloyl-D-maltose.

5.2 Methods

5.2.1 Chemicals and primers

All chemicals used were of highest purity grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), Merck (Darmstadt, Germany), and Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless otherwise noted. Ferulic acid methyl ester (FA-ME) and ferulic acid ethyl ester (FA-EE) (99% purity each) were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Methyl caffeate, *p*-coumarate, and sinapate were synthesized according to the method of Borneman *et al.* [175]. Feruloylated saccharides (5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (F-A), β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (F-AX), and α -L-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (F-AXG)) were prepared from destarched corn bran by *M. Bunzel* (Institut für Angewandte Biowissenschaften, KIT, Karlsruhe, Germany). DSWB was produced as described elsewhere [176]. PCR primers were synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

5.2.2 Strains and culture media

Escherichia coli strains *E. coli* TOP10 and *E. coli* BL21(DE3)Star (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were cultured in Luria-Bertani broth (Roth) supplemented with 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol, or 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zeocin when appropriate. *Pichia pastoris* yeast strains GS115 and SMD1168 (Invitrogen) were propagated on YPD medium (10 g L $^{-1}$ yeast extract, 20 g L $^{-1}$ peptone, 20 g L $^{-1}$ glucose). *Pleurotus sapidus* 8266 was obtained from the Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) and cultured as described by *Linke et al.* [48].

5.2.3 Isolation and cloning of the *EST1* gene in pUC57

Total RNA isolation from mycelium of *P. sapidus*, grown for 5 days in SNL medium (30.0 g L $^{-1}$ glucose, 4.5 g L $^{-1}$ L-asparagine monohydrate, 3.0 g L $^{-1}$ yeast extract, 1.5 g L $^{-1}$ KH₂PO₄ 0.5 g L $^{-1}$ MgSO₄; 1.0 mL L $^{-1}$ trace element solution (0.08 g L $^{-1}$ FeCl₃ \times 6 H₂O, 0.09 g L $^{-1}$ ZnSO₄ \times 7 H₂O, 0.03 g L $^{-1}$ MnSO₄ \times H₂O, 0.005 g L $^{-1}$ CuSO₄ \times 5 H₂O, 0.4 g L $^{-1}$ EDTA); the pH was adjusted to 6.0

with NaOH prior to sterilization) supplemented with 0.4% (v/v) Tween 80 and ss cDNA synthesis were performed as described by Linke *et al.* [11]. Specific primers PsEST1-F1 and PsEST1-R1 (Table 5-1) were used for amplification of the *EST1* gene using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany). The PCR program was performed as follows: 98 °C for 3 Min; 35× – 98 °C for 30 Sec, 54 °C for 30 Sec, 72 °C for 60 Sec; 72 °C for 10 Min; storage at 8 °C. After electrophoretic separation and extraction from agarose gel using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany), purified PCR amplification products were subcloned into the pUC57 vector (Thermo Scientific) using T4-DNA Ligase (Thermo Scientific). After transformation in *E. coli* TOP10 using a standard protocol [147] and selection, correct insertion of the target gene was first confirmed by colony PCR. Subsequently, the whole *EST1* sequence of pUC57-*EST1* was verified via extended hot shot DNA sequencing (SeqLab, Göttingen, Germany).

Tab. 5-1 | Nucleotide sequence of primers used for PCR amplification

Primers	Orientation	Sequence (5'-3')
PsEST1-F1	sense	TTTATGGTACTTCTCCGAGCTGTAGC
PsEST1-F2	sense	TTTTCCATGGTTGTACTTCTCCGAGCTG
PsEST1-F3	sense	TTTCTCGAGATGGTACTTCTCCGAGC
PsEST1-F4	sense	TTTCTCGAGCAGGCTCCTCAAGTTCAAGTCG
PsEST1-F5	sense	TTTCCTAGGACCATGGCGCATCATCATCATCATGTACTTCTCCGAGC
PsEST1-F6	sense	TTTCCTAGGACCATGGCGCATCATCATCATCATCAGGCTCCTCAAGTT
PsEST1-F7	sense	TTTCCTAGGACCATGGCGGTACTTCTCCGAGC
PsEST1-R1	antisense	TTTTCAGAACGAACGTCTATGATGCC
PsEST1-R2	antisense	TTTTTC TCGAGGAACGAACGTCTATGATG
PsEST1-R3	antisense	TTTGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGATGGAACGAACGTCTATGATG
PsEST1-R4	antisense	TTTGCGGCCGCTCAGAACGAACGTCTATGATGC
PsEST1-R5	antisense	TTTGCGGCCGCTCATTTTTCGAACTGCGGTTGGCTCCAGTTGAACGAACGTCTATG

5.2.4 Cloning of esterase expression vectors, transformation, and screening

Different *EST1* expression constructs were amplified by PCR (see Section 5.2.3) using the pUC57-*EST1* plasmid as a template for different forward and reverse primers listed in Table 5-1. After electrophoretic separation and purification, the PCR products and expression plasmids were double digested with appropriate restriction enzymes (Thermo Scientific), as presented in Table 5-2. The insertion cassettes were ligated with the expression plasmids and

transformed into *E. coli* TOP10. After selection on LB-Amp plates, colony PCR, and plasmid propagation, the resulting expression vectors were verified via DNA sequencing.

Tab. 5-2 | Vector constructs used for transformation

Construct	Primer pairs for amplification	Cloning site	Tag-sequence	Expression resulted in active enzyme
<i>E. coli</i>				
pET32(a)- <i>EST1</i>	PsEST1-F2/ PsEST1-R2	<i>NcoI/XhoI</i>	N-terminal <i>TRX</i> and <i>HIS</i> , C-terminal <i>HIS</i>	no
<i>P. pastoris</i>				
pGAPZ α A- <i>EST1</i>	PsEST1-F3/ PsEST1-R3	<i>XhoI/NotI</i>	C-terminal <i>HIS</i>	no
pGAPZ α A- <i>EST1</i> Δ 1-57	PsEST1-F4/ PsEST1-R3	<i>XhoI/NotI</i>	C-terminal <i>HIS</i>	no
pPIC9K- <i>EST1</i>	PsEST1-F5/ PsEST1-R4	<i>AvrII/NotI</i>	N-terminal <i>HIS</i>	no
pPIC9K- <i>EST1</i> Δ 1-57	PsEST1-F6/ PsEST1-R4	<i>AvrII/NotI</i>	N-terminal <i>HIS</i>	yes
pPIC9K- <i>Strep-EST1</i> Δ 1-57	PsEST1-F7/ PsEST1-R5	<i>AvrII/NotI</i>	C-terminal <i>STREP</i>	yes

E. coli expression strains

The pET32(a) vector (Novagen; Merck), containing an N-terminal thioredoxin-tag-sequence, was used for *EST1* expression in *E. coli*. Verified pET32(a)-*EST1* were transformed into *E. coli* BL21(DE3)Star. In addition, pET32(a)-*EST1* was transformed into five additional BL21(DE3)Star strains, carrying various chaperone coding vectors (pGro7, pG-KJE8, pKJE7, pG-Tf2, pTf16; TaKaRa Mobitec, Göttingen, Germany) for chaperone coexpression. For expression screening, *E. coli* overnight precultures were conducted in 15-mL falcon tubes. Therefore, 5 mL LB medium containing the appropriate antibiotics were incubated at 37 °C in an orbital shaker at 200 rpm. Precultures were used for inoculation of 10 mL LB main cultures in 50-mL falcon tubes to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1. Chaperone expression was induced immediately with 4 mg mL⁻¹ arabinose and/or 10 ng mL⁻¹ tetracycline according to the TaKaRa manual instruction. After reaching an OD₆₀₀ of 0.6–0.8, different isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside concentrations (0.01–1 mM) were used for induction of the target protein production. Cultivation took place for 18 h at 16 or 37 °C and 200 rpm. The cells were then harvested via centrifugation at 5,000 \times g for 15 Min and disrupted using a Precellys device (PeqLab, Erlangen, Germany). Thereafter, supernatants were analyzed in activity assays.

P. pastoris expression strains

The Invitrogen vectors pGAPZ α A and pPIC9K were used for *EST1* expression in *P. pastoris* GS115 and SMD1168 strains. Vector constructs with and without the native *EST1* signal sequence were cloned. N- and C-terminal *HIS*- and *STREP*-tag-sequences were introduced during the amplification of the insertion cassette. After linearization of pGAPZ α A expression vectors with *AvrII* and pPIC9K expression vectors with *SacI*, *P. pastoris* GS115 and SMD1168 were transformed by electroporation (MicroPulser Electroporator; Bio-Rad, Munich, Germany) according to Lin-Cereghino *et al.* [148]. *Pichia pastoris* clones harboring empty vectors served as a negative control during *EST1* expression. The selection of transformants containing pGAPZ α A or pPIC9K was performed on YPDS-plates (10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ peptone, 20 g L⁻¹ glucose, 182.2 g L⁻¹ sorbitol, 20 g L⁻¹ agar) containing 100 mg mL⁻¹ zeocin or on histidine-deficient minimal dextrose plates (13.4 g L⁻¹ yeast nitrogen base, 400 μ g L⁻¹ biotin, 20 g L⁻¹ glucose, 20 g L⁻¹ agar, 50 mg L⁻¹ each of L-glutamic acid, L-lysine, L-leucine, and L-isoleucin), according to the Invitrogen manual. His⁺ pPIC9K containing transformants were screened in a further selection step for their level of resistance to different geneticin (G418) concentrations (1, 2, and 4 mg mL⁻¹) on YPD-G418 plates. Selected clones were verified by colony PCR and DNA sequencing.

5.2.5 Culture conditions for *EST1* expression in *P. pastoris*

Microscale cultivation was performed in 96-well plates as described by Sygmond *et al.* [133]. Culture supernatants were analyzed for enzyme activity after 24, 48, 72, and 96 H. In addition, cell lysates were analyzed after 96 H. For cultivation of pGAPZ α A harboring strains, YPD medium was used. To maintain stable expression conditions, 0.5% (v/v) methanol or 0.5% glucose (v/v) were added every 24 H to transformants with pPIC9K or pGAPZ α A integration, respectively. For the upscaling, precultures of *P. pastoris* expression strains were conducted in 350-mL Erlenmeyer flasks with 100 mL YPD medium. After incubation for 3 days in an orbital shaker at 180 rpm at 28 °C, precultures were harvested by centrifugation at 2,000 \times g for 5 Min. Cell pellets containing pPIC9K expression vectors were resuspended in 5 mL buffered methanol complex medium (BMMY) according to the Invitrogen manual and used for inoculation of 400 mL BMMY main culture to an OD₆₀₀ of 1. The main culture was incubated

in 2.5-L Erlenmeyer flasks with four baffles at 80 rpm and 25 °C for 96 H, to a final OD₆₀₀ of approximately 36–40. For stable expression conditions, 0.5% (v/v) methanol was added every 24 H.

5.2.6 Purification of recombinant Est1

After centrifugation of the *P. pastoris* main culture, the culture supernatant was concentrated 25-fold using 10 kDa Ultracel-PL Membrane centricons (Merck). The concentrate was diluted in 36.5 mM sodium acetate pH 4.0 (buffer A) to a final volume of 50 mL. After filtration with 0.45 µm syringe filters (Macherey–Nagel), the sample was applied on a 1-mL High Trap SP-XL cation exchange column (GE Healthcare, Freiburg, Germany), equilibrated with buffer A. Proteins were eluted by stepwise (5, 10, 50, and 100 %) increase in buffer B (buffer A with 1 M NaCl) at a constant flow rate of 2 mL Min⁻¹. Collected 5 mL fractions were tested for esterase activity. Active fractions eluted with 10% buffer B were pooled, diluted at 1:1 ratio in 50 mM Bis–Tris (pH 6.5) with 2 M (NH₄)₂SO₄, and applied on a 1-mL High Trap Butyl FF column (GE Healthcare), equilibrated with Bis–Tris buffer (pH 6.5) with 1 M (NH₄)₂SO₄ (buffer I). Protein elution took place using a linear gradient of 0–100% Bis–Tris buffer pH 6.5 (buffer II). His-tag purification was performed using the Protino Ni-NTA Agarose (Macherey–Nagel) as described before [177]. Strep-Tag purification was done using Strep-Tactin[®] Sepharose[®] 50% suspension (IBA, Göttingen, Germany) according to the supplier manual.

5.2.7 SDS-PAGE analysis

For denaturing SDS-PAGE analysis, the samples were diluted at 1:1 ratio with SDS loading buffer (0.1 M Tris/HCl pH 6.8, 0.2 M dithiothreitol, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue) and denatured for 10 Min at 95 °C. The SDS-PAGE was performed according to the study of Laemmli [149] using polyacrylamide gels (12% resolving gel, 4% stacking gel). After electrophoresis at 15 mA per gel, the gels were stained with InstantBlue (Expedeon, Cambridgeshire, UK). Marker proteins from 250–10 kDa (Bio-Rad) were used for molecular mass determination. For SDS-PAGE analysis of deglycosylated Est1, 10 µL enzyme solution was incubated with 1 µL endoglycosidase H from *Streptomyces plicatus* for 1 H at 37 °C.

5.2.8 ESI–tandem MS of tryptic peptides

The amino acid sequences of tryptic peptides of recombinant Est1 were deduced by ESI–MS/MS mass spectra using a maXis QTOF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) and the Mascot search algorithm together with NCBI in-house database. The procedure was described in detail elsewhere [48].

5.2.9 Activity assay

FAE activity was determined via high-performance liquid chromatography (HPLC)-UV using methyl ferulate as a standard substrate. The reaction mixture contained 65 μL 3 mM substrate, 10 μL 500 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and 25 μL sample solution. After incubation for 1 h at 37 °C, the reaction was terminated by adding 100 μL acetonitrile. Hydrolysis of feruloylated saccharides and cinnamic and benzoic acid derivatives was determined by the same method. HPLC was performed using a Chromolith Performance RP-e reverse phase column (100 \times 4.6 mm²; Merck). Substrates and products were determined by using a stepwise gradient at a flow velocity of 1.5 mL Min⁻¹ as follows: 10 μL of sample loaded in 90% buffer A (0.1% formic acid) and 10% buffer B (acetonitrile), 10–36% buffer B in 8 Min; 36–50 buffer B in 1.5 Min; 55–96% buffer B in 0.5 Min; 96–99% buffer B in 2.5 Min; 99–15% buffer B in 0.5 Min; 15–10% buffer B in 1 Min and re-equilibration with 10% buffer B for 1 Min. Substance elution was detected at 232 nm (benzoic and 3-hydroxybenzoic acid), 254 nm (4-hydroxybenzoic and vanillic acid), 275 nm (cinnamic and gallic acid), 306 nm (*p*-coumaric acid), and 323 nm (ferulic, caffeic, chlorogenic, and sinapic acid) using a Shimadzu UV-Vis detector (SPD-10A VP; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany). One unit of enzyme activity was defined as one micromole of substrate hydrolyzed per minute under the experimental conditions. All measurements were performed at least twice.

5.2.10 Biochemical characterization of Est1

Temperature and pH optima

For the determination of the optimum temperature, an activity assay was performed for 60 Min at temperature from 15 to 60 °C using 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). Measurement of the optimum pH was conducted at pH range of 2.0–9.0, in which 50 mM glycine (pH 2.0–3.5), sodium acetate (pH 3.5–5.5), Bis-Tris (pH 5.5–7.0), and Tris (pH 7.0–9.0) buffers were used. The assay was carried out at 37 °C for 60 Min.

Temperature stability

Temperature stability was determined by incubation of purified Est1 for 60 Min at temperature ranging from 20 to 60 °C. Afterward, an activity assay was performed for 60 Min at 37 °C using 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.0.

Substrate specificity and kinetic parameters

Substrate specificity of Est1 and kinetic parameters were determined as described elsewhere [49].

Enzymatic hydrolysis of natural substrates

Enzymatic hydrolysis of DSWB using Est1 in combination with *Trichoderma viride* xylanase was performed as described before [50] using 1 mU of purified Est1 and a final concentration of 125 mM sodium acetate at pH 5.0. Incubation took place at 37 °C for 6 H at 650 rpm. Detection of oligomers of ferulic acid was performed via liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). The LC system operated with a RP-18 HD column (Eurosphere 100-C18-5-HD, 250 × 4 mm², 5 μm; Macherey-Nagel) and consisted of two high pressure gradient Varian 212-LC chromatography pumps (Palo Alto, CA) connected to a Varian four-channel vacuum degasser coupled to a VarianPro Star UV/Vis detector) and a 320-Triple Quad LC–MS (Palo Alto, CA). The MS was conducted simultaneously in the ESI positive and negative mode with a scan range of m/z 110–500 or 300–1,200, respectively. MS parameters for ESI(+)/ESI(–) were as follows: capillary voltage +30 V/–40 V, needle voltage 5,000 V/–4,500 V, nebulizer gas (N₂) 379 kPa, and drying gas 207 kPa at 350 °C. For HPLC–UV analysis, eluent A consisted of water/formic acid (99.9:0.1, [v/v]) and eluent B was acetonitrile. Elution was performed using the following

linear gradient at 300 $\mu\text{L Min}^{-1}$: 0–3 Min 90% A–10% B, up to 10% A–90% B within 20 Min. Additionally, UV absorption was monitored at 280 and 323 nm.

Transesterification

For the transesterification reaction, saturated solutions of mono- and disaccharides (D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-sucrose, D-lactose, and D-maltose) were used. The saccharides were dissolved in 100 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 and kept for 6-H at 50° C and 1,400 rpm. After centrifugation, 44 μL of the supernatant was mixed with 6 μL methyl ferulate (500 mM dissolved in DMSO), 2 μL 100 mM sodium azide, and 5 μL purified Est1 solution. After incubation for 48 H at 37 °C, the reaction was stopped with 800 μL acetonitrile (50% [v/v] in water) and analyzed via HPLC–UV and LC–MS. The LC system operated with a Kinetex C18 column (100 \times 4.6 mm², 2.6 μm) and consisted of two high pressure gradient Varian 212-LC chromatography pumps) connected to a Varian four-channel vacuum degasser coupled to a Varian Pro Star UV/Vis detector and a 320-Triple Quad LC–MS (Palo Alto, CA). Eluent A consisted of water/formic acid (99.9:0.1, [v/v]), and eluent B was acetonitrile. Elution was performed using the following gradient system: 0–16 Min 90% A–10% B at 300 $\mu\text{L Min}^{-1}$, 16–19 Min 60% A–40% B at 300 $\mu\text{L Min}^{-1}$, 19–21.5 Min 45% A–55% B at 300 $\mu\text{L Min}^{-1}$, 21.5–25 Min 5% A–95% B at 550 $\mu\text{L Min}^{-1}$, 25–28 Min 1% A–99% at 550 $\mu\text{L Min}^{-1}$. Elution of compounds was monitored spectrophotometrically at 280 and 323 nm. The MS was operated in negative-ion mode with full scan detection in the m/z range of 120–750.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Expression of the *EST1* encoding gene in *E. coli* and *P. pastoris*

The *EST1* encoding gene (accession number FN552459) was successfully amplified from ss cDNA and cloned into the pUC57 cloning vector. The resulting vector pUC57-*EST1* was used as a template for subsequent cloning steps.

For expression in *E. coli* BL21(DE3)Star, the gene was cloned with its native signal sequence into the expression vector pET-32(a). This vector is coding for an incorporated N-terminal thioredoxin-tag, which comprises 109 amino acids and has been shown to increase the yield

of soluble protein [178]. In the course of cloning, a C-terminal hexahistidine-tag was added to the *EST1* gene. Expression was investigated using *E. coli* BL21(DE3)Star cells containing pET32(a)-*EST1* vectors. In addition, the same expression strain carrying different chaperone coding vectors (pGro7, pG-KJE8, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) was used. No esterase activity was found in cell lysates or supernatants of any of the expression strains. Denatured SDS-PAGE analysis of *E. coli* pellets showed an additional protein band compared to the negative control (Fig. 5-1A) indicating that only Est1 inclusion bodies were formed. The band at 77.6 kDa was more prominent at higher inducer concentrations and identified via protein sequencing as Est1.

To express *EST1* in *P. pastoris*, different pPIC9K and pGAPZ α A expression vector constructs were generated. The vector pPIC9K incorporates a methanol inducible alcohol oxidase 1 promotor, while the pGAPZ α A comprises a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for constitutive expression. Both vectors include an N-terminal α -mating factor pre-pro sequence for secretion. To achieve an efficient secretion, the *EST1* gene was cloned with and without the 57 base pair comprising native signal sequence into the expression vectors. In addition, an N-terminal hexa-histidine-tag coding sequence was introduced in front of the *EST1* gene to facilitate purification of the fusion protein. The resulting expression vectors pGAPZ α A-*EST1*, pGAPZ α A-*EST1* Δ 1-57, pPIC9K-*EST1*, and pPIC9K-*EST1* Δ 1-57 were verified via DNA sequencing. Linearized plasmids were transformed into the *P. pastoris* strain GS115 (mut⁺ his4) and the peptidase-deficient strain SMD1168 (mut⁺ pep4 his4) via electroporation.

After selection of His⁺ transformants, colonies carrying pPIC9K constructs were screened for multicopy vector integrations using different G418 concentrations. Furthermore, correct genomic integration at the *AOX1* loci was verified using colony PCR and DNA sequencing. Cells transformed with pGAPZ α A constructs were screened on plates containing zeocin. Negative controls carrying empty vectors were transformed and screened likewise.

Esterase activity was detected in the culture supernatant and on a low level in the soluble lysate of *P. pastoris* pPIC9K-*EST1* Δ 1-57, whereby recombinant *P. pastoris* GS115 and SMD1168 colonies with different geneticin resistance showed similar activity levels. This was in accordance with previous studies, showing that multicopy integrations do not necessarily increase the amount of secreted protein [104, 112]. *Pichia pastoris* with integrated pGAPZ α A-

EST1, pGAPZ α A-*EST1* Δ 1-57, and pPIC9K-*EST1* as well as the negative controls did not show esterase activity in any fraction. These results indicated that the native signal sequence of Est1 interfered with correct protein folding, when not cleaved correctly during secretion. Similar observations for *E. coli* were made previously [179]. In addition, the lack of posttranslational modifications in *E. coli* could be a reason for inclusion body formation [180]. For *P. pastoris*, the appropriate choice of the signal sequence cannot be clearly predicted [116]. The α -mating factor pre-pro sequence is most widely used, but in some cases expressions using different signal sequences, including the native signal sequence, have shown better results [79, 105].

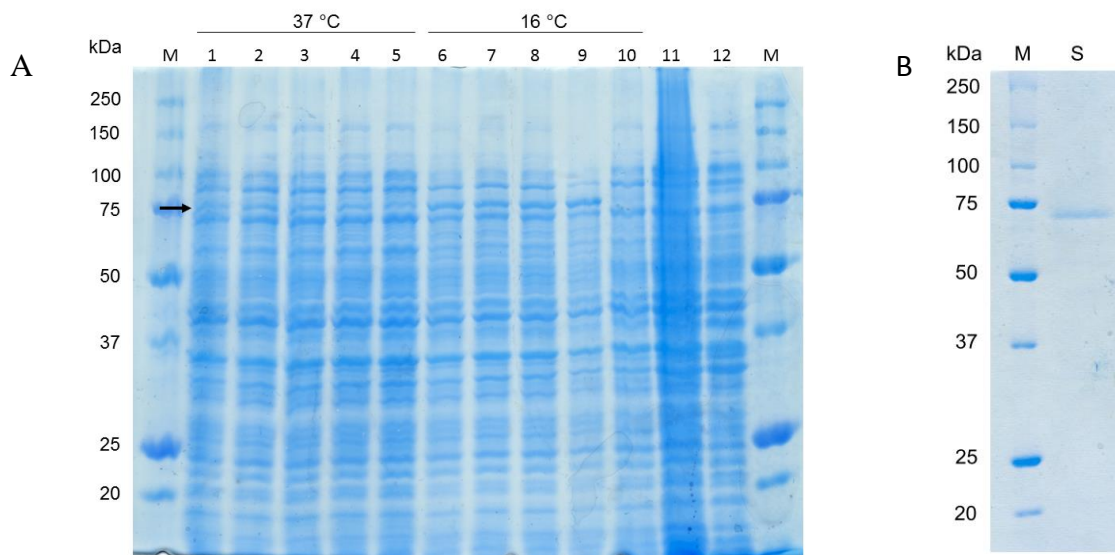


Fig. 5-1 | Expression of Est1 with *E. coli* and *P. pastoris*

(A) Expression of Est1 with *E. coli* BL21 (DE3)Star pET32(a)-EST1 using different isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) concentrations and temperatures. Coomassie blue stained SDS-PAGE gel of cell lysates. Lanes 1–5: Cultures incubated at 37 °C with 1 mM, 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, and 10 μ M IPTG, respectively. Lanes 6–10: Cultures incubated at 16 °C with 1 mM, 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, and 10 μ M IPTG, respectively. Lane 11: Cultures incubated at 16 °C without IPTG. Lane 12: *E. coli* BL21 (DE3)Star pET32(a) (negative control) incubated at 16 °C without IPTG. Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). Arrow marks thioredoxin tagged Est1 having an expected size of 77.6 kDa. (B) Purification of recombinant Est1. Coomassie blue stained SDS-PAGE gel. Lane S: Est1 (0.5 μ g) after cation exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography purification. Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad).

5.3.2 Purification of recombinant Est1

As Est1 produced with *P. pastoris* pPIC9K-*EST1* Δ 1-57 contained an N-terminal hexa-histidine tag, affinity chromatography using Ni-NTA agarose was performed. Unexpectedly, most of the

Est1 activity was found in the flow through and the first washing step (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5). Furthermore, SDS-PAGE analysis did not show an Est1 band in the elution fraction, implying that the His-tagged Est1 did not bind to the nickel matrix. As lack of steric accessibility of tags may be a reason for bad purification results [181], the His-tagged Est1 was denatured using 8 M urea and purified by Ni-NTA matrix using the same conditions. The elution fraction was monitored on a SDS-PAGE showing a single band at 70 kDa, as expected for Est1 (data not shown). Obviously, the N-terminal His-tag could not be accessed in the folded protein. Subsequently, purification using a C-terminal Strep-tag instead of the N-terminal His-tag was pursued. Another expression strain carrying the vector pPIC9K-Strep-EST1Δ1-57 was produced. Culture supernatant was purified using a StrepTactin matrix. Analyzing purification fractions, Est1 activity was found exclusively in the flow through and the first washing step, suggesting that both the N- and the C-terminus are not accessible for purification. Integration of a linker sequence between the tag and the enzyme could improve purification results [181]. However, it is difficult to predict promising purification strategies, as the structure of Est1 is unknown, due to a lack of crystal structures of homologous proteins.

Tab. 5-3 | Purification of recombinant Est1

	Volume [ml]	Total protein [mg]	Total activity [U]	Specific activity [mU mg ⁻¹]	Recovery [%]	Purification [fold] ^a
Culture supernatant	400	10320	0.212	0.02	100	-
Cation exchange chromatography	30	23.7	0.111	4.68	52	234
Hydrophobic interaction chromatography	10	0.07	0,077	1027	36	51350

^a High purification resulted from large quantities of peptone, yeast extract and yeast nitrogen base in the culture medium (BMMY)

Purification of Est1 from culture supernatant was finally achieved by two separation steps (Table 5-3) using a cation exchange chromatography followed by a hydrophobic interaction chromatography (HIC). Performing HIC, Est1 eventually eluted at a ratio of 60–70% buffer II. Denatured SDS-PAGE showed a single protein band at 70 kDa (Fig. 5-1B), which was identified as Est1 via sequence analysis of tryptic peptides using the Mascot search algorithm. An influence of glycosylation on protein mass was investigated, as the observed protein band showed a molecular mass 10 kDa higher than expected for Est1 with a fully cleaved signal

peptide. Est1 amino acid sequence contained four potential N-glycosylation sites, three of which were predicted to be N-glycosylated (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/). Therefore, N-linked glycosylations of the purified Est1 were removed using endoglycosidase H. The obtained deglycosylated Est1 was found at around 60 kDa in SDS-PAGE (data not shown), which corresponded well to the calculated molecular mass of 59.4 kDa.

5.3.3 Characterization of purified Est1

The effects of temperature and pH on esterase activity were determined using methyl ferulate as a substrate (Fig. 5-2). In accordance with the previously characterized wild-type enzyme [48], purified recombinant Est1 showed an optimum temperature of 50 °C and was relatively stable for 1 h in the temperature range of 20–40 °C. However, the pH optima of the native and recombinant Est1 differed slightly: while pH optimum of the native enzyme was determined to be pH 6.0, the recombinant Est1 showed an optimum at pH 5.0. Below pH 3.0 and above 8.0, no activity was detected for both native and recombinant variants.

A difference in posttranslational modifications, such as glycosylation, between *P. sapidus* and *P. pastoris* may be an explanation for such alterations in recombinant enzymes properties compared to the native counterparts. Benoit *et al.* reported the heterologous expression of a chlorogenic esterase, showing a higher degree of glycosylation and an increase in the temperature stability compared to the native enzyme [182]. Although little is known about the glycosylation of basidiomycete enzymes, studies of *U. maydis* [183] and *Schizophyllum commune* [184] show distinct differences compared to yeast. While the glycan structures of N-glycosylated proteins in these basidiomycetes possessed between five and eight mannose residues, yeast proteins showed hypermannosylation [82].

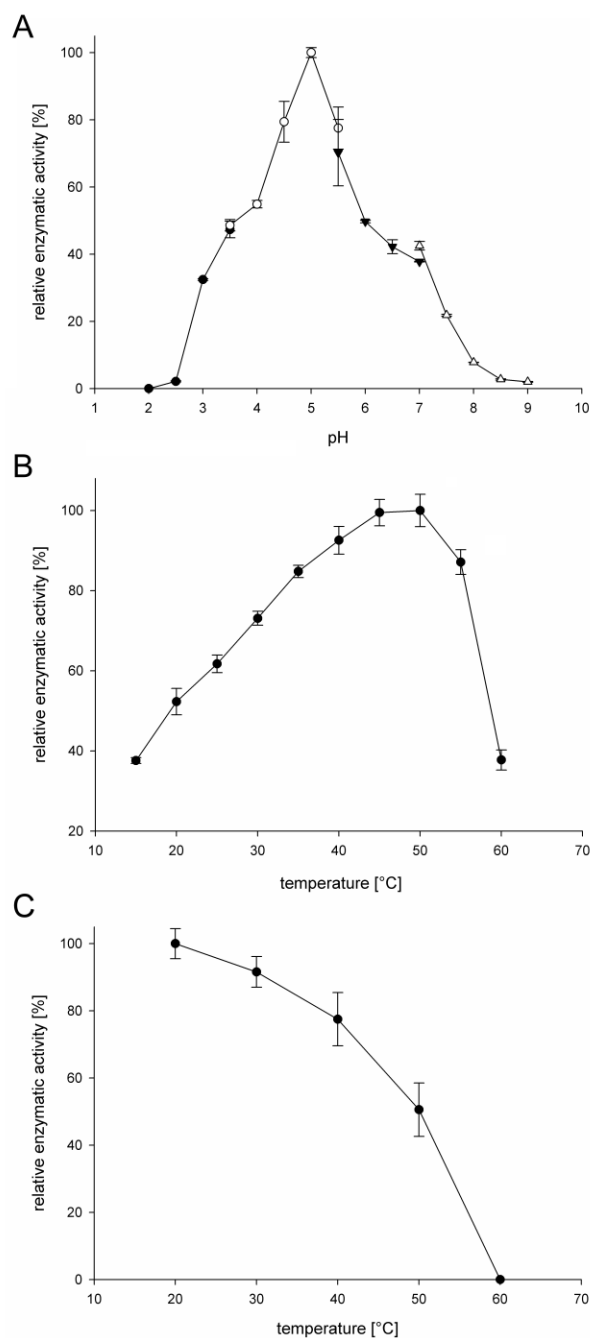


Fig. 5-2 | Effects of temperature and pH on the enzyme activity of purified recombinant Est1 from *P. pastoris* pPIC9K-EST1 Δ 1-57.

(A) Effect of pH on Est1 activity. The activity was determined at pH range of 2.0–9.0 with 50 mM glycine (pH 2.0–3.5), 50 mM sodium acetate (pH 3.5–5.5), 50 mM Bis–Tris (5.5–7.0), and 50 mM Tris/HCl (pH 7.0–9.0) buffers. (B) The effect of temperature on Est1 activity. Purified Est1 was assayed at different temperatures (15–60 °C) in sodium acetate buffer pH 5.0. (C) The effect of temperature on the stability of Est1. Est1 was incubated for 1 h at different temperatures (20–60 °C). Enzyme activity was afterwards determined in sodium acetate buffer pH 5.0. Values represent the mean of separate assays in triplicate.

5.3.4 Substrate specificity and kinetic parameters

A comprehensive set of substrates was tested towards hydrolysis by Est1 including cinnamic and benzoic acid derivatives as well as natural substrates, such as chlorogenic acid, F-A, F-AX and F-AXG (Table 5-4). The hydrolysis of F-AX proceeded most effectively resulting in a specific activity of $1.63 (\pm 0.07) \text{ U mg}^{-1}$. This activity was set to 100 % and used for calculation of relative activities of all further substrates tested. Est1 hydrolyzed all typical FAE substrates showing, in relation to F-AX, high activity with F-A (80 % relative activity), FA-EE (62 % relative activity) and FA-ME (61 % relative activity). In case of methyl sinapate (22.4 % relative activity) the presence of a second methoxy group at the *meta* position of the phenyl ring reduced the hydrolysis rate, while substrates without a methoxy group in *meta* position (i.e. methyl and ethyl esters of coumarate, caffeate and cinnamate) showed just low conversation rates (0.45 % to 3.3 % relative activity). Compounds without a methyl prop-2-enoate group (i.e. methyl gallate, vanillate esters and benzoate derivatives) were not accepted by Est1. These results agreed with Kroon *et al.* [185] and Topakas *et al.* [186] showing that substrate specificity of feruloyl esterases depended on the distance between ester bond and benzene ring in the substrate molecule as well as on the type of substitution of the aromatic group. Unexpectedly and in contrast to the previously characterized native Est1, recombinant Est1 was able to slowly hydrolyze methyl caffeate (2.6 % relative activity).

Crepin *et al.* classified feruloyl esterases into four types, A to D, according to their substrate spectrum and sequence homology [45]. Hydrolyzing FA-ME, methyl sinapate, methyl *p*-coumarate as well as methyl caffeate and showing highest nucleotide sequence homology to lipases [48], recombinant Est1 did not fit into the common classification. Likewise, EstBC from *Auricularia auricula-judae* hydrolyzed benzoates and synthetic cinnamate derivatives, but no natural substrates, such as FA, FAX, and FAX-G, suggesting that the classification of FAEs based on substrate specificity and sequence data may be insufficient [176]. The Crepin classification was extended on the basis of phylogenetic data by Benoit *et al.* [46] and descriptor based analysis by Udatha *et al.* [47]. After descriptor based classification analysis of the Est1 amino acid sequence according to Udatha (<http://faeclassification.webs.com>), it was established that the Est1 sequence did not show feature similarity with any particular FAE family. Hence, Est1 does not fit into the current classification models for feruloyl esterases.

Tab. 5-4 | Substrate specificity of Est1^a

Substance	Relative FAE activity [%]	Activity [mU/mg]
F-AX	100	1681±71
F-A	83.10	1397±8
Ferulic acid-EE	62.61	1052±28
Ferulic acid-ME	61.09	1027±45
F-AXG	48.41	814±32
Sinapinic acid-ME	22.42	377±16
Coumaric acid-ME	3.33	56±0
Caffeic acid-ME	2.58	43±0
Cinnamic acid-EE	0.50	8±1
Cinnamic acid-ME	0.45	8±2
Chlorogenic acid	ND	ND
Gallic acid-ME	ND	ND
Benzoic acid-ME	ND	ND
Benzoic acid-EE	ND	ND
3-OH-Benzoic acid-ME	ND	ND
4-OH-Benzoic acid-ME	ND	ND
4-OH-Benzoic acid-EE	ND	ND
4-OH-Benzoic acid-PE	ND	ND
4-OH-Benzoic acid-BE	ND	ND
Vanillic acid-ME	ND	ND
Vanillic acid-EE	ND	ND

^a Purified recombinant Est1 was incubated with 1.95 mM of different substrates for 1 h at 37 °C in 50 mM sodium acetate buffer pH 5. Relative enzyme activities were calculated based on F-AX, the substance most preferred by Est1, which was set to 100 %. The assays were done in duplicate. F-A: 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AX: β -D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AXG: α -L-galactopyranosyl-(1→2)- β -D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; ND: not detectable.

Kinetic constants (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) were determined from the initial rate of Est1 against F-AX and methyl ferulate. The purified enzyme possessed K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values for F-AX of 227 μ M, 1.96 Sec^{-1} , and 8.64 $\text{mM}^{-1} \text{Sec}^{-1}$, respectively, and for methyl ferulate of 427 μ M, 1.20 Sec^{-1} , and 2.81 $\text{mM}^{-1} \text{Sec}^{-1}$, respectively. These values clearly differed from the kinetic constants of the purified native Est1, which was shown to have a K_m of 1.95 mM and k_{cat}/K_m of 11.2 $\text{mM}^{-1} \text{Sec}^{-1}$ for methyl ferulate [48]. On the other hand, comparison of recombinant Est1 with the highly homologous *Pleurotus eryngii* feruloyl esterase PeFaeA (87 % identity on the amino acid level) showed similarities of the observed constants (K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m of 440 μ M, 3.41 Sec^{-1}

¹, 7.75 mM⁻¹ Sec⁻¹, respectively, for F-AX; 150 μM, 0.85 Sec⁻¹, 5.85 mM⁻¹ Sec⁻¹, respectively, for methyl ferulate) [49].

Changes in substrate specificity and kinetic parameters of an enzyme are mostly reported to be caused by changes in amino acid sequence, for example through directed evolution [187]. However, except for the N-terminal hexa-histidine tag, the amino acid sequence of Est1 did not differ from the sequence of the native enzyme. Whether alteration of determined substrate specificity and kinetic constants of recombinant Est1 in comparison to the native enzyme were caused by different posttranslational modifications in *P. pastoris* or due to other reasons, must remain the aim of further research.

5.3.5 Release of phenolic acids from the natural substrates DSWB

Purified Est1 was investigated for the release of ferulic acid and its oligomers from DSWB, an agricultural by-product containing ferulate linked through an ester-bond to arabinoxylans, in the presence and absence of endoxylanase (1 U) from *T. viride* as described in the section Enzymatic Hydrolysis of Natural Substrates. Endoxylanases catalyze the depolymerization of the polysaccharide backbone, therefore enabling the esterase to access the feruloyl arabinoxylans [188]. In the present work, endoxylanase alone released no ferulic acid, while Est1 (1 mU) released just small amounts of 0.3 μM ferulic acid after 6 H. A combination of both enzymes resulted in a release of 30 μM of ferulic acid. Thus, the synergistic action of both enzymes increased the level of liberated ferulic acid to 100-fold. These results are in accordance with *P. eryngii* PeFAE showing nearly the same levels of ferulic acid release [49]. The release of diferulates and triferulates was investigated using LC–MS, but was not detected in any of the samples.

5.3.6 Enzymatic synthesis of feruloyl-saccharide esters

The synthesis of feruloyl-saccharide esters is of high interest for applications in food, health, and pharmaceutical industries [44]. Enzymatic transesterification of methyl ferulate is rarely reported in the literature and carried out mostly in microemulsions containing organic solvents [172-174]. Tsuchiyama *et al.* first reported on a method using saturated aqueous

sugar solutions for enzymatic esterification and transesterification of several mono- and disaccharides [168]. Likewise, purified Est1 was used for transesterification of different mono- (D-glucose, D-fructose, and D-galactose) and disaccharides (D-sucrose, D-lactose, and D-maltose) using methyl ferulate as a ferulic acid donor. Est1 was incubated with methyl ferulate in saturated saccharide solutions for 48 H at 37 °C (see the section Transesterification). After enzyme inactivation using 50% acetonitrile, samples of the reaction mixture were analyzed via HPLC–UV and LC–MS (Fig. 5-3). In case of transesterification with glucose, fructose, and galactose, two different peaks were detected and the related substances identified via LC–MS as the corresponding feruloylated saccharides according to their molecular masses (m/z 355). For each of these three monosaccharides, two peaks were also reported by Tsuchiyama *et al.* [168]. Proposing that acylation of monosaccharides takes place at one primary hydroxyl group only, these results most likely reflect the occurrence of two ferulated monosaccharide anomers differing in HPLC mobility. For lactose, no transesterification products were detected. Samples of sucrose showed two peaks, and samples of maltose showed three additional peaks, which were identified as feruloylated disaccharides according to the mass of 517 m/z . One peak predominated suggesting the existence of one predominant disaccharide product under these conditions. These results agreed well with preliminary work of our group, using a purified analogous FAE from another basidiomycete for transesterification of sucrose under the same conditions. There, the predominant product was identified as 6-O-feruloyl- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques (unpublished data). Enzymatic feruloylation of sucrose was reported before by Couto *et al.* [172], while this is the first report on the enzymatic synthesis of feruloyl maltose. Concentration ranges of the ferulated saccharides were in a range of 4–6 μ M. Optimization of reaction conditions along with isolation and structural characterization of this broad spectrum of transesterification products using NMR will be the aim of future work.

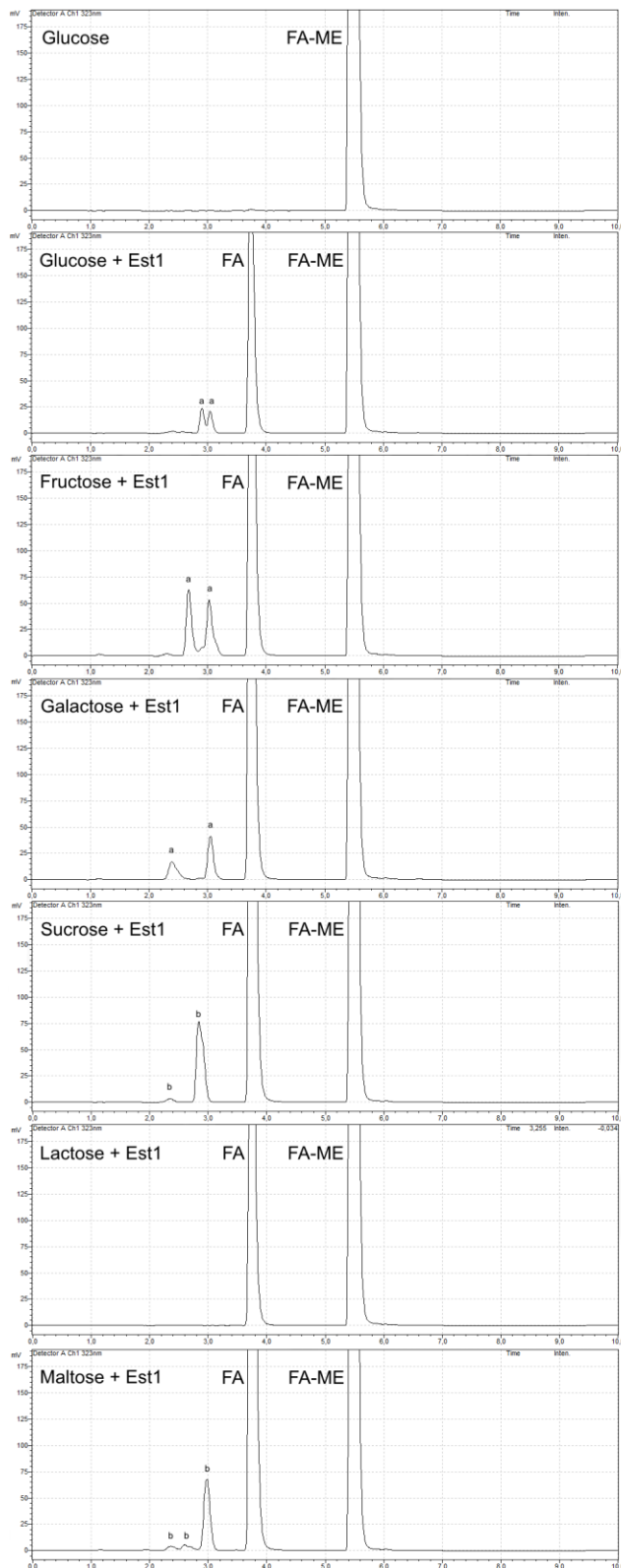


Fig. 5-3 | HPLC chromatogram (UV-detection at 323 nm) of transesterification reactions.

Recombinant Est1 catalyzed transesterification of saccharides with FA-ME. Peaks between 2.2 and 3.2 Min were identified as feruloylated saccharides via LC-MS. Molecular masses for the reaction products detected by LC-MS: a = m/z 355, b = m/z 517. Negative control: FA-ME and glucose without recombinant Est1.

5.4 Conclusions

The *EST1* gene from *P. sapidus* was heterologously expressed in *P. pastoris*. The enzyme was purified to homogeneity and showed the highest specific activities toward the natural substrates F-AX (1.68 U mg⁻¹) and F-A (1.40 U mg⁻¹). Est1 released ferulic acid from DSWB in synergistic action with endoxylanase. Transesterification of different mono- and disaccharides with methyl ferulate was achieved. Consequently, Est1 bears a high potential for future applications, not only for the valorization of brans and other lignified industrial side streams, but also for generating better water-soluble ferulates.

5.5 Acknowledgements

We thank Mirko Bunzel (KIT, Karlsruhe, Germany) for the preparation of the feruloylated saccharides and Julia Schäffer for her assistance in the laboratory work. Funding was provided by the BMBF cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B). The authors declare no conflict of interest.

6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mit der Lox1 und der Est1 zwei Enzyme heterolog in *P. pastoris* produziert werden. Um die Proteinausbeuten zu erhöhen und ausreichend Enzym im Hinblick auf industrielle Anwendungen zu produzieren, bieten sich Anschlussarbeiten an, in denen ein *upscaling* der Kulturführung auf Fermentermaßstab durchgeführt wird.

Bezüglich der in *P. pastoris* intrazellulär vorliegenden Lox1 könnten im Zuge dessen weitere Versuche unternommen werden, das Enzym durch den Sekretionsweg aus der Zelle zu schleusen. Neben der Nutzung verschiedener Signalsequenzen könnte ein Fusionsprotein, bestehend aus Lox1 und einem gut sekretierbarem N-terminalen Protein produziert werden. Um die Aufreinigung der rekombinanten Est1 zu erleichtern, sollte versucht werden, zwischen Est1 und den Protein-*tags* längere Linkersequenzen einzufügen, sodass auf diesem Weg ein verbesserter Zugang der *tags* zur Affinitätsmatrix ermöglicht wird.

Hinsichtlich der für die Est1 beschriebenen Synthese von feruloylierten Sacchariden eröffnet sich die Möglichkeit für Anschlussarbeiten, welche die Erhöhung der Ausbeute und Verbesserung der Wirtschaftlichkeit der Reaktion zum Ziel haben. Neben der Optimierung von Reaktionsbedingungen ist dabei die Etablierung einer kontinuierlichen Produktabtrennung am erfolgversprechendsten. Denkbar wäre eine Trennung auf Grund von Größenunterschieden mit Hilfe von Zeolithen bei gleichzeitiger Immobilisierung des Enzyms. In weiteren Arbeiten können die feruloylierten Saccharide isoliert und mittels NMR identifiziert werden, um den Mechanismus der Est1-katalysierten reversen Hydrolyse näher zu charakterisieren. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass rekombinante Est1 neben der Umesterung von FA-ME auch die Veresterung von Ferulasäure mit Sacchariden katalysieren kann (unveröffentlichte Daten). Somit wäre eine Weiternutzung der beim Abbau natürlicher Substrate wie Weizenkleie freigesetzten Ferulasäure möglich. Im Hinblick auf die Synthese von Produkten für die Feinchemie ist auszutesten, ob Ferulasäure und andere Hydroxymitsäuren auch mit weiteren Sacchariden und Alkoholen verestert werden können.

Angesichts der wenigen bisher charakterisierten FAE aus Basidiomycota und des großen biotechnologischen Potentials dieser Enzyme ist die Identifizierung, heterologe Produktion und Charakterisierung weiterer Vertreter dieser Enzymklasse erstrebenswert. Das Vorliegen

eines ungewöhnlichen Substratspektrums sowie der alternativen katalytischen Triade Ser-His-Glu in Esterasen aus *P. sapidus*, *P. eryngii* und *U. maydis* lässt auf die Existenz einer neuen Unterklasse der FAE in Basidiomycota mit anderen Eigenschaften schließen. Durch sequenzbasierte Motivsuche und anschließende Genexpression könnten ähnliche FAE charakterisiert werden, sodass die bestehende FAE-Klassifikation erweitert werden kann. Interessant wären im Zuge der heterologen Expression auch gerichtete Mutagenesen der katalytischen Triade. Auf diesem Weg könnte untersucht werden, ob sich durch den Austausch von Glutaminsäure durch Asparaginsäure (vgl. Kapitel 1.1.2.2), Auswirkungen auf das Substratspektrum der Enzyme ergeben.

Die im Rahmen dieser Arbeit produzierten Enzyme gehören zwei verschiedenen Enzymklassen an, deren Vertreter bisher nicht oder in wenigen Fällen heterolog in *P. pastoris* exprimiert wurden. Unter Beachtung der Diversität aller bisher in *P. pastoris* synthetisierten Enzymklassen wird deutlich, dass sich *P. pastoris* als Expressionswirt für die heterologe Produktion basidiomycetischer Enzyme eignet. Folglich sollte auch die Produktion von Enzymen aus anderen Enzymklassen in *P. pastoris* verfolgt werden. Von Interesse sind hierbei insbesondere basidiomycetische Enzyme mit ausgeprägten posttranslationalen Modifikationen sowie Enzyme, die bisher nicht oder nur schwer in *E. coli* synthetisiert werden können. Beispiele hierfür sind industriell wertvolle Enzyme wie Lignin-Peroxidasen [189] oder Glycerol-Oxidasen [190].

Denkbar ist in Zukunft auch die Co-Expression verschiedener Gene, um einfache Stoffwechselwege von Basidiomyceten in *P. pastoris* einzubringen und auf diesem Wege wertvolle Metabolite zu produzieren.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Blackwell, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American journal of botany* 98, 426-438.
- [2] Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H. (2008) Fungal secretomes --nature's toolbox for white biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 80, 381-388.
- [3] Decina, S., Crestini, C., Conversion of lignin: chemical technologies and biotechnologies –oxidative strategies in lignin upgrade, in *Biorefinery - From Biomass to Chemicals and Fuels* (2012) de Gruyter, Berlin/Boston, pp. 167-206.
- [4] Pointing, S. B. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 57, 20-33.
- [5] de Souza, P. M., de Oliveira Magalhaes, P. (2010) Application of microbial alpha-amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 850-861.
- [6] Grimrath, A., Berends, P., Rabe, S., Berger, R. G., Linke, D. (2010) Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *European Food Research and Technology* 232, 415-424.
- [7] El-Baky, H. A., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R. G. (2011) PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 10311-10316.
- [8] Adrio, J. L., Demain, A. L. (2003) Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6, 191-199.
- [9] Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of biological chemistry* 274, 23679-23682.
- [10] Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fuste, M. C., Busquets, M., Manresa, A. (2013) Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 4737-4747.
- [11] Brink, C., Dahlen, S. E., Drazen, J., Evans, J. F., Hay, D. W., Nicosia, S., Serhan, C. N., Shimizu, T., Yokomizo, T. (2003) International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacological reviews* 55, 195-227.
- [12] Schaller, F. (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of experimental botany* 52, 11-23.
- [13] Matsui, K. (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology* 9, 274-280.
- [14] Brodhun, F., Feussner, I. (2011) Oxylipins in fungi. *The FEBS journal* 278, 1047-1063.
- [15] Wurzenberger, M., Grosch, W. (1984) The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 794, 25-30.
- [16] Tasaki, Y., Toyama, S., Kuribayashi, T., Joh, T. (2013) Molecular characterization of a lipoxygenase from the basidiomycete mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 38-45.
- [17] Heshof, R., van Schayck, J. P., Tamayo-Ramos, J. A., de Graaff, L. H. (2014) Heterologous expression of *Gaeumannomyces graminis* lipoxygenase in *Aspergillus nidulans*. *AMB Express* 4, 65.
- [18] Heshof, R., Jylha, S., Haarmann, T., Jorgensen, A. L., Dalsgaard, T. K., de Graaff, L. H. (2014) A novel class of fungal lipoxygenases. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 1261-1270.
- [19] Kuribayashi, T., Kaise, H., Uno, C., Hara, T., Hayakawa, T., Joh, T. (2002) Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 1247-1253.
- [20] Plagemann, I., Krings, U., Berger, R. G. (2014) Isolation and characterization of wild-type lipoxygenase LOX(Psa)1 from *Pleurotus sapidus*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 69, 149-154.

- [21] Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P. D., Krings, U., Berger, R. G. (2013) LOX_{psa1}, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 87, 99-104.
- [22] Newcomer, M. E., Brash, A. R. (2015) The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science* 24, 298-309.
- [23] Maccarrone, M., Salucci, M. L., van Zadelhoff, G., Malatesta, F., Veldink, G., Vliegthart, J. F., Finazzi-Agro, A. (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* 40, 6819-6827.
- [24] Oliw, E. H. (2002) Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, 313-323.
- [25] Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H., Walther, M. (2010) Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives Biochemistry Biophysics* 503, 161-174.
- [26] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28, 235-242.
- [27] Chruszcz, M., Wlodawer, A., Minor, W. (2008) Determination of protein structures --a series of fortunate events. *Biophysical Journal* 95, 1-9.
- [28] Kim, M. R., Kim, S. H., Sok, D.-E. (1989) Inactivation of potato lipoxygenase by hydroperoxy acids as suicide substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164, 1384-1390.
- [29] Wiesner, R., Suzuki, H., Walther, M., Yamamoto, S., Kuhn, H. (2003) Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15S-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 304-315.
- [30] Balls, A. K., Axelrod, B., Kies, M. W. (1943) SOY BEAN LIPOXIDASE. *Journal of Biological Chemistry* 149, 491-504.
- [31] Casey, R., Hughes, R. K. (2005) Recombinant Lipoxygenases and Oxylipin Metabolism in Relation to Food Quality. *Food Biotechnology* 18, 135-170.
- [32] Belitz, H. D., Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001) Lehrbuch Der Lebensmittelchemie, Springer.
- [33] de Roos, A. L., van Dijk, A. A., Folkertsma, B., (2006) Bleaching of dairy products. US-Patent #US 20060127533 A1
- [34] Hirota, N., Kaneko, T., Ito, K., Takeda, K. (2006) Mapping a factor controlling the thermostability of seed lipoxygenase-1 in barley. *Plant Breeding* 125, 231-235.
- [35] Rackis, J. J., Sessa, D. J., Honig, D. H. (1979) Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56, 262-271.
- [36] Chedea, V. S., Jisaka, M. (2013) Lipoxygenase and carotenoids: a co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology* 12, 2786-2791.
- [37] Robinson, D. S., Wu, Z., Domoney, C., Casey, R. (1995) Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry* 54, 33-43.
- [38] Leonhardt, R. H., Berger, R. G. (2015) Nootkatone. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 148, 391-404.
- [39] Bunzel, M. (2009) Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews* 9, 47-64.
- [40] Faulds, C. B., Zanichelli, D., Crepin, V. F., Connerton, I. F., Juge, N., Bhat, M. K., Waldron, K. W. (2003) Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. *Journal of Cereal Science* 38, 281-288.
- [41] Yu, P., Maenz, D. D., McKinnon, J. J., Racz, V. J., Christensen, D. A. (2002) Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 1625-1630.

- [42] de O. Buanafina, M. M. (2009) Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives. *Molecular Plant* 2, 861-872.
- [43] Koseki, T., Fushinobu, S., Ardiansyah, Shirakawa, H., Komai, M. (2009) Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Applied microbiology and biotechnology* 84, 803-810.
- [44] Faulds, C. B. (2009) What can feruloyl esterases do for us? *Phytochemistry Reviews* 9, 121-132.
- [45] Crepin, V. F., Faulds, C. B., Connerton, I. F. (2004) Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied microbiology and biotechnology* 63, 647-652.
- [46] Benoit, I., Danchin, E. G., Bleichrodt, R. J., de Vries, R. P. (2008) Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology letters* 30, 387-396.
- [47] Udatha, D. B., Kouskoumvekaki, I., Olsson, L., Panagiotou, G. (2011) The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnology Advances* 29, 94-110.
- [48] Linke, D., Matthes, R., Nimtz, M., Zorn, H., Bunzel, M., Berger, R. G. (2013) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 7241-7251.
- [49] Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R. G. (2014) A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal biology* 118, 348-357.
- [50] Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Kelle, S., Linke, D., Krings, U., Popper, L., Berger, R. G. (2015) A chlorogenic acid esterase with a unique substrate specificity from *Ustilago maydis*. *Applied and environmental microbiology* 81, 1679-1688.
- [51] Wang, L., Ma, Z., Du, F., Wang, H., Ng, T. B. (2014) Feruloyl esterase from the edible mushroom *Panus giganteus*: a potential dietary supplement. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 7822-7827.
- [52] Wang, L., Zhang, R., Ma, Z., Wang, H., Ng, T. (2014) A feruloyl esterase (FAE) characterized by relatively high thermostability from the edible mushroom *Russula virescens*. *Applied biochemistry and biotechnology* 172, 993-1003.
- [53] Hashimoto, K., Kaneko, S., Yoshida, M. (2010) Extracellular carbohydrate esterase from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea* released ferulic and acetic acids from xylan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 1722-1724.
- [54] Haase-Aschoff, P., Linke, D., Berger, R. G. (2013) Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource technology* 130, 231-238.
- [55] McAuley, K. E., Svendsen, A., Patkar, S. A., Wilson, K. S. (2004) Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60, 878-887.
- [56] Suzuki, K., Hori, A., Kawamoto, K., Thangudu, R. R., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Yamada, C., Arakawa, T., Wakagi, T., Koseki, T., Fushinobu, S. (2014) Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 82, 2857-2867.
- [57] Goldstone, D. C., Villas-Boas, S. G., Till, M., Kelly, W. J., Attwood, G. T., Arcus, V. L. (2010) Structural and functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (Est1E) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*. *Proteins* 78, 1457-1469.
- [58] Lai, K. K., Stogios, P. J., Vu, C., Xu, X., Cui, H., Molloy, S., Savchenko, A., Yakunin, A., Gonzalez, C. F. (2011) An inserted alpha/beta subdomain shapes the catalytic pocket of *Lactobacillus johnsonii* cinnamoyl esterase. *PLoS one* 6, e23269.
- [59] Hermoso, J. A., Sanz-Aparicio, J., Molina, R., Juge, N., Gonzalez, R., Faulds, C. B. (2004) The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *Journal of molecular biology* 338, 495-506.
- [60] Faulds, C. B., Molina, R., Gonzalez, R., Husband, F., Juge, N., Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J. A. (2005) Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. *The FEBS journal* 272, 4362-4371.

- [61] Prates, J. A., Tarbouriech, N., Charnock, S. J., Fontes, C. M., Ferreira, L. M., Davies, G. J. (2001) The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9, 1183-1190.
- [62] Kumar, N., Pruthi, V. (2014) Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports* 4, 86-93.
- [63] Mathew, S., Abraham, T. E. (2004) Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 24, 59-83.
- [64] Gopalan, N., Rodriguez-Duran, L. V., Saucedo-Castaneda, G., Nampoothiri, K. M. (2015) Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology* 193, 534-544.
- [65] Record, E., Asther, M., Sigoillot, C., Pages, S., Punt, P. J., Delattre, M., Haon, M., van den Hondel, C. A., Sigoillot, J. C., Lesage-Meessen, L., Asther, M. (2003) Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Applied microbiology and biotechnology* 62, 349-355.
- [66] Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., Sabotic, J. (2012) Proteins of higher fungi--from forest to application. *Trends in biotechnology* 30, 259-273.
- [67] Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* 127, 335-347.
- [68] Zelena, K., Eisele, N., Berger, R. G. (2014) *Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota. *Biotechnology Advances* 32, 1382-1395.
- [69] Sharma, R., Katoch, M., Srivastava, P. S., Qazi, G. N. (2009) Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 2083-2094.
- [70] Couto, S. R., Toca-Herrera, J. L. (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances* 25, 558-569.
- [71] Fleissner, A., Dersch, P. (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied microbiology and biotechnology* 87, 1255-1270.
- [72] Chen, X. S., Funk, C. D. (2001) The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 811-818.
- [73] Walser, P. J., Haebel, P. W., Künzler, M., Sargent, D., Kües, U., Aebi, M., Ban, N. (2004) Structure and Functional Analysis of the Fungal Galectin CGL2. *Structure* 12, 689-702.
- [74] Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., Mikata, K. (1995) The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 59, 439-444.
- [75] Kurtzman, C. P. (2009) Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36, 1435-1438.
- [76] Kurtzman, C. P., Chapter 37 - *Komagataella* Y. Yamada, Matsuda, Maeda & Mikata (1995), in *The Yeasts (Fifth Edition)* (2011) Elsevier, London, pp. 491-495.
- [77] De Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 27, 561-566.
- [78] Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., Stillman, C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 9, 1316-1323.
- [79] Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* 24, 45-66.

- [80] Vogl, T., Hartner, F. S., Glieder, A. (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 1094-1101.
- [81] Berlec, A., Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40, 257-274.
- [82] De Pourcq, K., De Schutter, K., Callewaert, N. (2010) Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* 87, 1617-1631.
- [83] Romanos, M. A., Makoff, A. J., Fairweather, N. F., Beesley, K. M., Slater, D. E., Rayment, F. B., Payne, M. M., Clare, J. J. (1991) Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic acids research* 19, 1461-1467.
- [84] Boettner, M., Steffens, C., von Mering, C., Bork, P., Stahl, U., Lang, C. (2007) Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*—a comparative view on 79 human genes. *Journal of biotechnology* 130, 1-10.
- [85] Sinclair, G., Choy, F. Y. (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 26, 96-105.
- [86] Cregg, J., Introduction, in *Pichia Protocols* (2007) Humana Press, pp. 1-10.
- [87] Gleeson, M. G., White, C., Meininger, D., Komives, E., Generation of Protease-Deficient Strains and Their Use in Heterologous Protein Expression, in *Pichia Protocols* (1998) Humana Press, pp. 81-94.
- [88] Lin-Cereghino, J., Lin-Cereghino, G., Vectors and Strains for Expression, in *Pichia Protocols* (2007) Humana Press, pp. 11-25.
- [89] Pla, I. A., Damasceno, L. M., Vannelli, T., Ritter, G., Batt, C. A., Shuler, M. L. (2006) Evaluation of Mut+ and MutS *Pichia pastoris* phenotypes for high level extracellular scFv expression under feedback control of the methanol concentration. *Biotechnology progress* 22, 881-888.
- [90] Orman, M. A., Calik, P., Ozdamar, T. H. (2009) The influence of carbon sources on recombinant-human-growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: a comparison of Muts and Mut+ strains. *Biotechnology and applied biochemistry* 52, 245-255.
- [91] Huy, N. D., Thiyagarajan, S., Kim, D. H., Park, S. M. (2013) Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase with carbohydrate binding module from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of bioscience and bioengineering* 115, 507-513.
- [92] Zhang, Y. B., Jiang, M. L., Hu, X. J., Zhang, G. M., Ma, L. X. (2005) [Expression of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 45, 625-629.
- [93] Daly, R., Hearn, M. T. W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18, 119-138.
- [94] Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186, 37-44.
- [95] Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Luckl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D., Schwab, H. (1997) High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression and Purification* 11, 61-71.
- [96] Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., de Wolf, F. A. (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15, 1087-1096.
- [97] Vogl, T., Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New biotechnology* 30, 385-404.
- [98] Ruth, C., Zuellig, T., Mellitzer, A., Weis, R., Looser, V., Kovar, K., Glieder, A. (2010) Variable production windows for porcine trypsinogen employing synthetic inducible promoter variants in *Pichia pastoris*. *Systems and Synthetic Biology* 4, 181-191.

- [99] Kurjan, J., Herskowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha-factor. *Cell* 30, 933-943.
- [100] Fuller, R. S., Brake, A., Thorner, J. (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 1434-1438.
- [101] Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G., Thorner, J. (1983) Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* 32, 839-852.
- [102] Kjeldsen, T., Brandt, J., Andersen, A. S., Egel-Mitani, M., Hach, M., Pettersson, A. F., Vad, K. (1996) A removable spacer peptide in an alpha-factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 170, 107-112.
- [103] Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., Lin-Cereghino, J. (2013) The effect of alpha-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519, 311-317.
- [104] Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 5301-5317.
- [105] Vadhana, A. K., Samuel, P., Berin, R. M., Krishna, J., Kamatchi, K., Meenakshisundaram, S. (2013) Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 52, 177-183.
- [106] Jonsson, L. J., Saloheimo, M., Penttila, M. (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current genetics* 32, 425-430.
- [107] Soden, D. M., O'Callaghan, J., Dobson, A. D. (2002) Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology (Reading, England)* 148, 4003-4014.
- [108] Juarez-Montiel, M., Ibarra, J. A., Chavez-Camarillo, G., Hernandez-Rodriguez, C., Villa-Tanaca, L. (2014) Molecular cloning and heterologous expression in *Pichia pastoris* of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from basidiomycete *Ustilago maydis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 2530-2539.
- [109] Dragosits, M., Stadlmann, J., Albiol, J., Baumann, K., Maurer, M., Gasser, B., Sauer, M., Altmann, F., Ferrer, P., Mattanovich, D. (2009) The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of proteome research* 8, 1380-1392.
- [110] Gasser, B., Maurer, M., Rautio, J., Sauer, M., Bhattacharyya, A., Saloheimo, M., Penttila, M., Mattanovich, D. (2007) Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC genomics* 8, 179.
- [111] Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M., Enfors, S. O. (2003) Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology* 102, 45-53.
- [112] Aw, R., Polizzi, K. (2013) Can too many copies spoil the broth? *Microbial Cell Factories* 12, 128.
- [113] Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Ritter, G., Cregg, J. M., Old, L. J., Batt, C. A. (2007) Coexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 74, 381-389.
- [114] Samuel, P., Prasanna Vadhana, A. K., Kamatchi, R., Antony, A., Meenakshisundaram, S. (2013) Effect of molecular chaperones on the expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research* 168, 615-620.
- [115] Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., Harvey, L. M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-270.

- [116] Damasceno, L. M., Huang, C. J., Batt, C. A. (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied microbiology and biotechnology* 93, 31-39.
- [117] Spohner, S. C., Muller, H., Quitmann, H., Czermak, P. (2015) Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 202, 118-134.
- [118] Takagi, S., Tsutsumi, N., Terui, Y., Kong, X. Y., Method for methanol independent induction from methanol inducible promoters in *Pichia*. US-Patent US 8236528 B2
- [119] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., Yaropolov, Y. I. (2007) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43, 523-535.
- [120] Hong, Y. Z., Zhou, H. M., Tu, X. M., Li, J. F., Xiao, Y. Z. (2007) Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp.420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Current microbiology* 54, 260-265.
- [121] Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., Rodríguez-Couto, S. (2010) Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research* 2010.
- [122] Bao, S., Teng, Z., Ding, S. (2013) Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*. *Molecular biology reports* 40, 1927-1936.
- [123] Tian, Y. S., Xu, H., Peng, R. H., Yao, Q. H., Wang, R. T. (2014) Heterologous expression and characterization of laccase 2 from *Coprinopsis cinerea* capable of decolorizing different recalcitrant dyes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment* 28, 248-258.
- [124] Rabert, C., Weinacker, D., Pessoa, A., Jr., Farias, J. G. (2013) Recombinant proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 351-356.
- [125] Huy, N. D., Thiagarajan, S., Son, Y. L., Park, S. M. (2011) Heterologous Expression of Endo-1,4-beta-xylanase A from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. *Mycobiology* 39, 121-124.
- [126] Song, Y., Lee, Y. G., Choi, I. S., Lee, K. H., Cho, E. J., Bae, H. J. (2013) Heterologous expression of endo-1,4-beta-xylanase A from *Schizophyllum commune* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 52, 170-176.
- [127] Huy, N. D., Thiagarajan, S., Choi, Y. E., Kim, D. H., Park, S. M. (2013) Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from *Phanerochaete chrysosporium* and its synergistic action with endo-xylanase. *Bioprocess and biosystems engineering* 36, 677-685.
- [128] Amore, A., Amoresano, A., Birolo, L., Henrissat, B., Leo, G., Palmese, A., Faraco, V. (2012) A family GH51 alpha-L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization. *Applied microbiology and biotechnology* 94, 995-1006.
- [129] Kawai, R., Yoshida, M., Tani, T., Igarashi, K., Ohira, T., Nagasawa, H., Samejima, M. (2003) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* beta-glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67, 1-7.
- [130] Juturu, V., Aust, C., Wu, J. C. (2013) Heterologous expression and biochemical characterization of acetyl xylan esterase from *Coprinopsis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 597-605.
- [131] Bey, M., Berrin, J. G., Poidevin, L., Sigoillot, J. C. (2011) Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes. *Microbial Cell Factories* 10, 113.
- [132] Yoshida, M., Ohira, T., Igarashi, K., Nagasawa, H., Aida, K., Hallberg, B. M., Divne, C., Nishino, T., Samejima, M. (2001) Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65, 2050-2057.
- [133] Sygmund, C., Gutmann, A., Krondorfer, I., Kujawa, M., Glieder, A., Pscheidt, B., Haltrich, D., Peterbauer, C., Kittl, R. (2012) Simple and efficient expression of *Agaricus meleagris* pyranose dehydrogenase in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 94, 695-704.
- [134] Zelena, K., Krings, U., Berger, R. G. (2012) Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresource Technology* 108, 231-239.

- [135] Durand, F., Gounel, S., Mano, N. (2013) Purification and characterization of a new laccase from the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Protein Expression and Purification* 88, 61-66.
- [136] Faubion, J. M., Hoseney, R. C. (1981) Lipoxygenase: Its Biochemistry and Role in Breadmaking. *Cereal Chemistry* 58, 175 - 180.
- [137] Dunnewind, B., van Vliet, T., Orsel, R. (2002) Effect of Oxidative Enzymes on Bulk Rheological Properties of Wheat Flour Doughs. *Journal of Cereal Science* 36, 357-366.
- [138] Frazier, P. J., Brimblecombe, F. A., Daniels, N. W. R., Russell Eggitt, P. W. (1977) The effect of lipoxygenase action on the mechanical development of doughs from fat-extracted and reconstituted wheat flours *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 247-254.
- [139] Boussard, A., Cordella, C. B. Y., Rakotozafy, L., Moulin, G., Buche, F., Potus, J., Nicolas, J. (2012) Use of chemometric tools to estimate the effects of the addition of yeast, glucose-oxidase, soybean or horse bean flours to wheat flour on biochemical bread dough characteristics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 113, 68-77.
- [140] Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Duzgunes, N., Renugopalakrishnan, V. (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142, 105-124.
- [141] Kongrit, D., Jisaka, M., Kobayasi, K., Nishigaichi, Y., Nishimura, K., Nagaya, T., Yokota, K. (2006) Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution of a potato sprout allene oxide synthase involved in a 9-lipoxygenase pathway. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 2160-2168.
- [142] Hu, T., Qv, X., Hu, Z., Chen, G., Chen, Z. (2011) Expression, molecular characterization and detection of lipoxygenase activity of tomloxD from tomato. *African Journal of Biotechnology* 10, 490-498.
- [143] Reddy, R. G., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Marnett, L. J. (1994) Expression, purification, and characterization of porcine leukocyte 12-lipoxygenase produced in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205, 381-388.
- [144] Nigam, S., Patabhraman, S., Ciccoli, R., Ishdorj, G., Schwarz, K., Petrucev, B., Kuhn, H., Haeggstrom, J. Z. (2004) The rat leukocyte-type 12-lipoxygenase exhibits an intrinsic epoxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 279, 29023-29030.
- [145] Wennman, A., Oliw, E. H. (2013) Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii*. *Journal of lipid research* 54, 762-775.
- [146] Nyssola, A., Heshof, R., Haarmann, T., Eidner, J., Westerholm-Parvinen, A., Langfelder, K., Kruus, K., de Graaff, L., Buchert, J. (2012) Methods for identifying lipoxygenase producing microorganisms on agar plates. *AMB Express* 2, 17.
- [147] Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- [148] Lin-Cereghino, J., Wong, W. W., Xiong, S., Giang, W., Luong, L. T., Vu, J., Johnson, S. D., Lin-Cereghino, G. P. (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 38, 44, 46, 48.
- [149] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [150] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- [151] Britton, H. T. S., Robinson, R. A. (1931) CXCVIII. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 0, 1456.
- [152] Linke, D., Matthes, R., Nimtz, M., Zorn, H., Bunzel, M., Berger, R. (2012) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7241-7251
- [153] Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8, 785-786.

- [154] Cavener, D. R., Ray, S. C. (1991) Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic acids research* 19, 3185-3192.
- [155] Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187-208.
- [156] Higgins, D., Cregg, J., Introduction to *Pichia pastoris*, in *Pichia Protocols* (1998) Humana Press, pp. 1-15.
- [157] Sreekrishna, 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 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190, 55-62.
- [158] Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A., Sreekrishna, K. (1994) Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. *Nature Biotechnology* 12, 181-184.
- [159] Hong, F., Meinander, N. Q., Jonsson, L. J. (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering* 79, 438-449.
- [160] Murray, W., Duff, S. B., Lanthier, P. (1989) Induction and stability of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology* 32, 95-100.
- [161] Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H., Sauer, M. (2004) Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology* 113, 121-135.
- [162] Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., Lin-Cereghino, J. (2013) The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* 519, 311-317.
- [163] Pechan, T., Ma, P. W., Luthe, D. S. (2004) Heterologous expression of maize (*Zea mays* L.) Mir1 cysteine proteinase in eukaryotic and prokaryotic expression systems. *Protein Expression and Purification* 34, 134-141.
- [164] Bateman, A., Sandford, R. (1999) The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Current biology: CB* 9, R588-590.
- [165] Zhang, C., Zhou, X., Lu, F., Bie, X., Tao, T., Ying, Q., Lu, Z. (2012) [Cloning and expression of lipoxygenase gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 and purification, characterization of the recombinant enzyme]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* 28, 440-456.
- [166] Walther, M., Anton, M., Wiedmann, M., Fletterick, R., Kuhn, H. (2002) The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 27360-27366.
- [167] Kjeldsen, T., Pettersson, A. F., Hach, M. (1999) Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and applied biochemistry* 29 (Pt 1), 79-86.
- [168] Tsuchiyama, M., Sakamoto, T., Fujita, T., Murata, S., Kawasaki, H. (2006) Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et biophysica acta* 1760, 1071-1079.
- [169] Tabka, M. G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J. C. (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 897-902.
- [170] Ou, S., Kwok, K.-C. (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1261-1269.
- [171] Topakas, E., Vafiadi, C., Stamatis, H., Christakopoulos, P. (2005) *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 729-736.
- [172] Couto, J., St-Louis, R., Karboune, S. (2011) Optimization of feruloyl esterase-catalyzed synthesis of feruloylated oligosaccharides by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 73, 53-62.

- [173] Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P. (2006) Regioselective esterase-catalyzed feruloylation of L-arabinobiose. *Carbohydrate Research* 341, 1992-1997.
- [174] Mastihubová, M., Mastihuba, V., Bilaničová, D., Boreková, M. (2006) Commercial enzyme preparations catalyze feruloylation of glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38, 54-57.
- [175] Borneman, W. S., Hartley, R. D., Morrison, W. H., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. (1990) Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Applied microbiology and biotechnology* 33, 345-351.
- [176] Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Popper, L., Berger, R. G. (2013) An enzyme from *Auricularia auricula-judae* combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity. *Process Biochemistry* 48, 1872-1878.
- [177] Kelle, S., Zelena, K., Krings, U., Linke, D., Berger, R. G. (2014) Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 95, 233-239.
- [178] LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., McCoy, J. M., Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*, in *Methods in Enzymology* (2000) Academic Press, pp. 322-340.
- [179] Singh, P., Sharma, L., Kulothungan, S. R., Adkar, B. V., Prajapati, R. S., Ali, P. S., Krishnan, B., Varadarajan, R. (2013) Effect of signal peptide on stability and folding of *Escherichia coli* thioredoxin. *PLoS one* 8, e63442.
- [180] Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5, 172.
- [181] Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48, 1-13.
- [182] Benoit, I., Asther, M., Bourne, Y., Navarro, D., Canaan, S., Lesage-Meessen, L., Herweijer, M., Coutinho, P. M., Asther, M., Record, E. (2007) Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology* 73, 5624-5632.
- [183] Fernandez-Alvarez, A., Elias-Villalobos, A., Ibeas, J. I. (2010) Protein glycosylation in the phytopathogen *Ustilago maydis*: From core oligosaccharide synthesis to the ER glycoprotein quality control system, a genomic analysis. *Fungal genetics and biology : FG & B* 47, 727-735.
- [184] Berends, E., Ohm, R. A., de Jong, J. F., Rouwendal, G., Wosten, H. A., Lugones, L. G., Bosch, D. (2009) Genomic and biochemical analysis of N-glycosylation in the mushroom-forming basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Applied and environmental microbiology* 75, 4648-4652.
- [185] Kroon, P. A., Faulds, C. B., Brezillon, C., Williamson, G. (1997) Methyl Phenylalkanoates as Substrates to Probe the Active Sites of Esterases. *European Journal of Biochemistry* 248, 245-251.
- [186] Topakas, E., Christakopoulos, P., Faulds, C. B. (2005) Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *Journal of Biotechnology* 115, 355-366.
- [187] Romero, P. A., Arnold, F. H. (2009) Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nat Rev Molecular and Cellular Biology* 10, 866-876.
- [188] Vardakou, M., Katapodis, P., Samiotaki, M., Kekos, D., Panayotou, G., Christakopoulos, P. (2003) Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. *International journal of biological macromolecules* 33, 129-134.
- [189] Linke, D., Leonhardt, R., Eisele, N., Petersen, L. M., Riemer, S., Nimtz, M., Berger, R. G. (2015) Carotene-degrading activities from *Bjerkandera adusta* possess an application in detergent industries. *Bioprocess and biosystems engineering* 38, 1191-1199.
- [190] Linke, D., Lehnert, N., Nimtz, M., Berger, R. G. (2014) An alcohol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* with a distinct glycerol oxidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 61-62, 7-12.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Sebastian Kelle
Geburtsdatum 16.06.1986 in Magdeburg

SCHULBILDUNG

08/1992 – 07/1996 Grundschule am Elbdamm, Magdeburg
08/1996 – 06/2005 Immanuel-Kant-Gymnasium, Magdeburg
06/2005 Abitur; Prüfungsfächer: Biologie, Englisch, Deutsch, Mathematik, Psychologie

WEITERER WERDEGANG

10/2005 – 06/2006 Grundwehrdienst im Zentralen Sanitätsdienst der Bundeswehr
10/2006 – 10/2011 Biologie-Studium
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Hauptfach: Genetik, Nebenfächer: Biochemie, Biotechnologie und Pflanzenphysiologie

Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Diplomarbeit) „Analyse des *LAC*-Promotors in *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae*“
Akademischer Grad: Diplom-Biologe

10/2011 – 01/2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abteilung für Molekulargenetik

03/2012 – 09/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Leibniz-Universität Hannover
Institut für Lebensmittelchemie; Promotion