

P11.67

## Verbesserung der L-Threoninbildung mit *Corynebacterium glutamicum*

Dr. R. Diesveld<sup>1)</sup>, N. Staebler<sup>1)</sup>, Dr. L. Eggeling<sup>1)</sup> (E-Mail: l.eggeling@fz-juelich.de)<sup>1)</sup>Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, D-52428 Jülich, Germany

DOI: 10.1002/cite.200950302

*Corynebacterium glutamicum* wird weltweit zur Aminosäureproduktion benutzt. Besonders hervorzuheben ist dabei die Produktion von L-Glutamat und L-Lysin, von denen derzeit jährlich 1 800 000 Tonnen beziehungsweise 850 000 Tonnen hergestellt werden. Aber auch L-Threonin wird als Futtermittelzusatz in einer Größenordnung von jährlich etwa 70 000 Tonnen produziert. Im Gegensatz zu L-Glutamat und L-Lysin wird L-Threonin allerdings aus *Escherichia coli* gewonnen. Da *E. coli* un-

ter Umständen immunogen ist, ist bei der Herstellung ein zusätzlicher Separationsschritt notwendig. Ein solcher Schritt würde bei einer Produktion mit *C. glutamicum* entfallen. Die kondensierte Kulturbrühe könnte dem Futtermittel komplett zugegeben werden. Allerdings unterliegen die Ausbeuten bislang starken Limitationen. Unsere Arbeiten zeigen, dass der limitierende Schritt hierbei der Export der Aminosäure aus *C. glutamicum* ist [1]. Aus diesem Grund wurden vier Exporter aus

*E. coli*, die am Export von L-Threonin oder verwandten Aminosäuren beteiligt sind, hinsichtlich ihrer Funktion und Spezifität in *C. glutamicum* untersucht. Letztendlich konnte so ein Stamm, der eine deutlich erhöhte L-Threoninexportrate zeigt, geschaffen und damit die Grundlage für eine effiziente Produktion von L-Threonin mit *C. glutamicum* gelegt werden.

[1] R. Diesveld, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *16*, 198–207.

P11.68

## Mikrotiterplattenanalyse von Cytochrom P450 Metaboliten

A. König<sup>1)</sup> (E-Mail: anna2.koenig@tu-dortmund.de), J. Ksienczyk<sup>1)</sup>, C. M. Niemeyer<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Lehrstuhl für Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik, TU Dortmund, D-44221 Dortmund

DOI: 10.1002/cite.200950029

Bei der Cytochrom P450 (CYP)-Superfamilie handelt es sich um eine sehr heterologe Enzymklasse, die eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen katalysiert. CYP-Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Biotransformation von Endo- und Exobiotika. Während der Detoxifizierung können reaktive Zwischenprodukte entstehen, die canzerogene Eigenschaften haben [1]. Deshalb sind analytische in vitro-Methoden wünschenswert, die ein Screening neuer Wirkstoffe ermöglichen, um Tierversuche zu reduzieren. Darüber hinaus sind CYP-Enzyme für die Biokatalyse von

großem Interesse, da sie eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren, wie z. B. Hydroxylierungen und Epoxidierungen, die durch herkömmliche organische Synthesewege oft nur schwer zugänglich sind [2].

Es wird über einen P450-Aktivitäts-Assay in Mikrotiterplatten für das Screening von CYP-Enzymen berichtet. Als Testsystem wurde der Metabolismus des Modells substrates Testosteron (TS) durch CYP3A4 Baculosomen untersucht. In literaturbeschriebenen Aktivitätstests für das CYP3A4/TS-System werden typischerweise Reaktionsvolumina von 200

– 1000 µL und hohe Konzentrationen von hepatischen Mikrosomen (i. d. R. aus Ratten) benötigt, um ausreichende Signalintensitäten zu erzielen. Hier wird gezeigt, dass durch Einsatz von HPLC-MS/MS-Analytik ermöglicht wird, verschiedenen TS-Metaboliten mit deutlich verbesserten Nachweisgrenzen spezifisch zu detektieren.

[1] F. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 70.

[2] K. Rabe, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 1059.

P11.69

## Kontinuierliche enzymatische Herstellung von Lactulose

Dipl.-Ing. K. Jandl<sup>1)</sup> (E-Mail: jandl@uni-hohenheim.de), Dr. rer. nat. S. Lutz-Wahl<sup>1)</sup>, Prof. Dr.-Ing. J. Hinrichs<sup>2)</sup>, Prof. Dr. rer. nat. L. Fischer<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Fachgebiet Biotechnologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Garbenstraße 25, D-70599 Stuttgart, Germany<sup>2)</sup>Fachgebiet Lebensmittel tierischer Herkunft, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Garbenstraße 21, D-70599 Stuttgart, Germany

DOI: 10.1002/cite.200950305

Das Disaccharid Lactulose (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-fructose) wird aufgrund seiner präbiotischen Wirkung

bereits heute Lebensmitteln wie Säuglingsnahrung oder Joghurt (Japan) zugesetzt. Die industrielle Herstellung er-

folgt bislang ausschließlich über die chemisch-thermische Isomerisierung von Lactose [1]. Über einen neuen Weg

der enzymatischen Transgalactosylierung von Lactose und Fructose [2] ist die direkte Synthese von Lactulose im Lebensmittel möglich.

Zu diesem Zweck wurde eine hyperthermophile  $\beta$ -Glycosidase kovalent immobilisiert und ein kontinuierliches Verfahren für die Lactulose-Synthese aufgebaut. Als Lactosequelle wurde Molken-UF-Permeat ausgewählt, da Molke als Nebenprodukt der Käseherstellung in großen Mengen verfügbar ist. Unter Zugabe von 90 g L<sup>-1</sup> Fructose konnten 7 g L<sup>-1</sup> Lactulose im Produktstrom

synthetisiert werden. Die gebildete Lactulosemenge war über 14 Tage konstant.

Mit dem aufgezeigten Verfahren ist die kontinuierliche Umwandlung von Lactose und Fructose zu Lactulose in Molken-UF-Permeat möglich. Neben der präbiotischen Wirkung besitzt das entstehende Produkt eine hohe Süßkraft und kann nach der Konzentrierung an anderen Lebensmitteln zugesetzt werden. Darüber hinaus kann die Fütterung von Nutztieren mit diesen präbiotischen lactulosehaltigen Produkten erfolgen.

Dieses Vorhaben (AiF 14787 N) wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

- [1] F. Zokae et al., *Process Biochem.* **2002**, 37, 629.  
[2] J. Mayer et al., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6983.

### P11.70

## Sekretion einer Kofaktor-haltigen Oxidase durch *Corynebacterium glutamicum*

S. Scheele<sup>1)</sup> (E-Mail: s.scheele@fz-juelich.de), Dr. J. Bongaerts<sup>2)</sup>, Dr. K.-H. Maurer<sup>2)</sup>, Prof. Dr. R. Freudl<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, D-52425 Jülich, Germany

<sup>2)</sup>Henkel AG & Co. KGaA, Henkelstraße, D-40191 Düsseldorf, Germany

DOI: 10.1002/cite.200950388

Die Verwendung Gram-positiver Bakterien als Wirtsorganismen für die Produktion technischer Enzyme bietet eine Reihe an Vorteilen gegenüber der intrazellulären Proteinproduktion. Insbesondere das Gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* ist ein viel versprechender Wirtsorganismus für die sekretorische Produktion technisch interessanter Enzyme, da es im Vergleich mit dem vielfach verwendeten Bakterium *Bacillus subtilis* nahezu

keine extrazelluläre Proteaseaktivität aufweist.

Vor diesem Hintergrund wird über die Sekretion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase aus *Streptomyces coelicolor* über den Tat-Weg (twin-arginine translocation) von *C. glutamicum* berichtet. Im Gegensatz zum generellen Sekretionsweg, ermöglicht der Tat-Weg die Translokation vollständig gefalteter, Kofaktor-haltiger Proteine durch die bakterielle Cytoplasmamembran. Aus diesem Grund wurde

der hier untersuchten Sorbitol/Xylitol-Oxidase das Tat-abhängige Signalpeptid TorA aus *E. coli* vorgeschaltet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oxidase strikt über den Tat-Weg transloziert wird und das sekretierte Enzym in aktiver Form im Kulturüberstand vorliegt. Unseres Wissens ist dies das erste Mal, dass ein heterologes, normalerweise cytosolisches, Kofaktor-haltiges Protein über den Tat-Weg eines Gram-positiven Bakteriums in aktiver Form transloziert wurde.

### P11.71

## Auf der Suche nach nicht-natürlichen P450-Substraten

M. Erkelenz<sup>1)</sup>, K. S. Rabe<sup>1)</sup>, Prof. Dr. C. M. Niemeyer<sup>1)</sup> (E-Mail: christof.niemeyer@tu-dortmund.de)

<sup>1)</sup>FB Chemie Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik, Universität Dortmund, Otto-Hahn-Straße 66, D-44227 Dortmund, Germany

DOI: 10.1002/cite.200950090

Die enantioselektive Oxidierung von nicht-aktivierten C-C-Bindungen stellt eine Herausforderung für die Produktion von Feinchemikalien dar. Es ist daher interessant, den Werkzeugkasten der klassischen chemischen Synthese zu ergänzen und die Enzymfamilie der P450 Cytochrome technologisch nutzbar zu machen. Diese Enzyme sind unter anderem an der Hydroxylierung von C-C-Bindungen in hydrophoben Substraten beteiligt. In einigen Studien

konnte gezeigt werden, dass sich die katalytische Aktivität der P450 Cytochrome durch gerichtete Evolution steigern lässt. Voraussetzung dafür ist aber eine minimale Reaktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat. Diese kann anschließend durch mehrere Evolutionszyklen gesteigert werden.

Es wurde ein in-vitro Testsystem entwickelt, mit dem die Reaktivität von löslichen P450 Cytochromen gegenüber

verschiedenen Substraten ermittelt werden kann.

Dieses Testsystem umgeht den komplizierten Katalysezyklus der P450 Cytochrome, welcher NADPH und eine Reduktase erfordert, indem das Cytochrom über den „peroxide-shunt“-Weg betrieben wird. Dabei verwendet das Cytochrom Wasserstoffperoxid oder andere organische Peroxide als Co-Substrat, um das eigentliche Substrat zu hydroxylieren.