

Herstellung hochwertiger Kohlenhydrate durch den Einsatz von Biokatalysatoren aus dem thermoalkaliphilen, anaerobem Bakterium *Anaerobranca gottschalkii*

AZ 13040/09

Prof. Dr. Garabed Antranikian (Projektkoordinator), Dr. Costanzo Bertoldo, Volker Thiemann, TU Hamburg-Harburg

Dr. Hans-Peter Klenk, Dr. A. Zibat, EPIDAUROS AG

Prof. Dr. Roland Freudl, Angela Vollstedt, Forschungszentrum Jülich GmbH

Prof. Dr. Reinhard Sterner, Catharina Jürgens, Universität zu Köln

Prof. Dr. Wolfgang Liebl, Universität Göttingen

1. Zusammenfassung

Das aus dem Lake Bogoria isolierte Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* vereint zwei Extreme miteinander. Es wächst optimal bei hohem pH-Wert (9,5) und hoher Temperatur (60°C). Zusammen mit der Tatsache, dass *A. gottschalkii* ein breites Spektrum an Kohlenhydraten als C-Quelle nutzen kann, nimmt das extremophile Bakterium aus diesem Grund eine Sonderstellung unter allen extremophilen Bakterien ein. Durch die Sequenzierung des kompletten Genoms von *Anaerobranca gottschalkii* konnten eine Reihe biotechnologisch relevanter Biokatalysatoren identifiziert werden. In Kooperation mit den Projektpartnern gelang die heterologe Expression der für eine intra- und eine extrazelluläre Amylase, ein Entzweigungsenzym (Pullulanase), ein intrazelluläres Verzweigungsenzym (branching enzyme) und eine CGTase (Cyclodextrin-Glycosyltransferase) kodierenden Gene in den mesophilen Wirtstämmen *E. coli* und *Staphylococcus carnosus*. Die in *E. coli* produzierten Enzyme lagen in aktiver Form im Cytoplasma vor. Die in *S. carnosus* produzierten Enzyme (Verzweigungsenzym und CGTase) konnten in aktiver Form zur Sekretion gebracht werden und lagen daher im Kulturüberstand vor. Die Sekretion wurde erreicht durch die Herstellung von Fusionsgenen bestehend aus dem für das jeweilige Enzym kodierenden Gen aus *A.*

gottschalkii und verschiedenen Signalsequenzen. Dabei wurden Signalsequenzen aus dem Sec- und dem jüngst entdeckten Tat-Proteintranslokationsweg sowie sogenannte Propeptid-Sequenzen, die in früheren Versuchen eine sekretionstimulierende Wirkung gezeigt hatten, verwendet. Bei beiden Enzymen wurde die höchste extrazelluläre Aktivität durch Anheftung einer Tat-Signalsequenz aus *E. coli* beobachtet. Nach Kontrollversuchen konnte daher nicht nur gezeigt werden, dass *Staphylococcus carnosus* über einen funktionalen Tat-Translokationsapparat verfügt, sondern es konnte im Rahmen dieser Arbeit auch erstmalig in Gram-positiven ein Tat-abhängiges Expressionssystem zur sekretorischen Gewinnung von Enzymen etabliert werden. Gegenüberüber der cytoplasmatischen Produktion bieten sekretorische Expressionssysteme die Vorteile, dass zum einen die Gefahr von proteolytischem Abbau der rekombinanten Enzyme durch Wirtsproteasen und zum anderen die Neigung zur Bildung von „inclusion bodies“ (Proteinaggregationen) drastisch reduziert ist. Eine sekretorische Expression in Gram-positiven bietet gegenüber der Expression in Gram-negativen Bakterien den Vorteil, dass die rekombinanten Enzyme nicht im Periplasma, sondern im Kulturüberstand vorliegen, aus welchem sie leicht aufzureinigen sind. Die Nutzung des Tat-Systems schließlich bietet gegenüber der Nutzung des Sec-Systems den Vorteil, dass die rekombinanten Enzyme in gefalteter und somit aktiver Form sekretiert werden können.

Die rekombinant produzierten Enzyme wurden aufgereinigt und charakterisiert. Die pH-Optima der extrazellulären Enzyme lagen im Bereich des optimalen Wachstums von *A. gottschalkii*, die Temperaturoptima lagen ca. 10°C darüber. Es bewahrheitete sich die im Projektantrag formulierte Hoffnung, dass extrazelluläre Enzyme thermoalkaliphiler Mikroorganismen in einem weiten pH- und Temperaturbereich aktiv sind. Die Substrat und Produktspezifitäten der Enzyme wurden mit verschiedenen Methoden (HPLC, DC, HPAEC, SEC) bestimmt. Eine ökologische und ökonomische Evaluation der Cyclodextrinproduktion wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Heinzle durchgeführt.

2. Anlass und Zielvorstellung

Biopolymere wie Stärke bzw. Amylopektin und Amylose sind wertvolle nachwachsende Rohstoffe. Sie bestehen aus Glucose-Monomeren, die durch α -1,4-glycosidische und α -1,6-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Ziel des Projekts war es, mit Hilfe von thermostabilen Enzymen (α -Amylase, CGTase, Verzweigungsenzym, Entzweigungsenzym) aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *A. gottschalkii* umweltfreundliche Verfahren zur

Herstellung von hochwertigen Kohlenhydraten (Cyclodextrine, verzweigte Dextrine und Oligosaccharide) aus nachwachsenden Rohstoffen zu entwickeln.

Die enzymatische Stärkeverflüssigung zur Produktion von HFCD (high fructose corn syrup) ist ein bereits in der industriellen Anwendung etabliertes Verfahren (Schäfer und Dalbøge, 1999). Die einzelnen Verfahrensschritte laufen mit Amylasen, Pullulanasen und Glucoamylasen unter verschiedenen Temperatur- und pH-Bedingungen ab, was zum einen energieaufwendige Heiz- und Kühschritte erforderlich macht und zum anderen eine hohe Salzfracht (aus der Neutralisation) mit sich bringt. Neuartige Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen sind daher gefragt, um den Prozess mit weniger Schritten und unter konstanteren Prozessbedingungen ablaufen zu lassen.

Cyclodextrine werden ebenfalls enzymatisch aus dem nachwachsenden Rohstoff Stärke produziert. Die bisher eingesetzten Cyclodextringlycosyltransferasen (CGTasen) sind thermolabil. Daher kommt ein zweistufiges Verfahren zum Einsatz, bei dem die Stärke zunächst durch thermostabile α -Amylasen hydrolysiert ($>90^{\circ}\text{C}$) und anschließend bei niedrigeren Temperaturen ($40\text{-}50^{\circ}\text{C}$) durch CGTasen zu einem Gemisch von α -, β - und γ -Cyclodextrinen konvertiert wird. Diese werden anschließend in aufwendigen Verfahren mit Hilfe von umweltschädlichen, organischen Lösungsmitteln voneinander getrennt. Der Einsatz einer thermostabilen CGTase mit spezifischer Produktbildung könnte einen einstufigen Prozess ermöglichen und die Aufreinigungsschritte überflüssig machen.

3. Verwendete Methoden

- shotgun- Genomsequenzierung
- bioinformatische Auswertung der produzierten DNA-Sequenzen
- Herstellung von Fusionsgenen zur Sekretion ausgewählter Enzyme in *Staphylococcus carnosus*
- Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von Enzymen
- Zucker und Polymeranalytik mit HPLC , DC (Dünnschichtchromatographie), HPAEC (high performance anion exchange chromatography), SEC (size-exclusion chromatography)
- Enzymoptimierung durch rationales Protein-Design bzw. gerichtete Evolution
- Messung von Thermostabilität mittels Differential scanning calorimetry
- Herstellung von Enzymen durch großtechnische Fermentation

4. Ergebnisse und Diskussion

Genomsequenzierung

Ziel des Teilprojekts war, es unter geringst möglichem Aufwand und innerhalb kürzester Zeit alle oder möglichst viele Gene des Kohlenhydratstoffwechsels des extremophilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* zu identifizieren. Die Sequenzinformationen sowie Klone, die die gewünschten DNA-Fragmente enthielten, sollten den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt werden.

Die partielle Genomanalyse erfolgte über eine sogenannte shotgun-Sequenzierung. Dabei wurde die genomische DNA mechanisch geschert, kloniert und an den Fragmentenden sequenziert. In 14.865 Sequenzierungsansätzen wurden 11.634 brauchbare Sequenzen mit einer Rohsequenz von 11,97 Mbp generiert. Die produzierten Sequenzfragmente wurden in einer Datenbank zusammengefasst und assembliert. In einer ersten automatischen Annotation wurden die Sequenzen mit den in der hausinternen Datenbank gespeicherten Informationen aus ca. zwei Dutzend mikrobiellen Genomen verglichen. Die Sequenzen der Contigs und die Liste der identifizierten Gene wurden von der Firma Epidauros an die Kooperationspartner übergeben. Nach Durchsicht der Genlisten wurden verbliebene Sequenzlücken in biotechnologisch relevanten Genen geschlossen (insgesamt ca. 60 Gene). Der letzte Stand der Genomsequenz: 12.355 gute Sequenzen sind in 510 Contigs assembliert. Die Gesamtlänge dieser Contigs beträgt 1.921.832 bp mit einer Qualität von PHRED 38 (entspricht einem zu erwartenden Sequenzfehler in ca. 8.000 bp). Es wurden ca. 95% des Genoms bei 3,7-facher Sequenzabdeckung sequenziert. In der letzten Annotationsrunde wurden 1.956 ORFs identifiziert. 1.541 (78 %) der potentiellen Gene wiesen Homologien zu bereits bekannten Genen auf. Unter ihnen fanden sich 593 potentielle Membranproteine und insgesamt 93 Gene des Zuckermetabolismus. Den Projektteilnehmern wurden *Password*-geschützte Zugangsrechte auf den die Informationen enthaltenden Server eingerichtet. Ein Manuskript wird in Kürze zur Publikation in Gene eingereicht werden.

Etablierung eines Systems zur sekretorischen Expression von Enzymen aus A. gottschalkii

Ziel des Teilprojekts war die Etablierung effizienter mesophiler Expressionssysteme für die biotechnologische Gewinnung ausgesuchter Enzyme (intrazelluläres Verzweigungsenzym, extrazelluläre CGTase) aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii*. Im Gegensatz zu Ansätzen zu einer intrazellulären Enzymproduktion bietet eine sekretorische Proteingewinnung mit mesophilen Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus carnosus* den Vorteil, dass die gewünschten Proteine direkt in den Kulturüberstand sekretiert werden. *S. carnosus* eignet sich als Produktionswirt deshalb besonders, weil dieser im Gegensatz zu den meisten anderen Gram-positiven Bakterien keine Proteasen in den Kulturüberstand sezerniert, die die Ausbeute an sekretierten heterologen Proteinen beeinträchtigen können. Prinzipiell stehen in den meisten Gram-positiven Bakterien zwei Sekretionswege zur Verfügung. Dabei handelt es sich einerseits um den allgemeinen Sec-Weg, der bereits seit langem für die sekretorische Proteingewinnung verwendet wird. Die Sec-abhängige Sekretion von heterologen Proteinen, bei der diese in ungefalteter Form über die Plasmamembran transloziert werden und außerhalb des Cytosols ihre korrekte Konformation einnehmen müssen, verläuft allerdings häufig ineffizient. Fremdproteine sind oft nicht in der Lage, nach erfolgter Membrantranslokation in der Zellhülle schnell genug zu falten, um einem Abbau durch in der Zellwand lokalisierten Proteasen zu entgehen. Der erst kürzlich entdeckte Tat-Weg, für den eine biotechnologische Anwendung in Gram-positiven Bakterien bislang noch nicht beschrieben wurde, besitzt dagegen die herausragende Eigenschaft, bereits fertig gefaltete Proteine aus der Zelle auszuschleusen. Die für die Tat-abhängige Membrantranslokation notwendige Faltung von Vorläuferproteinen im Cytosol vermeidet dabei die genannten Probleme, die die Sec-abhängige Gewinnung heterologer Proteine beeinträchtigen. Dieser neue Exportweg eröffnet zum ersten Mal die Möglichkeit, Proteine, v.a. jene von biotechnologischer Relevanz, in Bakterien sekretorisch zu gewinnen, die mit einer Sekretion über den Sec-Weg bislang nicht oder mit nur geringer Effizienz produziert werden können.

Um die Nutzung des Tat-Weges für eine heterologe Proteinsekretion im Wirt *S. carnosus* zu erschließen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, ob *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt und, wenn ja, ob dieser in der Lage ist, Fremdproteine aus der Zelle zu sekretieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusion des intrazellulären Verzweigungsenzyms sowie des reifen Teils der extrazellulären CGTase mit der Signalsequenz des *E. coli* Tat-Substrates TorA zur Sekretion beider Enzyme in aktiver Konformation in den Kulturüberstand von *S. carnosus* führte. Die Inaktivierung des in der

Zwischenzeit klonierten Gens für den putativen Rezeptor der Tat-Translokase (TatC) von *S. carnosus* führte zur vollständigen Inhibierung der Sekretion der beiden Enzyme (Abb.1). Damit wurde erstmalig nachgewiesen, dass *S. carnosus* einen funktionellen Tat-Weg besitzt, der grundsätzlich für die heterologe Proteingewinnung geeignet ist.

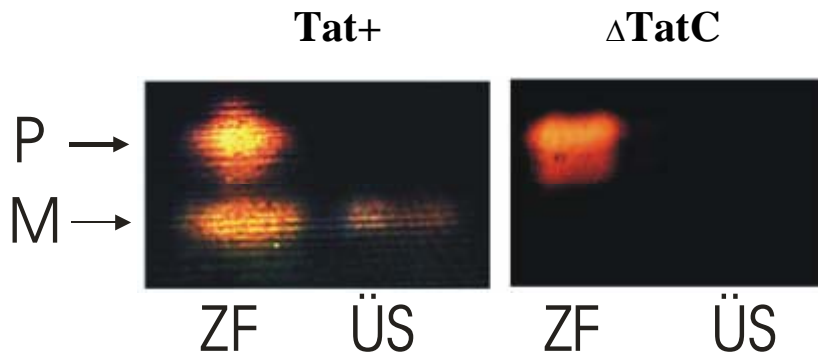


Abb. 1: Tat-abhängige Sekretion des Verzweigungsenzyms (VE) von *A. gottschalkii* durch *S. carnosus*. Die Fusion von VE mit dem Tat-Signalpeptid TorA aus *E. coli* führt in *S. carnosus* Wildtyp (Tat+) zur Translokation des Enzyms über die Plasmamembran. Diese ist in Abwesenheit des Rezeptors der Tat Translokase (Δ TatC) vollständig blockiert. Auftrennung und Sichtbarmachung der aktiven Formen des Verzweigungsenzymserfolgte durch native Gelelektrophorese mit anschließender Jod-Stärke-Reaktion. p: TorA-VE Vorläuferprotein; M: reifes VE-Protein; ZF: Zellfraktion; ÜS: Kulturüberstand.

Im Hinblick auf die maximal erreichbare Ausbeute an sekretiertem Enzym wurden vergleichende Untersuchungen zur Ausschleusung der Enzyme über den generellen Sec-Weg bzw. den alternativen Tat-Weg durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Sec-abhängige Produktion von Verzweigungsenzym und CGTase in *S. carnosus* nur bedingt geeignet ist. Die alleinige Fusion der Modellproteine mit der Signalsequenz einer Sec-abhängigen Lipase aus *S. hyicus* führte in beiden Fällen nicht zur Sekretion über den Sec-Weg von *S. carnosus*. Eine Sec-abhängige Sekretion wurde erst durch zusätzliches Einfügen eines Propeptides möglich, für das bekannt ist, dass es sich positiv auf die Sekretion heterologer Proteine auswirkt. Allerdings war der Einsatz des Propeptids für eine sekretorische Gewinnung der beiden Modellenzyme trotz der Sekretion großer Mengen an Propeptid-Fusionsprotein ebenfalls ungeeignet. Das Propeptid interferierte mit der korrekten Faltung des Verzweigungsenzyms, so dass ausschließlich enzymatisch inaktives Protein in den Kulturüberstand gelangte, während im Falle der CGTase das sekretierte Pro-CGTase Fusionsprotein durch zellassoziierte Proteasen in der Zellhülle abgebaut wurde und nur geringe Mengen des

intakten Fusionsproteins in den Überstand gelangten. Eine Sekretion der authentischen CGTase mit ihrer eigenen Signalsequenz über den Sec-Weg von *S. carnosus* war zwar prinzipiell möglich, führte jedoch nur zur Sekretion relativ geringer Mengen an reifer CGTase in den Kulturüberstand. Dennoch zeigte dieser Befund, dass Sec-Signalsequenzen aus extremophilen Bakterien mit dem Sec-Apparat mesophiler Bakterien produktive Wechselwirkungen eingehen können.

Im Vergleich zu den Ansätzen zur Sec-abhängigen Sekretion der Modellproteine konnten mit einer Tat-abhängigen Sekretion von Verzweigungsenzym und CGTase jeweils die höchsten Enzymaktivitäten im Kulturüberstand erzielt werden. Dieser Weg stellt demnach die Methode der Wahl für eine sekretorische Gewinnung dieser Enzyme in *S. carnosus* dar. Die erfolgreiche Tat-abhängige Gewinnung je eines heterologen intra- und extrazellulären Enzyms, deren Sekretion über den Sec-Weg in *S. carnosus* nur mit geringer Effizienz stattfand beweist, dass der Tat-Weg eine vielversprechende Alternative zur Sec-abhängigen Proteingewinnung darstellt. Offensichtlich ist es vorteilhaft, wenn heterologe Proteine ihre native Konformation unter Ausnutzung der cytosolischen Chaperone einnehmen können und erst anschließend im gefalteten Zustand über den Tat-Weg aus der Zelle ausgeschleust werden. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, dass das Potential der Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine durch den Siebeffekt der Zellwand limitiert wird. An Hand der Tat-abhängig sekretierten Enzymvarianten konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil der translozierten Enzyme im Zellwandkompartiment akkumuliert und sehr wahrscheinlich erst durch den während des Wachstums der Zellen stattfindenden Zellwandturnover in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Eine Tat-abhängige Gewinnung heterologer Proteine in Gram-positiven Bakterien bietet sich daher vor allem für kleinere Proteine an, für die eine Diffusion durch die Poren der Zellwand ungehindert möglich ist.

Vergleichende Charakterisierung der intra- und extrazellulären α -Amylase

Die für eine extrazelluläre (amyA) und eine intrazelluläre (amyB) α -Amylase kodierenden Gene konnten erfolgreich in *E. coli* kloniert und aktiv exprimiert werden. Die Enzyme, die 10% bzw. 4% des löslichen Gesamtproteins des jeweiligen *E. coli*-Stammes ausmachten, wurden mittels Anionenaustausch- und hydrophober Interaktions-Chromatographie gereinigt. Um die native Molekularmasse der rekombinanten Proteine zu bestimmen, wurden Gelfiltrationen (Superdex 200 Säule) durchgeführt. Für AmyA wurde so eine Molekularmasse

von ~58 kDa ermittelt, was gut mit der errechneten Molekularmasse von 59 kDa (ohne Signalpeptid) übereinstimmt. Damit ist davon auszugehen, dass die rekombinante AmyA als Monomer vorliegt. Für AmyB war das Resultat der Gelfiltration nicht eindeutig: Das Protein eluierte über einen breiten Bereich entsprechend einem Größenbereich von 78 - 142 kDa, was sich deutlich unterscheidet von dem Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse (~55 kDa) und der errechneten Größe von 52 kDa. Bei der nativ-PAGE Analyse dringt das Protein kaum in das Gel ein. AmyB ist daher vermutlich kein monomeres Enzym, der genaue Oligomerisierungszustand ist aber noch unklar. AmyA zeigte ihre höchste Aktivität in HEPES-Puffer, wohingegen AmyB in MES-Puffer am aktivsten war. Die extrazelluläre α -Amylase ist über einen pH-Bereich von pH 6,0 bis 9,5 und einen Temperaturbereich von 45 bis 70°C aktiv. Das Optimum der enzymatischen Aktivität liegt bei einer Temperatur von 70°C und einem pH-Wert von 8,0. Der Aktivitätsbereich der intrazellulären α -Amylase AmyB erstreckte sich von pH 5,5 bis 7,5 und von 40 bis 65°C. Ihr Aktivitätsoptimum liegt bei 55°C und pH 6,0. Bei der Untersuchung des Einflusses diverser Metall-Ionen auf die Aktivität der rekombinanten Amylasen stellte sich heraus, dass die Aktivität von AmyA, nicht aber von AmyB, durch die Gegenwart von Calcium-Ionen etwa 2-fach gesteigert wurde. AmyA ist aber andererseits nicht Calcium-abhängig, denn in Gegenwart von 5 mM EDTA ließ sich kein signifikanter Rückgang der Aktivität beobachten. Die Calcium-Unabhängigkeit wäre für den möglichen industriellen Einsatz von Vorteil.

Das Substrat, auf dem beide α -Amylasen die höchste spezifische Aktivität zeigten, ist Amylose. Beide Enzyme sind außerdem in der Lage, Stärke, Amylopektin, Pullulan, sowie α -, β - und γ -Cyclodextrin abzubauen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Enzymen wurde darin gefunden, dass AmyA das Trisaccharid Panose spalten konnte, AmyB dagegen nicht. Trehalose, Saccharose, Melibiose oder Raffinose wurden von keinem der Enzyme gespalten.

Durch dünnschichtchromatographische Analyse konnten Maltose und Glucose als Hauptprodukte der Hydrolyse von löslicher Stärke und Amylose für beide Amylasen nachgewiesen werden. Beide rekombinanten Enzyme spalten mit einem Endo-Mechanismus α -1,4-glycosidische Bindungen, und wurden daher als α -Amylasen klassifiziert. Eine bemerkenswerte Eigenschaft von AmyA ist, dass das Enzym mit Maltooligosaccharid-Substraten (Konzentration im Ansatz: 25 mM) starke Transferaseaktivität zeigte. Nach Umsetzung eines definierten Maltooligosaccharidsubstrates (DP2-DP7) entstanden jeweils

aus einem Substrat bestimmter Kettenlänge sowohl kürzere als auch längere Produkte. Bei ausgedehnter Inkubation wurden die länger-kettigen Produkte wieder abgebaut. Interessanterweise fiel bei der dünnschichtchromatographischen Analyse der Produkte auf, dass mit Ausnahme des Inkubationsansatzes mit Maltose bei allen Auftrennungen der Reaktionsprodukte ein Produktpot erschien, der auf Grund seines Laufverhaltens kein lineares Maltodextrin sein konnte. Weitere Analysen, unter anderem unter Verwendung eines Phenolphthalein-Komplexierungs-Assays, ergaben Hinweise darauf, dass es sich dabei vermutlich um β -Cyclodextrin handelt. Unseres Wissens ist Cyclodextrinbildung durch Transferaseaktivität bisher für keine andere α -Amylase beschrieben worden.

Frühere Versuche zur Untersuchung der Beständigkeit von AmyA gegen Hitzeinaktivierung haben gezeigt, dass dieses Enzym bei Temperaturen bis 60°C sehr stabil war. Die Enzymaktivität lag nach 58 h bei 60°C noch bei 84% der Ausgangsaktivität, während bei 70°C eine Halbwertszeit von ~40 h ermittelt wurde (siehe letzten Projektbericht). Somit ist dieses Enzym unter den für *A. gottschalkii* physiologischen Bedingungen ($T_{\text{opt}} \sim 55^\circ\text{C}$, $\text{pH}_{\text{opt}} \sim 8$) außerordentlich stabil. Auch AmyB war bei Temperaturen bis 60°C relativ stabil, jedoch deutlich weniger widerstandsfähig als AmyA. Nach vier Stunden bei 60°C wurde bei AmyB ein Aktivitätsverlust von 21 % festgestellt, und bei 70°C war eine Halbwertszeit der Inaktivierung von etwa 60 min zu beobachten. Die höhere Stabilität von AmyA könnte darin begründet liegen, dass dieses Enzym sekretiert wird und daher ungeschützt vom intrazellulären Milieu bestehen muss, während AmyB als cytoplasmatisches Enzym möglicherweise durch die im Zellinneren vorliegende hohe Makromolekülkonzentration oder durch stabilisierende Faktoren stabilisiert wird.

Tab. 1: Vergleich der *A. gottschalkii* α -Amylasen AmyA und AmyB

Eigenschaft	AmyA	AmyB
<u>Extrazellulär (Signalpeptid)</u>	+	-
pH-Optimum	8,0	6,0
'Temperatur-Optimum'	70°C	55°C
t _{1/2} (70°C)	40 h	1 h
Spaltung von Panose	+	-
Transglykosidierung von Maltooligosacchariden	+	-

Produktion des Entzweigungsenzyms (Pullulanase) zur effektiven Umsetzung von Stärke zu linearen Maltodextrinen

Aus der von der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von PulaA konnte abgeleitet werden, dass das Enzym in seinem natürlichen Wirt *A. gottschalkii* wahrscheinlich als Vorläufer mit Lipoprotein-Signalpeptid synthetisiert und nach posttranslationaler Modifizierung als Lipoprotein in der Cytoplasmamembran verankert vorliegt. Um bei der heterologen Expression Probleme zu vermeiden, wurde der ORF ohne Signalpeptid überexprimiert. Die Expression erfolgte in *E. coli*. Im Rahmen dieser Expressionsversuche wurden neben der Pullulanase (rPula) mit kompletter Sequenz eine N-terminal um 252 Aminosäuren trunctierte Pullulanase (rPula`) aufgereinigt. Außerdem wurde die native Pullulanase (Pula) gereinigt. Die Temperatur und pH-Spektren aller drei Enzyme sowie die Temperaturstabilität von rPula wurden bestimmt (Abb. 2). Alle drei Enzyme waren optimal bei einer Temperatur von 65-70°C und einem pH-Wert von 8-8,5 aktiv. Bei 65°C war rPula für mehrere Stunden stabil.

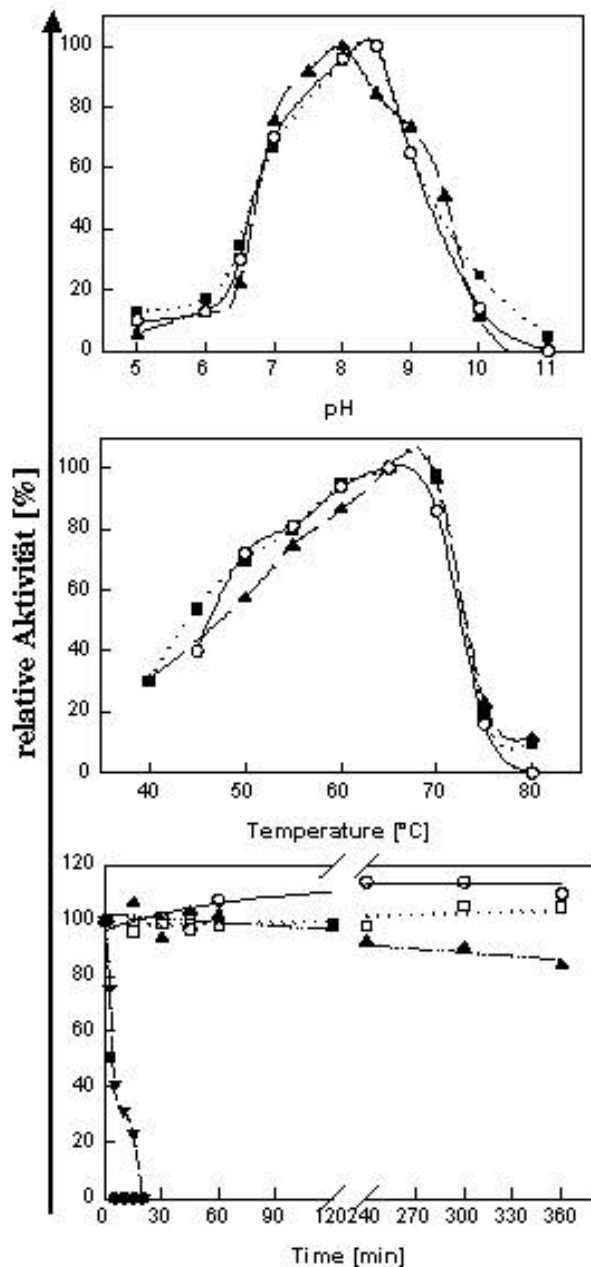


Abb. 2: Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf die Aktivität von rPulA(), rPulA'(■) und PulA(○) und die Thermostabilität von rPulA. Die Thermostabilität von rPulA wurde mit der rekombinanten Pullulanase bei 50°C (○), 65°C (□), 70°C (◇), 75°C (▽) und 80°C (●) bestimmt, indem nach unterschiedlichen Inkubationszeiten Proben entnommen und auf ihre Restaktivität getestet wurden.

rPulA zeigte höchste Aktivität mit Pullulan als Substrat (100%), das Enzym konnte jedoch auch β -Grenz-dextrine (24%), Amylopektin (14%) und Stärke (15%) hydrolysieren. Andere Polysaccharide (Glykogen, Dextran, Cellulose, Mannan, Laminarin), Oligosaccharide (α - oder β -Cyclodextrin, lineare Maltodextrine) oder Di- und Trisaccharide (Isomaltose,

Trehalose, Turanose, Cellobiose, Melibiose, Sucrose, Panose, Melizitose, Raffinose) wurden nicht hydrolysiert.

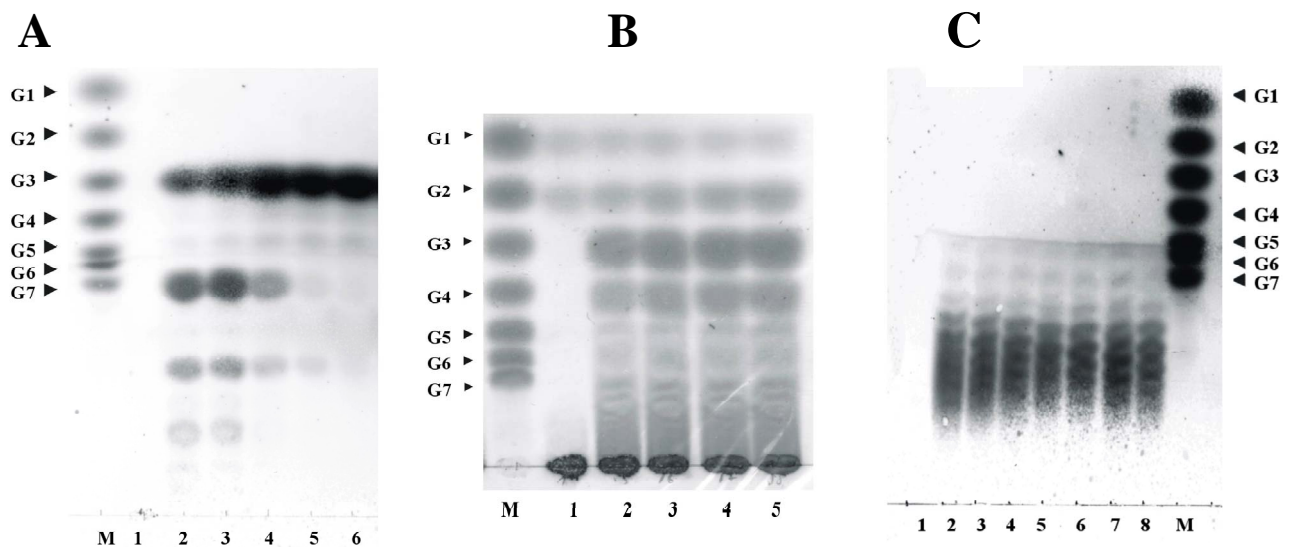


Abb. 3: Dünnschichtchromatographische Analyse der Produktbildung von rPulA mit Pullulan, Amylopektin und β -Grenz-dextrin. 200 μ l 0,5% Pullulan (A), 0,25% Amylopektin (B), oder 0,25% β -Grenz-dextrin(C) wurden zusammen mit 2 μ g (Pullulan) oder 5 μ g (Amylopektin und Grenz-dextrin) rPulA bei 60°C inkubiert. Während der Hydrolyse wurden nach 0 bis 180 min Proben (Spuren 1-8) genommen und dünnschichtchromatographisch getrennt. M, Maltodextrinmarker, bestehend aus Glucose (G1) bis Maltoheptaose (G7).

Aus Pullulan entstand durch rPulA-Hydrolyse ausschließlich Maltotriose (Abb. 3), was darauf hinweist, dass das Enzym ausschließlich die α -1,6-glycosidischen Bindungen des Substrates spaltet. Aufgrund seiner Substrat- und Bindungsspezifität konnte rPulA als TypI-Pullulanase klassifiziert werden. Das untersuchte Enzym stellt somit die erste bekannte TypI-Pullulanase aus einem thermoalkaliphilen Bakterium dar. Die kinetischen Konstanten K_m und v_{max} für die Pullulanhydrolyse durch rPulA bei 60°C betragen 0,75 mg/ml bzw. 62 U/mg. Die Aktivität von rPulA wurde durch Cyclodextrine gehemmt, wobei die stärkste Hemmung mit β -Cyclodextrin beobachtet wurden ($K_i=6$ mM). Somit wird rPulA im Vergleich zu bestimmten anderen Pullulanasen wie der aus *Thermotoga maritima* ($K_i=0,075$ mM für β -Cyclodextrin) nur moderat gehemmt. Das charakterisierte Entzweigunzenzym ist von Interesse in der Stärkehydrolyse. Es spaltet spezifisch die α -1,6 Bindungen und eignet sich daher zur Produktion linearer Dextrine, die in vielfältiger Weise eingesetzt werden. Unter anderem dienen Maltodextrine im Rahmen der Produktion von Glucose aus Stärke als Substrate für

Glucoamylasen, die diese zu Glucose abbauen. Der Einsatz thermophiler Pullulanasen in der Herstellung von Glucose aus Stärke bietet den Vorteil, dass der energieaufwendige Kühlschritt nach dem ersten Schritt entfiel und Amylasen, Pullulanen und Glucoamylasen könnten in einem Schritt eingesetzt werden.

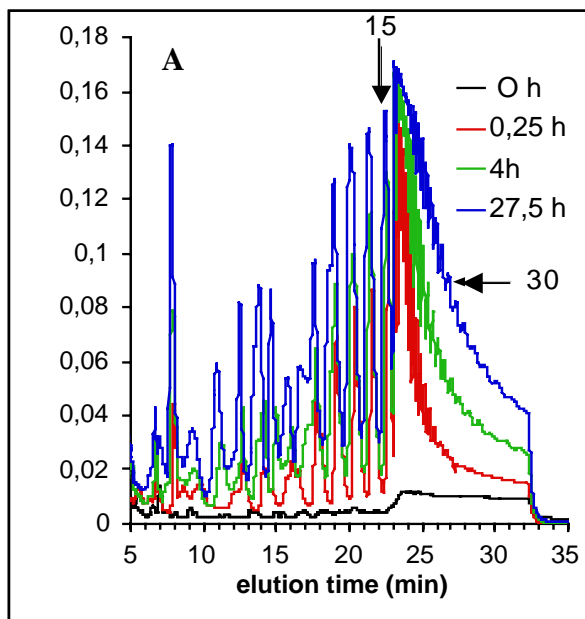
Die Untersuchungen zur *A. gottschalkii*-Pullulanase wurden in enger Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen Liebl und Antranikian durchgeführt. Ein Manuskript über die Resultate wurde in Form eines gemeinsamen Manuskripts im November 2003 zur Veröffentlichung in *Applied and Environmental Microbiology* eingereicht.

Produktion des Verzweigungsenzyms zur Umwandlung linearer Glucane in verzweigte Glucane

Verzweigungsenzyme (EC 2.4.1.18) sind intrazelluläre Enzyme, die die Spaltung von α -1,4-glycosidischen Bindungen in α -Glucanen und die anschließende α -1,6-glycosidische Anknüpfung der freigesetzten Oligomere katalysieren. Die Verzweigungen im Glykogen oder im Amylopektin von Stärken gehen auf die Aktivität des Verzweigungsenzyms zurück. Da die Löslichkeit der Moleküle mit steigendem Verzweigungsgrad zunimmt, kann die Löslichkeit von Stärke durch Behandlung mit dem Verzweigungsenzym erhöht werden und somit z.B. das Ausfällen (Retrogradation) von Stärke in Lebensmitteln reduziert werden. Des Weiteren besteht innerhalb der Stärkeindustrie stets Interesse an modifizierten Stärken (z.B. in der Papierbeschichtung).

Die Arbeitsgruppe Freudl stellte Fusionsgene aus dem Gen für das Verzweigungsenzym und verschiedenen Signalsequenzen her. Es gelang dabei die Herstellung von *Staphylococcus carnosus*-Stämmen, die das Verzweigungsenzym in aktiver Form sekretieren. Aus dem Überstand wurde das Verzweigungsenzym gereinigt und der Arbeitsgruppe Freudl gereinigtes Enzym zur Herstellung von Antikörpern zur Verfügung gestellt (s. letzter Zwischenbericht). Das rekombinate Enzym wurde in der Arbeitsgruppe Antranikian charakterisiert. In Zusammenarbeit mit Prof. Puls und Dr. Saake vom Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes der Bundesforschungsanstalt für Holz- und Forstwirtschaft wurde die Umwandlung von Amylose durch das Verzweigungsenzym mittels high performance anion exchange chromatography (HPAEC) und size exclusion chromatography (SEC) analysiert. Über die HPAEC-Analyse konnte nach Spaltung der neusynthetisierten α -1,6-Bindungen die Länge der transferierten Oligosaccharidketten bestimmt werden (Abb. 4A). Diese lag

zwischen Dp 4 und Dp 40, bei einem Maximum bei Dp 16. Mit der HPAEC können nur Moleküle bis zu einer maximalen Kettenlänge von Dp 50 analysiert werden. Daher war zu diesem Zeitpunkt nicht klar, wie hoch der Anteil an nicht umgesetzter Amylose war. Deshalb wurden die bei Umwandlung von Amylose entstehenden Produkte mittel SEC analysiert, die Glucane bis zu einem DP von ca. 6000 erfassen kann. (Abb. 4B). Dabei zeigte sich, dass am Reaktionsende alle Produkte nach Isoamylaseverdau Molekulargewichte von 10^3 bis 10^4 g/mol hatten, demnach allenfalls noch vernachlässigbare Mengen an nicht umgesetzter Amylose vorlagen.



B

Zur Anzeige wird der QuickTime™ Dekompressor "Foto - JPEG" benötigt.

Abb. 4: Analyse der Produkte des Verzweigungsenzyms zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Umwandlung von Amylose. Die neusynthetisierten α -1,6-Bindungen wurden mit Isoamylase gespalten und die Proben mittels HPAEC (A) und SEC (B) analysiert.

Es konnte damit gezeigt werden, dass das rekombinante Verzweigungsenzym aus *A. gottschalkii* die Viskosität von Amyloselösungen signifikant zu senken imstande ist und somit ein attraktiver Kandidat für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie ist.

Cyclodextrinproduktion

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide aus sechs bis acht Glucoseeinheiten (α -, β - und γ -CD), die durch Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTasen) aus Stärke und anderen Polysacchariden synthetisiert werden. Zur Herstellung von Cyclodextrinen, die in ihrem Inneren Gastmoleküle komplexieren können und deshalb vielfältige industrielle



Anwendung finden (z.B. zur Einkapselung von Wirkstoffen in der Pharmaindustrie oder zur Aromastabilisierung in der Lebensmittelindustrie) sind thermostabile CGTasen erwünscht, da der Prozess zur Lösung und Hydrolyse des Ausgangssubstrates (Stärke) bei hohen Temperaturen erfolgt. In diesem Zusammenhang wurde die CGTase aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* hergestellt und charakterisiert, sowie Versuche zu ihrer Stabilisierung mittels gerichteter Evolution unternommen

Das cgtase-Gen wurde ohne Signalsequenz in das Plasmid pET24a (Novagen) kloniert und in *Escherichia coli* BL21(DE3) Zellen aktiv exprimiert, wonach sich der überwiegende Teil des Proteinproduktes im löslichen Teil des Zellextraktes fand. Die CGTase konnte über Cyclodextrin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt werden (s. letzter Zwischenbericht). Um die Anwendbarkeit der rekombinanten CGTase zu untersuchen, wurde der Umsatz verschiedener Glucane bestimmt. Amylose, Amylopektin, Paselli-Stärke und native Kartoffelstärke wurden komplett umgesetzt, Glykogen hingegen nur zu ca. 50%.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das Produktspektrum vom Verzweigungsgrad des Substrates abhängt. Mit steigendem α -1,6-Verzweigungsgrad der Substrate erhöhte sich der relative Anteil an β -Cyclodextrin. Während mit Amylose als Substrat α -Cyclodextrin das Hauptprodukt darstellte, wurden mit Glykogen gleiche Mengen an α - und β -Cyclodextrin gebildet (Abb. 5). Auch steigende Substratkonzentrationen verschoben das Produktverhältnis zugunsten des β -Cyclodextrins. Bei Konzentrationen unter 10% Paselli-Stärke war α -Cyclodextrin das Hauptprodukt. Bei 10% Paselli-Stärke wurden gleiche Mengen an α - und β -Cyclodextrin gebildet, wohingegen bei höheren Konzentration die Menge gebildeten β -Cyclodextrins die des α -Cyclodextrins überwog (Abb.6). Es stellte sich daher heraus, dass Produktspektrum und Enzymeigenschaften sich unter analytischen und industrienahen Bedingungen stark voneinander unterscheiden. In Anwesenheit von Glucose wurde ein beschleunigter Stärkeumsatz beobachtet. Die HPLC- Analysen zeigten, dass dieser jedoch auf eine Erhöhung der Disproportionierungsreaktionen, und nicht auf eine erhöhte Cyclisierungsrate zurückgeht. Obwohl das pH- und Temperaturoptimum der CGTase bei pH 8,5 und 60° C liegt, wies das Enzym selbst in wässrigen Stärke-Lösungen, deren pH bei ca. 6 lag, bei 70°C und ohne Zusatz von Ca^{2+} -Ionen hohe Aktivitäten auf. Durch glucoamylolytischen Verdau der mit Amylose als Substrat gebildeten Produkte konnte nachgewiesen werden, dass die CGTase auch in der Lage ist, größere ($> \text{Dp } 8$) cyclische Verbindungen (Cycloamylose) zu synthetisieren. Die Menge der intermediär gebildeten,

größeren cyclischen Verbindungen war unter gewählten Bedingungen jedoch nicht hoch. Solche Verbindungen sind für die Pharmaindustrie zur Einkapselung höhermolekularer Wirkstoffe von großem Interesse. Außerdem konnte "Cycloamylose" bereits erfolgreich zur Proteinrückfaltung eingesetzt werden. Unter Umständen ließe sich durch die Wahl der Reaktionsbedingungen die Ausbeute an größeren cyclischen Ringen erhöhen. Desweiteren sind zur genauen Größen- und Ausbeutebestimmung SEC- Messungen erforderlich.

Zur Erhöhung der Thermostabilität der CGTase wurden durch Error Prone PCR zwei Genbanken erstellt, wobei jeweils eine mutagenisierte Hälfte des die CGTase kodierenden Gens mit einer unveränderten Hälfte fusioniert war. Die Genbanken wurden im Rahmen eines neu entwickelten Screeningverfahrens auf stabilisierte CGTasen durchsucht. Bislang konnte jedoch noch keine thermostabilisierte Mutante gefunden werden.

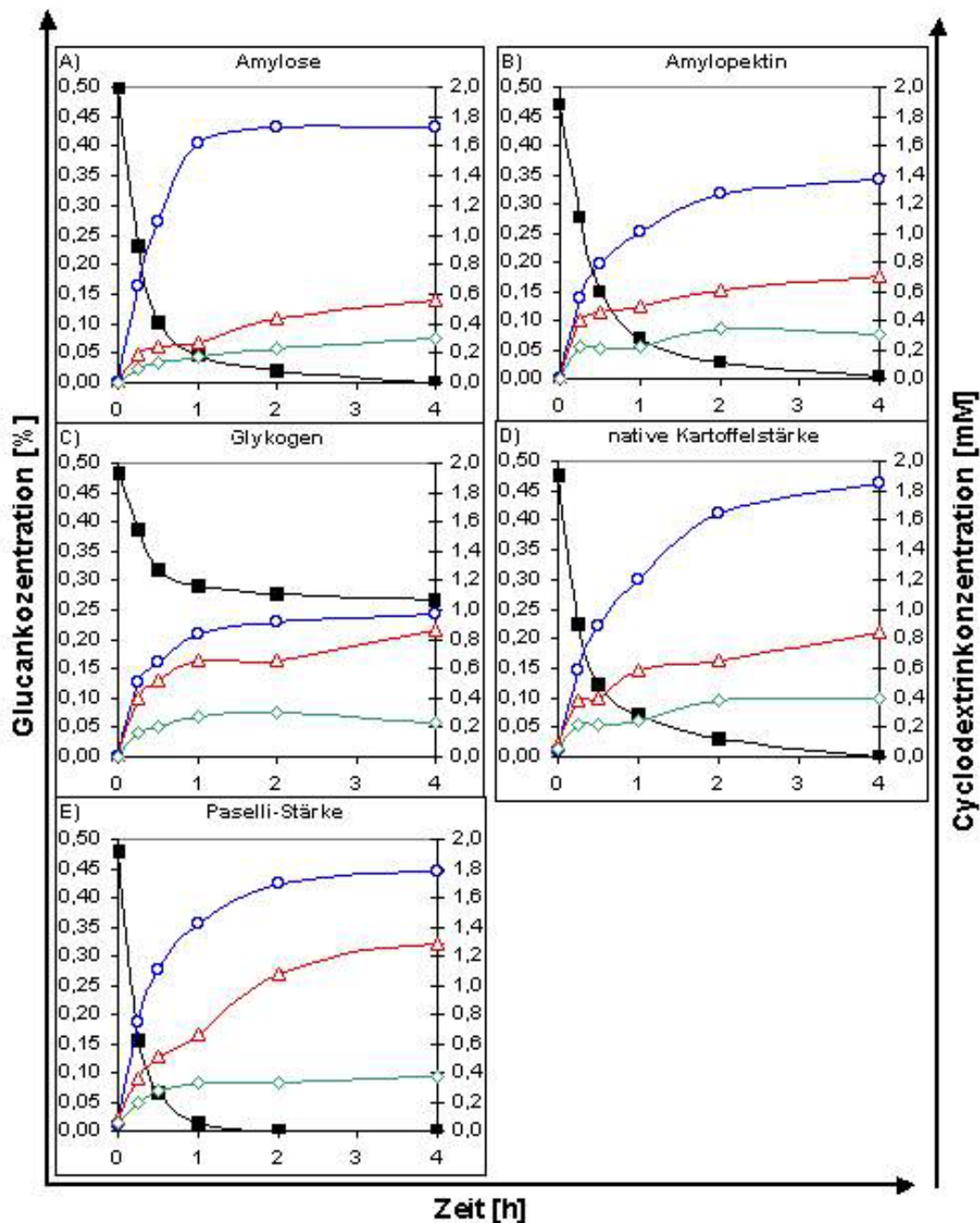


Abb. 5: Substratspezifität der rekombinanten CGTase aus *A. gottschalkii*. 10 ml 0,5 %iger Lösungen der Glucane Amylose (A), Amylopektin (B), Glykogen (C), nativer Kartoffelstärke (D) und Paselli-Stärke (E) wurden mit 2 U CGTase bei 60°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben genommen und mit HPLC analysiert.
 Glucan (■), α -Cyclodextrin (○), β -Cyclodextrin (△), γ -Cyclodextrin (◇).

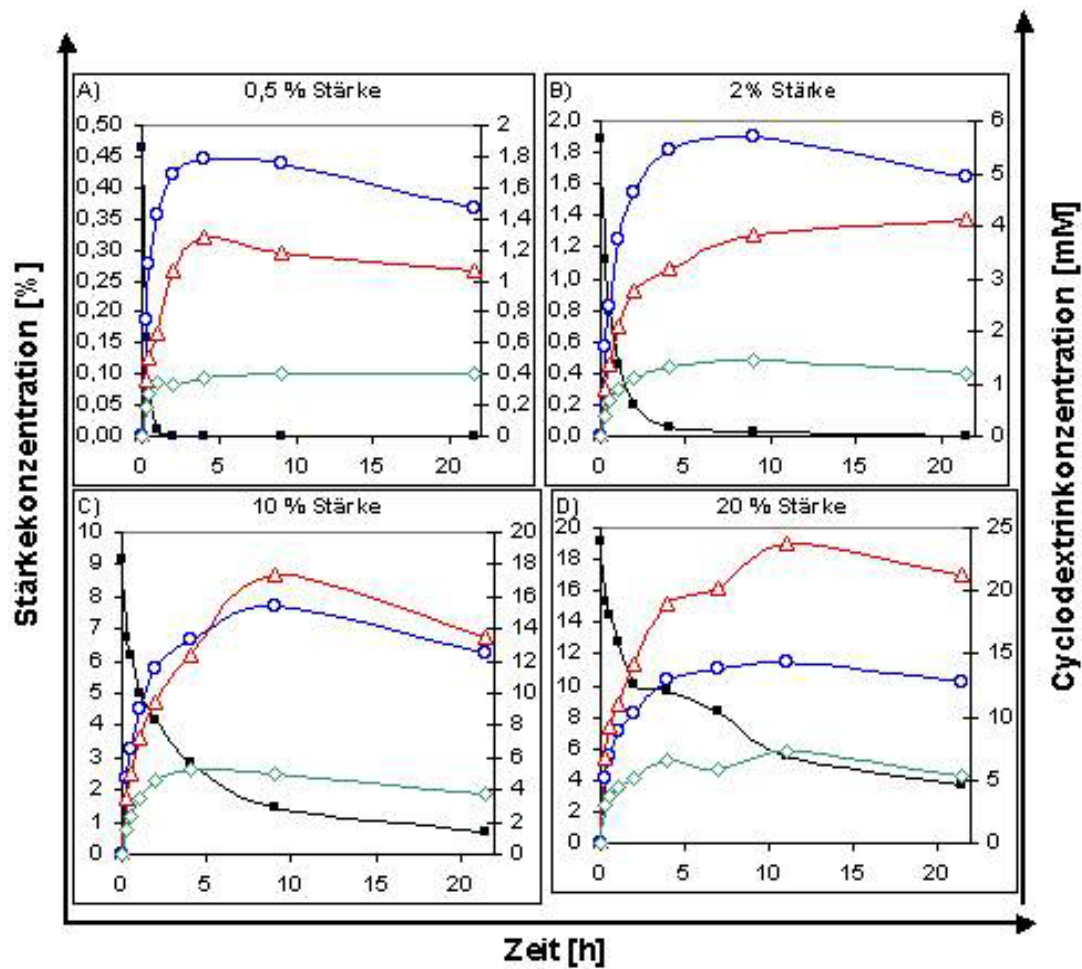


Abb.6: Einfluß der Substratkonzentration auf die Cyclodextrinbildung. 10 ml Paselli-Stärke-Lösungen mit Endkonzentrationen von 0,5% (A), 2 % (B), 10 % (C) und 20% (D) wurden mit 0,4 U CGTase pro mg Stärke bei 60°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben genommen und mit HPLC analysiert
Stärke (■), α -Cyclodextrin (○), β -Cyclodextrin (△), γ -Cyclodextrin (◇).

Es ist damit gelungen, das die CGTase kodierende Gen *A. gottschalkii* zu identifizieren, zu klonieren und in aktiver Form zu exprimieren. Das rekombinante Enzym wurde gereinigt und charakterisiert.

Das thermostabile Enzym wurde auf seine Anwendbarkeit getestet. Im Verlauf dieser Versuche zeigte sich, dass die Versuchsbedingungen einen hohen Einfluß auf die Ausbeute und die Zusammensetzung der Cyclodextrine haben. Durch Variation der Prozessbedingungen sollten daher weitergehende Optimierungen möglich sein.

5. Soll/Ist-Vergleich

Wie geplant, wurde das Genom von *Anaerobranca gottschalkii* erfolgreich sequenziert und die Daten an die Projektpartner weitergegeben. Entsprechend den Meilensteinen wurden insgesamt fünf (zwei α -Amylasen, ein Entzweigungsenzym, eine CGTase und ein Verzweigungsenzym) Kohlenhydrat-metabolisierende Enzyme in aktiver Form rekombinant produziert und charakterisiert. Neben der Expression in *E. coli* wurden das Verzweigungsenzym und die CGTase wie geplant in *Staphylococcus carnosus* exprimiert und in aktiver Form in den Überstand sekretiert. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein attraktives System zur sekretorischen Expression bereits gefalteter, industrierelevanter Enzyme etabliert werden. Die Herstellung thermostabilerer CGTase-Varianten verzögerte sich infolge anfänglicher Klonierungsschwierigkeiten. Es wurden zwei Genbanken zufallsmutagenisierter Klone auf CGTasen hergestellt. Bislang konnte jedoch im phänotypischen Screening auf erhöhte Thermostabilität, keine thermostabilisierte CGTase isoliert werden. Die Experimente mit dem rekombinanten Enzym zeigten jedoch, dass sich die Eigenschaften der CGTase durch die Inkubationsbedingungen positiv beeinflussen lassen, so dass, durch die thermostabilisierende Wirkung hoher Stärkekonzentrationen, eine Optimierung der Produktion bei 70°C möglich ist. Infolge anfänglicher Klonierungsschwierigkeiten wurden die gereinigten Enzyme bislang noch nicht im Industriemaßstab eingesetzt.

In Tabelle 2 sind anhand der Meilensteinplanung des Antrages Erreichtes und noch Ausstehendes dargestellt.

Tab. 2: Graphischer Soll/Ist-Vergleich der im Antrag formulierten Meilensteinplanung. Erfolgreich bearbeitet (✓), noch ausstehend (n). Antranikian (—) Sterner (—) Freudl (—) Liebl (—) Klenk(—)

Arbeitsschritt	Monat																		
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
Reinigung und biochemische Charakterisierung der bereits identifizierten Enzyme (CGTase, Verzweigungsenzym, α-Amylase) aus <i>A. gottschalkii</i>	—			✓															
	—			✓															
Detektion neuer Kohlenhydrat-metabolisierender Biokatalysatoren durch Genomsequenzierung	—						✓												
	—						✓												
Bioinformatische Auswertung der Ergebnisse aus der Genomsequenzierung				—												✓			
Klonierung und Expression ausgewählter industrierelevanter Enzyme (CGTase, Verzweigungsenzym, α-Amylase) aus <i>A. gottschalkii</i>		—												✓					
		—												✓					
																		✓	
Reinigung, biochemische und physikochemische Untersuchungen der rekombinanten Glycosylhydrolasen- und transferasen																		✓	
																		✓	
Produktion und Charakterisierung hochwertiger Kohlenhydrate mit Hilfe der Biokatalysatoren																		✓	
																		✓	
Optimierung der CGTase hinsichtlich der Thermoaktivität und -stabilität durch PCR Evolution und DNA Shuffling																		n	
																		n	
Überexpression der CGTase in <i>Bacillus subtilis</i> bzw. <i>Staphylococcus carnosus</i>																		✓	
																		✓	
Optimierung der Kultivierung im 300 l Maßstab																		n	
																		n	
Einsatz der Biokatalysatoren zur Herstellung hochwertiger Kohlenhydrate (Cyclodextrine, verzweigte Dextrine, und Oligosaccharide)																		n	
																		n	
																		n	
																		n	

6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Das Teilprojekt zur Cyclodextrinproduktion wurde von Herrn Biwer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heinzle ökonomisch und ökologisch bewertet. Da der Schwerpunkt des Projektes auf der Enzymentwicklung lag, stand in diesem Fallbeispiel das Aufzeigen und Bewerten von Potenzialen und nicht die Bewertung konkreter Prozessergebnisse im Vordergrund.

Die Evaluation erfolgte zu einem frühen Zeitpunkt (s. letzter Zwischenbericht), an dem erst seit kurzer Zeit aktives rekombinantes Enzym zur Verfügung stand. Deshalb konnte nur ein



Teil der experimentellen Daten berücksichtigt werden. Zunächst wurde daher zur Ermittlung von Verbesserungspotentialen das bestehende Standardproduktionsverfahren zur Herstellung von α -Cyclodextrin modelliert und bewertet. Grundlage der Modellierung waren deshalb Angaben der konventionellen Herstellung von α -Cyclodextrin in Anwesenheit des organischen Komplexbildners Decanol.

Im Verlauf der Experimente zeigte sich, dass die Menge der von der rekombinanten CGTase aus *A. gottschalkii* gebildeten α - und β -Cyclodextrine stark von den Reaktionsbedingungen abhängt. Vor allem bei hohen Substratkonzentrationen war nicht α -Cyclodextrin das Hauptprodukt, sondern wurden α - und β -Cyclodextrinen zu ähnlichen Anteilen gebildet. Eine Ursache hierfür ist, dass die Anwesenheit hoher α -Cyclodextrinkonzentrationen die Bildung der anderen Cyclodextrine begünstigt, welches der Grund dafür ist, dass in der konventionellen α -Cyclodextrin-Herstellung Decanol als Komplexbildner zugegeben wird. Des Weiteren wird bei hohen Cyclodextrinkonzentrationen der Abbau der Cyclodextrine durch Kopplungs-, Hydrolyse- und Disproportionierungsreaktionen begünstigt.

Im nächsten Schritt ist es daher wichtig, zu untersuchen, wie die Cyclodextrinbildung verläuft, wenn das α -Cyclodextrin, das zu Reaktionsbeginn in höchster Rate synthetisiert wird, durch Affinitätssäulen aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird.

Grundsätzlich sind Alternativverfahren nur dann ökologisch und ökonomisch konkurrenzfähig, wenn sie Ausbeuten und Selektivitäten des Standardverfahrens erreichen. Bisherige Versuche bilden daher die Grundlage für Versuche zur Cyclodextrinproduktion in Anwesenheit von Cyclodextrin-Affinitätssäulen.

7. Kooperation innerhalb des Projektes

Zur erfolgreichen Durchführung des Projekts war eine enge Zusammenarbeit aller Partner erforderlich. Das Genom von *Anaerobranca gottschalkii* wurde von der Arbeitsgruppe Klenk sequenziert und die Daten an die Projektteilnehmer weitergegeben. Die Arbeitsgruppe Freudl stellte Fusionsgene aus den Genen für die CGTase und das Verzweigungsenzym und verschiedenen Sekretionssignalen her und transformierte diese in *Staphylococcus carnosus*. Diese Stämme wurden an die Arbeitsgruppen Sterner bzw. Antranikian weitergegeben. In der Arbeitsgruppe Antranikian wurde das Verzweigungsenzym aus dem Überstand gereinigt und der Arbeitsgruppe Freudl zur Herstellung von Antikörpern zur Verfügung gestellt. (s. letzter Bericht) Die Produktspezifität der rekombinant hergestellten CGTase (Arbeitsgruppe Sterner)

wurde mit Hilfe einer HPLC in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Antranikian bestimmt. Das Teilprojekt wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Heinzle evaluiert. Die Arbeiten zu den α -Amylasen und der Pullulanase erfolgte in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen Liebl und Antranikian.

8. Literatur

ohne gutachterliche Praxis (3 Veröffentlichungen)

Antranikian, G., Klenk, H-P., Freudl, R., Sterner, R., Liebl W. (2001). Extremophile Mikroorganismen als Quelle stabiler Biokatalysatoren. *In*: Heiden, S. Erb, R. (eds) Biokatalyse Sonderausgabe BIOSpektrum and Spektrum Akademischer Verlag, 44-48.

Liebl, W. (2002). Extremophile: Mikroorganismen unter Extrembedingungen. *Georgia Augusta* 1:98-103.

Thiemann, V., Antranikian, G., Klenk, H.-P., Vollstedt, A., Freudl, R., Jürgens, C., Sterner, R., Liebl, W. (2003). Das thermoalkaliphile Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* als Quelle stabiler Enzyme zur Herstellung hochwertiger Kohlenhydrate. *Transkript (Sonderheft "Nachhaltige Biokatalyse" Stefanie Heiden, Rainer Erb, Eds.)*, pp. 90 - 93.

Mit gutachterlicher Praxis (8 Veröffentlichungen)

Bertoldo, C., Armbrecht, M., Becker, F., Schäfer, T., Antranikian, G., and Liebl, W. (2003). Cloning, sequencing and characterization of thermoalkaliphilic pullulanase type I from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, im Druck.

Biwer, A., Antranikian, G., Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 609-617.

Blaudeck, N, Sprenger G. A., Freudl, R., Wiegert, T. (2001). Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation. *J. Bacteriol.* 183, 604-610.

Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thömmes, J., Kula, M.-R., Takors, R., Wandrey, C., Weuster-Botz, D. (2000). Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 361-359.

Dilsen, S., Paul, W., Herforth, D., Sandgathe, A., Altenbach-Rehm, J., Freudl, R., Wandrey, C., Weuster-Botz, D. (2001) Evaluation of parallel operated small-scale bubble columns for microbial process development using *Staphylococcus carnosus*. J. Biotechnol. 88, 77-84.

Prowe, S. G. und G. Antranikian (2001). *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 457-465.

Sandgathe, A., Tippe, D., Dilsen, S., Meens, J., Halfar, M., Weuster-Botz, D.; Freudl, R.; Thömmes, J.; and Kula, M. R. (2003). Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption. Process Biochemistry 38, 1351 - 1361.

Sterner, R., and Liebl, W. (2001) Thermophilic adaptation of proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 36, 39-106.

In Vorbereitung/ingereicht (2 Veröffentlichungen)

Ballschmiter, M., Armbrrecht, M., Ivanova, K., and Liebl, W. (2004). Recombinant production and properties of two α -amylases from *Anaerobranca gottschalkii*. Manuskript in Vorbereitung.

Antranikian, G., Ruepp, A., Freudl, R., Liebl, W., Sterner, R., Klenk, H.-P. (2004). Insight into the carbohydrate metabolism of the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii* from a genomic perspective. Manuskript in Vorbereitung.

9. Präsentationen

Ballschmiter, M., Ivanova, K., Antranikian, G., Liebl, W. (2002). α -amylases from the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. Poster, biocat2002, Hamburg, 28.-31. Juli 2002.

Bertoldo, C., Liebl, W., Armbrecht, M., Duffner, F., Schäfer, T., Antranikian, G. (2002) Purification and characterization of a thermoalkaliphilic pullulanase type I from the thermophilic anaerobic bacterium *Anaerobranca gottschalkii* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. Poster, biocat2002, Hamburg, 28.-31. Juli 2002 and 4th International Congress on Extremophiles, Neapel, 22.-26. September 2002.

Jürgens, C. Prowe, S.G., Thiemann, V., Sterner, R., Antranikian, G. (2003). Purification and characterisation of the native and the heterologously expressed CGTase from the anaerobic thermoalkaliphile *Anaerobranca gottschalkii*, VAAM Tagung Berlin, 23.03.-26.03.2003 und 5th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Groningen, 6.4. – 9.4. , 2003.

Klenk, H.-P. Comparative genomics and evolution of extremophiles @ Extremophiles III. Hamburg, September 2000 und Whole genome comparisons @ International Conference on Structural Genomics. Yokohama, November 2000.

Thiemann, V., Vollstedt, A., Freudl, R., Reisen, M., Saake, B., Puls, J., Antranikian, G. (2002 und 2003). Purification and characterization of the heterologously expressed branching enzyme from the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. Vortrag VAAM Tagung Göttingen, 24.-27.04.2002 und Poster biocat2002, Hamburg, 28-31. Juli 2002, VAAM Tagung Berlin, 23.03.-26.03.2003 und 5th Carbohydrate Bioengineering Meeting. Groningen, 6.4. – 9.4.2003.

10. Dissertationen

abgeschlossene Dissertationen (2)

Catharina Jürgens (AG Prof. Sterner)

"Reinigung und Charakterisierung der Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii*". Dissertation, Universität zu Köln, 2003.

Angela Vollstedt (AG Prof. Freudl)

"Sekretorische Gewinnung von Enzymen aus dem thermoalkaliphilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* im mesophilen Wirt *Staphylococcus carnosus*". Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2003.

laufende Doktorarbeiten (1)

Volker Thiemann (AG Prof. Antranikian) Fertigstellung Juli 2004

"Characterization of the branching enzyme and the cyclodextrin glycosyl transferase (CGTase) from the thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*"

11. Wirtschaftliche Verwertung, Patente und Folgeprojekte

Die Firma Novozymes A/S hat ihr Interesse an einer Verwertung von Stärke-prozessierenden Enzymen aus *A. gottschalkii* bekräftigt. Im Rahmen dieser Kooperation wurden bereits zwei Enzyme (Amylase und CGTase) patentiert (EP939801A1, EP956346A1).

Die Arbeitsgruppen von Professor Antranikian und Professor Freudl haben auf der Basis des in diesem Projekt weiterentwickelten Expressionssystems ein neues Vorhaben bei der DBU (AZ 13092) begonnen.