

höher war als in den Proben einer alters- und geschlechtssprechenden Kontrollgruppe schlanker Personen ( $n = 17$ , BMI:  $24,2 \pm 2,7 \text{ kg/m}^2$ ) (Leptin/Sp1:  $2,53 \pm 0,72$  vs.  $2,00 \pm 1,50$ ,  $p < 0,05$ ). Bei den adipösen Personen fand sich außerdem im subkutanen Fettgewebe ein signifikant höherer Leptin/Sp1-Quotient als in den omentalen Fettgewebsproben ( $n = 25$ ,  $3,02 \pm 1,58$  vs.  $1,53 \pm 0,89$ ,  $p < 0,05$ ). Auffällig war dabei auch, daß die Leptinexpression im omentalen Fettgewebe mit zunehmendem Alter der Spender anstieg ( $r = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ). Die Leptinexpression korrelierte außerdem schwach mit den Leptinserumkonzentrationen aller Probanden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Leptinproduktion des Menschen mit steigendem Körpergewicht und Alter zunimmt und daß regionale Unterschiede existieren. Derzeit wird untersucht, inwieweit Nahrungsfaktoren die Leptinexpression direkt beeinflussen können.

### P11 Purification and characterization of two alkaline serine proteases from an alkalophilic *Bacillus* sp.

C. Ganesh Kumar<sup>1</sup> (✉), Prof. Dr. Klaus-Dieter Jany<sup>2</sup>,  
M.P. Tiwari<sup>1</sup>

Molekularbiologisches Zentrum der Bundesforschungsanstalt für Ernährung

<sup>1</sup>Dairy Microbiology Division,

National Dairy Research Institute, Karnal, India.

<sup>2</sup>Centre for Molecular Biology,

Federal Research Centre for Nutrition, Karlsruhe, Germany.

During concentration of whey and skim milk by UF/RO membrane systems, fouling of membranes is encountered due to protein deposition. To overcome this fouling problem, enzyme-based detergents can be used. In the course of developing an enzyme-based detergent formulation for UF/RO membrane cleaning, we purified two alkaline proteases. These two types of alkaline proteases were isolated from the culture filtrate of an alkalophilic *Bacillus* sp. MK5-6. The enzymes (AP-1 and AP-2) were purified by acetone precipitation, DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B and Sephadex S-200 column chromatographies. The purified enzymes showed single bands on SDS-PAGE. The molecular weights of proteases AP-1 and AP-2 were estimated as 28 and 29 kDa. The optimum pH values towards casein hydrolysis were pH 11.0 for AP-1 and pH 12.0 for AP-2. The optimum temperature for activity for both the proteases were 50-55° C. Both the enzymes were stable in the pH range of 6.0-12.0 and temperature upto 50° C. Thermostability of the enzyme was enhanced by addition of  $\text{Ca}^{2+}$ . The purified proteases hydrolysed a number of native protein substrates like casein, elastin, keratin, hemoglobin and albumin. The enzymes were stable in the presence of denaturing agents, organic solvents and many surface-active agents. The enzymes were inhibited by PMSF, suggesting that these enzymes belong to the family of serine proteases. The different characteristics obtained for these enzymes also indicate their potentiality for various other biotechnological applications.

### P12 Funktionelle Charakterisierung des intestinalen Peptidtransporters PepT1 nach Expression in der Hefe *Pichia pastoris*

Stefan Theis (✉), F. Döring, H. Daniel  
Institut für Ernährungswissenschaft, JLU Gießen  
Wilhelmstraße 20, 35392 Gießen

Die aus dem Nahrungsprotein stammenden Di- und Tripeptide sowie eine Reihe von Peptidpharmaka werden im Dünndarm durch einen protonengekoppelten Peptidtransporter (PepT1) aktiv in die Zelle aufgenommen. Nach Klonierung des entsprechenden intestinalen Peptidtransportergens *PepT1* sind wir nun in der Lage durch heterologe Expression die Funktion dieses Transporters in einer Zielzelle funktionell zu charakterisieren. Als Zielzelle wurde die methanotrophe Hefe *Pichia pastoris* gewählt, in der uns erstmals die funktionelle Expression eines Membrantransportproteins gelang. Hierzu wurde die *PepT1*-cDNA in einen *Pichia pastoris*-Vektor inseriert und anschließend durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert. Die ortsspezifische Integration wurde so gewählt, daß die *PepT1*-cDNA unter der Kontrolle eines methanol-induzierbaren Promotors steht. Die erhaltenen Hefe-Transformanten zeigten nach Induktion mit Methanol eine 20 bis 30-fach erhöhte Aufnahme des radioaktiv markierten Dipeptids  $^3\text{H}$ -(D)-Phe-Ala. Die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -(D)-Phe-Ala ist in den *PepT1*-exprimierenden Hefezellen ausgeprägt pH-abhängig und kann durch eine Vielzahl von Di- und Tripeptiden sowie durch ausgesuchte Peptidpharmaka vollständig gehemmt werden. Somit weist das exprimierte intestinale Transportprotein weitgehend alle von ihm erwarteten funktionellen Eigenschaften auf.

### P13 Identifizierung einer multifunktionellen Domäne im renalen Peptidtransporter PepT2

Dr. Frank Döring (✉), D. Dorn, U. Bachfischer,  
H. Daniel  
Institut für Ernährungswissenschaft, JLU Gießen  
Wilhelmstraße 20, 35392 Gießen

Der aktive Transport von Di- und Tripeptiden wird sowohl im Dünndarm als auch im proximalen Nierentubulus durch einen  $\text{H}^+$ -gekoppelten Peptidtransporter vermittelt. Beim intestinalen Peptidtransporter *PepT1* handelt es sich um ein System mit einer hohen Transportkapazität aber geringen Affinität. Die renale Isoform *PepT2* ist im Gegensatz dazu ein hochaffines System mit geringer maximaler Transportleistung. Nach dem uns in den letzten Jahren die Klonierung der entsprechenden Peptidtransportergene gelang, können wir nun die funktionellen Domänen identifizieren, die für die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Transporter verantwortlich sind. Hierzu haben wir ein rekombinantes, chimäres Peptidtransportergen (ChPep) hergestellt, dessen N-terminale Region (Aminosäuren 1 bis 420) für *PepT2* codiert. Die C-terminale Region (Aminosäure 421 bis 707) von ChPep trägt die codierende Information für *PepT1*. Nach Expression in *Xenopus laevis* Oocyten weist ChPep a) eine hohe Affinität zu Di-/Tripeptiden und Peptidpharmaka, b) eine geringe Transportleistung und c) eine für *PepT2* charakteristische pH-Abhängigkeit auf. Wir haben damit den ersten chimären Peptidtransporter funktionell analysiert und eine Domäne identifiziert, die für die spezifischen Transportereigenschaften der renalen Isoform verantwortlich ist. Darüber hinaus können wir schließen, daß in der identifizierten N-ter-