

Enzymatische Gewinnung von Lactosucrose und verwandten potentiell präbiotischen Oligosaccharid-Komponenten

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Universität Hamburg Institut für Organische Chemie Prof. Dr. J. Thiem
Industriegruppe:	Verein der Zuckerindustrie e.V., Bonn
	Projektkoordinator: Dr. L. Guderjahn, Palatinit GmbH, Kempten
Laufzeit:	2000 - 2002
Zuwendungssumme:	€ 204.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Das in Japan als Nahrungsmittelzusatz zugelassene Trisaccharid "Lactosucrose" (Gal β 1-4Glc α 1-2 α Fruf) zählt zu den präbiotischen Derivaten, deren In-vitro-Fermentierbarkeit einen positiven Einfluss auf die Ausbildung einer gegen gefährdende Keime stabilen Darmflora gemeinsam hat. Für die Darstellung der Lactosucrose sind bisher zwei Synthesewege beschrieben worden, die sich durch neuartige präparativ-enzymatische Verfahren verbessern lassen sollten.

Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Herstellung potentiell präbiotisch aktiver, gesundheitsfördernder Oligosaccharidkomponenten mit bifidogenen Eigenschaften durch Transglycosylierungen und vorteilhafte Aufarbeitungsmethoden.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens konnte gezeigt werden, dass die präparative chemoenzymatische β -Galactosylierung mit Glycohydrolasen vorteilhaft zur Herstellung neuartiger Oligosaccharide eingesetzt werden kann.

In Versuchen mit dem nicht-kariogenen Süßmittel Isomalt wurde unter Einsatz verschiedenartiger β -Galactosidasen die regioselektive Gewinnung von Trisacchariden in Ausbeuten von

ca. 6-12 % erreicht. Es konnte in Ansätzen mit bis zu 100 g Rohgemischen gearbeitet werden, so dass die neuartigen Oligosaccharide in Grammmengen verfügbar wurden. Auf diesem Weg waren mit den Galactosidasen aus Bovine testis, *Bacillus circulans* und *Aspergillus oryzae* die entsprechenden β 1-3-, β 1-4- bzw. β 1-6-Galactosylisomalte zu erhalten. Gleichermäßen konnte exemplarisch mit dem Enzym aus Bovine testis die Herstellung der β 1-3-Galactosylpalatinose erreicht werden.

Als orientierende Zielstruktur war die in anderen Ländern als Nahrungsmittelzusatzstoff zugelassene "Lactosucrose" bekannt. Hier gelang jetzt die Ausarbeitung einer neuartigen enzymatischen Synthese aus Lactose und Sucrose mit der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. Bei Einsatz der Enzyme aus Bovine testis bzw. *Aspergillus oryzae* wurden die Isomeren der Lactosucrose, die β 1-3- bzw. β 1-6-Galactosylsucrosen, gewonnen.

Für die α -Galactosylierungen konnten α -Glycosylfluoride mit D-galacto-, D-fuco- und L-arabino-Konfiguration als Donorsubstrate dargestellt werden. In enzymatischen Umsetzungen mit einem Modellakzeptorsubstrat gelangen bei Einsatz der α -Galactosidase RAF-A α -Galactosylierungen in knapp 20 % Ausbeute. Als Verhältnis der Regioisomeren ergaben sich durchgängig α 1-6- : α 1-4- : α 1-3-Galactosylierungen von ca. 65 : 25 : 10.

Es ist ebenfalls gelungen, diese Reaktionen auf die α -Galactosylierung von Sucrose als Akzeptorsubstrat auszudehnen und ein weiteres Isomer der "Lactosucrose" in ca. 20 % Ausbeute zugänglich zu machen.

In diesen Untersuchungen sind neben Wegen zur Herstellung, Optimierung und Maßstabsvergrößerung auch Trenn- und Reinigungsschritte für die hochhydrophilen Trisaccharide von ihren recht ähnlichen Donor- und Akzeptorsubstraten ausgearbeitet worden. Mit einer umfangreichen instrumentellen Analytik konnten die Strukturermittlungen gestützt werden.

Die β 1-3- sowie β 1-4-galactosylierten Isomalt-Derivate waren unter sauren Bedingungen sowie bei der Behandlung mit Pankreas stabil. Während Isomalt selbst von Dünndarmenzymen weitgehend abgebaut wird, zeigten die Galactosylisomalte erhebliche Stabilität. Dagegen konnte eine signifikante In-vitro-Fermentation zu kurzkettigen Fettsäuren, vor allem Butyrat, nachgewiesen werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Aus den Ergebnissen dieses Vorhabens leitet sich ab, dass mit Hilfe der robusten, preislich akzeptablen und gut handhabbaren Glycohydrolasen für die hier interessierenden Fälle der Galactosylierung wichtige Oligosaccharide in akzeptablen Ausbeuten mit hoher Regiespezifität zugänglich werden. Diese Entwicklung ist den bisherigen Herstellungswegen z.B. im Falle der in Japan als Lebensmittelzusatz verwendeten Mischung "Lactosucrose" deutlich überlegen. Anhand ausgewählter Beispiele ließ sich nachweisen, dass die neuen Verbindungen keine oder nur eine marginale Verstoffwechslung durch Dünndarmenzyme erfuhren. Dagegen erfolgte eine In-vitro-Fermentation von Bakterien im Dickdarm unter substantieller Butyratbildung, woraus sich eine gesundheitsfördernde Wirkung ableitet. Es liegen somit jetzt Ausarbeitungen vor, wonach milde enzymatische Reaktionen für die Herstellung einer Vielzahl unterschiedlicher galactosylierter Sucrose-, Isomaltulose- sowie Isomalt-Derivate erfolgreich angewendet werden können. Einige ausgewählte Vertreter der besonders relevanten, neuartigen Trisaccharide konnten hinsichtlich ihrer Stabilität sowie ihrer funktionellen Eigenschaften untersucht werden. Bei beachtenswerter Stabilität im Dünndarm erfolgte die Bakterien-induzierte Fermentation im Dickdarm unter substantieller Butyratbildung.

Diese gesundheitsfördernden Effekte lassen die neuartigen Komponenten für Funktionsprüfungen im Bereich Lebensmittel für mittelständische Unternehmen außergewöhnlich relevant erscheinen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2003.
2. Farkas, E., Schmidt, U., Thiem, J., Kowalczyk, J., Kunz, M. und Vogel, M.: Regioselective Synthesis of Galactosylated Tri- and Tetrasaccharides by Use of β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Synthesis*, 699-706 (2003).
3. Schröder, S., Schmidt, U. und Thiem, J., Kowalczyk, J., Kunz, M. und Vogel, M.: Synthesis of oligosaccharides as potential novel food components and upscaled enzymatic reactions employing the β -galactosidase from bovine testes. *Tetrahedron* 60, 2601-2608 (2004).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg
Institut für Organische Chemie
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg
Tel.: 040/42838-2823, Fax: 040/42838-4325
E-Mail: thiem@chemie.uni-hamburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de