

Enzymatische Gewinnung von Lactulose in lactosehaltigen Milchprodukten und technischen Lactoselösungen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. Dr. J. Hinrichs
Forschungsstelle II:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie Prof. Dr. L. Fischer
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Bonn
	Projektkoordinator: S. R. Döring Sachsenmilch AG, Unternehmensgruppe T. Müller GmbH & Co. KG, Leppersdorf
Laufzeit:	2006 – 2008
Zuwendungssumme:	€ 278.500,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Lactulose ist ein Disaccharid [4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-fructose], das sowohl präbiotische Eigenschaften (Dosis ca. 2,5 g pro Tag) als auch medizinischen Nutzen als Darmtherapeutikum aufweist. Bisher wird Lactulose ausschließlich durch eine chemisch-thermische Isomerisierung aus aufgereinigter Lactose gewonnen. Zur Ausbeutesteigerung müssen dieser Reaktion Komplexbildner zugesetzt und entstehende Nebenprodukte anschließend abgetrennt werden. Ein alternatives enzymatisches Verfahren zur industriellen Herstellung von Lactulose existiert nicht. Ebenso ist bisher kein Verfahren etabliert, mit dem gezielt direkt in einer komplexen Milchmatrix Lactulose erzeugt wird.

Ziel des Forschungsvorhabens war deshalb sowohl die Entwicklung eines neuen enzymatischen Verfahrens zur direkten Bildung von Lactulose in komplexen lactosehaltigen Milchprodukten als auch zur separaten Herstellung

von Lactulosepräparaten aus molkenbasierten Lactoselösungen.

Forschungsergebnis:

Für die Produktion von lactulosehaltigen Milchzeugnissen wurden mehrere β -Galactosidasen auf ihre Fähigkeit zur Lactulosesynthese getestet, die aufgrund ihrer mikrobiellen Herkunft für eine Zulassung im Lebensmittelbereich als geeignet erschienen. Für die Lactulosesynthese in einer Lactoselösung erwiesen sich die β -Galactosidasen aus *Aspergillus oryzae* und *Escherichia coli* als vielversprechend. Drei getestete β -Galactosidasen aus dem Metagenom zeigten keine höhere Lactuloseausbeute als die bereits bekannten, getesteten β -Galactosidasen.

Entsprechend diesen Ergebnissen wurden weitere Versuche mit den β -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *E. coli* in verschiedenen Lebensmittelmatrizes durchgeführt. Es wurden

lagerfähige Milchmodellsysteme auf Basis neutraler und gesäuerter Milchprodukte unter Einsatz von Ultrafiltration und Umkehrosmose hergestellt. Die Analyse der enzymatischen Reaktionsprodukte erfolgt über Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).

Im Rahmen des Projekts wurde eine neue Methodik entwickelt, mit der die Identifizierung von Lactulose und Lactose verbessert wurde. Die Struktur der mit der neuen Methode nachgewiesenen Lactulose wurde mittels Nuklearmagnetresonanzspektroskopie (NMR) bestätigt.

Die Bildung von Lactulose in Milchmodellsystemen wurde mit β -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *E. coli* studiert und in Abhängigkeit von den Reaktionsparametern Enzymaktivität, Fructosekonzentration, Temperatur und Zeit beschrieben. In den verschiedenen Modellsystemen (UF-Permeate von Magermilch, Süß- und Sauermolke) wurden maximale Lactulosekonzentrationen von $4,7 \text{ g L}^{-1}$ (*A. oryzae*) und $9,5 \text{ g L}^{-1}$ (*E. coli*) erreicht. Dies bedeutet, dass bei einem Konsum von 250 g bis 1 kg des jeweiligen Produktes pro Tag ein präbiotischer Effekt zu erwarten wäre. Mittels statistischer Methoden wurden Funktionen für den Zusammenhang zwischen maximal gebildeter Lactulosekonzentration und den einzelnen Reaktionsparametern erstellt. Die Gültigkeit der erstellten Modelle wurde für die Systeme Magermilch und Joghurt überprüft und bestätigt.

Da die Bildung von Lactulose in Milchprodukten kinetisch kontrolliert ist, ist es notwendig, das eingesetzte Enzym nach erfolgter Transglycosylierung aus der Lösung zu entfernen oder zu inaktivieren, um die Hydrolyse der gebildeten Lactulose zu verhindern. Entsprechend wurden die kinetischen Parameter der thermischen Inaktivierung bestimmt. Es zeigte sich, dass die β -Galactosidase aus *A. oryzae* durch eine Hoch-/UHT-Erhitzung und die aus *E. coli* durch eine Kurzzeitpasteurisation ausreichend ($> 3 \text{ log}$) inaktiviert wird.

Der Herstellungsprozess eines lactulosehaltigen Milchdrinks wurde auf Basis der experimentellen Ergebnisse beispielhaft ausgelegt und im Technikumsmaßstab umgesetzt. Genutzt wurde die β -Galactosidase aus *A. oryzae*, für die zunächst mit dem Modell für die Reaktionsparameter 90 g L^{-1} Fructose, 450 nkat mL^{-1} Enzymaktivität, 5 °C bzw. 45 °C Reaktionstemperatur die jeweils maximal erzielbare

Lactulosekonzentration berechnet wurde. Als thermische Behandlung zur Inaktivierung des Enzyms wurde unter Berücksichtigung der Inaktivierungskinetik 90 °C für 100 s genutzt. Als Lactulosekonzentrationen wurden bei den Milchdrinks $3,5 \text{ g L}^{-1}$ (5 °C , berechnet $3,9 \text{ g L}^{-1}$) und $2,9 \text{ g L}^{-1}$ (45 °C , berechnet $2,5 \text{ g L}^{-1}$) erzielt.

Für die kontinuierliche Synthese von Lactulose in molkenbasierten Lactoselösungen wurde die β -Glucosidase aus *Pyrococcus furiosus* (CelB) auf einem oxiranhaltigen Träger kovalent immobilisiert. Die Parameter aus der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für die Hydrolyse $K_m \text{ Lactulose}$ und $K_m \text{ Lactose}$ nahmen durch die Immobilisierung ab. Die Inhibitorkonstante $K_i \text{ Lactose}$ für Galactose und Lactulose veränderten sich nicht (kompetitive Hemmung). Fructose aktivierte das freie CelB, inhibierte aber das immobilisierte CelB kompetitiv.

Die kontinuierliche Synthese von Lactulose in einem proteinarmen Süß-/Sauermolkegemisch ($\text{pH } 5,0$, $0,5 \text{ M Fructose} = 90 \text{ g L}^{-1}$) wurde in einem Fließbettreaktor durchgeführt. Es wurden die Katalysatormenge über die Betthöhe H_0 und die Ausdehnung des Katalysatorbettes H/H_0 variiert. Als optimale Bedingungen wurden ein H/H_0 von $2,0$ mit einem H_0 -Wert von 20 cm genannt. Unter diesen Bedingungen wurden mit einer Produktivität von $103 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Produktstrom $6,8 \text{ g L}^{-1}$ Lactulose synthetisiert. Die Rückführung umgesetzter Lösung in den Prozess bewirkte keine Zunahme der Lactulosekonzentration. In einem Langzeitversuch mit Molken-UF-Permeat blieb die Lactulosesynthese über 14 Tage konstant, wobei insgesamt 360 L Permeat umgesetzt wurden. Das Scale-up des Versuchsaufbaus in den Industriemaßstab ist gegeben, da die Höhe des Reaktors konstant bleibt und nur der Säulenquerschnitt angepasst werden muss.

Die Konzentrierung (Faktor 7) und Trocknung eines lactulosehaltigen Molke-UF-Permeats wurden getestet. Durch den hohen Anteil an Monosacchariden und den Fructosezusatz ist die Trocknung erschwert, jedoch sollte die industrielle Umsetzung bei Nutzung von Technologien, die für die Herstellung zuckerhaltiger, hygroskopischer Produkte, wie Fruchtpulver, etabliert sind, möglich sein.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die enzymatische Lactulosesynthese stellt erstmalig eine Möglichkeit dar, in Milchprodukten und lactosehaltigen Milchsystemen unter Zugabe von Fructose aus Lactose den präbiotischen Zucker Lactulose zu bilden. Diese Reaktion kann bei entsprechender Prozessentwicklung zur Herstellung von Lebensmitteln mit präbiotischem Zusatznutzen eingesetzt werden. Gleichzeitig können Nebenprodukte, wie Molke, zu Präparaten mit hoher physiologischer Wertigkeit transformiert werden. Von der Wertschöpfung durch diese einfach durchführbaren Prozesse können insbesondere kleine und mittelständische Unternehmen profitieren.

Im Rahmen des Projektes wurde eine neue Technologie zur Lactulosesynthese in Milchprodukten entwickelt und an verschiedenen Beispielen das Potenzial zur Umsetzung demonstriert. Vorteilhaft für die Vermarktung lactulosehaltiger Produkte sind in diesem Zusammenhang die nachgewiesene präbiotische Wirksamkeit, die toxikologische Unbedenklichkeit sowie die mehr als 40-jährige Erfahrung im medizinischen Bereich.

Die enzymatische Gewinnung von Lactulose in den unterschiedlichsten lactosehaltigen Milchsystemen schafft sowohl für die Lebensmittelwirtschaft als auch die pharmazeutische und biotechnologische Industrie (Enzymhersteller) Optionen für neue Produkte. Des Weiteren kann die Tierzucht und -haltung von neuen lactulosehaltigen, präbiotischen Halbfertigprodukten profitieren.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2009.
2. Schuster-Wolff-Bühning, R., Michel, R. und Hinrichs, J.: A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactulose and

lactulose in milk. Dairy Sci. Technol., DOI 10.1051/ dst/2010034 (2010).

3. Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L. und Hinrichs, J.: Production and physiological action of the disaccharide lactulose. Int. Dairy J. 11, 731-741 (2011).
4. Mayer, J., Kranz, B. und Fischer, L.: Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. J. Biotechnol. 145, 387-393 (2010).
5. Jaendl, K., Lutz-Wahl, S., Hinrichs, J. und Fischer, L.: Kontinuierliche enzymatische Herstellung von Lactulose. Chem. Ing. Techn. 81 (8), 1308-1309 (2009).
6. Jaendl, K., Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L. und Hinrichs, J.: Enzymatische Synthese von Lactulose in Milch- und Molkeprodukten. DMZ 15 (2009).
7. Schuster-Wolff-Bühning, R., Jaendl, K., Fischer, L. und Hinrichs, J.: A new way to refine lactose: enzymatic synthesis of prebiotic lactulose. Eur. Dairy Mag. 7, 25-27 (2009).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Lebensmittel tierischer Herkunft
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
Tel.: 0711/459-23792, Fax: 0711/459-23617
E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Biotechnologie
Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart
Tel.: 0711/459-22311, Fax: 0711/459-24267
E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.