

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Ansprüche des Konsumenten an Süßungsmittel haben sich in den letzten Jahren deutlich gewandelt. Durch die Bereiche *Functional* und *Wellness Food* sind die Anforderungen an Lebensmittel erheblich gestiegen. Nahrungsmittel sollen nicht nur einen guten Geschmack besitzen, sondern sich auch positiv auf die Gesundheit und das Wohlbefinden des Verbrauchers auswirken. Aus diesen Gründen werden verstärkt Alternativen für den traditionellen Tafelzucker gesucht.

Während die Menge an verkauftem Zucker zwischen 2002 und 2006 um 16 % zurückging, stieg der Umsatz von Zuckeraustauschstoffen um 22 % (Mintel Group Inc., 2007). Von Interesse sind besonders neue Süßungsmittel, die durch enzymatische oder chemische Modifikationen aus natürlichen Zuckern gewonnen werden (Martä et al., 2008). Zu diesen alternativen Kohlenhydraten gehört auch Isomaltulose, die durch enzymatische Konversion von Saccharose hergestellt wird. Isomaltulose ist ein natürlich vorkommender, zahnfreundlicher Zucker, der nach dem Verzehr nur eine geringe Insulinantwort hervorruft. Neben der Anwendung als neuartiger *Wellness*-Zucker wird aus Isomaltulose (Palatinose™) großtechnisch von der Südzucker AG der kalorienreduzierte Zuckeralkohol Palatinit™ hergestellt. Darüber hinaus kann Isomaltulose in der chemischen Industrie als regenerativer Ausgangsstoff für die Herstellung von z.B. Tensiden, Detergenzien oder Polymeren eingesetzt werden.

Die Profitabilität eines industriellen Biokonversionsprozesses hängt unter anderem von der ausreichenden Bereitstellung des aktiven Biokatalysators und von dessen Langzeitstabilität ab. Bei der Nutzung mikrobieller Enzyme werden diese von dem Wildtyporganismus meist in unzureichenden Konzentrationen produziert. Dieses Problem kann mithilfe der Fremdgenexpression überwunden werden. Durch den Einsatz hochentwickelter, genetisch veränderter Mikroorganismen wie z.B. *Escherichia coli* kann das heterologe Zielenzym überexprimiert und mittels Hochzelldichtefermentation (Zelldichten  $\geq 100$  g/L Biotrockenmasse) in großen Mengen bereitgestellt werden. Die für den technischen Einsatz benötigte Stabilität des Enzyms wird durch seine Immobilisierung erreicht. Hierfür steht eine breite Palette an Immobilisierungsmethoden zur Verfügung, welche für die jeweilige Anwendung speziell

angepasst werden müssen. Durch den Einsatz innovativer Gen- und Immobilisierungstechniken können Produktionskosten gesenkt und industrielle Bioprozesse rentabel gemacht werden.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der fermentativen Herstellung rekombinanter Isomaltulose-Synthase und ihrer Immobilisierung. Dies beinhaltete die Auswahl eines geeigneten Expressionsstammes und das Scale up der Kultivierung vom Schüttelkolben in den Fermentationsmaßstab. Gleichzeitig sollte eine geeignete Fermentationsstrategie für die Überexpression der Isomaltulose-Synthase entwickelt werden, die zu hohen Zelldichten und Enzymaktivitäten führt. Das produzierte heterologe Enzym sollte anschließend durch Zellaufschluss gewonnen und immobilisiert werden. Im Fokus dieser Optimierungsphase standen das Erreichen einer maximalen und stabilen Produktbildung sowie die Gewährleistung der Mehrfachverwendbarkeit der Biokatalysatoren.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Isomaltulose (Palatinose<sup>TM</sup>)

Isomaltulose, auch Palatinose<sup>TM</sup> genannt, ist ein reduzierendes Disaccharid, das in geringen Mengen in Honig (Low et al., 1988) oder in zuckerreichen Flüssigkeiten wie z.B. Rohrzuckermelassen oder Zuckerrübenextrakten (Weidenhagen et al., 1957a) zu finden ist.

#### 2.1.1 Chemische Struktur und physikalische Daten

Als eines der fünf Saccharose-Isomere besteht Isomaltulose (6-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-D-fructose, CAS-Nr. 13718-94-0) aus je einem Molekül  $\alpha$ -1,6 glykosidisch verknüpfter Glucose und Fructose (siehe Abbildung 2.1) (Schiweck, 1980).

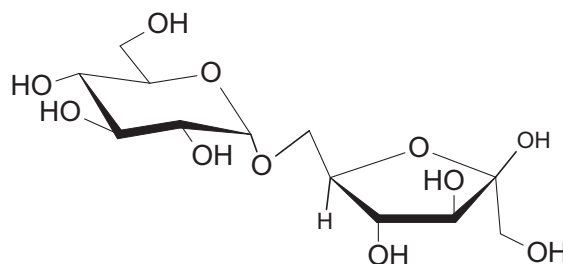


Abbildung 2.1: Chemische Struktur der Isomaltulose (Palatinose<sup>TM</sup>)

Ihre  $\alpha$ -1,6-Bindung verleiht der Isomaltulose im Vergleich zur Saccharose ( $\alpha$ -1,2-Bindung) unterschiedliche Eigenschaften. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die physikalischen Eigenschaften von Saccharose und Isomaltulose.

Isomaltulose ist eine kristalline, nichthyroskopische Substanz, die leicht aus wässriger Lösung mit einem Mol Kristallwasser auskristallisiert (Schiweck, 1983). Im Vergleich zur Saccharose zeigt sie eine sehr hohe Säurestabilität (pH 2,5 - 6,0) (Cheetham, 1984; Cheetham et al., 1985). Isomaltulose besitzt 42 % der Süßkraft von Saccharose (10 %ige wässrige

Lösungen) und zeigt ein sehr ähnliches Geschmacksprofil ohne störenden Nachgeschmack. Ihr Süßungsgrad nimmt mit steigender Konzentration zu (Sträter, 1987). Beim Auflösen von Isomaltulose kommt es zu keinem Kühlungseffekt (*cooling mouth effect*) und das Geschmacksprofil ist nicht temperaturabhängig (Takazoe, 1989; Schiweck et al., 1990). Wie auch bei Saccharose werden dem Körper pro Gramm Isomaltulose 4 kcal zugeführt.

Tabelle 2.1: Physikalische Eigenschaften von Saccharose und Isomaltulose

<b>Eigenschaft</b>	<b>Saccharose</b>	<b>Isomaltulose / Palatinose™</b>
Süßkraft	100	42
Charakter der Süße	rund, ausgeglichen	neutral
Schmelzpunkt (Bereich) [°C ]	160 - 185	123 - 124
Spezifische Drehung [°]	+ 66,5	+ 103
Lösungsenthalpie [kJ/kg]	- 18,2	- 21,7
Kühlungseffekt beim Auflösen	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Löslichkeit bei 20 °C [g/g H <sub>2</sub> O]	ca. 2	0,49
Hygroskopie des Pulvers	gering	sehr gering
Viskosität in Lösung	gering	gering
Bräunungsreaktion	+	+
Kalorien / Gramm Zucker [kcal/g]	4	4

Quelle: Schiweck et al., 1990

### 2.1.2 Besondere Eigenschaften der Isomaltulose

Aufgrund ihrer Süßkraft kann Isomaltulose als alternatives Süßungsmittel eingesetzt werden (Matsukubo et al., 2006; Martä et al., 2008). Ihr besonderer Vorteil gegenüber Süßstoffen liegt hierbei in dem reinen Geschmacksprofil und der Eigenschaft, andere unerwünschte Geschmacksnoten in Nahrungsmitteln zu maskieren. So ist es möglich, mit Isomaltulose den bei manchen Süßstoffen auftretenden metallischen Nachgeschmack zu überdecken.

Isomaltulose besitzt einen sehr geringen Glykämischen Index (GI) von 32 (Saccharose: GI = 100) (Godshall, 2007). Nach Verabreichung von Isomaltulose erfolgt der Anstieg des Blutzuckerspiegels nur sehr langsam und nicht so stark wie beim Verzehr von Saccharose. Dies kann auf die langsamere Isomaltulose-Hydrolyse aufgrund ihrer  $\alpha$ -1,6-Bindung zurückgeführt werden. Isomaltulose ist sehr säurestabil und wird nur schwer von Enzymen in Mund und Magen abgebaut (Kawai et al., 1985; Achten et al., 2007). Ihre Hydrolyse erfolgt im unteren Bereich des Dünndarms durch den Saccharose/Isomaltase-Enzymkomplex. Die

freigesetzten Fructose- und Glucose-Einheiten werden anschließend auf den klassischen Stoffwechselwegen metabolisiert. Isomaltulose ermöglicht eine Langzeitversorgung mit der gleichen Energiemenge wie Saccharose (4 kcal/g), die jedoch langsamer an den Körper abgegeben wird (Tsuji et al., 1986; Lina et al., 2002). Somit bewirkt die Einnahme von Isomaltulose nur eine geringe Insulinantwort und ist auch für Diabetiker gut geeignet (Kawai et al., 1989).

Als langsamer Energielieferant kann Isomaltulose bei der Gewichtskontrolle eingesetzt werden. Studien haben gezeigt, dass der Zucker auch die Fettverbrennung im Körper fördert (Oizumi et al., 2007; Arai et al., 2007). Zusätzlich wird der Verabreichung von Isomaltulose eine bifidogene Wirkung und eine positive Wirkung auf die menschliche Gehirnfunktion zugesprochen (Kashimura et al., 2003; Krastanov et al., 2007). Probanden wiesen deutliche Verbesserungen des Gedächtnisses und der mentalen Konzentrationsfähigkeit auf.

Studien zur Sicherheit und Verträglichkeit von Isomaltulose zeigen, dass der Zucker nicht mutagen, nicht toxisch und gut verträglich ist (Takazoe, 1989; Jonker et al., 2002). Isomaltulose-Mengen von 1 g/kg Körpergewicht oder Dosen von 50 g/d (Macdonald et al., 1983; Kawai et al., 1985) werden auch von Diabetikern gut vertragen und führen zu keinen Magen-Darm-Beschwerden wie Flatulenz oder Diarrhoe (Takazoe, 1989; Lina et al., 2002).

Isomaltulose kann durch die meisten Mikroorganismen nicht verwertet werden, wodurch die Lagerungsfähigkeit von isomaltuloseenthaltenden Nahrungsmitteln erhöht wird (Takazoe, 1989; Pahl et al., 2008). Ein weiterer Vorteil von Isomaltulose gegenüber Saccharose ist ihre geringe Abbaubarkeit durch die Mundflora (Ooshima et al., 1983). Viele Plaquebakterien sind aufgrund der  $\alpha$ -1,6-Verknüpfung nicht in der Lage Isomaltulose zu hydrolysieren, so dass nach ihrem Verzehr keine auffällige Säurebildung im Mund zu beobachten ist (Minami et al., 1990). Zusätzlich hemmt Isomaltulose die Bildung von wasserunlöslichen Glykanen (Ooshima et al., 1983; Minami et al., 1990), was die Plaquebildung deutlich senkt und die Zähne vor Säureeinwirkungen und Kariesbildung bewahrt (Hamada, 2002; Matsukubo et al., 2006).

## 2.1.3 Einsatzmöglichkeiten von Isomaltulose

### 2.1.3.1 Isomaltulose im Nahrungsmittelbereich

Aufgrund ihres niedrigen Glykämischen Indexes bei gleichzeitiger Energielangzeitversorgung ist Isomaltulose besonders gut für den *Functional* und *Wellness Food* Bereich einsetzbar. Hierbei zu nennen sind z.B. Fitness- und Sportgetränke (Dörr et al., 2005) sowie für

Diabetiker geeignete Lebensmittel. Weiterhin kann Isomaltulose in Diätprodukten für die Gewichtskontrolle verwendet werden. Durch Hitzebehandlung von Isomaltulose im sauren Milieu ist die Herstellung eines prebiotischen Kondensationsproduktes möglich, das eine proliferationsstimulierende Wirkung auf Bifidobakterien der Darmflora besitzt (Nakajima et al., 1989; Crittenden et al., 1996).

Als Zuckeraustauschstoff kann Isomaltulose in Süßigkeiten wie z.B. Hart- (Arenz et al., 2006; Kowalczyk et al., 2008) und Weichkaramellen (Bernard et al., 2006) sowie in Schokolade, zahnschonenden Kaugummis, Milchprodukten und Backwaren eingesetzt werden (Sträter, 1987; Beyts, 1990; Egerer, 1994). Hierbei stellt die Eigenschaft, beim Backen Bräunungsreaktionen einzugehen, einen wichtigen Vorteil von Isomaltulose gegenüber manchen künstlichen Süßstoffen dar (Schiweck et al., 1990). Weitere Patente schützen den Einsatz von Isomaltulose in den Bereichen Cerealien (Fritzsching et al., 2006; Fritzsching et al., 2008) und regenerativ wirkenden Nahrungsmitteln (Berg et al., 2008a; Berg et al., 2008b). Isomaltulose wurde auch als nachgeschmackreduzierendes Agens patentiert (Arenz et al., 2008).

Ein großer Anteil der Isomaltulose-Produktion fließt in die Herstellung des Zuckeraustauschstoffes Isomalt. Isomalt (CAS-Nr. 64519-82-0, auch Palatinit<sup>TM</sup> genannt) gehört zu den Zuckeralkoholen und wird durch Hydrierung von Isomaltulose an Raney-Nickel gewonnen (Schiweck, 1980). Es besteht aus einer äquimolaren Mischung aus 1-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-mannitol und 6-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-sorbitol (Schiweck, 1979; Gau et al., 1979). Palatinit<sup>TM</sup> wird von der Palatinit GmbH, einem Tochterunternehmen der Südzucker AG, mit 35.000 t/a hergestellt (Kunz et al., 1996; Rose et al., 2002). Der Zuckeraustauschstoff besitzt ein saccharoseähnliches Geschmacksprofil (Schiweck, 1979), führt dem Körper jedoch nur die Hälfte ihrer Kalorien (2 kcal/g) zu (Grupp et al., 1978). Wie auch Isomaltulose ist Isomalt zahnfreundlich und für Diabetiker geeignet (Bollinger, 1987). Mit 45 - 60 % der Süßkraft von Saccharose kann Isomalt diese 1:1 ersetzen und verleiht dem Produkt somit Körper und Textur (Irwin, 1990). Isomalt wird für Bonbons, Kaugummi, Schokolade, Backwaren und pharmazeutische Produkte (Cola et al., 1991; Bayerköhler et al., 2004; Fritzsching et al., 2007) verwendet.

### 2.1.3.2 Isomaltulose als Ausgangsmaterial für die chemische Industrie

Neben dem Lebensmittelsektor kann Isomaltulose auch im *Non Food* Bereich eingesetzt werden. Das reduzierende Disaccharid erlaubt aufgrund der 2-Ketogruppierung in der

offenkettigen Form des Fructoseteils selektive, klassische Carbonyl-Reaktionen. Aus diesem Grund gewinnt Isomaltulose für die chemische Industrie zunehmend als erneuerbarer *building block* an Bedeutung. Durch Reaktionen wie z.B. oxidative Spaltung (Trombotto et al., 2000), reduktive Aminierung (Cartarius et al., 2002) und katalytische Oxidation mit Metall- (Kunz et al., 1995) bzw. Biokatalysatoren (Buchholz et al., 1990) kann Isomaltulose funktionalisiert und in chemisch interessante Intermediate überführt werden. Auf diesem Weg können stabile Polyhydroxy-Verbindungen hergestellt werden, die Reaktionen mit z.B. Fettsäuren oder Vinyl-Derivaten zu Tensiden und polymerisierbaren Vinylsacchariden ermöglichen (Kunz, 1991; Lichtenthaler et al., 1991a).

Die mit Isomaltulose hergestellten Tenside können aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften auch in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Desai, 1989). Die Produktion von biologisch abbaubaren Tensiden ist ebenfalls realisierbar (Cartarius et al., 2001). Vinylsaccharide ermöglichen hingegen die Herstellung von hydrophilen Biopolymeren und Tensid-Polymeren (Kunz, 1991). Zusätzlich ist Isomaltulose zu neuen Detergenzien verarbeitbar. Es wurden bereits Patente über die Vorstufen und Herstellung von Tensiden (Klein et al., 1988; Lichtenthaler et al., 1991b), Detergenzien (Driemel et al., 1990) und Polymeren (Klein et al., 1988) aus Isomaltulose angemeldet. Durch enzymatische Umwandlung in Isomaltulose kann die in großen Mengen zur Verfügung stehende Bulkchemikalie Saccharose als nachwachsender Rohstoff für die chemische Industrie eingesetzt werden.

## 2.1.4 Industrielle Herstellung von Isomaltulose

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften und vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ist Isomaltulose eine wichtige Bereicherung für den Sektor der nachwachsenden Rohstoffe. Hierdurch erklären sich auch die zunehmenden Forschungsaktivitäten nach Entdeckung der Isomaltulose, die eine verbesserte Bereitstellung des Zuckers zum Ziel hatten.

### 2.1.4.1 Entdeckung und Etablierung der Isomaltulose

Erstmals wurde Isomaltulose 1952 von Stodola erwähnt, der das damals noch unbekanntes Disaccharid in Produkten des Mikroorganismus *Leuconostoc mesenteroides* fand (Stodola et al., 1952). Unabhängig davon entdeckten Weidenhagen und Lorenz 1957 im Forschungslabor der Süddeutschen Zucker AG (Südzucker AG), dass ein Eigenisolat aus Zuckerrübensaft die Fähigkeit besaß, ein unbekanntes reduzierendes Disaccharid aus Saccharose herzustellen

(Weidenhagen et al., 1957a). Das Disaccharid wurde als Isomaltulose identifiziert und mit dem Trivialnamen Palatinose, nach dem Ort der Entdeckung, Obrigheim in der Pfalz (lat. *Palatinum*), versehen (Bollinger, 1987). Der isolierte Mikroorganismus wurde später von Windisch als *Protaminobacter rubrum* identifiziert (Windisch, 1958). Das erste Patent über die Produktion von Palatinose<sup>TM</sup> wurde 1957 der Süddeutschen Zucker AG, Mannheim erteilt (Weidenhagen et al., 1957b).

Isomaltulose wurde 1967 auch als natürlicher Bestandteil in Honig gefunden (Siddiqui et al., 1967). Hervorgerufen durch wissenschaftliche Publikationen über Struktur (Dreissig et al., 1973), Vorkommen (Low et al., 1988) und zu erwartende Eigenschaften der Isomaltulose (Weidenhagen, 1961; Cheetham et al., 1985) sowie des isomaltulosebildenden Enzyms (Cheetham, 1984), nahm das Interesse an Isomaltulose zu und auch andere Zuckerunternehmen fingen an, sich mit dem reduzierenden Disaccharid zu beschäftigen. Neben der Südzucker AG machten besonders die Unternehmen Mitsui Sugar C., Japan und Tate & Lyle, England durch Publikationen auf sich aufmerksam (Sträter, 1987).

In Japan wird Isomaltulose seit 1985 als Lebensmittelzusatz eingesetzt. In 2006 überstieg dort die jährliche Produktion 5.000 t (Krastanov et al., 2006). Im Juli 2005 ließ die Europäische Kommission Isomaltulose als neuartiges Lebensmittel (*Novel Food* Zulassung) gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 zu. Den GRAS Status (*Generally Recognized As Safe*) erhielt Isomaltulose im März 2006 (Godshall, 2007). Seit August 2007 besitzt Palatinose<sup>TM</sup> auch die *Novel Food* Zulassung für Australien und Neuseeland und im September 2007 erkannte die US-Lebensmittelbehörde FDA Palatinose<sup>TM</sup> als nichtkariogen an (Südzucker AG). Isomaltulose wird derzeit von den Unternehmen Südzucker AG (Palatinit GmbH), Mitsui Sugar C., Japan und Cargill Corp. in den USA im Großmaßstab produziert (Eggleston, 2008). Die Jahresproduktion der Südzucker AG beläuft sich auf über 60.000 t/a (Südzucker AG).

#### 2.1.4.2 Industrielle Herstellungsverfahren von Palatinose<sup>TM</sup>

Die chemische Synthese von Isomaltulose ist sehr aufwändig, aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Produktion des Zuckers überwiegend mit Hilfe von Biokatalysatoren durchgeführt. Erste Prozesse zur Herstellung von Isomaltulose nutzten lebende freie Zellen. Die Entwicklung eines kontinuierlichen, einstufigen Fermentationsprozess mit *Protaminobacter rubrum*, in dem Zellwachstum und Substratumsatz gleichzeitig vollzogen wurden, eröffnete 1976 die Möglichkeit zur industriellen Isomaltulose-Produktion (Crueger et al., 1979a; Crueger et al., 1979b; Crueger et al., 1979c). Probleme bei der Nutzung freier Zellen lagen jedoch in hohen Aufreinigungskosten und geringen Isomaltulose-Ausbeuten (Schiweck



et al., 1990). Fortschritte im Bereich der Immobilisierungstechniken ermöglichten die Entwicklung von stabileren, kosteneffektiveren Prozessen mit immobilisierten Mikroorganismen oder Enzymen, wobei aus ökonomischen Gesichtspunkten hauptsächlich ganze Zellen zum Einsatz kamen (Schiweck et al., 1991). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über einige Patentanmeldungen für Isomaltulose-Herstellungsverfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren.

Tabelle 2.2: Patentanmeldungen für Isomaltulose-Herstellungsverfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren

Patentnummer	Offenlegungsdatum	Anmelder	Erfinder	Immobilisierter Biokatalysator
DE 30 38 219 A1	1982	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
EP 0 091 063 A2	1983	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
DE 32 13 107 A1	1983	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
US 4,640,894	1987	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
DE 30 38 218 A1	1982	Bayer AG	Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.; Schutt, H.	Enzym
EP 0 049 801 A2	1982	Bayer AG	Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.; Schutt, H.	Enzym
EP 0 160 260 A2	1985	Bayer AG	Egerer, P.; Haese, W.; Perrey, H.; Schmidt-Kastner, G.	ganzer MO
EP 0 160 253 A2	1985	Bayer AG	Haese, W.; Egerer, P.; Schmidt-Kastner, G.; Perrey, H.	ganzer MO
DE 35 28 752 A1	1986	Bayer AG	Egerer, P.; Crueger, W.; Schmidt-Kastner, G.	Enzym
US 4,857,461	1989	Bayer AG	Egerer, P.; Crueger, W.; Schmidt-Kastner, G.	Enzym
US 4,390,627	1983	Miles Laboratories	Lantero, O. J.	ganzer MO
GB 2 082 591 A	1982	Mitsui Sugar Co.	Shimizu, J.; Suzuki, K.; Nakajima, Y.	ganzer MO
DE 31 33 123 A1	1982	Mitsui Sugar Co.	Shimizu, J.; Yokohama, K.; Suzuki, K.; Ayase, K.; Nakajima, Y.; Yamato, K.	ganzer MO
EP 0 028 900 A1	1981	Tate & Lyle	Bucke, C.; Cheetham, P.S.J.	Enzym/ganzer MO
US 4,670,387	1987	Tate & Lyle	Bucke, C.; Cheetham, P.S.J.	Enzym/ganzer MO

MO = Mikroorganismus