

Prebiotika aus Molke– Neuer Weg zur Herstellung von Galactooligosacchariden



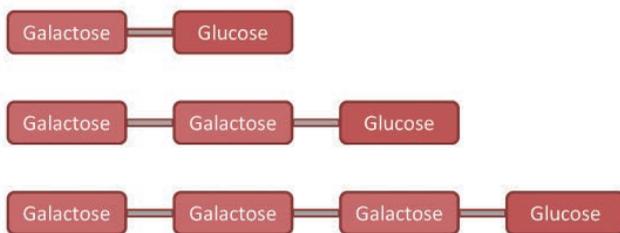
PREBIOTIKA AUS MOLKE

Neuer Weg zur Herstellung von Galactooligosacchariden

1. Einleitung

Im vergangenen Jahrzehnt haben sogenannte funktionelle Lebensmittel, d. h. Lebensmittel mit gesundheitlichem Zusatznutzen, beim Verbraucher zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ein Hauptziel von funktionellen Lebensmitteln ist die positive Beeinflussung des Gastrointestinaltraktes. Dazu gehört auch der Aufbau einer gesunden Darmflora. Hierbei können Galactooligosaccharide (kurz: GOS) nützlich sein. Als GOS werden Mehrfachzucker bezeichnet, welche aus einer Reihe von Galactosemolekülen und optional einem endständigen Glucosemolekül bestehen (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Struktur von Galactooligosacchariden



GOS kommen natürlicherweise in der humanen Muttermilch vor (Bruzzese et al. 2006) und sind maßgeblich für den bifidogenen Effekt der Muttermilch verantwortlich (González et al. 2008). Wenn Mütter nicht ausreichend Milch bereitstellen können, kann Säuglingsergänzungsnahrung auf Kuhmilchbasis die Versorgung mit lebenswichtigen Nährstoffen sicherstellen. Allerdings enthält Kuhmilch deutlich weniger Oligosaccharide (Martinez-Ferez et al. 2006), sodass es vorteilhaft für Säuglinge ist, wenn Oligosaccharide zugefügt werden. An eine Isolierung humaner Oligosaccharide – bisher wurden ca. 130 von über 1000 verschiedenen Oligosacchariden identifiziert – für kommerzielle Zwecke ist selbstredend nicht zu denken. An Stelle humaner Oligosaccharide werden daher bovine Galactooligosaccharide als wertvoller und geeigneter Ersatz angesehen (Schwab und Gänzle 2011). Diese sind zum Teil auch in der humanen Muttermilch vorhanden (Tzortzis und Vulevic 2009).

2. Eigenschaften von Galactooligosacchariden

2.1 Prebiotische Wirkung

Nach einer Definition von Gibson & Roberfroid 1995 werden als Prebiotika unverdauliche Lebensmittelbestandteile bezeichnet, die selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität ein oder mehrerer Bakterien des Dickdarms fördern und demnach die Gesundheit des Wirts verbessern. Sie werden auch als „Bifidus-Faktor“ bezeichnet.

Die prebiotische Wirkung von Galactooligosacchariden wurde bereits in zahlreichen Studien bestätigt. Sie fördern sowohl

das Wachstum von Bifidobakterien (z. B. Boehm et al. 2002, Knol et al. 2005, Ben et al. 2008) als auch von Lactobazillen (Ben et al. 2004) und hemmen gleichzeitig pathogene Keime, wie Clostridien (Vivatvakin et al. 2010). Durch Zusatz von GOS gleichen sich die Anzahl und die Art der kurzkettigen Fettsäuren von nicht gestillten (Flaschen-) Säuglingen denen der gestillten Säuglinge an (Bakker-Zierikzee et al. 2005, Ben et al. 2004). Auswirkungen auf die Stuhlfrequenz und -konsistenz wurden ebenfalls von zahlreichen Autoren beschrieben (z. B. Nakamura et al. 2009). Zudem gab es positive Effekte im Hinblick auf die Vermeidung von Atemwegsinfektionen (Bruzzese et al. 2009, Puccio et al. 2007, Rivero et al. 2005) und eine verbesserte Mineralstoffaufnahme (Sako et al. 1999, Van Den Heuvel et al. 2000).

Der bifidogene Effekt konnte auch bei Erwachsenen bestätigt werden (Ito 1990, Davis et al. 2010), wobei der Effekt stark von der täglichen Dosis abhängig ist (getestet wurden 2,5 bis 10 g pro Tag). Werden Galactooligosaccharide während der Schwangerschaft konsumiert, ist der bifidogene Effekt jedoch nur bei der werdenden Mutter und nicht beim Fötus nachweisbar (Shadid et al. 2007).

2.2 Weitere Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten

Neben ihrem positiven gesundheitlichen Effekt, besitzen GOS weitere nützliche Eigenschaften, welche ihren Einsatz in Lebensmitteln interessant machen. Aufgrund ihrer Struktur können sie von den Enzymen im Mund, den α -Amylasen, nicht verstoffwechselt werden. Das hat zur Folge, dass GOS keine Karies verursachen (Splechna et al. 2001). Der Einsatz als Zuckeraustauschstoff in Kaugummi oder Konfekt ist daher naheliegend (Suter 2010). Sie gelangen demnach unverdaut in den Magen, den sie aufgrund ihrer guten Stabilität im sauren Milieu, unverändert passieren. Diese Eigenschaft macht auch den Einsatz in Fruchtsäften denkbar (Ito 1990). Auch besitzen GOS eine sehr hohe thermische Stabilität (keine Veränderung nach 10 Min. bei 160 °C und pH 7 (Sako et al. 1999)) und ein hohes Wasserbindungsvermögen, was den Einsatz in Brot und anderen Backwaren ermöglicht (Sonoike et al. 1994). Die Viskosität ist mit der von Fruktosesirup vergleichbar und trägt zu einem verbesserten Mundgefühl bei (Tzortzis und Vulevic 2009). Weiterhin haben GOS einen niedrigen Kalorienwert (1,73 kcal/g, entspricht ca. 50 % des Kalorienwertes von Haushaltszucker (Saccharose)), da sie den Dünndarm passieren ohne verdaut zu werden. Dies macht GOS wiederum geeignet für Diabetikernahrung. Auch die Süßkraft entspricht je nach Zusammensetzung nur 30 bis 60 % der Süßkraft von Saccharose.

3. Produkte mit GOS

Zunächst muss unterschieden werden zwischen reinen GOS-Produkten und zwischen Lebensmitteln, denen Galactooligosaccharide zugesetzt werden.

Im Bereich der reinen GOS-Erzeugnisse gibt es weltweit einige Produzenten, so z. B. Nissin Sugar Manufacturing Company und Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. in Japan, GTC Nutrition in den USA, Dairygold Food Ingredients in Irland, First Milk Ingredients und Clasado Inc. in Großbritannien oder Friesland Campina in den Niederlanden. Die Produkte sind meist als Sirup erhältlich und als Zwischenprodukt zur Weiterverarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt. Einzig bei dem Produkt Bimuno von Clasado Inc. handelt es sich um ein verbrauchsfertiges Produkt. Es wird als Pulver in Sachets oder als Kapseln angeboten. Von den enthaltenen Zuckern sind jedoch nur ca. 48 % GOS, die eine Kettenlänge von zwei bis fünf Monomeren aufweisen (Torres et al. 2010). Der Rest entfällt auf Glucose (18 %), Galactose (12 %) und Lactose (22 %). Die meisten der GOS-Produkte enthalten 50 bis 70 % GOS, einzig Purimune™ von GTC Nutrition enthält 90 bis 92 % GOS (Torres et al. 2010). Der hohe GOS-Anteil wird jedoch nicht während der Synthese erzielt, sondern durch eine nachträgliche chromatographische Aufreinigung der Mischung, bei der der Großteil der Monosaccharide Glucose und Galactose (Rest: 0 bis 1 %) und der überwiegende Teil der Lactose (Rest: 7 bis 10 %) abgetrennt werden.

Der Einsatz von Galactooligosacchariden in verschiedenen Produkten der Lebensmittelindustrie nimmt stetig zu. Von 2005 bis 2011 ist die Anzahl der weltweit neuentwickelten Produkte pro Jahr um das 12-fache gestiegen (Staley und Mallee 2012). 2011 kam im Durchschnitt an jedem 3. Tag ein neues GOS-enhaltendes Produkt auf den Markt. Der Großteil dieser Produkte fällt in den Bereich der Säuglings- (Anfangsnahrung, Folgenahrung) und Kleinkindnahrung (Früchtoprodukte, Desserts, Getränke). Aber auch Milchprodukten (Joghurts, aromatisierte Milch, Milchdesserts) und Getränken (Energy-Drinks, Fruchtsäfte) werden GOS zugesetzt.

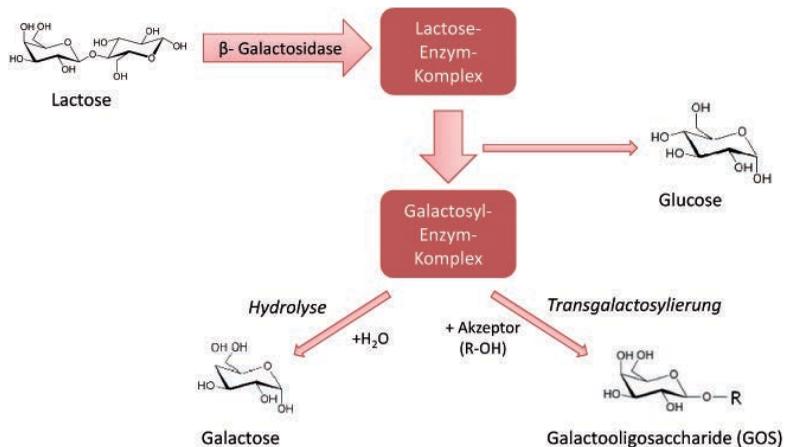
Europa ist neben dem asiatischen Raum der weltweit zweitgrößte Markt für GOS-Produkte. Von 2001 bis 2011 stammten 38 % der Produktneueinführungen mit GOS aus Europa (57 % aus Asien). In Deutschland wurden in diesem Zeitraum insgesamt 25 Produkte mit GOS eingeführt (Staley und Mallee 2012). Der Einsatz von GOS beschränkt sich hierzulande v.a. auf Säuglings- und Folgenahrung (z. B. Aptamil von Milupa). Einige europäische Länder haben bereits GOS-Produkte jenseits des Baby- und Kleinkindnahrungssektors auf dem Markt. In Finnland gibt es beispielsweise einen prebiotischen Joghurt von Valio Ltd., in Italien verschiedene Kekse, Cracker und Getränke unter der Marke Alixir.

4. Synthese von Galactooligosacchariden

4.1 Prinzip

Die Abbildung 2 zeigt schematisch die Synthese von Galactooligosacchariden aus Lactose (bestehend aus den Monomeren Glucose und Galactose) mit Hilfe des Enzyms β -Galactosidase (EC 3.2.1.23, auch: Lactase). Zunächst wird ein Lactose-Enzym-Komplex gebildet. Das Enzym bewirkt die Spaltung der Lactose und die Freisetzung der Glucose. Der

Abbildung 2: Enzymatische Synthese von Galactooligosacchariden



Galactosyl-Rest verbleibt dabei zunächst am aktiven Zentrum des Enzyms und wird anschließend auf einen Akzeptor mit einer OH-Gruppe übertragen. Dabei können zwei mögliche Reaktionen ablaufen: Ist der Akzeptor Wasser, findet lediglich eine Spaltung (Hydrolyse) statt, und es entsteht freie Galactose. Ist jedoch ein anderes Zuckermolekül der Akzeptor, so entstehen neue Zucker, die Galactooligosaccharide. Diese Reaktion nennt man Transgalactosylierung. Bei diesem „anderen“ Zuckermolekül kann es sich um alle in der Reaktionslösung vorhandenen Zucker handeln, d.h. sowohl Lactose, als auch die aus der Hydrolyse-reaktion entstandenen Monosaccharide Galactose und Glucose, aber auch bereits entstandene GOS. Dadurch kommt es zur Kettenverlängerung, und es entstehen Oligosaccharide, die bis zu neun Monomere aufweisen können. Die entstandenen GOS unterscheiden sich neben der Kettenlänge auch in der Art der Verknüpfung. Weit verbreitet sind bspw. die β -1,6-verknüpfte Allolactose (Disaccharid aus Glucose und Galactose) oder auch Galactosyl-Lactosen, welche aus Lactose und einem zusätzlich β -1,6- oder β -1,3- angekoppelten Galactose-Molekül bestehen. Bereits entstandene Galactooligosaccharide sind einerseits Akzeptor für weitere Galactosyl-Reste, können jedoch andererseits auch wieder hydrolysiert werden. Die Ausbeute und Zusammensetzung von GOS hängt damit wesentlich von der Reaktionszeit ab und lässt sich nur schwer vorhersagen.

4.2 Einflussfaktoren

Neben der Reaktionszeit beeinflussen zahlreiche andere Faktoren die GOS-Ausbeute. Ein wichtiger Parameter ist die Enzymquelle, d.h. der Mikroorganismus aus welchem die Lactase gewonnen wurde. Je nach Enzymquelle ist die Transgalactosylierung stärker oder schwächer ausgeprägt. Weiterhin kann die im Verlauf der Reaktionen freigesetzte Glucose das Enzym hemmen, dessen Ausmaß jedoch auch von der jeweiligen Enzymquelle abhängig ist.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die anfängliche Lactosekonzentration, wobei mit zunehmender Lactosekonzentration auch die GOS-Ausbeute steigt (z. B. Albayrak und Yang 2002). Grund dafür ist, dass bei höherer Zuckerkonzentration folglich weniger Wassermoleküle für eine Hydrolyse-reaktion zur Verfügung stehen und demnach die Wahrscheinlichkeit, dass der Akzeptor ein Zuckermolekül ist, steigt.

Die technisch mögliche Anfangskonzentration hängt natürlich auch von der Löslichkeit der Lactose ab, welche bekanntermaßen temperaturabhängig ist. Die Arbeitstemperatur kann jedoch nicht beliebig gesteigert werden, da sie durch die je nach Enzymquelle unterschiedliche Thermostabilität der Lactasen begrenzt ist. Auch der zulässige pH-Wert ist durch die jeweiligen Aktivitäten und Stabilitäten des Enzyms im sauren oder basischen Milieu begrenzt. Weiterhin spielt auch die Reinheit des Enzyms eine Rolle, ob ganze Zellen zur Synthese eingesetzt werden oder ob das Enzym bzw. die Zellen frei oder immobilisiert (d. h. an einen Träger gebunden) vorliegen.

4.3 Synthese in Lactoselösungen

Der Großteil der Publikationen beschäftigt sich mit der Synthese von GOS aus reinen Lactoselösungen. Dabei wurden β -Galactosidasen aus Pilzen (z. B. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Kluyveromyces*), Bakterien (z. B. Bifidobakterien, Lactobazillen) und Archaeen (z. B. *Sulfolobus*) eingesetzt. Aus der letztgenannten Gruppe sind zwei Mikroorganismen bekannt, deren β -Glycosidasen hyperthermophile Eigenschaften aufweisen und die zur GOS-Synthese eingesetzt wurden: *Sulfolobus solfataricus* und *Pyrococcus furiosus*. Die maximale Ausbeute lag bei ca. 45 bis 52 % (Park et al. 2008, Boon et al. 1998).

Aus der Gruppe der Bakterien ist der Einsatz sowohl von mesophilen als auch von thermophilen Enzymen bekannt. Eine Vielzahl von Autoren verwendeten Enzyme aus Bifidobakterien (z. B. Rabiou et al. 2001, Tzortzis et al. 2005, Goulas et al. 2007). Die höchste Ausbeute mit diesen Enzymen lag bei ca. 63 % und wurde mit einem isolierten und aufgereinigten Enzym von *B. infantis* bei 30 %-iger Anfangskonzentration an Lactose, 60 °C, pH 7,5 nach 15 h erreicht.

Auch Enzyme verschiedener Spezies von Lactobazillen (*L. acidophilus*, *L. reuterii*, *L. sakei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*) wurden auf ihre Eignung zur GOS-Synthese getestet. Bei einer Lactosekonzentration von ca. 20 % lag die Ausbeute stets um die 40 % bei einem Hydrolysegrad (Lactosespaltung) von ca. 80 % (u. a. Iqbal et al. 2010, Maischberger et al. 2010, Splechna et al. 2006, Nguyen et al. 2007).

Zur Eignung von β -Galactosidasen aus Pilzen wurden v. a. verschiedene *Aspergillus*-, *Penicillium*- und *Kluyveromyces*-Arten untersucht. Lactase aus *Aspergillus niger* katalysiert vor allem die Spaltung der Lactose. Die GOS-Ausbeute ist mit 16 % recht niedrig, der Lactosehydrolysegrad mit 85 % jedoch sehr hoch (bei 30 % Anfangslactose) (Toba und Adachi 1978). Mit *Aspergillus oryzae* als Enzymquelle wurden ähnliche Ausbeuten von 18 % bereits bei einem niedrigen Lactosegehalt von 7,5 % erhalten (Toba und Adachi 1978). Der Hydrolysegrad war mit 37 % zudem deutlich niedriger. Das Enzym aus *A. oryzae* verfügt offensichtlich über ein höheres Transgalactosylierungsvermögen als jenes aus *A. niger*. Innerhalb der Enzyme aus *Penicillium*-Arten wurde die höchste Ausbeute mit *P. dupontii* erzielt: Bei einem Hydrolysegrad von 90 % betrug die GOS-Ausbeute 50 % nach 8 h (Nakkharat et al. 2006). Lactasen aus *Kluyveromyces fragilis* besitzen vorrangig hydrolytische Aktivität: Bei 5%-iger Lactoseanfängskonzentration gelang nur eine Ausbeute von 22 %, gleichzeitig lag der Hydrolysegrad jedoch bei 100 % (Roberts und Pettinati 1957).

4.4 Synthese in Molkenpermeat

Nur wenige Publikationen gibt es zur Verwendung anderer Substrate wie Molke oder Molkenpermeat. Dieses enthält neben Lactose auch Milchsäure, welche die Enzyme inhibieren, aber auch aktivieren können. Vor allem Calcium ist als Inhibitor bekannt, Magnesium wirkt in vielen Fällen aktivierend. Über das Zusammenspiel verschiedener Ionen auf Lactasen finden sich jedoch kaum Aussagen.

Bei Verwendung von Lactose-supplementiertem UF-Molkenpermeat (Enzym aus *K. lactis*) sank bei einer Steigerung der Anfangslactosekonzentration von 10 % auf 30 % die GOS-Ausbeute von 13,7 % auf ca. 10 % (Adamczak et al. 2009). Bei der Synthese in reinen Lactoselösungen ist die Abhängigkeit genau entgegengesetzt (Albayrak und Yang 2002). Mit einer *Aspergillus oryzae*-Lactase wurde in unsupplementiertem Molkenpermeat, welches demzufolge nur eine geringe Lactosekonzentration von 6 % besitzt, nur eine GOS-Ausbeute von 9 % erreicht (Lopez Leiva und Guzman 1995). Bei konzentriertem Molkenpermeat mit hohen Lactosekonzentrationen von 40 % konnte aber auch mit Enzymen aus *A. oryzae* eine recht hohe Ausbeute von 25 % erzielt werden (Valero und Yang 2005).

Die mit ca. 38 % höchste GOS-Ausbeute mit Lactose-supplementiertem Molkenpermeat als Substrat konnte mit Enzymen aus *Bifidobacterium bifidum* erreicht werden (Goulas et al. 2007).

5. Aktuelle Forschung an der Hochschule Anhalt zur Thematik GOS

5.1 Molke

Allein in Deutschland fallen jährlich ca. 12,5 Mio. Tonnen Molke an. Die Suche nach neuen lukrativen Verwertungsmöglichkeiten, die über eine Verwertung der Molkenproteine hinausgehen, ist daher stets von großem Interesse.

Je nach Art der Casein-Fällung werden verschiedene Arten von Molke unterschieden. Bei der Käseherstellung erfolgt die Fällung mit Lab-Enzymen. Die daraus resultierende Molke wird Süßmolke oder auch Labmolke genannt. Bei der Frischkäse- und Quarkproduktion wird mit Milchsäurebakterien gefällt, wodurch die sogenannte Sauermolke entsteht. Die Zusammensetzung der verschiedenen Molkearten ist in Tabelle 1 dargestellt. Während der Trockenmasse-, Lactose- und Fettgehalt ähnlich ist, sind zum Teil erhebliche Unterschiede beim Asche- und Proteingehalt ersichtlich. Mit 0,75 % enthält Süßmolke mehr als doppelt so viel Protein wie Sauermolke. Der höhere Aschegehalt der Sauermolke im Vergleich zu Süßmolke kann maßgeblich auf den höheren Anteil von Calciumphosphat zurückgeführt werden. Ursache ist die Ionisierung der Calciumphosphatbrücken bei der Säurefällung des Caseins, wodurch Calciumphosphat von den Caseinmicellen in die Molke übergeht. Weiterhin enthält Sauermolke ca. 0,4 % fermentativ erzeugte Milchsäure.

Die Verwendung von Molke als lactosehaltiges Substrat für die Synthese von GOS würde eine Wertsteigerung des Produktes Molke mit sich bringen. Es ergäben sich vielfältige neue Applikationsmöglichkeiten und Produktideen von lactoseabgereicherten Molkeprodukten bis hin zu Molkedrinks mit prebiotischer Wirkung. Die GOS-Synthese in Molke ist jedoch nicht trivial. Eine Übertragung der Erkenntnisse, welche aus der Synthese in

Tabelle 1: Zusammensetzung von Süß- und Sauermolke (Quelle: Milchindustrieverband)

Bestandteil	Süßmolke (pH 6,1)	Sauermolke (pH 4,6)
Trockenmasse [%]	6,20	5,70
Lactose [%]	4,80	4,60
Protein [%]	0,75	0,30
Fett [%]	0,05	< 0,01
Asche [%]	0,60	0,80

reinen Lactoselösungen gewonnen wurden, ist nicht ohne Weiteres möglich, wie verschiedene Publikationen zeigen. Beispielsweise spielen die in Molke enthaltenen Salze und/oder Proteine eine Rolle hinsichtlich der Inhibierung der *Streptococcus thermophilus*- β -Galactosidase (Greenberg und Mahoney 1984). Die Anwesenheit dieser Stoffe kann sich jedoch je nach Enzymquelle auch positiv auswirken. Das Vorhandensein von bovinem Serumalbumin bewirkt zum Beispiel eine Enzymstabilisierung bei *Bacillus stearothermophilus* (Goodman & Pederson 1976).

5.2 GOS-Synthese in Molke

Die Hochschule Anhalt beschäftigt sich im Rahmen eines Forschungsprojektes mit der kostengünstigen Produktion von Galactooligosacchariden aus Molke. Hierzu wurden zunächst zwei kommerziell erhältliche Lactasen (optilactase LX2 aus *Kluyveromyces lactis* und optilactase A (Pulverlactase) aus *Aspergillus oryzae* von optiferm GmbH) eingesetzt. Die Reaktion wurde beim jeweiligen Temperatur- und pH-Optimum der Enzyme (45 °C und pH 6,5 für optilactase LX2, 55 °C und pH 4,5 für optilactase A) durchgeführt. Die Molkekupfer (Süßmolkenpulver, Sauermolkenpulver) wurden so rekonstituiert, dass sich eine Anfangslactosekonzentration von 39 g/Liter ergab. Zum Vergleich wurde eine 39 g/Liter Lactoselösung in destilliertem Wasser (optilactase A) bzw. PEM-Puffer (optilactase LX2) untersucht. Das verwendete

Enzym/Substrat-Verhältnis betrug 50 Units pro Gramm Lactose. Die Reaktion wurde in einem Schüttelwasserbad unter Verwendung von 300 ml-Schliffkolben (Füllmenge: 100 ml) durchgeführt. Die Probenahme (1,5 ml) erfolgte über einen Zeitraum von 4 (optilactase LX2) bzw. 8 Stunden (optilactase A). Zur Enzymdenaturierung wurden die Proben in einem Thermoschüttler bei 95°C für 10 Min. erhitzt und anschließend mittels HPLC analysiert. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der GOS-Ausbeute in den Medien PEM-Puffer, Süßmolke und Sauermolke bei Verwendung des Enzym optilactase LX2 aus *K. lactis*. Während in PEM-Puffer ein sehr schneller Anstieg der GOS-Konzentration zu beobachten ist, ist die GOS-Bildung in beiden Molken deutlich verlangsamt. In PEM-Puffer wurde die maximale GOS-Ausbeute von 10,93 % schon nach 30 Min. erreicht. Allerdings ist mit zunehmender Zeit ein schneller Abbau zu beobachten, sodass nach 1,5 Stunden 60 % der zuvor gebildeten GOS bereits wieder abgebaut waren. In Süßmolke ist die GOS-Ausbeute mit 4,3 % nach 30 Min. deutlich geringer. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym in diesem Milieu bereits nach ca. 30 Min. nahezu vollständig inaktiviert ist, sodass weder Hydrolyse noch Transgalactosylierung ablaufen können. Zur GOS-Bildung in Süßmolke ist dieses Enzym daher ungeeignet. In Sauermolke hingegen ist das Enzym wesentlich stabiler (Inaktivierung nach ca. 2 Stunden). Demzufolge können ähnliche Ausbeuten (10,56 %) erzielt werden wie im Vergleichsmedium PEM-Puffer. Dennoch wird das Enzym durch Inhaltsstoffe der Sauermolke gehemmt, da die GOS-Synthese deutlich verzögert stattfindet.

Anders verhält es sich bei dem Enzym optilactase A aus *A. oryzae* (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz zum Enzym aus *K. lactis*, verläuft die GOS-Bildung in allen Substraten ähnlich, d.h. das Enzym wird nicht durch die in den Molken vorhandenen Salze oder Proteine inhibiert. Im Gegenteil: Während es in Lactoselösung und Süßmolke keinen Unterschied bei der maximalen GOS-Ausbeute (10,9 %) gibt, ist in Sauermolke sogar eine leichte Ausbeutesteigerung (11,3 %) zu beobachten. Unterschiede werden auch im Abbau der gebildeten GOS sichtbar: Innerhalb von 6 Stunden nach Erreichen der maximalen Ausbeute sind in Sauermolke ca. 43,5 %, in Süßmolke ca. 37,6 % und in Lactoselösung nur ca. 29,6 % der GOS wieder abgebaut. Zu bemerken ist auch, dass trotz gleichem Enzym/Substrat-Verhältnis, die GOS-Synthese in reiner Lactoselösung mit dem Enzym aus *A. oryzae* deutlich langsamer abläuft als mit optilactase LX2 aus *K. lactis* (vgl. Abbildung 3 und 4). Demnach scheint die Affinität zu Lactose bei dem *Aspergillus*-Enzym weniger stark ausgeprägt.

Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der GOS-Synthese in PEM-Puffer (rot), Süßmolke (gelb) und Sauermolke (blau) mit dem Enzym optilactase LX2 aus *K. lactis*

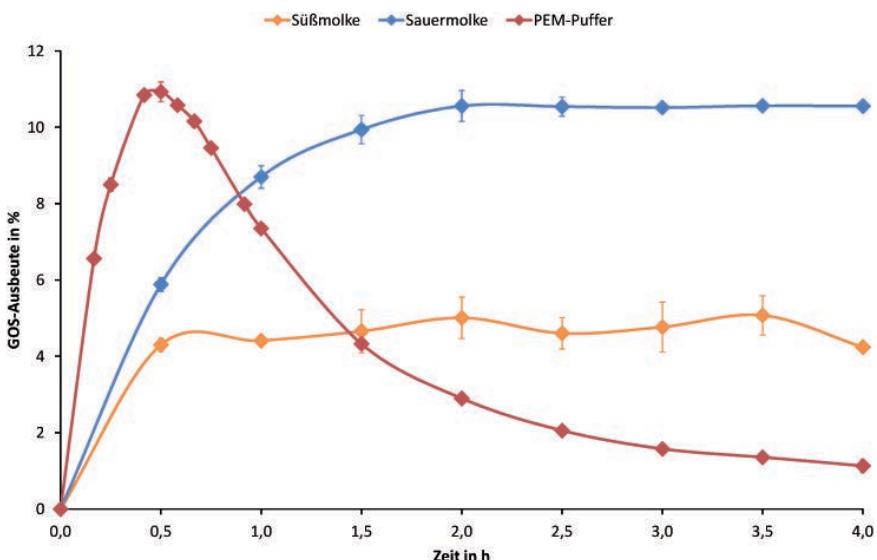
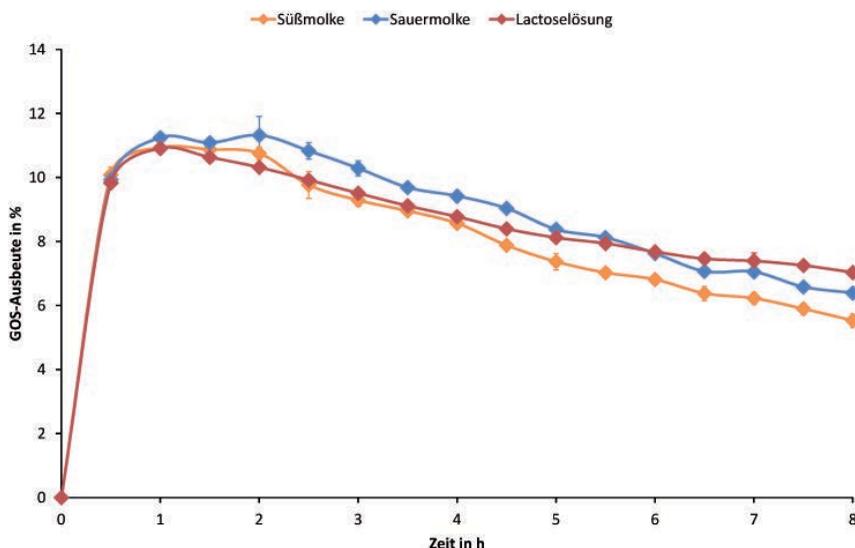


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der GOS-Synthese in Lactoselösung (rot), Süßmolke (gelb) und Sauermolke (blau) mit dem Enzym optilactase A aus *A. oryzae*



Die Abbildung 5 gibt die GOS-Ausbeute beider Enzympräparate in Abhängigkeit des Lactosehydrolysegrads wieder. Daraus lässt sich erkennen, inwiefern die Enzyme zur Hydrolyse oder zur Transgalactosylierung neigen. Der Unterschied zwischen beiden Enzymen ist klar ersichtlich: Vergleicht man die Daten der Reaktion in reiner Lactoselösung, so konnte mit der Lactase aus *K. lactis* (offene Symbole) ein Hydrolysegrad von 100 % erreicht werden. Der Lactoseabbau mit dem *A. oryzae*-Enzym (geschlossene Symbole) liegt in der doppelten Zeit bei nur ca. 60 %. Die hydrolytische Aktivität der *K. lactis*-Lactase ist demnach deutlich stärker ausgeprägt. Die Fähigkeit zur Transgalactosylierung ist jedoch bei beiden Präparaten gleichermaßen vorhanden, da ähnliche Ausbeuten erzielt wurden (siehe auch Tabelle 2).

Vergleicht man die verschiedenen Substrate untereinander, so zeigt sich bei beiden Enzymen, dass bei Verwendung von Sauermolke als Synthesemedium anstatt reiner Lactoselösung, das Reaktionsgleichgewicht zur Transgalactosylierung hin verschoben ist. Dies zeigt sich daran, dass bei gleichem Hydrolysegrad eine höhere Ausbeute erzielt wird.

Auch im Hinblick auf die Zusammensetzung der gebildeten Galactooligosaccharide gibt es Unterschiede zwischen den verwendeten Medien und Enzymen (siehe Tabelle 2). Während die Lactase aus *A. oryzae* vorrangig Tri- und sogar einige Tetrasaccharide bildet, bestehen die Galactooligosaccharide der *K. lactis*-Lactase ausschließlich aus Di- und Trisacchariden. Bei optilactase A unterscheidet sich

die Zusammensetzung der GOS in Lactoselösung und Süßmolke nicht wesentlich voneinander. Lediglich in Sauermolke ist die Trisaccharid-Fraktion mit ca. 82,2 % zugunsten der Di- (ca. 8,1 %) und Tetrasaccharide (ca. 9,7 %) etwas vermindert. Beim *K. lactis*-Enzym stellen bei Verwendung reiner Lactoselösung die Disaccharide die größte Fraktion dar (58,4 %). In Süßmolke werden hingegen deutlich mehr Tri- (65,5 %) als Disaccharide (34,5 %) gebildet. Das Verhältnis in Sauermolke ist nahezu ausgeglichen.

5.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass Molke ein vielversprechendes Substrat für die Synthese von

Galactooligosacchariden darstellt. Während Enzyme aus *Aspergillus oryzae* sowohl in Süß- als auch in Sauermolke einsetzbar wären, ist die GOS-Synthese mit Enzymen aus *Kluyveromyces lactis* lediglich in Sauermolke zufriedenstellend möglich.

Die konkrete Applikation wird darüber entscheiden, welches der Enzyme bevorzugt einzusetzen ist. Da Galactooligosaccharide je nach Zusammensetzung eine geringere Süßkraft als Lactose besitzen können, ist unter Umständen die hohe Spaltungsaktivität der *K. lactis*-Lactase erwünscht, um mit der stärkeren Süßkraft von Glucose und Galactose, den Geschmack an Verbrauchervünsche anzupassen.

Nichtsdestotrotz besteht weiterer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet. Es ist zum einen wünschenswert, die bishe-

Abbildung 5: GOS-Ausbeute in Abhängigkeit vom Lactosehydrolysegrad der Enzyme optilactase A aus *A. oryzae* (geschlossene Symbole) und optilactase LX2 aus *K. lactis* (offene Symbole) in Lactoselösung (rot), Süßmolke (gelb) und Sauermolke (blau)

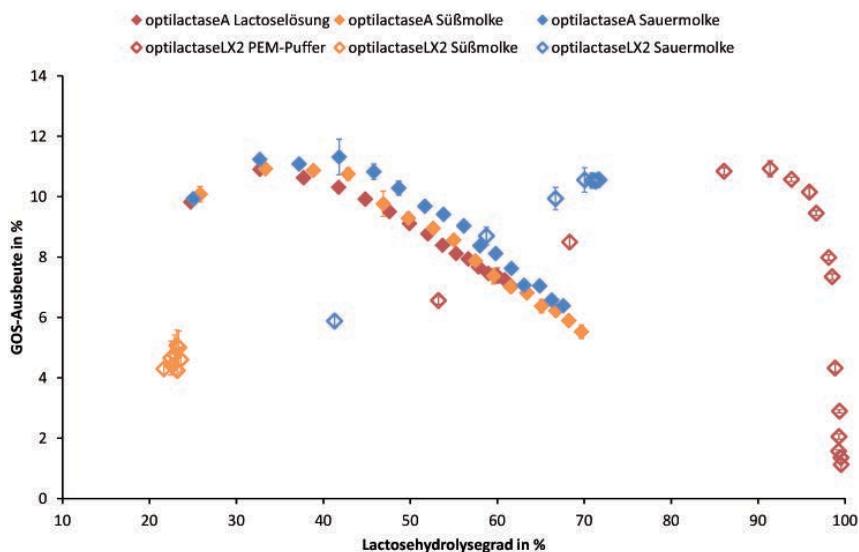


Tabelle 2: Zusammensetzung der gebildeten GOS zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute

Enzym	Substrat	GOS-Ausbeute in %	GOS-Zusammensetzung in %			Hydrolysegrad in %*
			Disaccharide	Trisaccharide	Tetrasaccharide	
optilactase A (<i>A. oryzae</i>)	Lactose	10,91 +/- 0,01	6,27 +/- 0,15	87,25 +/- 0,16	6,48 +/- 0,37	32,69 +/- 0,14
	Süßmolke	10,93 +/- 0,18	4,71 +/- 1,31	88,97 +/- 0,07	6,32 +/- 0,27	33,31 +/- 0,02
	Sauermolke	11,32 +/- 0,59	8,10 +/- 2,34	82,19 +/- 1,88	9,71 +/- 1,01	41,79 +/- 0,30
optilactase LX2 (<i>K. lactis</i>)	Lactose	10,93 +/- 0,26	58,42 +/- 2,69	41,58 +/- 0,45	0,00 +/- 0,00	91,37 +/- 0,76
	Süßmolke	4,30 +/- 0,17	34,45 +/- 4,05	65,55 +/- 0,01	0,00 +/- 0,00	21,64 +/- 0,03
	Sauermolke	10,56 +/- 0,41	48,09 +/- 3,95	51,91 +/- 0,10	0,00 +/- 0,00	70,04 +/- 0,53

* bei maximaler GOS-Ausbeute

rige Ausbeute zu steigern, was durch eine Konzentrierung der Molken gelingen könnte. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob die damit gleichzeitig stattfindende Konzentrierung eventueller Hemmstoffe sich nachteilig auf den Prozess auswirkt. An der Hochschule Anhalt wird zudem nach anderen Enzymquellen gesucht, welche eine hohe Toleranz gegenüber Milchsäuren aufweisen, um so die GOS-Ausbeute weiter zu verbessern.

Autoren: M.Sc. Christin Fischer (c.fischer@bwp.hs-anhalt.de) und Prof. Dr. Thomas Kleinschmidt (t.kleinschmidt@bwp.hs-anhalt.de), Hochschule Anhalt, Bernburger Str. 55, 06366 Köthen

Weiterführende Literatur:

ADAMCZAK, M., CHARUBIN, D. & BEDNARSKI, W. (2009) Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate, *Chemical Papers*, Vol. 63, No. 2, 111-116.

ALBAYRAK, N. & YANG, S. T. (2002) Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 77, No. 1, 8-19.

BAKKER-ZIERIKZEE, A. M. et al. (2005) Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life, *British Journal of Nutrition*, Vol. 94, No. 5, 783-790.

BEN, X. M. et al. (2004) Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants, *Chinese Medical Journal*, Vol. 117, No. 6, 927-931.

BEN, X. M. et al. (2008) Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*, *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 14, No. 42, 6564-6568.

BOEHM, G. et al. (2002) Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal *Bifidobacteria* in preterm infants, *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, Vol. 86, No. 3, F178-F181.

BOON, M. A. et al. (1998) Synthesis of oligosaccharides catalyzed by thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, Vol. 75, No. 2-3, 269-278.

BRUZZESE, E. et al. (2006) Impact of prebiotics on human health, *Digestive and Liver Disease*, Vol. 38, No. Suppl. 2, S283-S287.

BRUZZESE, E. et al. (2009) A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study, *Clinical Nutrition*, Vol. 28, No. 2, 156-161.

DAVIS, L. M. G. et al. (2010) A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 144, No. 2, 285-292.

GIBSON, G. R. & ROBERFROID, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition*, Vol. 125, No. 6, 1401-1412.

GREENBERG, N. A. & MAHONEY, R. R. (1984) The activity of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey, *Food Chemistry*, Vol. 15, No. 4, 307-313.

GONZALEZ, R. et al. (2008) Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 15, 4686-4694.

GOODMAN, R. E.; PEDERSON, D. M. (1976) β -Galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 22, 817-825.

GOULAS, A., TZORTZIS, G. & GIBSON, G. R. (2007) Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *International Dairy Journal*, Vol. 17, No. 6, 648-656.

IQBAL, S. et al. (2010) β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides, *Carbohydrate Research*, Vol. 345, No. 10, 1408-1416.

ITO, M., DEGUCHI, Y., MIYAMORI, A., MATSUMOTO, K., KIKUCHI, H., MATSUMOTO, K., KOBAYASHI, Y., YAJIMA, T., KAN, T. (1990) Effects of Administration of Galactooligosaccharides on the Human Faecal Microflora, Stool Weight and -Abdominal Sensation, *Microbial ecology in heal and dis-ease*, Vol. 3, No. -, 285-292.

KNOL, J. et al. (2005) Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: More like breast-fed infants, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 40, No. 1, 36-42.

LOPEZ LEIVA, M. H. & GÜZMAN, M. (1995) Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates, *Process Biochemistry*, Vol. 30, No. 8, 757-762.

MAISCHBERGER, T. et al. (2010) β -galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides, *Biotechnology Journal*, Vol. 5, No. 8, 838-847.

MARTINEZ-FEREZ, A., GUADIX, A. & GUADIX, E. M. (2006) Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes, *Journal of Membrane Science*, Vol. 276, No. 1-2, 23-30.

NAKAMURA, N. et al. (2009) Molecular ecological analysis of fecal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 4, 1121-1128.

NAKKHARAT, P. et al. (2006) Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel beta-galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*, *Biotechnology Journal*, Vol. 1, No. 6, 633-638.

NGUYEN, T. H. et al. (2007) Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 269, No. 1, 136-144.

PARK, H. Y. et al. (2008) Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 24, No. 8, 1553-1558.

PUCCIO, G. et al. (2007) Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics, *Nutrition*, Vol. 23, No. 1, 1-8.

RABIU, B. A. et al. (2001) Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from *Bifidobacterium Species*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 6, 2526-2530.

RIVERO, M. et al. (2005) Effect of a new infant formula enriched with prebiotics, probiotics, nucleotides and LC-PUFA on recovery after infection, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 569, No. -, 186-187.

ROBERTS, H. R. & PETTINATI, J. D. (1957) Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 5, No. 2, 130-134.

SAKO, T., MATSUMOTO, K. & TANAKA, R. (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides, *International Dairy Journal*, Vol. 9, No. 1, 69-80.

SCHWAB, C. & GÄNZLE, M. (2011) Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 315, No. 2, 141-148.

SHADID, R. et al. (2007) Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity - A randomized, double-blind, placebo-controlled study, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 86, No. 5, 1426-1437.

SPLICHTNA, B. et al. (2006) Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, No. 14, 4999-5006.

STALEY, S. & MALLEE, L. (2012) Market trends and developments in prebiotics: focusing on galacto-oligosaccharides Pre- & Probiotics 2012.

TOBA, T. & ADACHI, S. (1978) Hydrolysis of Lactose by Microbial β -Galactosidases. Formation of Oligosaccharides with Special Reference to 2-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucose, *Journal of Dairy Science*, Vol. 61, No. 1, 33-38.

TORRES, D. P., GONZALVES, M., TEIXEIRA, J. A. & RODRIGUES, L. R. (2010) Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 9, No. 5, 438-454.

TZORTZIS, G., GOULAS, A. K. & GIBSON, G. R. (2005) Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 68, No. 3, 412-416.

TZORTZIS, G. & VULEVIC, J. (2009) Kapitel 7, *Galacto- Oligosaccharide Prebiotics in: Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, pp. 207-244 (Springer-Verlag, Heidelberg).

VALERO, J. I. S. & YANG, S. T. (2005) Production of galacto-oligosaccharides from whey lactose by using two-step immobilized enzyme reactor, *AICHE Annual Meeting, Conference Proceedings*.

VAN DEN HEUVEL, E. G. H. M., SCHOTERMAN, M. H. C. & MUIJS, T. (2000) Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women, *Journal of Nutrition*, Vol. 130, No. 12, 2938-2942.

VIVATVAKIN, B. et al. (2010) Effect of a whey-predominant starter formula containing LCPUFAs and oligosaccharides (FOS/GOS) on gastrointestinal comfort in infants, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 19, No. 4, 473-480.



DLG e.V., Ausschuss Sensorik

Eschborner Landstraße 122, 60489 Frankfurt am Main

Telefon: 069/24788-360, Fax: 069/24788-8360

E-Mail: B.Schneider@DLG.org; Internet: www.DLG.org/sensorikausschuss.html