

Screening und Bereitstellung neuer, industrietauglicher Beta-Galactosidasen für die Milchindustrie

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie Prof. Dr. L. Fischer/Dr. S. Lutz-Wahl
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Dipl.-Ing. H.-J. Denzler, BIOLAC GmbH & Co. KG, Harbarnsen
Laufzeit:	2008 – 2011
Zuwendungssumme:	€ 236.400,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die enzymatische Hydrolyse von Lactose, dem Hauptkohlenhydrat von Milch und Molke, ist bereits seit einigen Jahrzehnten Gegenstand der angewandten Forschung. Die bei der enzymatischen Lactosehydrolyse durch mikrobielle β -Galactosidasen (Name des humanen Enzyms: Lactase) entstehenden Zucker Galactose und Glucose besitzen eine höhere Süßkraft, eine bessere Löslichkeit und sind leichter zu fermentieren als Lactose. Des Weiteren ist ein Teil der Weltbevölkerung lactoseintolerant, weshalb Lactose seit kurzem in Europa der Kennzeichnungspflicht unterliegt, wenn sie Lebensmitteln zugesetzt wird (Deklarationsgrenze 1 g/kg). Man kann davon ausgehen, dass milchhaltige Lebensmittel mit einer Auslobung „lactosearm“ bzw. „lactosefrei“ zukünftig eine noch stärkere Aufmerksamkeit beim Verbraucher erzielen werden. Zurzeit liegen die Grenzwerte in Deutschland für „lactosearm“ bei 1 g·100 g⁻¹ bzw. für „lactosefrei“ bei 0,1 g·100 g⁻¹.

Obwohl in der Literatur eine Vielzahl an mikrobiellen β -Galactosidasen beschrieben ist, stehen der Industrie aktuell nur wenige Enzympräparate, vor allem aus den Hefen *Kluyveromyces lactis* und *K. fragilis*, zur Verfügung. Die kommerziell erhältlichen Enzympräparate besitzen jedoch einige gravierende Nachteile, unter anderem hohe K_M -Werte für Lactose, Inhibierung durch Galac-

tose oder Calciumionen und Peptidasenebenaktivitäten.

Damit es zukünftig zur Entwicklung und Vermarktung neuer und höherwertiger Milch- und Molkeprodukte durch den Einsatz von β -Galactosidasen kommen kann, ist es erforderlich, nach neuen, besser an die Aufgabenstellung der Lactosehydrolyse angepassten Enzymen zu screenen. Die neuen Enzyme müssen dabei von einem Mikroorganismus mit *food-grade*-Status kostengünstig produziert werden können und am Ende des Hydrolyseprozesses leicht inaktivierbar sein.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, neue mikrobielle β -Galactosidasen, die für den Einsatz zur enzymatischen Hydrolyse von Lactose in Milch- und Molkeprodukten in der Lebensmittelindustrie optimal geeignet sind, sowohl in Metagenombibliotheken (als Quelle neuer Enzyme von nicht-kultivierbaren Mikroorganismen) als auch in einer Stammsammlung mit kultivierbaren Lebensmittelmikroorganismen zu finden und herzustellen. Es sollte ein β -Galactosidase-Präparat für die Lebensmittelindustrie hergestellt werden, das mit hoher Aktivität (Umsatz pro Zeit) und Affinität (niedriger K_M -Wert) ohne Produktinhibierung und Peptidasenebenaktivität bei niedrigen Temperaturen (4 – 8°C) Lactose hydrolysiert und sich leicht inaktivieren lässt (65°C). Das neue Enzym, die Ziel β -Galactosidase, sollte die Anforderungen zur Verwen-

derung als technischer Hilfsstoff erfüllen und daher keiner Deklarationspflicht für das Lebensmittel unterliegen.

Die Herstellung mindestens einer industrietauglichen β -Galactosidase sollte durch mehrere aufeinander abgestimmte Teilschritte erreicht werden. Parallel dazu standen das Auffinden des geeigneten Enzyms und die Up-scale-fähige Herstellung des Enzyms im Bioreaktor im Blickpunkt des Projekts.

Forschungsergebnis:

Nach der Entwicklung eines selektiven X-Gal-Plattenassays konnten zunächst 140 *Escherichia coli*-Metagenom-Klone gefunden werden, die bei 10° C β -Galactosidase-Aktivität aufwiesen. Diese wurden mit Lactose als Substrat untersucht und die Hydrolyseleistung mit dem Enzympräparat Maxilact® verglichen. Da kein Kandidat bessere Eignung zur Lactosehydrolyse in Milch zeigte, wurden neue Zielparameter für das Screening definiert. Hierbei wurde die Kinetik (K_M -Wert, Inhibierung durch Galactose) der Kandidaten berücksichtigt. Zudem wurden die Kultivierung und der Zellaufschluss in Mikrotiterplatten verbessert. Mit dieser Screeningstrategie wurden 245 Metagenom- β -Galactosidasen untersucht. Die vielversprechendsten Kandidaten wurden im Schüttelkolben rekombinant in *E. coli* exprimiert und nach Herstellung des zellfreien Rohextraktes zur Lactosehydrolyse in Milch bei 8° C eingesetzt. Nach biochemischer Charakterisierung (K_M , K_i , T- und pH-Optimum) wurden die Kandidaten zur Steigerung der Enzymausbeuten in *E. coli* BL21 im pET20b-System exprimiert. Eine β -Galactosidase (3J_33) erwies sich bezüglich der Hydrolyse-Eigenschaften deutlich besser als das Referenzpräparat Godo 2YNL. Diese wurde im 35-L-Arbeitsvolumen rekombinant exprimiert, mittels Ammoniumsulfat-Fällung gereinigt und für weitere Hydrolysen im 500-mL-Arbeitsvolumen mit höherer Aktivität in Milch und Molkefraktionen eingesetzt. Bei Einsatz von 40 nkat_{Lactose} /mL Milch bei 8° C waren nach 24 Stunden 0,11 g/L Lactose vorhanden. Durch Erhöhung der Temperatur, wie sie auch im Rahmen der Pasteurisation stattfindet, konnte der Lactosegehalt auf unter 0,1 g/L gesenkt werden. Für die Herstellung von Modell- β -Galactosidasen erfolgte die rekombinante Produktion der β -Galactosidasen Lac4 aus *Kluyveromyces lactis* wie auch CelB aus *Pyrococcus furiosus* in *Lactobacillus* ssp. Als Expressionsvektoren kamen die Vektoren pSIP403 und pSIP409 zum Ein-

satz. Mit beiden gelang die Expression der Modell- β -Galactosidasen unter anderem in *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* und *Lb. casei*. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden in *Lb. plantarum* bei CelB-Produktion mit 2.500 nkat_{pNPGal}/mg_{Protein} nach Kultivierung im Bioreaktor in MRS-Medium mit mehrfacher Glucosezugabe erreicht. Die Kultivierung und rekombinante Produktion erfolgte ebenfalls in einem neu entwickelten und kostengünstigen Molkepermeat basierendem Medium.

Da die erreichten Enzymaktivitäten in *Lactobacillus* ssp. deutlich unter den im *E. coli*-System erreichten Aktivitäten lagen, erfolgte die Produktion der aufgefundenen Ziel- β -Galactosidase 3J_33 im *E. coli*-BL21-Stamm mit pET20b als Expressionsvektor. Nach Verbesserung der Kultivierungsstrategie, erfolgte die Produktion im Batch-Verfahren im 35-L-Volumen. Die erhaltenen Enzymaktivitäten bei 8° C lagen mit 50.000 nkat_{Lactose}/mL_{Rohextrakt} deutlich höher als die im Schüttelkolben erreichten Werte von 1.200 nkat_{Lactose}/mL_{Rohextrakt}. Nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung stand ein Enzympräparat zur Verfügung, welches frei von Peptidaseaktivitäten ist. Eine in einem *K. lactis*-food-grade-Expressionssystem durchgeführte Produktion der Ziel- β -Galactosidase 3J_33 hatte nach Deletion der nativen β -Galactosidase eine um Faktor 75 geringere Enzymaktivität als Ergebnis. Somit ist *E. coli* BL21 als bevorzugter Expressionswirt anzusehen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Bisher stehen der Industrie nur β -Galactosidasen mit unzureichenden Prozesseigenschaften zur Verfügung. Damit können die Produktionsprozesse zum Erreichen der Grenzwerte für die Auslobung „lactosearm“ bzw. „lactosefrei“ unter den gegebenen ökonomischen und sensorischen Rahmenbedingungen des Lebensmittelmarktes nur schwierig bzw. in diversen Lebensmittelmatrizes gar nicht erreicht werden. Durch die neue, industrietaugliche β -Galactosidase können unter lebensmittelgerechten Prozessbedingungen (niedrige Temperatur, kurze Verweilzeit, keine unerwünschten Nebenprodukte) neue Produktlinien mit technisch, physiologisch und/oder sensorisch verbesserten Eigenschaften entwickelt und erfolgreich vermarktet werden. Je nach Expertise und Portfolio der Unternehmen sind dann neue individuelle, lactosearme bzw. -freie Zwischen- oder Endprodukte für den Lebensmittelmarkt realisierbar. Außerdem können durch die neue, effektivere β -Galactosidase die Prozess-

kosten zur Herstellung lactosefreier Produkte gesenkt werden.

Auch könnte die Steigerung der Süßkraft bei konstantem Kohlenhydratanteil durch die enzymatische Lactosehydrolyse bestimmter Milchprodukte ausgelobt und speziell beworben werden. Und zwar in dem Sinne, dass in lactosehydrolysierten Milchprodukten bei *unveränderter Menge* an Kohlenhydraten eine vergleichsweise höhere Süße erzeugt wird. Dadurch könnte beispielsweise die Zugabemenge an Kristallzucker oder Glucosesirup bei ohnehin gesüßten Milchprodukten reduziert und neu eingestellt werden, was insgesamt zu einem niedrigerem Kaloriengehalt des Endprodukts führen würde.

Die neue β -Galactosidase aus dem Metagenom, die durch dieses Projekt erstmalig zur Verfügung steht, besitzt neue biochemische Eigenschaften und eignet sich daher bedeutend besser für eine vollständige Lactosehydrolyse in Milchprodukten als bisher bekannte Enzympräparate. Zielgruppe für die neuen, optimierten β -Galactosidase-Präparate sind hauptsächlich kleine und mittelständische Unternehmen der Milchverarbeitenden Industrie, die damit *neue* lactosefreie Milch- und Molkeprodukte sowohl für den Verbraucher als auch die weiterverarbeitende Lebensmittelindustrie bereitstellen können.

Der Jahresumsatz der deutschen Milchindustrie beträgt ca. 21 Mrd. €; ca. 5 % dieses Umsatzes wird durch den Absatz von lactosefreier Milch bzw. lactosefreien Milchprodukten erwirtschaftet. Die deutsche Molkereiwirtschaft ist mittelständisch organisiert und beschäftigt ca. 37.000 Mitarbeiter.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2011.
2. Böhmer, N., König, S. und Fischer, L.: A novel manganese starvation-inducible expression system for *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol. Lett. 324 (1), 37-44 (2013).

3. Böhmer, N., Dautel, A., Eisele, T. und Fischer, L.: Recombinant expression, purification and characterisation of native glutamate racemase from *Lactobacillus plantarum* NC8. Prot. Expr. Purif. 88 (1), 54-60 (2013).
4. Erich, S., Böhmer, N., Meyer, S. und Fischer, L.: Laktosefreie Milchprodukte durch β -Galaktosidasen der nächsten Generation. Biospektr. 18 (6), 668-669 (2012).
5. Erich, S., Anzmann, T. und Fischer, L.: Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. Food Chem. 136 (4), 2393-2396 (2012).
6. Böhmer, N., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L.: Recombinant production of hyperthermostable CelB from *Pyrococcus furiosus* in *Lactobacillus sp.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 96 (4), 903-912 (2012).
7. Böhmer, N., Liu, L., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L.: Recombinant production of a thermophilic β -glycosidase in *Lactobacillus plantarum*. 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, 21.-23.9.2010, Posterabstract (2010).
8. Böhmer, N., Liu, L., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L.: Production of β -Galactosidasen in food grade *Lactobacillus plantarum*. 4. Lebensmittelwissenschaftliches und Biotechnologisches Kolloquium, Universität Hohenheim, 7.-9.7.2009, Posterabstract (2009).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Biotechnologie
Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-22311
Fax: +49 711 459-24267
E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 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:

