



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Die Optimierung der Erythritolproduktion mit einer
Mutante der Hefe *Moniliella pollinis* im
Ganzkornmais-Hydrolysat“

Verfasser

Christian Reiter

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Auf dem Weg zum Abschluss meines Studiums und zur Vollendung dieser Diplomarbeit haben viele Menschen beigetragen.

Danken möchte ich Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner, welcher sich bereit erklärte, mich als Betreuer für diese Diplomarbeit zu unterstützen. Stets bewies er Nachsicht, Geduld und Kompetenz für meine Anliegen.

Weiterer Dank gilt der Firma Jungbunzlauer Austria AG in Pernhofen, die mir ermöglichten, die praktische Forschung dieser Arbeit zu erfüllen. Besonderer Dank gilt hierbei dem Leiter der Abteilung Produktentwicklung Ing. Robert Edlauer für die Erlaubnis diese Arbeit durchzuführen und meinem externen Betreuer der Firma Jungbunzlauer DI Stefan Trimmel, der mir während der Forschungszeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich an den praktischen Laboralltag heranführte.

Von ganzem Herzen danken möchte ich Cornelia, die ich während des Schreibens dieser Arbeit heiraten durfte. Ohne die allumfassende Unterstützung und Geduld meiner wunderbaren Frau hätte ich womöglich nicht die Kraft für das Vollenden dieser Arbeit aufgebracht.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, Johanna und Christian, die mich während der ganzen Jahre des Studiums unterstützt haben. Ohne sie wären weder Studium noch Studienabschluss zustande gekommen.

Des Weiteren möchte ich meinen Freunden, allen voran DI Clemens Gugimaier und MMag. Andreas Weiß, für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Zu guter Letzt möchte ich der Familie Ernst aus Untermarkersdorf danken, die mich während meiner Praktika bei der Firma Jungbunzlauer, so die Fahrt nach Wien nicht möglich war, bei sich in familiärer Weise aufgenommen hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Abbildungsverzeichnis..... IIIII

1	Einleitung	1
2	Erythritol und seine Bedeutung für den Menschen	2
2.1	Chemische und physikalische Eigenschaften sowie Struktur von Erythritol	2
2.2	Geschmack und Süße	4
2.3	Die Bildung von Erythritol	6
2.4	Natürliches Vorkommen	7
2.4.1	Erythritol als natürlicher Bestandteil in Nahrungsmitteln	7
2.4.2	Natürliches Vorkommen von Erythritol im menschlichen Organismus	8
2.5	Physiologie, Verstoffwechselung im Menschen	8
2.5.1	Studien zur Abklärung der Verträglichkeit von Erythritol für den Menschen	8
2.5.2	Erythritol im Tierversuch	9
2.5.3	Klinische Studien zu Erythritol	10
2.6	Verwendung als Lebensmittelzusatz	15
2.6.1	Verwendung in der Nahrung	16
2.6.2	Erythritol als Bestandteil von Dingen des täglichen Lebens	18
2.6.3	Die Verwendung von Erythritol in Kombination mit anderen Süßungsmitteln.....	18
2.6.4	Weltweite Erythritolproduktion und Erythritolpreis.....	19
3	Erythritolproduktion: Stand der Forschung	21
3.1	Optimierung des Fermentationsmediums.....	21
3.1.1	Kohlenstoffquellen	22
3.1.2	Stickstoffquellen.....	28
3.1.3	Spurenelemente	31
3.1.4	Vitamine.....	34
3.2	Optimierung der Fermentationsbedingungen	36
3.2.1	Volumen, Umwälzung und O ₂	36
3.2.2	Batch, Fed-Batch und Repeated-Fed-Batch.....	38
3.2.3	Temperatur	40
3.2.4	pH-Wert	41

3.3	Untersuchungen zu Enzymen der verwendeten Organismen	42
3.3.1	Erythrosereduktase	43
3.3.2	Transketolase	47
3.4	Suche nach neuen Mikroorganismen, Isolierung aus der Umgebung .	48
3.5	Mutation und Selektion	51
4	Fragestellung	55
5	Material und Methoden	57
5.1	Rahmenbedingungen der Forschung	57
5.1.1	Forschungskontext	57
5.1.2	Aussagenreichweite	57
5.1.3	Forschungsbedingungen	57
5.2	Forschungsablauf	59
5.3	Bestimmung der Generationszeit von <i>Moniliella pollinis</i>	60
5.4	Mutieren mittels NTG (MNNG)	62
5.4.1	Vorbereitungen zum Mutieren	62
5.4.2	Mutieren inkl. Absterbekinetik	65
5.4.3	Screenen und Selektieren der Mutanten	71
5.5	Vergleich von Mutanten mit bewährten Stämmen	73
5.6	Versuchsreihen zur Optimierung des Mediums mit gewählter Mutante	74
5.6.1	Schüttelkolbenversuche	74
6	Ergebnisse	77
6.1	Vergleich von Hefestämmen	78
6.2	Thiaminreihe	79
6.3	KNO ₃ Reihe	80
6.4	NaNO ₃ Reihe	81
6.5	NH ₄ NO ₃ Reihe	83
6.6	Manganreihe	84
7	Diskussion	86
	Zusammenfassung	90
	Abstract	91
	Lebenslauf	92
	Geräte und Material	93
	Literatur	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Erythritol in der Keilstrichdarstellung	2
Abb. 2 Erythritol in der Fischer-Projektion	2
Abb. 3 Erythritolkristalle in einer Schale	3
Abb. 4 „Stoffdaten von Erythrit und anderen Zuckeraustauschstoffen im Vergleich“, [BIPPES, 2007, Seite 4]	5
Abb. 5 Wachstumskinetik der Hefe <i>Moniliella pollinis</i>	61
Abb. 6 Füllplan für das Mutieren mittels NTG	67
Abb. 7 Verdünnungsreihe nach dem Waschen der Hefezellen nach der Mutation	68
Abb. 8 Absterberate bei 40µg/ml Hefelösung	70
Abb. 9 Absterberate bei 50µg/ml Hefelösung	70
Abb. 10 Absterberate bei 60µg/ml Hefelösung	71
Abb. 11 Ansatz, in dem <i>DCR417</i> entdeckt wurde	73
Abb. 12 Stammvergleich ohne und mit Thiamin	79
Abb. 13 Thiaminreihe mit Reihe mit der Mutante <i>DCR417</i>	80
Abb. 14 KNO ₃ Reihe mit der Mutante <i>DCR417</i>	81
Abb. 15 NaNO ₃ Reihe mit der Mutante <i>DCR417</i>	82
Abb. 16 NH ₄ NO ₃ Reihe mit der Mutante <i>DCR417</i>	84
Abb. 17 Manganreihe mit der Mutante <i>DCR417</i>	85

1 Einleitung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um den Versuch die Bedingungen der Erythritolproduktion so weit zu erhellen, dass Aussagen zur Optimierung des Produktionsvorganges möglich werden. Neben einer intensiven Literaturrecherche baut die vorliegende Diplomarbeit auf einer empirischen Forschung auf. Diese konnte durch Zusammenarbeit mit einem führenden Unternehmen auf dem Gebiet der Erythritolproduktion, Firma Jungbunzlauer Austria AG, Pernhofen, erzielt werden.

Die vorliegende Arbeit dokumentiert die Tätigkeit im zur Verfügung gestellten Forschungslabor. Der aufgearbeitete Stand der Forschung liefert den theoretischen Rahmen zur praktischen Forschungsarbeit.

Aufbau der Arbeit

In Kapitel 2 wird der Stoff um den es in dieser Diplomarbeit geht, Erythritol, physikalisch und chemisch beschrieben. Weiters wird gezeigt welche Bedeutung Erythritol in der menschlichen Ernährung hat. Ein Schwerpunkt liegt auf dem Einfluss, den Erythritol auf den Körper, speziell die Verdauung, das Menschen hat. Kapitel 3 ist der ausführlichen Aufarbeitung des aktuellen Standes der Forschung unter Einbeziehung einer historischen Perspektive gewidmet. Die wissenschaftliche Literatur wird nach drei unterschiedlichen Gesichtspunkten aufbereitet. Bei den Bereichen handelt es sich um die erythritolproduzierenden Mikroorganismen, um das verwendete Fermentationsmedium und um die Fermentationsbedingungen. In Kapitel 4 werden der Forschungskontext sowie die Fragestellung der vorliegenden Diplomarbeit beschrieben. Das darauffolgende Kapitel 5 geht auf die praktische Forschungstätigkeit ein. Das verwendete Material, sowie die angewandten Methoden werden detailliert und nachvollziehbar beschrieben. Kapitel 6 dient der schriftlichen und graphischen Darstellung der Ergebnisse, die in den unternommenen Versuchen erzielt werden konnten. Die Ergebnisse werden in Kapitel 7 diskutiert.

Auf Basis der Erörterungen lassen sich abschließend einige Schlüsse für eine Optimierung der Erythritolproduktion ziehen.

2 Erythritol und seine Bedeutung für den Menschen

Der Ausdruck Erythritol ist im alltäglichen Sprachgebrauch noch wenig verbreitet. Tatsächlich kommt es im Leben der Menschen an vielfältiger Stelle vor und erlangt in unserer Gesellschaft immer größere Bedeutung.

2.1 Chemische und physikalische Eigenschaften sowie Struktur von Erythritol

Erythritol ist eine Kohlenstoffverbindung mit dem UPAC Namen meso-1,2,3,4-Tetrahydroxybutan und einem Molekulargewicht von 122,12g [MOON et al., 2010]. Erythritol hat die gleiche Summenformel ($C_4H_{10}O_4$) wie Threitol, jedoch eine andere räumliche

Anordnung. Erythritol besitzt eine

Symmetrieachse zwischen dem 2. und 3. Kohlenstoffatom und ist daher trotz 2

Chiralitätszentren optisch inaktiv [BIPPES, 2007; MOON et al., 2010].

Die Kohlenstoffverbindung ist sowohl gegenüber Säuren und Basen, als auch Hitze stabil [MOON et al., 2010].

Es ist ein Molekül, dessen Gerüst aus 4 Kohlenstoffatomen besteht. Erythritol gehört zu den Zuckeralkoholen und damit zu den Polyolen

[RÖPER und GOOSSENS, 1993; BERNT et al., 1996; GONZE und DE SADELEER, 1996; OKU und OKAZAKI, 1996; TETZLOFF et al., 1996; KRISTOFIKOVA et al., 1997; ARRIGONI et al., 2005; KIM Y et al., 2011]. Es besitzt keine reduzierenden Endgruppen [MOON et al., 2010].

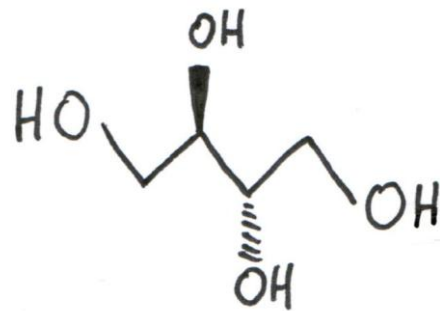


Abb. 1 Erythritol in der Keilstrichdarstellung

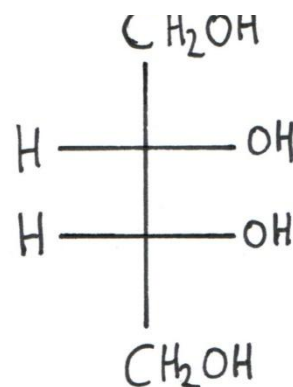


Abb. 2 Erythritol in der Fischer-Projektion

In wasserfreier Form bildet Erythritol Kristalle, welche bei 122°C zu schmelzen beginnen [MOON et al., 2010]. Erythritol ist aufgrund seiner physikalischen Stoffeigenschaften gut wasserlöslich und kristallisiert rasch aus [RÖPER und GOOSSENS, 1993; TALJA und ROOS, 2001; OHMORI et al., 2004]. Durch die



Abb. 3 Erythritolkristalle in einer Schale

Kristallisation des Erythritol kann in der Verarbeitung nach der Fermentation ein hoher Reinheitsgrad von mehr als 99% erreicht werden [RÖPER und GOOSSENS, 1993].

Lösungen mit Erythritol sind auch in höherer Konzentration nur wenig klebrig [OHMORI et al., 2004] und wenig viskos [SEO et al., 2001]. Erythritol hat starke kolligative Eigenschaften. So kann es in (verdünnter) Lösung den Gefrierpunkt herabsetzen, aber auch den Siedepunkt nach oben verschieben [SEO et al., 2001; MOON et al., 2010]. Wird Erythritol gelöst erhöht sich der osmotische Druck dieser Lösung [SEO et al., 2001].

Erythritol ist ein Zuckeralkohol, welcher keine oder nur wenige hygroskopischen Eigenschaften besitzt [KAWANABE J, 1990; SEO et al., 2001; OHMORI et al., 2004], jedoch hat es ein gewisses Maß an Quellvermögen [SEO et al., 2001].

Aufgrund der stark positiven Lösungsenthalpie entzieht Erythritol der Umgebung Wärme und es kommt zu einem stark kühlenden Effekt [RÖPER und GOOSSENS, 1993; GONZE und DE SADELEER, 1996; SEO et al., 2001; DE TROOSTEMBERGH, 2004].

Erythritol ist kalorienarm und hat weniger Energie als üblicher Zucker (4 kcal/g) [RÖPER und GOOSSENS, 1993; BERNT et al., 1996; GONZE und DE SADELEER, 1996; OKU und OKAZAKI, 1996; TETZLOFF et al., 1996; KRISTOFIKOVA et al., 1997; TALJA und ROOS, 2001; GONZE, 2002; DE TROOSTEMBERGH, 2004; KIM HJ et al., 2004].

Der Energiegehalt von einem Gramm Erythritol wird auf ca. 0,3-0,4kcal geschätzt [RÖPER und GOOSSENS, 1993; BORNET et al., 1996a].

2.2 Geschmack und Süße

Erythritol hat etwa 60-80% der Süßkraft von Saccharose [KAWANABE J, 1990; BERNT et al., 1996; GONZE und DE SADELEER, 1996; GONZE, 2002; LEE JK et al., 2003a; DE TROOSTEMBERGH, 2004]. In anderen Quellen wird Erythritol als ein mäßiges Süßungsmittel beschrieben [RÖPER und GOOSSENS, 1993; MOON et al., 2010], welches in einer 10%igen Lösung in etwa eine 60-70%ige Süßkraft von Saccharose hat [SEO et al., 2001].

Der Geschmack von Erythritol liegt bei gleicher Konzentration nahe bei dem von Saccharose. Es hat wie diese keinen bitteren Nachgeschmack [SEO et al., 2001; TALJA und ROOS, 2001; GONZE, 2002; WEHLAN et al., 2008].

In der folgenden Abbildung werden chemische, physikalische und physiologische Daten von Erythrit (Erythritol), Saccharose und gängigen Zuckeralkoholen, die in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden, aufgelistet und miteinander verglichen [BIPPES, 2007].

Stoffdaten von Erythrit und anderen Zuckeraustauschstoffen im Vergleich

		Erythrit	Threit	Xylit	Mannit	Sorbit	Maltit	Palatinit	Lactit	Saccharose
Kohlenstoff	[n°]	4	4	5	6	6	12	12	12	12
Molmasse	[g/mol]	122	122	152	182	182	344	344	344	342
Physiol. Brennwert	[kcal/g] ¹	0,2	k.A.	2,4	1,6	2,6	2,1	2,0	2,0	4,0
Süße [relativ zu Saccharose]		0,7	k.A.	1,0	0,4-0,5	0,4-0,5	0,9	0,45	0,3	1,0
Kühlungseffekt	[-]	kühl	k.A.	sehr kühl	kühl	kühl	nein	nein	wenig kühl	nein
Schmelzpunkt	[°C]	120	78 0. 90 2.	94	166-168	95	150	145-150	122	190
Glasübergangstemperatur	[°C]	53,3	k.A.	46,5	40,0	43,5	34,5	35,5	k.A.	32,0
Lösungsenthalpie	[J/g]	-180,2	k.A.	-152,9	-119,4	-108,9	-79,2	-39,4	-58,2	-18,0
Temperaturstabilität	[°C]	>160	k.A.	>160	>160	>160	>160	>160	>160	160
pH-Stabilität	[-]	2-10	k.A.	2-10	2-10	2-10	2-10	2-10	>3	hydrolysiert
Partielles molares Volumen in wässriger Lösung	[cm ³ /mol]	86,83	k.A.	102,12	119,22	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Axiale Länge	[Å]	8,0-9,3	k.A.	9,6-9,9	10,1-10,7	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Maximaler Durchmesser	[Å]	3,1-3,2	k.A.	3,2-3,3	3,4	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Viskosität		sehr niedrig	k.A.	sehr niedrig	niedrig	mittel	mittel	hoch	sehr niedrig	niedrig
Hygroskopizität		sehr niedrig	k.A.	hoch	niedrig	mittel	mittel	niedrig	mittel	mittel
Löslichkeit [% w/w bei 25 °C]		37	k.A.	64	20	70	60	25	57	67
Löslichkeit [% w/w bei 50 °C]		55	k.A.	80	31	83	70	45	74	72
	auf Blutzucker-/Insulinhaushalt	ohne	k.A.	klein	klein	klein	wahrs. gering	wahrs. gering	ohne	mäßig groß
Wirkung	Kariogenität	-	k.A.	-	+	+	-	k. A.	-	+
	Laxation	-	k.A.	+	+	+	+	++	++	-

Abb. 4 „Stoffdaten von Erythrit und anderen Zuckeraustauschstoffen im Vergleich“, Grafik entnommen aus: *Verfahrensentwicklung zur mikrobiellen Herstellung von Erythrit* [BIPPES, 2007, Seite 4]

2.3 Die Bildung von Erythritol

Erythritol kann mittels chemischem Verfahren aus Dialdehydstärke unter hoher Temperatur und in Anwesenheit eines Nickel Katalysators hergestellt werden [PFEIFER et al., 1960]. Das in der Natur vorkommende Erythritol wird jedoch hauptsächlich von Mikroorganismen, vor allem durch Hefen und Bakterien, produziert [BIPPES, 2007]. Die Biosynthese von Erythritol erfolgt in einem bestimmten Abschnitt des Stoffwechsels dieser Organismen, dem sogenannten Pentosephosphatweg [BIPPES, 2007; SAWADA et al., 2009]. Dieser Stoffwechselweg kann aufgrund der chemischen Reaktionen in einen oxidativen und in einen nicht-oxidativen Teil unterschieden werden [MÜLLER-ESTERL, 2009, 522ff]. In diesem „adaptiven Stoffwechselmodul“ wird Glucose in die Pentose Ribose umgewandelt. Im 2., nicht-oxidativen Teil des Stoffwechselweges werden C₃-, C₄-, C₅-, C₆- und C₇-Zucker in komplexer Weise ineinander überführt [MÜLLER-ESTERL, 2009, 522]. Als eines der Endprodukte kann Erythrose-4-phosphat entstehen; entweder wird Sedoheptulose-7-phosphat durch eine Transaldolase in Erythrose-4-phosphat umgewandelt oder es entsteht mittels Transketolase aus Fructose-6-phosphat [MÜLLER-ESTERL, 2009, 524]. Erythrose-4-phosphat kann in weiteren Schritten zu Erythritol umgewandelt werden. Dieser Umwandlung wird durch eine Phosphatase und eine Aldosereduktase, der Erythrosereduktase, ermöglicht. Im Grunde spielt es dabei keine Rolle, ob Erythrose-4-phosphat zuerst dephosphoriliert und dann hydriert wird, oder umgekehrt [BIPPES, 2007, 16f]. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass in osmophilen, erythritolproduzierenden Hefen vor allem Erythrosereduktase vorhanden ist [ISHIZUKA et al., 1992; TOKUOKA et al., 1992; LEE JK et al., 2002, 2003a, 2003b, 2003c; OOKURA et al., 2005]. Aufgrund dieser Tatsache muss Erythrose-4-phosphat vorher dephosphoriliert werden, um anschließend mittels Erythrosereduktase und unter Verbrauch von NADH + H⁺ in Erythritol umgewandelt zu werden [BIPPES, 2007]. Die Erythrosereduktase wird oftmals auch das Schlüsselenzym¹ in der Erythritolherstellung genannt [LEE JK et al., 2002, 2003a, 2003b, 2003c].

¹ Zur näheren Beschreibung der Erythrosereduktase siehe Kapitel: 3.3.1 Erythrosereduktase

2.4 Natürliches Vorkommen

Erythritol ist in der Natur weit verbreitet. Wie viele andere Kohlenstoffverbindungen (z.B. Zucker oder Zuckeralkohole) kann auch Erythritol als Speicherprodukt in Pflanzen und Mikroorganismen dienen. Organismen können Energie in Form des Stoffwechselproduktes Erythritol auf Vorrat anlegen. Eine solche Energierücklage wird etwa in Seegräsern oder Pilzen angehäuft [SEO et al., 2001]. Erythritol wurde unter anderem auch in den Konidien vom Schlauchpilz *Beauveria bassiana* und *Paecilomyces farinosus* mit einem Gehalt von bis zu 32 mg/g Konidien [HALLSWORTH und MAGAN, 1996; TAROCCO et al., 2005], aber auch in den Blastosporen von *Metarhizium anisopliae* gefunden [YPSILOS und MAGAN, 2004].

2.4.1 Erythritol als natürlicher Bestandteil in Nahrungsmitteln

Als natürlicher Inhaltsstoff kommt Erythritol in vielen Lebensmitteln vor. Einen Gehalt von bis zu 0,13% Erythritol haben etwa Wein, Sake, Bier, aber auch Pilze, Wassermelonen, Birnen und Weintrauben. Auch in Soja Sauce und Käse kann es nachgewiesen werden [BERNT et al., 1996]. So enthält weißer Bordeaux Wein in etwa 74mg Erythritol pro Liter, roter Bordeaux Wein lediglich 29 mg/l. Auch in Traubenmost können geringe Mengen von Erythritol enthalten sein, etwa 31 mg/l [DUBERNET et al., 1974].

Der Pro-Kopf-Konsum von Erythritol aus natürlichen Quellen liegt in den USA zwischen 24 und 80mg, in Japan bei etwa 105mg und im Dänemark bei etwa 47mg pro Person pro Tag. Das entspricht in etwa einer Aufnahme von 0,4-1,7mg Erythritol pro kg Körpergewicht pro Tag [BERNT et al., 1996; SCF², 2003].

² SCF: Scientific Committee on Food, European Commission

2.4.2 Natürliches Vorkommen von Erythritol im menschlichen Organismus

Erythritol kommt auch aufgrund endogener Produktion im menschlichen und tierischen Organismus vor. Es lässt sich in den Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisen. Im menschlichen Blutplasma konnte man einen Erythritolwert von ca. 1,2 mg/l messen. Eine ähnliche Konzentration konnte auch im fötalen Blut von Tieren nachgewiesen werden [BERNT et al., 1996].

Geringe Mengen von Erythritol konnten auch natürlicherweise im Urin gefunden werden. Die gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich von 10 bis 100 mg/l. Bezogen auf Kreatinin sind das ca. 42-65mg Erythritol pro g Kreatinin [BERNT et al., 1996].

2.5 Physiologie, Stoffwechselung im Menschen

Im Folgenden wird eine Übersicht darüber gegeben, wie Erythritol im menschlichen Organismus vorkommt und wie es dort verstoffwechselt wird.

2.5.1 Studien zur Abklärung der Verträglichkeit von Erythritol für den Menschen

Es wurden zahlreiche toxikologische und metabolische Studien zum Thema Erythritol unternommen. Im Tierversuch wurde dabei vor allem bei Ratten, Mäusen und Hunden der Einfluss von Erythritol untersucht. Die toxikologischen Studien beinhalteten einerseits Langzeit-Fütterungsversuche [OKU und NODA, 1990], wobei man das karzinogene Potential von Erythritol zu ergründen versuchte [MUNRO et al., 1998]. Andererseits versuchte man das teratogene Vermögen von Erythritol zu erkennen, indem man durch intravenöses und orales Verabreichen von Erythritol die Auswirkungen auf die Föten untersuchte [MUNRO et al., 1998]. Weiters wurden in Studien die Folgen einer oralen Gabe von Erythritol über 1 oder 2 Generationen beobachtet, um die Reproduzierbarkeit der ermittelten Ergebnisse gewährleisten zu können [MUNRO et al., 1998]. In anderen Studien versuchte man mittels

Bakterienkulturen und durch Säugetierbeobachtungen das mutagene Potential von Erythritol abzuschätzen [MUNRO et al., 1998].

Der Großteil der Studien versuchte anhand von Ess- bzw. Aufnahmeversuchen die Einflüsse von Erythritol auf den Organismus abzuschätzen [HIELE et al., 1993; MUNRO et al., 1998]. Dabei gab es Studien, die die einzunehmende Menge an Erythritol über die Versuchsdauer konstant hielten, aber auch ansteigen ließen [TETZLOFF et al., 1996]. Bei diesen Untersuchungen wurde Erythritol sowohl in flüssige als auch in feste Nahrung gemischt, wobei eine Erythritolkonzentration von 20% nicht überschritten wurde [MUNRO et al., 1998].

2.5.2 Erythritol im Tierversuch

Bei Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Erythritol fast gänzlich aus dem Magen-Darm-Trakt (GIT) absorbiert wird [OKU und NODA, 1990; BERNT et al., 1996; MUNRO et al., 1998]. Dabei wird es jedoch nicht verstoffwechselt. In der Folge zeigte sich, dass Erythritol unverändert im Urin ausgeschieden wird [OKU und NODA, 1990; MUNRO et al., 1998]. Bei hohen Dosen beträgt die im Urin ausgeschiedene Menge in etwa 83% des verabreichten Erythritols, wobei die übrige Menge über den Stuhl ausgeschieden wird [OKU und NODA, 1990]. In einem Versuch zeigte sich, dass Erythritol in geringen Mengen aber auch durch die Galle von Hunden ausgeschieden werden kann [BARNHART und COMBES, 1978]. Durch den Einsatz von Somatostation, einem anticholerischen Wirkstoff, kann die Erythritolausscheidung über die Galle um bis zu 25% reduziert sein [MAGNUSSON et al., 1989].

Im Tierversuch zeigte sich, dass es durch Erythritolaufnahme aus der Nahrung zu keinen signifikanten Änderungen im Stoffwechsel kommt. Bei der Beobachtung der physiologischen Vorgänge konnte lediglich ein leicht erniedrigter Serumspiegel von Triacylglycerin erkannt werden [OKU und NODA, 1990].

In „Sicherheitsstudien“ konnte gezeigt werden, dass Erythritol gut verträglich ist und dass eine Aufnahme keine toxikologischen Folgen hat. In den

unterschiedlichen Studien wurden sowohl Aufnahmedauer als auch Aufnahmefrequenz variiert, wie z.B. Untersuchungen zur einmaligen Aufnahme oder wiederholten Aufnahme in einem Zeitraum von 14 Tagen [TETZLOFF et al., 1996], aber auch zur Aufnahme von Erythritol über einen kurzen Zeitraum (8 Tage) [TETZLOFF et al., 1996; MUNRO et al., 1998].

Beim Vergleich der Ergebnisse der Studien lassen sich große Ähnlichkeiten zwischen dem tierischen und dem menschlichen Organismus bezüglich des Erythritolmetabolismus erkennen. Aufgrund dieser Tatsache liegt es nahe, dass man weitere Untersuchungen zur Sicherheit von Erythritol mittels Tierversuche unternimmt [MUNRO et al., 1998].

2.5.3 Klinische Studien zu Erythritol

Die klinischen Studien zeigten, dass Erythritol gut verträglich ist und keine toxikologischen Folgen zu erwarten sind. Auch bei der Aufnahme von hohen Dosen, das kann ein Anteil von bis zu 20% der Masse der Nahrung sein, ist eine gute Verträglichkeit gegeben [KRISTOFIKOVA et al., 1997; MUNRO et al., 1998; MOON et al., 2010].

Verstoffwechselung und Ausscheidung von Erythritol

Oral verabreichtes Erythritol wird rasch aus dem menschlichen Verdauungstrakt aufgenommen, wobei erhebliche Mengen davon aufgrund der geringen Größe des Moleküls bereits im Dünndarm resorbiert werden [RÖPER und GOOSSENS, 1993; HIELE et al., 1993; TETZLOFF et al., 1996; ARRIGONI et al., 2005], jedoch zumindest zu 60 bis 90% [BERNT et al., 1996]. Laut HIELE et al., 1993; BORNET et al., 1996a; TETZLOFF et al., 1996; MUNRO et al., 1998; GONZE, 2002; ARRIGONI et al., 2005 unterliegt Erythritol keiner Verstoffwechselung und wird infolge dessen unverändert in quantitativer Menge über den Urin ausgeschieden. In einer anderen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass bei der peroralen Aufnahme von Erythritol nur etwa 80% des verabreichten Erythritols über den Urin ausgeschieden werden [TETZLOFF et al., 1996].

In einer anderen Studie wurde nach 24-stündiger Beobachtung festgestellt, dass 78% des verabreichten Erythritols über den Urin ausgeschieden wurde [BORNET et al., 1996a]. Bei hohen Dosen beträgt dieser Wert in etwa 90% des verabreichten Erythritols, wobei aber auch im Fäzes geringe Mengen nachgewiesen werden konnten [HIELE et al., 1993; BORNET et al., 1996a; MUNRO et al., 1998; ARRIGONI et al., 2005; MOON et al., 2010].

Eine große Menge an renal ausgeschiedenem Erythritol führt zu einer höheren Osmolarität des Harns, beeinflusst aber weder die Ausscheidung von Kreatinin, Zitraten und Harnstoff, noch die von den Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- und Pi (Phosphat) [TETZLOFF et al., 1996]. Ca^{2+} ist im Urin jedoch leicht erhöht [TETZLOFF et al., 1996]. Ebenso leicht erhöht sind die Mengen von ausgeschiedenem Albumin (0,32 mg/h, +3%), Beta- 2-Mikroglobulin (5,4 $\mu\text{g/h}$, +26%) und N-Acetylglucosaminidase (0,25 IU/h, +25%) [TETZLOFF et al., 1996], jeweils im Vergleich mit Saccharose. Die Studienautoren weisen diese Werte aber als noch in den akzeptablen Bereich liegend aus [TETZLOFF et al., 1996, 290].

Der Einfluss von Erythritol auf die Darmflora

Durch in-vitro Studien konnte belegt werden, dass Erythritol von der Darmflora nicht metabolisiert wird [RÖPER und GOOSSENS, 1993; HIELE et al., 1993; ARRIGONI et al., 2005]. In einer in-vitro Studie konnte gezeigt werden, dass die Darmbakterien auch nach 24 Stunden ihren Stoffwechsel und ihre Enzymaktivität nicht auf die Fermentation von Erythritol umgestellt haben [ARRIGONI et al., 2005]. In der Studie konnten weder vermehrte Gasbildung, noch ein Abfall des pH-Wertes, noch eine Anhäufung von kurzkettigen Fettsäuren beobachtet werden [ARRIGONI et al., 2005]. Aufgrund der Tatsache, dass in-vivo viel mehr leichter fermentierbare Substanzen in den Dickdarm gelangen, ist eine bakterielle Verstoffwechselung des Erythritol nicht sehr wahrscheinlich [ARRIGONI et al., 2005]. In früherer wissenschaftlicher Literatur wird jedoch die mikrobielle Fermentation des Erythritols im Dickdarm beschrieben [OKU und NODA, 1990], was dem oben genannten widerspricht und von den neuen Erkenntnissen widerlegt scheint.

Einfluss von Erythritol auf den Blutzuckerspiegel

Studien legen nahe, dass Erythritol ein für Diabetiker geeignetes Süßungsmittel ist. Aufgrund der geringen Verstoffwechselung ist Erythritol in üblichem Maß für Diabetiker geeignet [RÖPER und GOOSSENS, 1993; KRISTOFIKOVA et al., 1997; GONZE, 2002; KIM HJ et al., 2004; LEE DH et al., 2010]. Aber auch für Menschen mit Adipositas gilt der Konsum von Erythritol als sicher [KIM HJ et al., 2004]. Im Gegensatz zu Glucose führt der Konsum von Erythritol nur zu einem geringen Anstieg des Blutzuckerspiegels und hat damit kaum Einfluss auf den Glykämischen Index [WHELAN et al., 2008; KIM Y et al., 2011]. An anderer Stelle der wissenschaftlichen Literatur wird beschrieben, dass nach Erythritolkonsum sowohl Plasmaglukose, als auch Insulinspiegel komplett unbeeinflusst waren [BORNET et al., 1996a; MOON et al., 2010].

Der Konsum von Erythritol verursacht im Vergleich zu Glucose und Lactitol keine erhöhte Menge an ausgeschiedenem CO₂ und H₂ in der Atemluft [HIELE et al., 1993].

Der geringe Energiegehalt von Erythritol spiegelt sich im Ergebnis einer Studie wieder, in welcher 1g Erythritol pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht wurde. Sowohl Körpergewicht als auch Blutdruck blieben über den gesamten Verlauf der Untersuchung von 7 Tagen konstant [TETZLOFF et al., 1996].

Erwartete Folgen eines erhöhten Erythritolkonsums

Die Menge Erythritol, ab der eine abführende Wirkung erwartet werden kann, wurde anhand anderer Polyole auf eine Menge von 0,8 g/kg Körpergewicht pro Tag für Männer und 0,66 g/kg Körpergewicht pro Tag für Frauen geschätzt [OKU und OKAZAKI, 1996]. In der Studie konnten jedoch bei keinem der Studienteilnehmer laxative Eigenschaften von Erythritol auch bei einer Menge von 1,2 g/kg Körpergewicht pro Tag festgestellt werden [OKU und OKAZAKI, 1996]. Auch an anderer Stelle der wissenschaftlichen Literatur wird bestätigt, dass die Aufnahme von Erythritol gut vertragen wird [DEN HARTOG et al., 2010] und es zu keinem gastrointestinalen Unbehagen führt [RÖPER und GOOSSENS, 1993; BERNT et al., 1996].

Es zeigte sich, dass auch durch die wiederholte orale Aufnahme von Erythritol keine physischen Beeinträchtigungen, wie Durchfall, entstehen. So schlossen Studienteilnehmer, nach ihren körperlichen Befinden und möglichen Nebeneffekten bezüglich Konsistenz und Frequenz von Stuhl und Urin befragt, jegliche Unannehmlichkeiten aus [TETZLOFF et al., 1996].

Toxizität von Erythritol

Aufgrund der vorliegenden Studien kann gesagt werden, dass Erythritol für den Menschen keine toxischen Eigenschaften hat [MUNRO et al., 1998] und auch bis zu einer täglichen Dosis von 1g Erythritol pro kg Körpergewicht gut vom Menschen vertragen wird [BERNT et al., 1996; OKU und OKAZAKI, 1996; TETZLOFF et al., 1996]. Aufgrund der geringen Toxizität wurde für Erythritol kein ADI- Wert festgelegt. Der NOAEL-Wert, ab dem eine abführende Wirkung erwartet werden kann, wird für Erythritol mit etwa 0,8g/kg Körpergewicht pro Tag angegeben [BORNET et al., 1996b; EFSA³, 2010].

Komplikationen infolge einer erhöhten Aufnahme von Erythritol

Nachteilig scheint sich Erythritol in Kombination mit Fructose auszuwirken. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verstärkung der fructosebedingten Intoleranz im menschlichen Körper kommt. Wird Glucose als Begleitstoff verabreicht, kommt es zu einer verbesserten Aufnahme von Fructose und folglich zu einer Reduzierung der Beschwerden. Ähnlich wie Fructose wird auch Erythritol über einen parazellulären Mechanismus aufgenommen [KIM Y et al., 2011]. Diese Tatsache ermöglicht die Hypothese, dass der parazelluläre Transport des einen Substrates den des anderen fördern könne. In Kombination mit Erythritol lässt sich jedoch eine Verstärkung der negativen Effekte, wie Blähungen, Durchfall, Bauchschmerzen und Übelkeit, erkennen [KIM Y et al., 2011], was den Schluss zulässt, dass die Einnahme von äquimolaren Mengen (0,278mol) Erythritols und Fructose zu einer gesteigerten Malabsorption von Kohlenhydraten führt [KIM Y et al., 2011]. Wiedergespiegelt wird diese Tatsache auch anhand der um das 8,75fache erhöhten AUC

³ EFSA: European Food Safety Authority

(area under the curve) von Wasserstoff in der Atemluft nach der Aufnahme von Fructose gemeinsam mit Erythritol im Vergleich zur Aufnahme von Fructose gemeinsam mit Glucose [KIM Y et al., 2011].

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Erythritol die Faltung von Proteinen verhindert, so zeigte sich, dass durch das Polyol die Faltung der Alkoholdehydrogenase (ADH) gestört sein kann [DWIVEDI et al., 2010].

Kariogenität von Erythritol

Erythritol verursacht im Gegensatz zu Saccharose trotz seiner Süße keine Zahnfäule (Karies) [KAWANABE J, 1990; RÖPER und GOOSSENS, 1993; GONZE und DE SADELEER, 1996; KRISTOFIKOVA et al., 1997; TALJA und ROOS, 2001; DE TROOSTEMBERGH, 2004; KIM HJ et al, 2004; ARRIGONI et al., 2005; MÄKINEN, 2011]. Es konnte bewiesen werden, dass Erythritol das Wachstum von kariesbildenden Bakterien, wie *Streptococcus mutans*, hemmt. Weiters verhindert Erythritol die Zellaggregation der Keime und dadurch die Plaques-Bildung am Zahn. Auch die Milchsäureproduktion aus Erythritol von den im Mund und Rachenraum lebenden Bakterien wird verhindert [KAWANABE J, 1990; DE TROOSTEMBERGH, 2004; YAO et al., 2009]. Indem Erythritol den kariesverursachenden Mikroorganismen nicht als Substrat dient, kann keine Milchsäure gebildet werden und in weiterer Folge kommt es zu keinem Abfall des pH-Wertes im Mundraum [RÖPER und GOOSSENS, 1993].

Erythritol als Antioxidans und Schutz für Endothelzellen

Erythritol zeigt exzellente Fähigkeiten als Radikalfänger [DEN HARTOG et al., 2010]. Es wurde nachgewiesen, dass durch die Reduktion von Hydroxyl-Radikalen unter Abspaltung eines kohlenstoffgebundenen Wasserstoffatoms die ungefährlichen Verbindungen Erythrose und Erythrulose gebildet werden [DEN HARTOG et al., 2010]. Weiters zeigte sich bei diabetischen Ratten, induziert durch Streptozochin, eine schützende Wirkung auf die Endothelzellen [DEN HARTOG et al., 2010]. Aufgrund dieser Beobachtungen kann Erythritol helfen durch Hyperglykämie verursachte Schäden zu reduzieren [DEN HARTOG et al., 2010].

2.6 Verwendung als Lebensmittelzusatz

Erythritol kann als Lebensmittelzusatz mit der Nummer E 968 als Zuckeraustauschstoff und Süßungsmittel dienen [GONZE und DE SADELEER, 1996; KIM HJ et al., 2004; KRISTOFIKOVA et al., 1997]. Es wird aufgrund der vielen positiven Eigenschaften als eine vielversprechende Alternative zu üblichem Zucker und Zuckeralkoholen gesehen [TETZLOFF et al., 1996]. Anwendung findet Erythritol vor allem in der Nahrungsindustrie, aber auch in der pharmazeutischen, kosmetischen und chemischen Industrie [RÖPER und GOOSSENS, 1993; GONZE und DE SADELEER, 1996; KRISTOFIKOVA et al., 1997; TALJA und ROOS, 2001; RYMOWICZ et al., 2009].

Erythritol wird wie übliche Polyole verwendet. Da Erythritol die anderen Zuckeralkohole im gleichen Verhältnis ersetzt, ist die Gesamtaufnahme von Polyolen pro Kopf konstant [BERNT et al., 1996].

Der Konsum von Zuckeralkoholen liegt bei Personengruppen, die einen erhöhten Bedarf an energiearmen Süßungsmitteln haben, wie z.B. Diabetikern, in Europa bei etwa 4-5g pro Tag und Person [BERNT et al., 1996]. In den USA beträgt die durchschnittliche Erythritolaufnahme, ohne Berücksichtigung des Konsums von Kaugummi, in etwa 7g pro Tag und Person, das entspricht ca. 115 mg/kg Körpergewicht pro Tag [BERNT et al., 1996]. Alleine durch das Kauen von Kaugummi beträgt die Aufnahme von Erythritol in den Vereinigten Staaten etwa 4g pro Tag und Person, das entspricht ca. 67 mg/kg Körpergewicht pro Tag [BERNT et al., 1996].

Die Verbrauchsmenge von Erythritol liegt in Japan bei etwa 46mg Erythritol pro Person pro Tag. Das entspricht einem Durchschnitt von etwa 0,7mg Erythritol pro kg Körpergewicht pro Tag [BERNT et al., 1996].

Trotz der vermehrten Verfügbarkeit von Erythritol in Lebensmitteln kann davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme dieses Zuckeralkohols nicht mehr als 20% aller in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzten Polyole ausmacht [BERNT et al., 1996].

2.6.1 Verwendung in der Nahrung

Erythritol wird in Japan seit den frühen 1990er Jahren als Lebensmittelzusatz eingesetzt. Es findet dabei vor allem als energiearmes Süßungsmittel in der Nahrung Verwendung [OKU und NODA, 1990; BERNT et al., 1996; GONZE, 2002]

Erythritol lässt sich hervorragend in Nahrungsmittel mischen. So zeigten sich keine Probleme bei der Beimengung von Erythritol zu mehr oder weniger flüssigen Nahrungsmitteln, wie Joghurt und Erfrischungsgetränken, aber auch zu festen, wie Keksen und Schokolade [RÖPER und GOOSSENS, 1993; BERNT et al., 1996; GONZE und DE SADELEER, 1996; TETZLOFF et al., 1996; TALJA und ROOS, 2001; GONZE, 2002; DE TROOSTEMBERGH, 2004]. Weiters wird Erythritol zum Süßen von Kaugummis, Marmeladen, Gelees, Teigen und Fondants, aber auch von Getränkepulvern und Puderzucker verwendet [RÖPER und GOOSSENS, 1993; BERNT et al., 1996; GONZE und DE SADELEER, 1996; GONZE, 2002; DE TROOSTEMBERGH, 2004].

In den USA wird Erythritol in vielerlei Hinsicht eingesetzt. Erythritol wird oftmals aufgrund seines saccharoseähnlichen Geschmacks als Geschmacksverstärker verwendet. [BERNT et al., 1996; SEO et al., 2001; WEHLAN et al., 2008]. So findet es als nicht bitterer Zuckerersatzstoff zur Verbesserung von Rezepturen Gebrauch [BERNT et al., 1996]. Trotz seiner geringen Hygroskopizität wird es in Kombination mit anderen Polyolen als Feuchthaltemittel und Stabilisator den Produkten beigemischt [BERNT et al., 1996]. Weiters findet Erythritol in den USA Anwendung als Dickungsmittel oder Formgeber [BERNT et al., 1996]. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von Erythritol als Komplexbildner [BERNT et al., 1996].

Die Verwendung von Erythritol geschieht nicht in einheitlichen Mengen und variiert von Erzeugnis zu Erzeugnis. Bis zu 100% der Masse der Zuckeraustauschstoffe kann hierbei die Menge von Erythritol betragen. Bei der Produktion von harten Bonbons oder Zuckerln kann die eingesetzte Menge an Erythritol bis zu 50% der Masse ausmachen [BERNT et al., 1996]. Bei weichen

Süßigkeiten, wie Pfefferminzbonbons oder Schokolade, ist aufgrund der Rezeptur ein Einsatz von bis zu 40% der Masse möglich [BERNT et al., 1996].

Auch in Getränken lässt sich Erythritol hervorragend als energiearmes Süßungsmittel einsetzen. So wird es in kalorienarmen oder light Getränken in Mengen von bis zu 1,5% eingesetzt [BERNT et al., 1996].

Erythritol eignet sich sehr gut für den Einsatz in Backwaren [RÖPER und GOOSSENS, 1993]. So kann es für die Herstellung von Keksen, Kuchen und Gebäck verwendet werden. Für die mehr oder weniger fettreichen Cremen oder Teige kann Erythritol eine Menge von bis zu 60% der Masse betragen [BERNT et al., 1996; TALJA und ROOS, 2001; SCF, 2003]. Ebenfalls bis zu 60% kann der Erythritolgehalt in Kaugummi ausmachen [BERNT et al., 1996].

Erythritol eignet sich aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften und sensorischen Qualität hervorragend als Austauschstoff für Saccharose in Speiseeis [GONZE und DE SADELEER, 1996; WHELAN et al., 2008].

Erythritol konnte ebenfalls erfolgreich Saccharose bei der Herstellung eines Chiffon-Kuchens ersetzen. Die Krümel und Kruste des Kuchens waren mit Erythritol leichter, schmeckten jedoch auch weniger süß als mit Saccharose. Bei der Herstellung des Kuchens konnten keine spezifischen Unterschiede in Gewicht, Volumen oder Feuchtigkeitsgehalt des Teiges festgestellt werden. Auch der fertige Kuchen stand dem Original mit Saccharose in Farbe und Zartheit um nichts nach [LIN SD et al., 2003]

Erythritol eignet sich gut als süßer Bestandteil von zuckerfreiem Überzugsmittel oder Deckmaterial von Gegenständen oder Süßigkeiten, da es sich im Vergleich mit anderen Zuckeraustauschstoffen gut versprühen lässt und es rasch aufrocknet [OHMORI et al., 2004].

Eine andere Einsatzmöglichkeit von Erythritol ist die als Konservierungsmittel. Der Zuckeraustauschstoff wird in diesem Fall nicht nur als kalorienreduziertes Süßungsmittel gebraucht, sondern wird in Kombination mit anderen, zum Großteil starken, Süßungsmitteln eingesetzt und dient vor allem der Konservierung des süßen Geschmacks und der Vorbeugung von Nachgeschmack [GONZE, 2002]. Bei der Lagerung von energiereduzierten,

alkoholfreien Getränken kann es aufgrund von Einflüssen, wie etwa Wärme und pH-Wertänderungen zum Zersetzen der Süßstoffe kommen [GONZE, 2002]. Erythritol verhindert den Verlust der Geschmacksqualität, was sich auch in einer längeren Lagerfähigkeit der Produkte auswirkt [GONZE, 2002]. Eingesetzt wird Erythritol vor allem in energiereduzierten, alkoholfreien Getränken, wie Orangen-, Colageetränken und Limonaden, welche als Süßstoff Aspartam enthalten [GONZE, 2002].

2.6.2 Erythritol als Bestandteil von Dingen des täglichen Lebens

Erythritol findet neben der Nahrungsmittelindustrie vor allem in der Pharma- und Kosmetikindustrie Anwendung [GONZE und DE SADELEER, 1996; KRISTOFIKOVA et al., 1997; TALJA und ROOS, 2001]. So wird Erythritol in der Pharmaindustrie als Süßungs- und Füllmittel eingesetzt [GONZE und DE SADELEER, 1996]. In der Kosmetikindustrie findet Erythritol unter anderem Einsatz als Süßungsmittel in Zahnpasten [DE TROOSTEMBERGH, 2004]

Aufgrund der geringen wasserziehenden Eigenschaften (Hygroskopie) und der geringen Viskosität in Lösung, lässt sich Erythritol gut zur Reduzierung und Kontrolle der Wasseraktivität (AW-Wert) in Produkten des täglichen Lebens gebrauchen [SEO et al., 2001].

2.6.3 Die Verwendung von Erythritol in Kombination mit anderen Süßungsmitteln

Erythritol eignet sich zur Kombination mit anderen Süßungsmitteln. So lässt es sich gut mit kleinen Mengen intensiver Süßstoffe kombinieren [RÖPER und GOOSSENS, 1993; GONZE und DE SADELEER, 1996]. Es bieten sich Kombinationsmöglichkeiten mit Saccharin, Thaumatin und Sucralose aber auch Glycerrhizin und Steviosid [GONZE und DE SADELEER, 1996; GONZE, 2002; WHELAN et al., 2008]. Besonders geeignet ist Erythritol für den Einsatz in Kombination mit Aspartam, da es keinen bitteren Nachgeschmack hat [SEO et al., 2001]. Wird Erythritol

gemeinsam mit Sucralose eingesetzt, lässt sich neben der Süße auch der eigene Geschmack verstärken [WHELAN et al., 2008].

Die Kombination von Erythritol mit einem intensiven Süßstoff lässt auch die Möglichkeit des Einsatzes als Tafel-, Puder- oder Würfelzuckers zu. Hierbei muss jedoch auf die vom Verbraucher erwartete Süße geachtet werden. Es muss sichergestellt werden, dass der intensive Süßstoff in richtigem Maße mit Erythritol kombiniert wird. Weiters muss auch eine gleichmäßige Verteilung des mengenmäßig kombinierten Süßstoffes auf dem Produkt, etwa einem Zuckerwürfel, garantiert werden können [GONZE und DE SADELEER, 1996].

2.6.4 Weltweite Erythritolproduktion und Erythritolpreis

Die weltweite Erythritolproduktion lag im Jahr 2006 bei etwa 20.000 metrischen Tonnen [MOON et al., 2010]. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Erythritols erhöhten in den letzten Jahren den Bedarf des Zuckeralkohols [RÖPER und GOOSSENS, 1993]. So schätzt man die Weltjahresproduktion für das Jahr 2011 bereits auf ca. 23.000 Tonnen [MOON et al., 2010].

Wurde Erythritol im Jahr 1993 umgerechnet noch zu einem Preis von 17,90 Euro angeboten [RÖPER und GOOSSENS, 1993], so wurde es im Jahr 2007 bei Abnahme großer Mengen am Weltmarkt zu einem Preis von etwa 4,5 US Dollar (ca. 3 EURO) pro Kilogramm gehandelt [RYMOWICZ et al., 2008]. Durch die Entdeckung des Erythritolmarktes durch die biotechnologische Industrie wird vermehrt Erythritol produziert. Durch eine effizientere Produktion konnte der Weltmarktpreis für Erythritol leicht gesenkt werden. So ergab eine Internetrecherche, dass bei Kauf entsprechender Mengen der Erythritolpreis auf ca. 3,6 US Dollar pro Kilogramm gesenkt werden kann (Stand: September 2012).⁴

Für den Privatkunden ist Erythritol aufgrund der Zwischenhändler teurer. Eine Internetrecherche ergab unter Berücksichtigung der verschiedenen Packungsgrößen eine Spannweite des Erythritolpreises von 8,25 bis

⁴ Preisangabe entnommen aus: <http://www.alibaba.com/showroom/erythritol.html> (Stand 27.9.2012)

19,88 Euro⁵ pro Kilogramm. Für die Preisbestimmung gilt: je größer die Einheit, desto billiger ist sie auch.

Erythritol ist über das Internet bestellbar und wird unter verschiedenen Markennamen geführt. Als Zuckerersatzstoff wird Erythritol beispielsweise unter folgenden Namen angeboten: Sukrin, Sucolin, Erysweet, Zerosweet, Xucker light und NEXT-Zucker. Der Preis ist online von Anbieter zu Anbieter unterschiedlich, beläuft sich jedoch bei Bestellung in Haushaltsgrößen für 1kg Erythritol auf etwa 12€.

⁵ Folgende Preisangaben wurden gefunden (Stand 27.9.2012):

€ 8,25 http://shop.null-kalorien.de/index.php?cat=c9_Grossgebinde---Sackware-Erythritol-9.html;

€ 9,98 <http://www.novasweet.de/Online-Shop/sweetERY-Erythritol/sweetERY-3-x-800g-Erythritol-Erythrit-Zucker-Ersatz.html>;

€ 10 http://www.amazon.de/Wiezucker-%C2%AE-Kg-Erythrit-Erythritol/dp/B005M9IOHA/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-1;

€ 11,10 bis 19,88 <http://www.zuckerersatz-shop.de/index.php?cPath=2>;

€ 11,50 http://sandos-naturkost.de/product_info.php/info/p352_Erythritol---Wiezucker-E.html;

€ 13,99 <http://minapo.com/onlineshop/erythrit-erythritol-dose.html>;

€ 17,25 http://www.amazon.de/SUKRIN-4x500g-ZuckerErsatz-Erythritol-Einf%C3%BChrungsangebot/dp/B006QS8P9I/ref=sr_1_4?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-4;

€ 17,80 <http://www.low-carb-shop.cc/pi7/pi20/pd21.html>

3 Erythritolproduktion: Stand der Forschung

Die Literaturlandschaft zur Erythritolproduktion setzt maßgeblich in den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts ein. Davor gibt es vereinzelte Artikel, die die Erythritolproduktion behandeln. [YUILL, 1948; BINKLEY und WOLFROM, 1950; SLOAN et al., 1957; SPENCER und SALLANS, 1956] Eine beständige wissenschaftliche Beschäftigung mit dem Thema entwickelte sich ab den 1960er Jahren und hält bis heute an. Angetrieben von wirtschaftlichen Interessen intensiviert sich die Forschung ab den 1990er Jahren. Hauptsächliche Themenbereiche, die in der Literatur bearbeitet werden, sind die Zusammensetzung des Fermentationsmediums; die Fermentationsbedingungen, betreffend Belüftung und Art der Fermentation (Batch oder Fed-Batch); das Erforschen der für die Erythritolgewinnung verantwortlichen Enzyme der verwendeten Organismen; das Suchen nach neuen Mikroorganismen und das Mutieren neuer oder bekannter erythritolproduzierender Stämme. Für die Herstellung von Erythritol werden unterschiedliche Verfahren beschrieben. So kann Erythritol mittels chemischem Verfahren aus Dialdehydstärke unter hoher Temperatur und in Anwesenheit eines Nickel Katalysators hergestellt werden [PFEIFER et al., 1960]. Mit dieser Methode lassen sich aber keine großen Mengen an Erythritol in einer wirtschaftlichen Form herstellen [JEYA et al., 2009].

Im Folgenden wird ein thematisch geordneter Überblick über die wissenschaftliche Literatur und den Stand der Forschung zur Erythritolproduktion dargebracht.

3.1 Optimierung des Fermentationsmediums

Eine weitere Art der Produktion ist die mittels mikrobieller Fermentation. Am häufigsten werden dazu Hefen verwendet, vor allem solche, die in der Lage sind in einer Umgebung zu leben, in der der osmotische Druck erhöht ist. Das Fermentieren mit osmophilen Hefen wird in den beschriebenen Studien oft angewandt. Beginnend in den 1950er Jahren gilt es bis heute als das Mittel der Wahl für die Herstellung von Erythritol [BINKLEY und WOLFROM, 1950;

SPENCER und SALLANS 1956; HAJNY et al., 1964; HATTORI und SUZUKI, 1974; ONISHI und SHIROMURA, 1984; LARSSON et al., 1990; TOKUOKA et al., 1992; KIM SY et al., 1997; LEE JK et al., 2000, 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c; BURSCHAEPERS et al., 2002; MOON et al., 2010; SAVERGAVE et al, 2011; und weitere.]

Neben den Hefen wurden aber auch andere Pilze untersucht, die Erythritol produzieren. Oft sind die entstandenen Polyole, wie z. B. Mannitol oder Arabitrol aber auch Erythritol, jedoch nur Nebenerzeugnisse neben dem Hauptprodukt, wie etwa Zitronensäure und deshalb in nicht allzu großen Mengen vorhanden [YUILL, 1948; MARGULIES und VISHNIAC, 1961; BRAUN und NIEDERPRUEM, 1969; HATTORI und SUZUKI, 1974].

Weiters ist die Erythritolproduktion mit Bakterien zu erwähnen [VEIGA-da-CUNHA et al., 1992, 1993]. Die Produktionserfolge lassen sich aber nicht mit jenen von den osmophilen Hefen vergleichen und spielen wie die Produktion mit Hilfe von Pilzen nur eine untergeordnete Rolle in der heutigen industrialisierten Form der Erythritolherstellung.

3.1.1 Kohlenstoffquellen

Ein Teil der Forschung zur Steigerung der Erythritolproduktion beschäftigt sich mit der Optimierung des Mediums, in welchem die Mikroorganismen fermentiert werden. Bei Erythritol handelt es sich, wie in Kapitel 1 beschrieben, um einen Zuckeralkohol, bestehend aus 4 Kohlenstoffatomen. Daher wird in einem Teil der Forschung nach wie vor nach einer optimalen Kohlenstoffquelle für den verwendeten Organismus gesucht. Nicht nur die Art der Kohlenstoffquelle ist von Bedeutung, sondern auch die Konzentration mit der sie im Medium vorkommt ist ein Thema in den Studien [HATTORI und SUZUKI, 1974; KIM SY, 1997; BURSCHAEPERS et al., 2002; und weitere].

Es gibt die verschiedensten Untersuchungen zu der optimalen Kohlenstoffquelle im Fermentationsmedium, da die unterschiedlichen Mikroorganismen auch unterschiedliche Kohlenstoffquellen bevorzugen und dementsprechend unterschiedlich wachsen und Erythritol produzieren.

Bei der Fermentation mit der Mutante der Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* mit Namen KN75 wurden verschiedene Kohlenstoffquellen untersucht. Als Quellen dienten Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Saccharose, Dextrine, lösliche Stärke, Maisstärke, Glycerin und Sojabohnenöl. Bei der aeroben Fermentation mittels Fed-Batch Verfahren stellte sich die Glucose als die beste Quelle heraus. Bei einer Mediumszusammensetzung von 30% Glucose und 1,5% Maisquellwasser wurden die höchsten jemals erzielten Werte für die maximale Erythritolkonzentration von 245 g/l, die Produktivität von 2,86 g/l/h und eine Ausbeute von 61% im Vergleich zur eingesetzten Glucose erzielt. Diese Ergebnisse konnten auch nach erfolgreichem Scale-up vom 7 Liter Fermenter über einen Pilotversuch im 300 Liter Fermenter bis hin zum großtechnischen 50.000 Liter Fermenter bestätigt werden. Als der entscheidende Faktor für das Scale-up vom Labormaßstab bis hin zur industriellen Form konnte der Gehalt an gelöstem Sauerstoff ausgemacht werden. [JEYA et al., 2009]

Es wurde ermittelt, dass Glucose, welche durch die chemische oder enzymatische Hydrolyse von Weizen- oder Maisstärke hergestellt wurde, und Saccharose die am besten geeigneten Kohlenstoffquellen bei der Fermentation durch die Hefe *Trichosporonoides sp.* sind [AOKI et al., 1993].

Bei der Fermentation mittels einer Mutante von *Aurobasidium sp.* konnte Glucose als die beste Kohlenstoffquelle ausgemacht werden. Bei einer Konzentration von 40% Glucose wurde eine Produktivität von 1,82 g/l/h und eine Ausbeute von 44% pro eingesetzter Glucose erreicht. [ISHIZUKA et al., 1989]

Bei der Fermentation mit *Trichosporon sp.* stellte sich heraus, dass bei einer Glucosekonzentration von 22% die beste Produktivität erzielt werden kann. Wurde die Glucosemenge auf 30% und mehr erhöht, reduzierte sich aufgrund des hohen osmotischen Drucks die Erzeugung von Erythritol deutlich. Bei diesem Fed-Batch Verfahren wurde dem Medium weiterer Kohlenstoff in Form von reiner Glucose zugeführt. In der Folge fiel die Rate der spezifischen Erythritolproduktion von 0,042 g/l/h auf 0,023 g/l/h ab. Wurde neben der zugegebenen Glucose auch Maisquellwasser verabreicht, sank die Produktion nicht und konnte bei etwa 0,042 g/l/h gehalten werden. [PARK J et al., 1998]

Bei der Erythritolproduktion durch den Pilz *Penicillium sp. KJ-UV29* bewährte sich vor allem Saccharose als Kohlenstoffquelle. Andere untersuchte Quellen waren Glucose, Galactose, Maltose, Mannose, Fructose und Lactose, deren Verwendung allesamt eine geringere Produktion von Erythritol zur Folge hatte. Bei Sorbit, Arabinose und Xylose konnte hingegen überhaupt keine Erythritolproduktion festgestellt werden. Die Mutante *KJ-UV29* vermag in einem Medium von bis zu 70% Saccharose zu wachsen und Erythritol zu produzieren, jedoch liegt die optimale Konzentration bei 30%. Durch die Zugabe von 0,5% Hefeextrakt, 0,5% Ammoniumoxalat, 0,1% Kaliumnitrat und 0,1% Natriumnitrat konnte die Erythritolproduktion signifikant erhöht werden [LEE KJ und LIM JY, 2003].

Ein interessanter Ansatz ist die Verwendung von Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle für die biotechnologische Erzeugung von Erythritol. Auf der Suche nach einem billigen Rohstoff für die Fermentation stieß man auf Glycerin, welches bei der Biodieselherstellung als Nebenprodukt anfällt [KOUTINAS et al., 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008]. Bei der Fermentierung mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde neben Zitronensäure auch Erythritol hergestellt. Durch anpassen der Fermentationsbedingungen konnte der Ertrag am Polyol Erythritol gesteigert werden. Die Acetat-negative Mutante *Yarrowia lipolytica Wratislavia K1* vermochte in einem Medium mit Roh-Glycerin als Kohlenstoffquelle und unter Limitierung des Stickstoffgehaltes Erythritol in beachtlichen Mengen zu produzieren. Die Erzeugung erfolgte in einem 3,5 Liter Fermenter nach einer Fed-Batch Methode. Zu Beginn des Prozesses hatte das Medium eine Glycerinkonzentration von 150 g/l, wurde im Laufe der Fermentation jedoch auf 250 g/l erhöht. Bei konstantem pH von 5,5 und bei 30°C wurde für 168 Stunden fermentiert. Die maximale Erythritolkonzentration betrug 81 g/l Fermentationsmedium und die maximale Produktivität 0,6 g/l/h, als beste Ausbeute wird 32% angegeben. Durch eine neuerliche Änderung des Fermentationsmediums konnte die Entstehung von Zitronensäure verhindert und die erzielten Erträge gesteigert werden. So betrug die maximale Erythritolkonzentration 170 g/l, die Produktivität 1 g/l/h und die Ausbeute 56% [RYMOWICZ et al., 2006, 2008, 2009]. Die hier erreichten Zahlenwerte blieben

somit unter den anderen berichteten Werten für die maximale Erythritolkonzentration, Produktivität und Ausbeute, welche mittels Hefefermentation im Glucosemedium erzielt werden können. Da Roh-Glycerin in der sich rasch entwickelnden Biodieselherstellung in beträchtlichen Mengen anfällt, kann es jedoch als kostengünstige Kohlenstoffquelle für die biotechnologische Herstellung von Erythritol in Betracht gezogen werden. [RYMOWICZ et al., 2006, 2008, 2009]

Ein Großteil der Studien beschäftigt sich mit der Suche nach der optimalen C-Quelle und deren Verwertung hinsichtlich maximaler Erythritolproduktion, Produktivität des Mikroorganismus und Ausbeute, sprich entstandenes Erythritol pro eingesetztem Zucker. Am häufigsten wurde dabei Glucose untersucht. Es stellte sich heraus, dass Glucose für viele erythritolproduzierende Mikroorganismen eine vielversprechende Kohlenstoffquelle darstellen kann. [HOOTMANN et al., 1991; VEIGA-da-CUNHA et al., 1992,1993; KIM SY et al., 1997; YANG et al., 1999; LIN et al., 2001; RICHTER et al., 2001; KOH et al., 2003; MOON et al., 2010; SAVERGAVE et al., 2011]

Die Mutante *Candida zeylanoides* KY 6166 wurde zur Erythritolproduktion in einem Medium fermentiert, das als Kohlenstoffquelle n-Alkane gelöst hatte. Die Länge der Ketten betrug zwischen 12 und 15 Kohlenstoffatome. Die Zusammensetzung der Fermentationslösung hatte eine Konzentration von 200 g n-Alkane pro Liter. Die Fermentation erfolgte in einem 5 und einem 300 Liter Fermenter, wobei der pH-Wert unter 4 gehalten wurde. Die maximal erzielte Erythritolkonzentration betrug 180 mg/g. Als Nebenprodukt konnten geringe Mengen an Mannitol ausgemacht werden. Die Ausbeute an Erythritol betrug, bezogen auf die verbrauchten Alkane, 90%. Das Produktionsverhältnis von Erythritol zu Mannitol war stark vom Phosphatgehalt des Mediums abhängig. Bei einem hohen Niveau (0,04-0,2 mg/l) von Phosphor, in Form von Kaliumdihydrogenphosphat, war das Produktionsgleichgewicht gänzlich auf Seiten des Mannitols. [HATTORI und SUZUKI, 1974]

Eine Studie aus dem Jahre 1964 [HAJNY et al., 1964] untersuchte die Auswirkungen einer unterschiedlichen Zusammensetzung des Kulturmediums

unter dem Blickwinkel Kohlenstoff- und Stickstoffquelle bei der Fermentation der Hefe der Gattung *Torula*. Beim mikrobiellen Ansatz zeigte sich, dass sowohl das Wachstum der Biomasse als auch die Produktion von Erythritol von der Kohlenstoffquelle beeinflusst werden. Bei einer Konzentration von 5% des zu untersuchenden Kohlenstoffs und 1% Hefeextrakt stellte sich heraus, dass das Biomassewachstum bei Mannitol, Erythritol, Glycerin, Fructose, Mannose, Maltose und Saccharose gut, am besten aber bei Glucose war. Kaum Biomasse bildete sich bei der Fermentierung mit Inositol, Sorbit, Xylit, Galactose, Xylose, Arabinose, Lactose, und Raffinose. Eine Erythritolproduktion konnte lediglich bei Glucose, Fructose, Mannose, Maltose und Saccharose nachgewiesen werden. Weiters stellte sich heraus, dass eine hohe Ausgangskonzentration der Kohlenstoffquelle – im Gegensatz zu einer niedrigen – eine höhere Erythritolkonzentration zulässt. Auf diese frühe Studie wird in den nachfolgenden Publikationen immer wieder verwiesen und aus den Erkenntnissen zitiert. [HAJNY et al., 1964]

Auch in weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass bei der Erythritolproduktion mittels *Torula sp.* Glucose die optimale Kohlenstoffquelle ist [KIM KA et al., 1999; LEE JK et al., 2000, 2001; MOON et al., 2010], wobei sich herausstellte, dass bei einer kontrollierten Glucosekonzentration im Fermentationsmedium von 225 g/l die Lagphase der Hefen deutlich erniedrigt ist und es somit zur höchsten Produktivität kommt. Wird nur die Ausgangskonzentration in Betracht gezogen, so ergibt sich aus einer Konzentration von 300g Glucose pro Liter die maximale Produktivität [OH et al., 2001].

Allgemein kann gesagt werden, dass eine hohe Anfangskonzentration an Glucose zu einer erhöhten Produktionsrate und Ausbeute an Erythritol bei der Fermentation führen kann, sofern der Organismus den hohen osmotischen Druck toleriert [MOON et al., 2010].

Bei einer anderen Untersuchung mit der Hefe der Gattung *Torula* [KIM KA et al., 2000] stellte sich jedoch heraus, dass sich Saccharose am besten für die Produktion von Erythritol eignet. In einem Medium mit 40% Saccharose und 2% Hefeextrakt konnten nach einer 120 stündigen

Fermentation die folgenden Maximalwerte erreicht werden: Erythritolkonzentration 20%, Produktivität 1,67 g/l/h und Ausbeute 60%. [KIM KA et al., 2000]

Bei der Fermentation mit der Hefe *Trigonopsis variabilis* stellte sich Glucose als die effektivste Kohlenstoffquelle heraus. Infolge einer Steigerung des osmotischen Drucks von 1,3 auf 3,9 kPa durch die Erhöhung der Glucosekonzentration, konnte auch die Produktionsrate von Erythritol mehr als verdoppelt werden. Mit dem erhöhten Druck sank jedoch die Wachstumsrate der Hefen. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurde eine Zwei-Phasen-Fermentation konzipiert, bei der zwischen einer Wachstums- und einer Produktionsphase unterschieden wird. In ersterer wurde der osmotische Druck auf 1,4 kPa eingestellt, damit sich Biomasse schneller bilden kann. In der 2. Phase wurde der Druck auf 3,7 kPa erhöht, was in einer doppelt so hohen Erythritolproduktion als in der Ein-Stufen-Produktion resultierte [KIM SY et al, 1997].

Auch der für Insekten gefährliche (entomopathogene) Pilz *Metahizium anisopliae* kann unter Wasserstress Erythritol produzieren. Die Erythritolkonzentration in den Blastosporen nimmt bei einem AW-Wert zwischen 0,98 und 0,97 und mit steigendem Alter zu [YPSILOS und MAGAN, 2004].

Bei einer anderen Studie wurde mit dem Mikroorganismus *Candida magnoliae* gearbeitet, wobei ebenfalls Glucose als Kohlenstoffquelle diente. Nach Erreichen einer Trockenzellmasse von 75 g/l im Fermentationsmedium wurde dem Wachstumsmedium Glucose in Pulverform beigemengt, bis die Konzentration 40% betrug. Zugleich stellte diese Erhöhung des osmotischen Drucks den Wechsel vom Wachstums- hin zum Produktionsmedium dar. Als maximale Werte für die Produktivität werden 2.8 g/l/h und für die Ausbeute 41% genannt. Diese ermittelten Zahlenwerte stellen eine 5fache Steigerung im Vergleich zu einer einfachen Batch-Fermentation dar. Ein Nachteil ergab sich jedoch aus der hohen Glucosekonzentration im Produktionsmedium. So war die Entstehung von organischen Säuren, wie Zitronen- und Buttersäure, gegeben. [RYU et al., 2000]

Auch in anderen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass Glucose als Kohlenstoffquelle bei der Fermentation von *Candida magnoliae* dienen kann [SEO et al., 2001].

Auch bei der Fermentation der Hefe *Moniliella tomentosa* var *pollinis* wurde Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Es spielt dabei keine Rolle ob die Glucose aus chemischer oder enzymatischer Hydrolyse hergestellt wurde. Mittels Batch Verfahren konnte im Fermentationsmedium eine maximale Erythritolkonzentration von 90 g/l und eine Ausbeute von 36% erreicht werden. Bei der Fermentation im Fed-Batch Modus konnte die maximale Erythritolkonzentration auf 170 g/l gesteigert werden. Die höchsten Werte dieser Studie konnten mittels Fermentation in einer 80 Liter Blasensäule erzielt werden. Bei einer Ausgangskonzentration von 500g Glucose pro Liter Medium wurde die maximale Trockenzellmasse von 65 g/l, eine maximale Erythritolkonzentration von 175 g/l und eine Ausbeute von 43% gemessen [BURSCHAEPERS et al., 2002].

3.1.2 Stickstoffquellen

Ein weiteres Teilgebiet der Mediumsoptimierung ist die Suche nach der optimalen Stickstoffquelle. Stickstoff wird bei der Fermentation für das Wachstum des Mikroorganismus gebraucht. Ohne ausreichende Versorgung mit Stickstoff können nicht genügend Nukleinbasen gebildet werden und infolgedessen kommt es zu keinem ausreichenden Wachstum der Biomasse, was eine eingeschränkte Produktion von Erythritol zur Folge hat [HANSSEN et al., 1972; LEE KJ und LIM JY, 2003; EDLAUER und TRIMMEL, 2009; JEYA et al. 2009; und weitere].

Bei einer anderen Untersuchung mit der Hefe der Gattung *Torula* [KIM KA et al., 2000; LEE JK et al; 2001] stellte sich heraus, dass nicht allein die Menge an vorhandenem Stickstoff ausschlaggebend für eine erfolgreiche Fermentation ist. Es wurde ermittelt, dass das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffquelle wichtig für eine erfolgreiche Produktion von Erythritol ist. Das optimale Verhältnis liegt bei 20 (C/N). In einem Medium mit 40% Saccharose und 2% Hefeextrakt konnten nach einer 120 stündigen Fermentation die

folgenden Maximalwerte von Erythritolkonzentration, Produktivität und Ausbeute von 20%, 1,67 g/l/h und 60% erreicht werden. [KIM KA et al., 2000; LEE JK et al; 2001]

Auch andere Studien stellen einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration der Kohlenstoffquelle und der für die Fermentation benötigten optimalen Stickstoffmenge her. So gehen frühe Untersuchungen mit der Hefe *Moniliella tomentosa* davon aus, dass bei einer hohen Glucosekonzentration (30%) 1-2% Hefeextrakt benötigt wird um erfolgreich Erythritol herstellen zu können [HANSSEN et al., 1972].

Bei der Fermentation mit der Hefe *Moniliella tomentosa* var *pollinis* konnte erkannt werden, dass die Komplexität vieler eingesetzter Stickstoffquellen Probleme nach sich ziehen kann. Als solch komplexe N-Quellen werden Hefeextrakt, Peptone und Maisquellwasser genannt, aber auch andere tierischen oder pflanzlichen Ursprungs. Es wurden Anstrengungen unternommen diese komplexen Stickstoffquellen zu reduzieren. Als Ersatz wurden organische Quellen, wie Harnstoff, oder anorganische Salze, wie Ammoniumsulfat gefunden. Die komplexen oder organischen Verbindungen können den pH-Wert des Mediums beeinflussen, sich aber auch negativ auf die spätere Aufarbeitung des Produktes auswirken. In dieser Studie scheint die Verwendung von nur einer anorganischen Stickstoffquelle das Mittel der Wahl zu sein. Als geeignete N-Quellen werden Kaliumnitrat, Natriumnitrat und Ammoniumnitrat beschrieben. [EDLAUER und TRIMMEL, 2009]

In einem Bericht wird erwähnt, dass der Einsatz von Harnstoff bei einer Fermentation gesundheitsschädliche Folgen haben kann. Aus Harnstoff kann sich die als kanzerogen geltende Substanz Urethan bilden. [HASSELBECK und HENKE, 2007] Urethan hat bei oraler Aufnahme eine LD₅₀ von 1,810 g/kg Körpergewicht [PEREIRA et al., 1991].

Bei der Fermentation durch den Pilz *Penicillium* sp. KJ-UV29 konnte die Erythritolproduktion durch die Zugabe von 0,5% Hefeextrakt, 0,5% Ammoniumoxalat, 0,1% Kaliumnitrat und 0,1% Natriumnitrat zur 30%igen Saccharoselösung signifikant erhöht werden. Durch die Optimierung der

Stickstoffquellen konnte die maximale Erythritolkonzentration von 15,1 g/l auf 45,3 g/l gesteigert werden. [LEE KJ und LIM JY, 2003]

Es wurden auch Beobachtungen entgegen den Erwartungen gemacht. So produzierte die acetat-negative Mutante *Yarrowia lipolytica* *Wratislavia* K1 in einem Medium mit Roh-Glycerin als Kohlenstoffquelle und unter Limitierung des Stickstoffes Erythritol in beachtlichen Mengen. In einem für diesen Mikroorganismus optimierten Fermentationsmedium betrug die maximale Erythritolkonzentration schließlich 170 g/l, die Produktivität 1 g/l/h und die Ausbeute 56%. [RYMOWICZ et al., 2008, 2009]

Bei der Fermentation mit einer Mutante von *Candida magnoliae* stellte sich heraus, dass neben Glucose als Kohlenstoffquelle die Stickstoffquelle in Form von Hefeextrakt von Bedeutung ist. Mittels einer Fed-Batch Fermentation konnten mit einer Mediumszusammensetzung von 23,8% Glucose und 0,92% Hefeextrakt die Maximalwerte an Erythritolkonzentration von 87,8 g/l und eine Ausbeute von 31,1% erzielt werden. Die Reduktion der Nebenprodukte Mannitol und Glycerin beinhaltet Optimierungspotential und wird Bestandteil zukünftige Forschungen sein [SAVERGAVE et al., 2011].

Es wird an mehreren Stellen der Literatur beschrieben, dass sich Hefeextrakt als geeignete Stickstoffquelle für die Fermentation mittels *Candida magnoliae* erweist [SEO et al., 2001].

In einer anderen Studie mit *Candida magnoliae* wurde ebenfalls Hefeextrakt als die optimale N-Quelle beschrieben. Das verwendete Nährmedium hatte eine Glucosekonzentration von 30% und beinhaltete Stickstoff in Form von 20g Peptone und 10g Hefeextrakt pro Liter. Folgende Maximalwerte wurden ermittelt: Erythritolkonzentration (200 g/l), Produktivität (1,2 g/l/h) und Ausbeute (43%). [KOH et al., 2003]

Die Verwendung von Peptonen oder Hefeextrakt als Stickstoffquellen wird in weiteren Studien beschrieben, aber auch der Einsatz von getrockneter Fleischbrühe [HIRATA et al., 1999; LIN et al., 2001].

Schon frühe Untersuchungen stellten fest, dass bei der biotechnologischen Herstellung von Erythritol neben der Suche nach der optimalen Kohlenstoffquelle auch das Finden einer optimalen Stickstoffquelle von

höchster Bedeutung ist. In einer Studie wurde festgestellt, dass sich Hefeextrakt, Maisquellwasser, schwarze Melasse, Malzkeimextrakt, Malzextrakt und Trockenschlempe gut als Stickstoffquelle eignen. Es wurde erkannt, dass der Einsatz von 1-2% Hefeextrakt zu einem üppigen Wachstum der Biomasse führt und somit die Erythritolproduktion beeinträchtigt.

Um eine optimale Erythritolproduktion zu gewährleisten muss das Zellwachstum limitiert werden, was mit der strengen Kontrolle der Stickstoffzufuhr erreicht werden kann. Als optimale Menge werden 0,5% Hefeextrakt als Stickstoffquelle bestimmt. Mit dem Einsatz von maximal 0,1% Harnstoff konnte die Menge der eingesetzten N-Quelle deutlich gesenkt werden. Der ermittelte Maximalwert für die Ausbeute betragen 43%. Der hohe Preis von Hefeextrakt lässt vermutlich keine industrielle Verwendung zu. Somit scheint Maisquellwasser das Mittel der Wahl zu sein [HAJNY et al., 1964; JEYA et al., 2009].

Weiters ist der Einsatz von einem Gemisch aus Stickstoff aus den unterschiedlichsten Quellen eine Möglichkeit. So wird bei der Fermentation mittels der Hefe *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* von einer Kombination aus Harnstoff, Ammoniumsulfat, Maisquellwasser und Hefeextrakt berichtet. Unter Fermentationsbedingungen, bei denen die Stickstoffzufuhr limitiert war, kam es zu Schaumbildung. Durch den Schaum kam es zu einer Behinderung der Erythritolproduktion. Unter der optimalen Zufuhr von Stickstoff konnte eine Trockenzellmasse von bis zu 116 g/l, eine Erythritolkonzentration von bis zu 175 g/l und eine Ausbeute von bis zu 43% erreicht werden [BURSCHAEPPERS et al., 2002].

Des Weiteren wird auch der Einsatz von Stickstoffquellen tierischen Ursprungs beschrieben. Bei der Fermentation mit *Candida tropicalis* stellte sich heraus, dass sich Milchprotein (Casein) als Stickstoffquelle für diesen Mikroorganismus eignet [RAO et al., 2006].

3.1.3 Spurenelemente

In der Erythritolproduktion liegt ein weiteres Augenmerk auf dem Einfluss von Mengen- und Spurenelementen auf die verwendeten Mikroorganismen. Diese Elemente, oft sind es Metall-Ionen, spielen vor allem als Zentralatome in den

Enzymen und Proteinen der Fermentationskeime eine entscheidende Rolle [LEE JK et al., 2000, 2001; und weitere].

Bei der Fermentierung mit dem Mikroorganismus *Torula sp.* konnte die Erythritolproduktion und die Ausbeute durch den Zusatz von Metall Ionen gesteigert werden. Dem Fermentationsmedium wurden Cu^{2+} Ionen in Form von 2mg Kupfer- und Mn^{2+} in Form von 10mg Mangansulfat beigemengt. Die Anwesenheit dieser Ionen ließ die Erythritolkonzentration im Medium sinken. Weiters stellte sich eine gesteigerte Aktivität der Erythrosereduktase ein, was auf die Anwesenheit von Cu^{2+} zurück zu führen war. Es kann gesagt werden, dass die Supplementierung des Fermentationsmediums mit Mn^{2+} zu einer Änderung der Permeabilität der Zellen führt und dass Cu^{2+} zu einer erhöhten Aktivität der Erythrosereduktase in den Hefezellen beiträgt. Durch einen Einsatz beider Elemente kommt es aufgrund von Synergieeffekten zu einer gesteigerten Erythritolproduktion. [LEE JK et al., 2000]

Bei einer weiteren Untersuchung mit dem Mikroorganismus *Torula sp.* wurde mit dem Einsatz von Metall- und Nichtmetallionen die Produktion von Erythritol zu steigern versucht. So wurde in einer Studie aus dem Jahr 2000 [KIM KA et al., 2000] das Fermentationsmedium bestehend aus Saccharose und Hefeextrakt mit der Zugabe von Kupfer in Form von 10mg Kupfersulfat und Phosphor in Form von 3g Kaliumdihydrogenphosphat optimiert. In Folge dieser Verbesserung kam es zu einer vollkommenen Einschränkung der Produktion der Nebenerzeugnisse Glycerin und Ribitol. [KIM KA et al., 2000] Auch in anderen Studien konnten Mangan und Kupfer als wichtige Zusätze zum Fermentationsmedium ausgemacht werden [HATTORI und SUZUKI, 1974]. Aber auch Zink wird eine positive Eigenschaft in Bezug auf die Erythritolproduktion zugeschrieben [HATTORI und SUZUKI, 1974].

Weiters konnte erkannt werden, dass Phytinsäure als Phosphorquelle bei der biotechnologischen Herstellung von Erythritol mittels *Torula sp.* dienen kann. Vor allem werden Zellwachstum und die Aktivität der Erythrosereduktase gesteigert und in Folge dessen kommt es zu einer erhöhten Erythritolproduktion [LEE JK et al., 2001; OH et al., 2001]. In der Literatur wird die Verwendung von Phytinsäure als Phosphorquelle häufig beschrieben. Es stellte sich

heraus, dass auch bei der Fermentation durch die osmophile Hefe *Candida magnoliae* Phytinsäure erfolgreich zur Steigerung der Erythritolproduktion eingesetzt werden kann [KOH et al., 2003].

Auch der Einsatz von Kaliumdihydrogenphosphat und Magnesiumsulfat kann bei der Fermentation mittels *Candida magnoliae* zu einer Steigerung der Erythritolproduktion beitragen [SAVERGAVE et al., 2011].

In der Studie von KIM et al. [1999] wurde die Wirkung von den Salzen Natriumchlorid und Kaliumchlorid untersucht. Die Spannweite der Konzentration dieser Salze im Fermentationsmedium reicht von geringen Konzentrationen bis hin zur hohen osmotischen Aktivität. Es wurde beobachtet, dass sowohl das Zellwachstum als auch der Verbrauch an Glucose beim Mikroorganismus *Torula sp* mit zunehmender Konzentration von sowohl Natriumchlorid als auch Kaliumchlorid sinkt. In einem Medium mit einer Ausgangskonzentration von 200 g/l Glucose wurde die optimale Menge der Salze ermittelt. Diese beläuft sich für Natriumchlorid auf 17,5 g/l und für Kaliumchlorid auf 28,8 g/l. Nach einer 120 stündigen Fermentation konnte eine Erythritolkonzentration von 54,3 g/l gemessen werden. Bei Salzkonzentrationen, welche über den oben genannten liegen, wird vor allem das Wachstum der Hefezellen eingeschränkt. Bei einer weiteren Steigerung des osmotischen Drucks steigt auch die Ausbeute an Erythritol an. So wurde bei einer Osmolalität von 2,4mol mit 49% die höchste Ausbeute gemessen [KIM KA et al., 1999]. Bereits im Jahre 1964 waren die Metallionen von Natrium und Kupfer Teil einer Untersuchung bei der Fermentation mittels der Hefe *Torula sp.*. Es wurde festgestellt, dass sich das Vorhandensein von Natrium nicht sonderlich auf die Fermentation und die Erythritolproduktion auswirkt. Die Präsenz von Kalium verursacht hingegen eine erhöhte Produktion von Glycerin. Des Weiteren stellte sich heraus, dass mit dem Zusatz von anorganischem Phosphor die Erythritolproduktion gesteigert werden kann. Als Optimum wird ein Level von 70 mg/l angegeben, wobei eine Ausbeute von 34,9% erzielt wurde. Konzentrationen, die darüber hinausgehen, haben eine Reduktion der Erythritolproduktion zur Folge. [HAJNY et al., 1964]

Die Suche nach salztoleranten Hefen ist auch in anderen wissenschaftlichen Untersuchungen dokumentiert [SEO et al., 2001].

Bei der Fermentation mit der Mutante *KY 6166* der Hefe *Candida zeylanoides* stellte sich heraus, dass das Produktionsverhältnis von Erythritol zu Mannitol stark vom Phosphatgehalt des Mediums abhängig ist. Bei einem hohen Niveau (0,04-0,2 mg/l) an Phosphor, in Form von Kaliumdihydrogenphosphat, war das Produktionsgleichgewicht gänzlich auf die Seite des Mannitols verschoben. [HATTORI und SUZUKI, 1974]

Bei der Fermentation mit dem Pilz *Penicillium sp. KJ-UV29* konnte die Erythritolproduktion durch die Zugabe von 0,01% Eisensulfat zur 30%igen Saccharoselösung signifikant erhöht werden [LEE KJ und LIM JY, 2003].

Auch bei der Fermentation mit *Yarrowia lipolytica Wratislavia K1* stellte sich heraus, dass mittels Zusatz von Metallen eine Steigerung der Erythritolproduktion zu erzielen ist. In einem Medium in welchem Glycerin als Kohlenstoff- und Hefeextrakt als Stickstoffquelle dienen, erwies sich die Beimengung von 1 g/l Magnesiumsulfat und 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat als geeignet, um die Produktion von Erythritol zu steigern. [RYMOWICZ et al., 2009]

Bei der Durchsicht der wissenschaftlichen Literatur zeigt sich, dass vor allem mit Ionen der Elemente Kalium, Kupfer und Mangan geforscht wird. Je nach verwendetem Fermentationsstamm können diese Metallionen einen positiven Einfluss auf die Erythritolproduktion haben. Eine allgemeine Empfehlung kann man unter der Berücksichtigung der vielen Parameter einer Fermentation jedoch nicht aussprechen.

3.1.4 Vitamine

Ein anderer Teil der Mediumsoptimierung beschäftigt sich mit Einfluss von Vitaminen auf den Stoffwechsel der Fermentationsstämmen. Es werden hauptsächlich Vitamine des B-Komplexes untersucht, da diese unter anderem einen Einfluss auf den Kohlehydratstoffwechsel des Organismus haben können [HATTORI und SUZUKI, 1974; LEE JK et al., 2001; RICHTER et al., 2001; EDLAUER und TRIMMEL, 2009; SAWADA et al., 2009].

In einer Studie von LEE et al. [2001] wurde der Einfluss vitaminähnliche Verbindungen auf die Erythritolproduktion des Stammes *Torula sp* untersucht.

Es zeigte sich, dass Inosit die vielversprechendste unter den getesteten Verbindungen mit Vitamincharakter ist. Inosit wurde jedoch nicht alleine verabreicht, sondern in Verbindung mit Phosphor. Als organische Phosphorquelle diente Phytinsäure, auch bekannt unter dem Namen Hexa-Phospho-Inosit (IP6), welche 6 Phosphorreste bereitstellen kann. Bei der alleinigen Verabreichung von Phytinsäure konnte diese die Erythritolproduktion mehr steigern als die alleinige Gabe von Inosit. Ursache für dieses Phänomen sind Synergieeffekte zwischen dem Inosit und den Phosphatresten. Durch die Zugabe dieser Substanzen kommt es vor allem zu gesteigertem Zellwachstum und einer erhöhten Aktivität der Erythrosereduktase. Bei genauerer Betrachtung wurde erkannt, dass Inosit das Zellwachstum und die Erythritolproduktion deutlicher anregt, als Phosphate alleine. [LEE JK et al., 2001]

Des Weiteren wurde auch der Einfluss von Pyridoxin, in Form von Pyridoxinhydrochlorid, auf die Erythritolproduktion untersucht. Bei der Fermentation mittels *Torula* sp. wurde eine optimale Pyridoxinhydrochloridmenge von 10 mg/l Medium ermittelt. Bei der Gegenüberstellung der Fermentationsergebnisse zeigte sich, dass der positive Einfluss von Inositol auf die Erythritolproduktion größer ist, als der von Pyridoxin. Wurde dem Fermentationsmedium mit einer Konzentration von 200 g/l Glucose 100 mg/l Inositol beigemengt, zeigte sich eine Erythritolkonzentration von 56,6 g/l. Fügt man dem Medium 10 mg/l Pyridoxinhydrochlorid hinzu, erreichte die maximale Erythritolkonzentration 50,5 g/l. Ohne jeglichen Zusatz von Vitaminen wurde lediglich eine Erythritolkonzentration von 46,2 g/l erreicht. Bei der optimalen Zusammensetzung des Fermentationsmediums mit einer Glucose Ausgangskonzentration von 400 g/l konnten folgende Maximalwerte für Erythritolkonzentration von 182 g/l, Produktivität von 1,35 g/l und Ausbeute von 45,5% erzielt werden. [LEE JK et al., 2001]

Bereits 1964 wurde vermutet, dass Vitamine des B-Komplexes einen Einfluss auf die Erythritolproduktion mittels Hefen haben könnten. Bei der Fermentation mit Hilfe des Stammes *Torula* sp. stellte sich heraus, dass der Einsatz von den Vitaminen Biotin, Pyridoxamin, Calcium-Pantothenat, Nikotinsäure und Inositol

zu einem leichten Rückgang (-2%) der Erythritolproduktion im Gegensatz zur Fermentation in vitaminfreiem Medium führte. Bei den Proben in denen Thiamin zugesetzt war, konnte keine Erythritolproduktion festgestellt werden [HAJNY et al., 1964]. Andere Studien hingegen konnten eine positive Auswirkung auf die Erythritolproduktion durch die Zugabe von Thiamin nachweisen [HATTORI und SUZUKI, 1974; SAWADA et al., 2009; EDLAUER und TRIMMEL, 2009].

Bei der biotechnologischen Herstellung von Erythritol durch das Milchsäurebakterium *Oenococcus oeni* wurde festgestellt, dass es durch Limitierung des Vitamins Pantothersäure zu einer erheblichen Produktion von Erythritol kommt [RICHTER et al., 2001].

3.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen

Die Literatur beschäftigt sich neben der Optimierung des Fermentationsmediums mit der ständigen Verbesserung der Fermentationsbedingungen. So werden die Fermentationen etwa in unterschiedlich großen Behältern mit den verschiedensten Volumina durchgeführt, wobei das Scale-up vom Labormaßstab hin zu Anlagen von industriellem Ausmaß eine entscheidende Rolle spielt [KOH et al., 2003; JEYA et al., 2009]. In großtechnischen Anlagen wird etwa mit Fermentern mit Volumina von etwa 100.000 bis 200.000 Litern gearbeitet [SAWADA et al., 2009; KOSUMI T et al., 1998 in MOON et al., 2010]. Diese verschiedenartigen Gefäße haben zur Folge, dass es zu unterschiedlich starker Lösung des zugeführten Sauerstoffs kommt [JEYA et al., 2009].

3.2.1 Volumen, Umwälzung und O₂

Bei einer Fermentation mittels *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42 in einem 100.000 Liter Fermenter konnte nach einer Fermentationsdauer von 96 Stunden eine Produktivität von 2g Erythritol pro Liter pro Stunde und eine Ausbeute von 47% erzielt werden [SAWADA et al., 2009].

Für die biotechnologische Herstellung von Erythritol mittels Hefen werden durchwegs aerobe Prozesse beschrieben. Schon früh wird in der Literatur über die Auswirkungen der Belüftung berichtet. So wurde festgestellt, dass für die Erythritolproduktion durch die Hefe *Torula sp.* eine entsprechende Sauerstoffversorgung nötig ist. Nur durch eine ausreichende Sauerstoffversorgung seien hohe Erträge vom Polyol Erythritol zu erwarten [HAJNY et al., 1964]. Bei einer Unterversorgung mit Sauerstoff und in Folge dessen anaeroben Stoffwechsels der Mikroorganismen wird anstelle des Erythritol vor allem Ethanol produziert [HAJNY et al., 1964]. Dass die kontrollierte Zufuhr von Sauerstoff eine strikt zu beachtende Komponente bei der Fermentation darstellt, wird in der Literatur immer wieder hervorgehoben. Es ist wichtig ein Gleichgewicht einzuhalten. Während bei zu geringer Belüftung Ethanol vermehrt produziert wird, kommt es bei einem zu viel an Luft zu einem zu üppigen Wachstum der Biomasse. Hierbei fließt zu wenig Stoffwechselenergie in die Produktion von Erythritol [KIM KA et al., 2000].

Die Belüftung der Fermentationsbehälter geschieht entweder aktiv durch Zufuhr von Luft ins Medium oder, wenn keine Möglichkeit zur externen Belüftung besteht, durch die Aufnahme von Sauerstoff aus der Luft. Hierzu wird die Schüttelfrequenz der Behältnisse angepasst. Je höher die Frequenz ist, desto mehr Gasaustausch findet statt und desto besser ist die Belüftung. [HAJNY et al., 1964]

In einer Studie von JEYA et al. [2009] wurde versucht eine erfolgreiche Fermentation mit der Mutante der Hefe *Pseudozyma tsukubaensis* mit dem Namen *KN75* vom Labormaßstab über einen Pilotversuch hin zur großtechnischen Fermentation anzupassen. Bei einer Mediumszusammensetzung von 30% Glucose und 1,5% Maisquellwasser wurden die höchsten jemals erzielten Werte für die maximale Erythritolkonzentration von 245 g/l, die Produktivität von 2,86 g/l/h und eine Ausbeute von 61% im Vergleich zur eingesetzten Glucose erzielt. Diese Ergebnisse konnten auch nach erfolgreichem Scale-up vom 7 Liter Fermenter über einen Pilotversuch im 300 Liter Fermenter bis hin zum großtechnischen 50.000 Liter Fermenter bestätigt werden. Als der entscheidende Faktor für das

Scale-up vom Labormaßstab bis hin zur industriellen Form konnte der Gehalt an gelöstem Sauerstoff ausgemacht werden. [JEYA et al., 2009]

Im Gegensatz zur aeroben Fermentation wird auch die Erythritolproduktion mittels anaeroben Organismen beschrieben. Es stellte sich heraus, dass bei der Fermentation durch das Bakterium *Leuconostoc oenos* das Verhältnis der entstehenden Produkte stark von der Belüftung des Mediums abhängt. Bei zu starker Sauerstoffzufuhr kommt es zu einer übermäßigen Produktion von Glycerin, was nachteilig für die Erythritolproduktion ist [VEIGA-da-CUNHA et al., 1992, 1993].

In einer Studie konnte festgestellt werden, dass *Aspergillus niger* unter bestimmten Umständen Erythritol produzieren kann. Wird der Pilz auf Xylose kultiviert und unter Sauerstofflimitierung gehalten, werden anstelle von Apfelsäure und Succinaten vermehrt Polyole, wie Erythritol, gebildet [MEIJER et al., 2007].

3.2.2 Batch, Fed-Batch und Repeated-Fed-Batch

Des Weiteren werden in der wissenschaftlichen Literatur Batch-Verfahren und Fed-Batch-Verfahren unterschieden [SAVERGAVE et al., 2011; MOON et al., 2010; und weitere]. Einer Fermentation, die mittels einmaligem Ansatz und Beimpfen gestartet und beendet wird, bezeichnet man als Batch-Verfahren. Bei der Erythritolproduktion in einem Fed-Batch-Verfahren wird die Fermentation gestartet und bei Erreichen einer bestimmten Zusammensetzung werden dem Medium weitere Zusätze beigemengt.

Es wird berichtet, dass bei der Fermentation mit Hilfe des Mikroorganismus *Trichosporon sp.* bei einem Repeated-Fed-Batch-Verfahren eine Produktivität von 1,86 g/l/h und eine Ausbeute von 45% erreicht wurden. Die Produktivität liegt damit um 23% und die Ausbeute um 15% über den berichteten Werten der Batch-Fermentation [PARK J et al., 1998].

In einer Untersuchung mit dem Ständerpilz *Basidiomycota Ustilago* konnte in einem Medium mit einer Glucosekonzentration von 20% und dem Zusatz von 1% getrockneter Fleischbrühe mittel Batch-Verfahren nach einer Fermentationszeit von 950 Stunden der Maximalwert für die

Erythritolkonzentration von 75 g/l und eine Ausbeute von 37,5% ermittelt werden. Nach Adaptierung zu einer kontinuierlichen Fed-Batch Fermentation konnte durch eine kontinuierliche Zugabe von 6-7% einer Glucoselösung nach 530 stündiger Fermentation die maximale Erythritolkonzentration auf 100 g/l und die Ausbeute auf 39,3% gesteigert werden [HIRATA et al., 1999].

In einer anderen Studie wurde ebenfalls an kontinuierlicher Fermentation geforscht. Als Fermentationsstamm diente die Mutante SN-G42 des Hefepilzes *Trichosporoniodes megachiliensis*. Über einen Zeitraum von 55 Tagen wurde kontinuierlich fermentiert, wobei man der aus dem Fermenter entnommenen Brühe die Hefezellen entnahm und wieder dem Fermentationsmedium zuführte. Durch dieses Zellrecycling konnte eine Produktivität von 3 g/l/h bei einer Ausbeute von 55% erreicht werden [SAWADA et al., 2002].

Bei einer Studie mit der Hefe *Torula sp.* [OH et al., 2001] konnten mittels Fed-Batch Verfahren hohe Mengen an Erythritol hergestellt werden. Zu Beginn hatte das Fermentationsmedium eine Glucosekonzentration von 300 g/l, wobei Phytinsäure als Phosphorquelle diente. Im Laufe des Prozesses wurde die Konzentration von Glucose im Medium mittels Zuführung auf 225 g/l reguliert, wodurch sich die Lagphasen der Hefen verkürzten. In dieser Fed-Batch Kultur mit einer Fermentationsdauer von 88 Stunden wurde schließlich eine Erythritolkonzentration von 192 g/l und eine Produktivität von 2,26 g/l/h gemessen. Die ErythritolAusbeute belief sich auf 48%. [OH et al., 2001]

In einer weiteren Studie wird ebenfalls zwischen einer Wachstums- und einer Produktionsphase unterschieden. Bei einer Zwei-Stufen Fed-Batch Fermentation mit der Hefe *Candida magnoliae* wird dem Fermentationsmedium Glucose in Pulverform beigemischt, sobald die Trockenzellmasse von 75 g/l erreicht wird. Die Zugabe von reiner Glucose erfolgt bis im Fermentationsmedium eine Konzentration von 40% herrscht. Diese Erhöhung des osmotischen Drucks stellt den Wechsel vom Wachstums- hin zum Produktionsmedium dar. Als maximale Werte für die Produktivität werden 2,8 g/l/h und für die Ausbeute 41% genannt. Diese ermittelten Zahlenwerte stellen eine 5fache Steigerung im Vergleich zu einer einfachen Batch-Fermentation dar. Ein Nachteil ergab sich jedoch aus der hohen

Glucosekonzentration im Produktionsmedium, so war die Entstehung von organischen Säuren, wie Zitronen- und Buttersäure begünstigt [RYU et al., 2000].

In einer Studie [BURSCHAEPERS et al., 2002] wird berichtet, dass eine Fermentation mit Hilfe der Hefe *Moniliella tomentosa var pollinis* in einem 30 Liter Rührkessel durchgeführt wurde. Die Fermentationen erfolgten mittels Batch und Fed-Batch-Verfahren. Bei der Batch Methode konnte im Fermentationsmedium eine maximale Erythritolkonzentration von 90 g/l und eine Ausbeute von 36% erreicht werden, wobei die Trockenzellmasse 65 g/l betrug. Bei der Fermentation im Fed-Batch Modus konnten die maximale Erythritolkonzentration auf 170 g/l und die Trockenzellmasse auf 126 g/l gesteigert werden. Die höchsten Werte dieser Studie konnten jedoch mittels Fermentation in einer 80 Liter Blasensäule erzielt werden. Bei einer Ausgangskonzentration von 500g Glucose pro Liter Medium wurde die maximale Trockenzellmasse von 65 g/l, eine maximale Erythritolkonzentration von 175 g/l und eine Ausbeute von 43% gemessen. [BURSCHAEPERS et al., 2002]

Nach Analyse der vorliegenden wissenschaftlichen Literatur kann festgestellt werden, dass die Fermentation mittels Fed-Batch Variante eine höhere Produktion von Erythritol zulässt als die Fermentation mittels ausschließlich einmaliger Befüllung des Fermenters (Batch) [HIRATA et al., 1999; SEO et al., 2001; LIN et al., 2010].

3.2.3 Temperatur

Auch die Temperatur während der Fermentation wird in den Studien immer wieder erwähnt. Sie unterscheidet sich je nach Methode und verwendetem Organismus. Die optimale Fermentationstemperatur wird in praktisch jeder Untersuchung entsprechend den Umständen ermittelt und muss daher jeweils spezifisch angepasst werden. Daher ist es nicht möglich von einer allgemeinen optimalen Temperatur zu sprechen. Die Bandbreite der Temperatur liegt aber üblicherweise in einem Bereich von ca. 28°C bis 35°C.

Ein Beispiel für eine Studie, die sich mit dem Einfluss der Temperatur auf die Erythritolproduktion beschäftigt hat, stammt bereits aus dem Jahr 1965 [HAJNY et al., 1965]. In der Untersuchung wurde mit der Hefe *Torula sp.* gearbeitet. Es hat sich gezeigt, dass bei einer Temperatur von 25-30°C das Hauptnebenprodukt Glycerin nur in geringem Maß synthetisiert wird. Mit steigender Temperatur lässt sich auch eine Zunahme des Zuckerumsatzes feststellen. Bei einer Temperatur von 35°C wird neben Erythritol auch eine große Menge an Glycerin produziert. Eine optimale Temperatur wurde mit 30°C ermittelt [HAJNY et al., 1965].

3.2.4 pH-Wert

In der Literatur wird auch auf den pH-Wert des Fermentationsmediums eingegangen. Es ist nicht ungewöhnlich, dass sich der pH-Wert des Mediums während der Fermentation ändert. Je nach Studie sind die Berichte über den pH-Wert des Fermentationsmediums unterschiedlich. Einerseits wird der pH-Wert einmalig vor der Fermentation eingestellt, bei anderen Studien wird der Wert auch während der Fermentationsdauer mittels Zusätzen streng reguliert. Je nach pH-Wert im Medium und verwendetem Mikroorganismus sind die entstehenden Produkte unterschiedlich [HATTORI und SUZUKI, 1974; KIM KA et al., 2000; LEE JK et al., 2000; RYMOWICZ et al., 2009].

Eine Studie aus dem Jahr 1972 beschäftigte sich mit der Produktion von Polyolen mit Hilfe der Hefe *Moniliella tomentosa*. Es stellte sich heraus, dass die Erythritolausbeute in einem Fermentationsmedium mit einem pH-Wert von 3,4 höher ist als bei einem pH von 6,4. [HANSEN et al., 1972]

Bei der Erythritolproduktion mit Hilfe der Mutante *Candida zeylanoides* KY 6166 stellte sich heraus, dass durch die externe Regelung des pH-Wertes die Art der Produkte verändert werden können. Die Hefe wurde in einem Medium kultiviert, welches 12 bis 15 C-Atome lange Alkane als Kohlenstoffquelle beinhaltete und eine Konzentration von 200 g/l aufwies. Der pH-Wert des Fermentationsmediums wurde unter 4 gehalten, wodurch es zu einer praktisch vollständigen Hemmung der Zitronensäuresynthese kam und dementsprechend mehr Erythritol produziert werden konnte. Dies konnte sowohl für Fermenter mit

einem Volumen von 5 Litern als auch für Volumina mit 300 Litern bestätigt werden. Die maximal erzielte Erythritolkonzentration betrug 180 mg/g, als Nebenprodukt konnten geringe Mengen an Mannitol ausgemacht werden. Die Ausbeute an Erythritol betrug, bezogen auf die verbrauchten Alkane, 90% [HATTORI und SUZUKI, 1974].

Untersuchungen mit dem acetat-negativem Bakterium *Yarrowia lipolytica* zeigten, dass der pH-Wert des Fermentationsmediums sowohl Erythritolproduktion als auch Ausbeute beeinflussen kann. Bei einem pH-Wert von 3 konnte eine Erythritolkonzentration von 170 g/l und eine Ausbeute von 56% ermittelt werden. [RYMOWICZ et al., 2009]

Eine Studie mit dem Mikroorganismus *Pseudozyma tzukubaensis* ermittelte einen für dieses Erythritolproduktionsvorhaben geeigneten pH-Bereich. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes wird für eine Fermentationstemperatur von 34°C ein optimaler Wert von 6 angegeben. [JEYA et al., 2009]

Auch in den Konidien von *Beauveria bassiana* konnte Erythritol nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 5-6 und einem AW-Wert von 0,999 wurde ein Erythritolgehalt von 3 mg/g Konidien gemessen. Dieser Wert stieg auf das 33fache an, als man *Beauveria bassiana* in einem Medium mit pH 4,5 und einem AW-Wert von 0,95 kultivierte [TAROCCO et al., 2005].

3.3 Untersuchungen zu Enzymen der verwendeten Organismen

Im Zuge der Forschungstätigkeit zu Erythritol erkannte man, dass man, nach Entschlüsselung der Stoffwechselvorgänge in den erythritolproduzierenden Organismen, gezielt auf die beteiligten Enzyme einwirken kann. In den Studien werden dabei immer wieder die Enzyme Transketolase und vor allem die Erythrosereduktase genannt. Diese beiden Enzyme haben eine entscheidende Rolle in der Erythritolproduktion. Sie erfüllen ihre Aufgaben vor allem im Pentosephosphatweg, in welchem im letzten Schritt Erythritol entstehen kann.

3.3.1 Erythrosereduktase

Die Erythrosereduktase ist eine NAD(P)H-abhängige Aldose-Reduktase und wird in der Literatur häufig als ein beziehungsweise das Schlüsselenzym bei der biotechnologischen Herstellung von Erythritol bezeichnet. So findet man in der wissenschaftlichen Literatur Studien die sich mit der Extraktion von Erythrosereduktase aus den unterschiedlichsten Organismen beschäftigen. [BRAUN und NIEDERPRUEMER, 1969; ISHIZUKA et al., 1992; TOKUOKA et al., 1992; LEE JK et al., 2002; OOKURA et al., 2005; OOKURA und KASUMI, 2007].

Bereits im Jahr 1969 konnten Braun und Niederpruemmer [BRAUN und NIEDERPRUEMER, 1969] bei der Untersuchung des Stoffwechsels in *Schizophyllum commune* eine Reduktase erkennen, die in Gegenwart von D-Erythrose ihr Maximum an Aktivität erreichte. Als pH-Wert mit der höchsten Aktivität der Erythrosereduktase wurde 7 ermittelt. Bei der Kultivierung in einem Medium mit Kohlenstoffquelle entstanden die beiden Produkte Erythritol und NADPH. [BRAUN und NIEDERPRUEMER, 1969]

Im Jahr 1992 isolierte Ishizuka [ISHIZUKA et al., 1992] eine Erythrosereduktase aus den Zellen eines für seine hohe Erythritolproduktion bekannten Stammes. Dieser Mikroorganismus war eine Mutante des Schimmelpilzes *Aureobasidium sp.*. Die Erythrosereduktase wurde mittels chromatographischer und anderer Trennverfahren aufgereinigt. Beschrieben wird sie mit einem Molekulargewicht von 37 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,8. Die reduzierende Aktivität wurde mithilfe von D-Erythrose bestimmt und weist bei einem pH von 6,5 und einer Temperatur von 45°C ihr Maximum auf. [ISHIZUKA et al., 1992] Eine andere Untersuchung im gleichen Jahr kam zu ähnlichen Ergebnissen [TOKUOKA et al., 1992]. Bei der Untersuchung des Stammes *Aureobasidium sp. SN-G42* konnten 3 Formen von Erythrosereduktasen gefunden und isoliert werden. Diese 3 Iso-Formen hatten leicht verschiedene Eigenschaften bzw. Optima. Das Molekulargewicht wurde mittels SDS-PAGE (Natriumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ermittelt und betrug für Ery-Red-1 38 kDa, für Ery-Red-2 und Ery-Red-3 jeweils 37 kDa. Die ermittelten isoelektrischen Punkte der einzelnen Erythrosereduktasen betrugen für Ery-

Red-1 5,2, für Ery-Red-2 5,0 und für Ery-Red-3 4,8. Die 3 Formen der Erythrosereduktase verhielten sich in Bezug auf pH und Temperatur Optima ähnlich und wurden mit pH 6,5 und 45°C ermittelt. Die größten reduzierenden Aktivitäten zeigten sich bei allen 3 Enzymen auf Erythrose. [TOKUOKA et al., 1992]

Bei der Fermentierung mit dem Mikroorganismus *Torula sp.* konnte die Erythritolproduktion und die Ausbeute durch den Zusatz von Metallionen gesteigert werden. Dem Fermentationsmedium wurden Cu^{2+} Ionen in Form von 2mg Kupfer- und Mn^{2+} in Form von 10mg Mangansulfat beigemengt. Die Anwesenheit dieser Ionen ließ die Erythritolkonzentration im Medium sinken. Weiters stellte sich eine gesteigerte Aktivität der Erythrosereduktase ein, was auf die Anwesenheit von Cu^{2+} zurückzuführen war. Es kann gesagt werden, dass die Supplementierung des Fermentationsmediums mit Mn^{2+} zu einer Änderung der Permeabilität der Zellen führt und dass Cu^{2+} zu einer erhöhten Aktivität der Erythrosereduktase in den Hefezellen beiträgt. Durch einen Einsatz beider Elemente kommt es aufgrund von Synergieeffekten zu einer gesteigerten Erythritolproduktion. [LEE JK et al., 2000]

Bei der fermentativen Produktion von Erythritol mit Hilfe des Stammes *Torula sp.* wurde eine große Menge von sich anhäufenden Nebenprodukten beobachtet. Zur genaueren Untersuchung dieser Produkte setzte man eine mit UV-Detektor gekoppelte HPLC ein. Die Nachforschungen ergaben, dass es sich dabei um Fumarsäure oder Fumarate, welche die Salze der Fumarsäure sind, handelte. Es stellte sich heraus, dass bei steigender Supplementierung mit Cu^{2+} Ionen die Konzentration an Fumaraten sinkt, die an Erythritol jedoch zunahm. Aufgrund dieser Tatsachen wird vermutet, dass es bei der fermentativen Produktion von Erythritol zu einer Entstehung von Fumaraten kommt, diese aber mit der Zugabe von Cu^{2+} Ionen gesenkt werden kann. Somit kann gesagt werden, dass die Fumarsäure und ihre Salze (Fumarate) als starker Hemmer der Erythrosereduktase gelten. Der Mechanismus, wie die Fumarsäure die Erythrosereduktase beeinflusst oder behindert ist nicht genau bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. [LEE JK et al., 2002] Im Detail zeigte sich, dass bis zu einer Fermentationsdauer von 70 Stunden kaum ein Unterschied in

der Erythritolproduktion zwischen dem Einsatz von Cu^{2+} Ionen und der Fermentation ohne Cu^{2+} Ionen besteht. Erst ab einer Fermentationsdauer von 70 Stunden wird in dem mit Cu^{2+} versetzten Fermentationsmedium deutlich mehr Erythritol produziert. Die Trockenzellmasse verhält sich hingegen bei beiden Versuchen über die gesamte Fermentationsdauer von 150 Stunden ähnlich. Kupfer wurde in Form von 2mg Kupfersulfat (CuSO_4) pro Liter zugesetzt. [LEE JK et al., 2002] In der wissenschaftlichen Literatur findet man häufig Hinweise auf die Entstehung von beträchtlichen Mengen an Fumaraten bei der oxidativen Fermentierung von Glucose [MARGULIES und VISHNIAC, 1961; LEE JK et al., 2002]

Die Forschung zur Erythritolproduktion beschäftigt sich auch mit enzymkinetischen Parametern, mit denen eine Erythrosereduktase beschrieben werden kann. So wurden etwa für den Stamm *Torula corallina* die Messgrößen K_m (Michaelis-Konstante) und die $V_{\max}$ (maximale Umsatzgeschwindigkeit) ermittelt. Für die K_m wurde ein Wert von etwa 7,12mM bestimmt, die $V_{\max}$ wurde mit 26 mmol/min/mg Protein beziffert. [LEE JK et al., 2002] Für die Hefe *Candida magnoliae* wurden ein K_m -Wert von 7,9mM und eine katalytische Effizienz von 0,73katal ermittelt [LEE JK et al., 2003a]. Weiters zeigte sich, dass die Erythrosereduktase mit Co-Enzymen unterschiedlich reagiert. So wurde mit NADH (450 katal) eine deutlich höhere katalytische Effizienz als mit NADPH (5,5 katal) erreicht. [LEE JK et al., 2003a] Bei der Untersuchung der Mutante *JH110* der Hefe *Candida magnoliae* stellte sich hingegen heraus, dass NADPH gegenüber NADH das favorisierte Co-Enzym ist [LEE DH et al., 2010]. Es wurde ermittelt, dass die Erythrosereduktase für die optimale Aktivität Verbindungen benötigt, die eine Schwefel-Wasserstoff-Gruppe (R-SH) enthalten [LEE JK et al., 2003a]. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Erythrosereduktase durch Cu^{2+} und Quercetin gehemmt wird [LEE JK et al., 2003a]

In einer anderen Studie wurde die Erythrosereduktase aus der Mutante *KFCC-11023* der Hefe *Candida magnoliae* isoliert. Die Molekulargewichte wurden mittels SDS-PAGE und GPC (Gel-Permeations-Chromatographie) ermittelt. Die detektierten Molekulargewichte betrugen 38,8 kDa und 79 kDa. Das Verhältnis

dieser beiden Molekulargewichte lässt auf ein Homodimer schließen. Die Erythrosereduktase von *Candida magnoliae* katalysiert die Reduktion von verschiedenen Aldosen, jedoch ist die Erythrose jene mit der größten Affinität. [LEE JK et al., 2003a]

Bei der Untersuchung der Mutante *KCCM-10171* der Hefe *Torula corallina* konnten Molekulargewichte der Erythrosereduktase von 35,4 kDa und 71 kDa ermittelt werden. Diese Verteilung der Molekulargewichte könnte ebenfalls die auf ein Dimer der Erythrosereduktase hindeuten. Dieses Enzym kann unter NAD(P)H Verbrauch sowohl Erythrose reduzieren, als auch Erythritol oxidieren. Für die Reduktion liegen die Optima für Temperatur und pH-Wert bei 40°C und 6,0. Für die Oxidation bei 45°C und einem pH-Wert von 8,0. Die Affinität der Erythrosereduktase für Erythrose wird mit 7,12 mmol/l (K_m) angegeben. Aufgrund der Tatsache, dass die Spezifität dieses Enzyms so hoch ist und keine anderen Polyole synthetisiert werden, könnte die hohe Erythritolausbeute des untersuchten Stammes erklärt werden. [LEE JK et al., 2003c]

Eine andere Studie beschäftigt sich ebenfalls mit einer Mutante der Hefe *Candida magnoliae*. In dieser Untersuchung wurden die Gensequenz und die funktionellen Eigenschaften dieser neuen NAD(P)H abhängigen Erythrosereduktase der Mutante *JH110* veröffentlicht. Das Gen dieser neu erforschten Erythrosereduktase hat eine Länge von 849 Nukleotiden und codiert ein Polypeptid mit einem errechneten Molekulargewicht von 31,4 kDa. Die ermittelte Aminosäuresequenz der Erythrosereduktase zeigt ein hohes Maß an Ähnlichkeit gegenüber den anderen Aldo-Keto-Reduktasen. So auch gegenüber den 3 Erythrosereduktase-Iso-Enzymen von *Trichosporonoides megachiliensis* SNG-42⁶. Die Optima für Temperatur und pH-Wert dieser neuen Erythrosereduktase liegen bei 42°C und bei 5,5. [LEE DH et al., 2010] In einer weiteren Studie konnte das gesamte Genom von *Candida magnoliae* entschlüsselt werden. Man erstellte eine Art „Übersichtskarte“ vom Proteom der Hefe und analysierte die Proteine mittels zweidimensionaler Elektrophorese, Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit

⁶ Die Erythrosereduktase dieses Mikroorganismus wird in der Studie von Ookura et al., *Primary Structure Analysis and Functional Expression of Erythrosereduktase from Erythritol-producing Fungi (Trichosporonoides megachiliensis SNG-42)* beschrieben [OOKURA et al., 2005].

Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS), Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) und dem Abgleich mit bestehenden Datenbanken. [KIM HJ et al., 2004] Die Entschlüsselung des Proteoms von erythritolproduzierenden Organismen ermöglicht es den Kohlehydratstoffwechsel genauer zu erklären und eventuelle Stoffwechselwege vorauszusagen. [PARK YC et al., 2005]

Es stellte sich heraus, dass es bei der Fermentation mit dem Stamm *Torula corallina* zu einer Anreicherung des Mediums mit Melanin kommt. In Folge dessen kann es bei der Gewinnung und Aufreinigung von Erythritol zu Problemen kommen. In Studien [LEE JK et al., 2003b; MOON et al., 2010] wurden Stoffe untersucht, die die Biosynthese von Melanin behindern. Als solche wurden 3,4-Dihydroxyphenylalanin und 1,8-Dihydroxynaphtalen-Melanin-Hemmer verwendet. Nur der Zusatz von DHN-Melanin-Hemmern zeigte einen hindernden Effekt. Unter den DHN-Melanin-Hemmern war Azocyclotin (Tricyclazol) der wirkungsvollste Zusatz. Mit dem Einsatz von Azocyclotin konnte die Produktion von DHN-Melanin signifikant gesenkt werden. Die Erythrosereduktase war von Azocyclotin nicht beeinflusst, wodurch sich eine erhöhte Erythritolproduktion messen ließ. [LEE JK et al., 2003b; MOON et al., 2010]

3.3.2 Transketolase

Eine Studie [SAWADA et al., 2009] untersuchte den Stoffwechsel einer Mutante (SN-G42) des in der großindustriellen Erythritolproduktion verwendeten Mikroorganismus *Trichosporonoides megachiliensis*. Um die Produktionsmechanismen und eventuelle Schlüsselenzyme herauszufinden wurde der Stamm mit verschiedenen Kultivierungsmethoden untersucht. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass viele der gefundenen Enzyme Bestandteile des Pentosephosphatwegs sind. So wurden etwa die Enzyme Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Gluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase und Erythrosereduktase erkannt. Es zeigte sich, dass nach Beendigung des Zellwachstums die Enzyme des Pentosephosphatweges deutlich aktiver waren als die des Zitronensäurezyklus (Tricarbonsäurezyklus, TCA). Es stellte sich ein direkter Zusammenhang

zwischen der Aktivität der Transketolase und der Produktion von Erythritol heraus. Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Erythritol hauptsächlich über den Pentosephosphatweg synthetisiert wird, in welchem die Transketolase ein Schlüsselenzym sein könnte. [SAWADA et al., 2009] Auch *Pichia farinosa* kann unter Glucoseverbrauch Polyole, wie Erythritol bilden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die bei der Synthese beteiligten Enzyme, wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transaldolase und eine Polyol-Dehydrogenase, Bestandteile des Pentosephosphatweg sind. [HOOTMANN et al., 1991]

3.4 Suche nach neuen Mikroorganismen, Isolierung aus der Umgebung

Eine weitere bedeutende Möglichkeit, die Erythritolproduktion effizienter und letztlich wirtschaftlicher zu gestalten, stellt die Suche nach neuen erythritolproduzierenden Mikroorganismen dar. In der Literatur findet man mehrere Ansätze für das Suchen und Finden neuer erythritolproduzierender Stämme. [ISHIZUKA et al., 1989; PARK YC et al., 2005] Da Erythritol in vielen Mikroorganismen nachgewiesen werden konnte, gestaltet sich auch die Suche nach den begehrten Mikroorganismen vielfältig. Hat man Mikroorganismen gefunden, gilt es diese aus ihrem Umfeld zu isolieren und in Reinkultur zu bringen. In speziellen „Aufzuchtmedien“ wird ausreichend Biomasse erzeugt um gezielte Forschungen anzustellen. Zum Teil wird in den Studien auch versucht den isolierten Stamm einer Gattung zuzuordnen [SEO et al., 2001]. Dies geschieht hauptsächlich durch Untersuchungen von DNA Sequenzen [JEYA et al., 2009]. Aber auch durch Untersuchungen mittels Phylogenie und der Physiologie der neu isolierten Stämme [JEYA et al., 2009].

In einer Studie wurde Schlamm aus einer Region in Korea untersucht. Dabei wurden 1037 Stämme von Mikroorganismen aus der Umwelt isoliert. Die Mikroorganismen wurden auf einem speziellen Kartoffel-Dextrose-Agar-Nährmedium (PDA) kultiviert und für 3 Tage inkubiert. Danach wurden die sich morphologisch unterscheidenden Kolonien in ein Nährmedium mit 400g Glucose und 10g Hefeextrakt pro Liter überführt und für 5 Tage bei 30°C und

einer Schüttelfrequenz von 200 rpm bebrütet. Es stellte sich heraus, dass von den 1037 Stämmen 21 in der Lage waren Erythritol zu produzieren. Einer dieser Stämme vermochte auch in einem Medium mit hohem osmotischen Druck zu wachsen und Erythritol zu produzieren. Beschrieben werden kann der Stamm durch seine Fähigkeit sich asexuell durch „Budding“ (Knospung) zu vermehren und dadurch, dass er auf die Anfärbung mit Diazonium Blau B negativ reagiert. Durch phylogenetische und physiologische Analysen zeigte sich, dass der Stamm zur Spezies *Pseudozyma tsukobaensis* gehört. Benannt wurde er mit KN75. Unter aerober Kultivierung in einem Glucosemedium konnte mittels Fed-Batch-Verfahren eine Produktivität von 2,86g Erythritol pro Liter pro Stunde und eine Ausbeute von 61% erreicht werden. Diese Werte stellen die höchsten jemals berichteten Ergebnisse in Bezug auf Erythritolproduktion dar. [JEYA et al., 2009]

In einer anderen Studie wurden Mikroorganismen aus Honig isoliert. Es stellte sich heraus, dass es sich bei einem gefundenen osmophilen Mikroorganismus um einen hefeähnlichen Pilz von *Moniliella* sp. mit dem Namen 440 handelt. Bei der Fermentation in einem Medium mit 40% Glucose und 1% Hefeextrakt konnte eine Erythritolkonzentration von 113 g/l erreicht werden. Dieser neu isolierte Stamm wurde in weiterer Folge erfolgreich mutiert. Die entstandene Mutante erhielt den Namen N61188-12. Bei der Fermentation im oben genannten Medium konnte eine maximale Erythritolkonzentration von 237,8 g/l gemessen werden, was eine Steigerung von 110% gegenüber dem Ausgangsstamm bedeutet. [LIN et al., 2010] Auch andere Studien beschreiben die Isolierung erythritolproduzierender Keime aus Honig. [LIN et al., 2001; PARK YK et al., 1996]

Dass erythritolproduzierende Stämme auch von Pollen und Bienen isoliert werden können, beschreibt z.B. eine Studie aus Taiwan. Es wurden 26 unterschiedliche Mikroorganismen isoliert, von denen 6 Erythritol produzierten. Das beste Fermentationsmedium setzte sich aus 30% Glucose und 1% Hefeextrakt zusammen. Nach einer Fermentationsdauer von 144 Stunden konnten Erythritolkonzentrationen zwischen 90,9 und 116,4 g/l ermittelt werden.

Die jeweilige Ausbeute der einzelnen Stämme wird mit mehr als 30% angegeben. [LIN et al., 2001]

In einer weiteren Untersuchung beschäftigte man sich mit einem von Pollen isolierten Mikroorganismus. Während der Kultivierung in einem Glucosemedium stellte sich heraus, dass der neue Mikroorganismus Erythritol produzieren konnte. Bei einer Glucosekonzentration von 20% und dem Zusatz von 1% getrockneter Fleischbrühe konnten aus dem Fermentationsmedium nach 950h die Maximalwerte für Erythritolkonzentration von 75 g/l und eine Ausbeute von 37,5% ermittelt werden. Nach der Untersuchung der gesamten rRNA des neu isolierten Stamms konnte mit 99,5%iger Sicherheit gesagt werden, dass es sich um einen Mikroorganismus der Gattung *Ustilago* vom Stamm *Basidiomycota* handeln müsse. Durch eine kontinuierliche Gabe von 6-7% einer Glucoselösung konnte nach 530 stündiger Fermentation die maximale Erythritolkonzentration auf 100 g/l und die Ausbeute auf 39,3% gesteigert werden. [HIRATA et al., 1999] Auch eine andere Studie [PARK YK et al., 1996] beschreibt das Isolieren erythritolproduzierende Keime von Pollen und auch aus Honig. Von 1753 untersuchten Stämmen konnten 43 Polyole, wie Erythritol, fermentativ herstellen. Mit 6 von diesen ließen sich hohe Ausbeuten erzielen. [PARK YK et al., 1996]

Bereits im Jahr 1964 [HAJNY et al., 1964] wurde in einer Studie von der Isolierung neuer erythritolproduzierender Stämme berichtet. In der angeführten Untersuchung erfolgte die Isolierung der Stämme aus Bienenstöcken, aus Honig aus Brutbienenwaben, aus Pollen, die auf Bienenwaben gefunden wurden und aus frischen Kleeblüten in der näheren Umgebung der Bienenstöcke. [HAJNY et al., 1964]

Auch in einer anderen Untersuchung wird die Isolierung von potentiellen Mikroorganismen aus Bienenwaben beschrieben. Unter den vielversprechendsten wurden auch Hefen der Gattung *Candida magnoliae* sp. erkannt. [SEO et al., 2001] Auch der hochproduktive osmophile Hefestamm *Candida magnoliae* JH110 wurde ursprünglich aus Honigwaben isoliert [LEE DH et al., 2010]. Des Weiteren wurden auch die beiden sehr erfolgreich Erythritol produzierenden Stämme *Trichosporonoides* sp. 150-5 und 331-1 von

Honigwaben isoliert. Bei der Fermentation in einem Glucose- oder Saccharosemedium konnte Erythritol als einziges Polyol nachgewiesen werden; Glycerin entstand nur in Spuren. [AOKI et al., 1993]

Eine andere Studie zeigt, dass man erythritolproduzierende Mikroorganismen auch am Boden finden kann. Lee und Lim isolierten vom Boden unter Getreidegarben den Schlauchpilz *Penicillium* sp. KJ81, welcher im Saccharosemedium Erythritol produzieren konnte. [LEE KJ und LIM JY, 2003]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analyse der wissenschaftlichen Literatur zur Isolierung neuer erythritolproduzierender Stämme zeigt, dass vor allem Mikroorganismen, die aus der näheren Umgebung von Bienen – sei es Bienenhonig, Bienenwaben, Pollen oder Blüten einzelner Pflanzen – erfolgreich isoliert werden konnten und sich für die fermentative Erythritolproduktion eignen. In anderen Studien wird jedoch auch von der erfolgreichen Isolierung von Keimen aus Schlamm oder Böden berichtet.

3.5 Mutation und Selektion

Eine wichtige Methode die Erythritolproduktion zu steigern liegt darin neu isolierte oder bereits vorhandene Stämme durch Mutation produktiver zu machen. Diese Mutation wird mittels chemischer Substanzen, sogenannter Mutagene oder durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht erreicht [ISHIZUKA et al., 1989; LEE KJ und LIM JY, 2003; LIN et al., 2010; MOON et al., 2010; SAVERGAVE et al., 2011]. Hierbei erfolgt die Mutation rein zufällig. Es kann nicht eine bestimmte Eigenschaft des Mikroorganismus gezielt verändert werden. Eine Mutationsrunde ist daher nicht immer erfolgreich und benötigt deshalb auch immer ein passendes Screening. Die Mutanten werden nach erwünschten Eigenschaften ausgewählt und weiter optimiert. In der Literatur findet man gewünschte Eigenschaften beschrieben. So soll eine Mutante gegenüber dem Wildstamm bei gleichen Bedingungen mehr Erythritol erzeugen. Andere erwünschte Eigenschaften sind z.B. eine erhöhte Osmotoleranz oder die Reduktion von Nebenprodukten. [YANG et al., 1999; LEE KJ und LIM JY, 2003; KOH et al., 2003; MOON et al., 2010]

Um die Erythritolproduktion durch *Penicillium sp. KJ81* zu erhöhen wurde in einer Studie der verwendete Stamm durch Behandlung mit NTG (auch MNNG; N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso Guanidine) und UV (ultraviolett) Bestrahlung mutiert. Unter den gescreenten Mutanten zeigte ein Stamm keine morphologischen Veränderungen und hatte gegenüber dem Wildstamm 3 entscheidende Vorteile. Die entstandene Mutante mit dem Namen *Penicillium sp. KJ-UV29* war ihrem Ausgangsstamm in punkto Erythritolproduktion, Schaumbildung und Nebenproduktbildung überlegen. So produzierte *Penicillium sp. KJ-UV29* bei gleichen Fermentationsbedingungen deutlich mehr Erythritol als der Wildstamm. Des Weiteren bildete sich bei der Fermentation kein hinderlicher Schaum und schließlich entstand bei der Fermentation mit der neuen Mutante signifikant weniger Glycerin. Die Produktion von Erythritol und Glycerin betrugen bei *Penicillium sp. KJ-UV29* 15,1 g/l und 6,1 g/l. Unter den gleichen Bedingungen produzierte der Wildstamm nur 11,7g Erythritol pro Liter und jedoch 19,4g Glycerin pro Liter. Es zeigte sich, dass Saccharose die wirkungsvollste Kohlenstoffquelle unter optimalen Bedingungen darstellte. Die höchste Produktivität wurde in einem Medium mit 30% Saccharose erreicht, jedoch vermag die Mutante auch bei einer Saccharosekonzentration von 70% Erythritol zu produzieren. Durch den Zusatz von Ammoniumcarbonat und Kaliumnitrat konnte die Erythritolproduktion signifikant gesteigert werden. Unter optimalen Bedingungen synthetisierte die Mutante *Penicillium sp. KJ-UV29* schließlich 45,2g Erythritol pro Liter. [LEE KJ und LIM JY, 2003]

Bereits im Jahr 1989 versuchte man bekannte erythritolproduzierende Mikroorganismen erfolgreich zu mutieren. So mutierte man den Stamm *Aureobasidium sp. SN 124A* mittels NTG und UV Behandlung. Als erfolgreichste Mutante wurde *SN G42* gescreent. Auch diese neue Mutante wies in mehreren Punkten gegenüber dem Ausgangsstamm verbesserte Eigenschaften auf. Zum einen konnte in einem Medium mit 22,5% Glucose eine Ausbeute von 47,6% erzielt werden, die des Ausgangsstammes belief sich lediglich auf 41,8%. Zum anderen konnte auch in einem Medium mit 47% Glucose eine höhere Ausbeute von 37,3% im Gegensatz zu 14,2% erreicht werden. Weiters belief sich die maximale Erythritolkonzentration durch die neue

Mutante auf 164,8 g/l. Der Elternstamm erreichte lediglich 110g Erythritol pro Liter. Schließlich war das Schäumen im Fermentationsmedium der Mutante deutlich unterdrückt. [ISHIZUKA et al., 1989]

Auch in einer weiteren Studie [SAVERGAVE et al., 2011] wird beschrieben, dass durch Mutation eine Verbesserung der erythritolproduzierenden Eigenschaften eines Keims erreicht wurde. So screenete man nach der NTG Behandlung und UV Bestrahlung der Hefe *Candida magnoliae* eine osmophile Mutante mit vielversprechenden Eigenschaften. In einem Medium aus Glucose und Hefeextrakt vermochte die Mutante R23 60,3g Erythritol pro Liter zu produzieren, der Elternstamm dagegen lediglich 14 g/l. Mittels Fed-Batch-Verfahren und in einem optimalen Medium bestehend aus 23,8% Glucose, 0,92% Hefeextrakt, 0,516% KH_2PO_4 und 0,023% MgSO_4 konnte eine maximale Erythritolkonzentration von 87,8 g/l und eine Ausbeute von 31% erreicht werden, wobei keine Nebenprodukte gefunden wurden. Diese Werte stellen eine 6,2fache Steigerung in der Erythritolproduktion und eine 3,4fache der Ausbeute gegenüber dem Ausgangsstamm dar. [SAVERGAVE et al., 2011]

In einer anderen Studie konnte ebenfalls die Hefe *Candida magnoliae* erfolgreich mutiert werden. In dieser Untersuchung konnte vielversprechend vom Labormaßstab upgescaled werden. Unter optimalen Bedingungen wurde eine Erythritolkonzentration von 200 g/l, eine Produktivität von 1,2 g/l/h und eine Ausbeute von 43% erreicht. [KOH et al., 2003]

Von der erfolgreichen Mutation der Hefe *Moniliella sp. 440* mittels NTG wird in einer anderen Studie berichtet. Bei der Fermentation in einem Medium mit 40% Glucose und 1% Hefeextrakt wurde mit der Mutante N61188-12 eine maximale Erythritolkonzentration von 237,8 g/l erreicht. Im Gegensatz dazu produzierte der Wildstamm lediglich 113g Erythritol pro Liter. Die Erythritolproduktion konnte mit Hilfe der neuen Mutante daher um 110% gesteigert werden. [LIN et al., 2010]

In den Studien zur Verbesserung der erythritolproduzierenden Mikroorganismen durch Mutationen wird auf die Steigerung der Erythritolproduktion, die Produktivität und Ausbeute, auf die Verminderung der Nebenprodukte, das Vermögen bei hohem osmotischem Druck zu produzieren und auf eine geringe

Neigung zu Schaumbildung hingearbeitet. Zahlreiche Studien können von erfolgreichen Mutationsversuchen bewährter oder neu isolierter Mikroorganismen berichten, die diese Kriterien erfüllen konnten [BRAUN und NIEDERPRUEMER, 1969; ISHIZUKA et al., 1992; TOKUOKA et al., 1992; YANG et al., 1999; SEO et al., 2001; RAO et al., 2006; RYMOWICZ et al., 2008, 2009; MOON et al., 2010].

4 Fragestellung

Die vorliegende Forschungsarbeit untersteht der Fragestellung, wie die Produktion von Erythritol optimiert werden kann.

Die Optimierung der Erythritolproduktion muss in diesem Fall jedoch in Relation zu den Bedingungen begriffen werden, unter denen die Produktion stattfindet.

Durch die Kooperation mit einem Unternehmen, das Erythritol großtechnisch herstellt, und das die Diplomarbeit begleitet, konnte ein Set an Möglichkeiten definiert werden, in dem die Produktion verstanden werden muss. Auf Basis der gegebenen Voraussetzungen wird der Begriff „optimal“ relational definiert.

So muss bedacht werden, dass im vorliegenden Fall nicht ausschließlich das Erreichen bestmöglicher Zahlenwerte bzgl. Produktivität, Ausbeute oder maximale Erythritolkonzentration zur Bilanzierung einer optimalen Produktion herangezogen werden darf. Dies würde wirtschaftliche Aspekte außer Acht lassen, die bei industrieller Produktion eine gewichtige Rolle spielen.

In Studien zur Erythritolproduktion wird häufig Hefeextrakt als Zusatz zum Fermentationsmedium verwendet. Es wird hinsichtlich Ausbeute und Produktivität als „optimale“ Stickstoffquelle bei Versuchen im Labormaßstab gehandelt. Trotz der hervorragenden Eigenschaften von Hefeextrakt bei geringen Mengen, eignet es sich nicht für die industrielle Produktion von Erythritol, da es zu hohe Kosten verursacht.

Ein weiteres Beispiel für den Rahmen, innerhalb dessen die Schritte zur Annäherung an die Fragestellung gesetzt werden konnten, bezieht sich auf die Kohlenstoffquelle. In der wissenschaftlichen Literatur wurden die Eigenschaften von reiner Glucose als Kohlenstofflieferant gelobt. Glucose kann für die vorliegende Forschung aber nicht als einzige C-Quelle dienen. Statt von einem synthetisch hergestellten Fermentationsmedium muss von einer großtechnisch wirtschaftlichen Alternative, nämlich einem Hydrolysat aus dem ganzen Maiskorn, ausgegangen werden, das im Unternehmen als Standard eingesetzt wird.

Zur Erreichung des Ziels, die Erythritolproduktion zu optimieren bzw. zu steigern, stand unter den gegebenen Voraussetzungen einerseits die Erzeugung einer vielversprechenden Mutante eines erythritolproduzierenden

Organismus' zur Verfügung. Andererseits konnte auf das Fermentationsmedium eingewirkt werden, indem mögliche Zusätze zu der bereits verwendeten Rezeptur auf ihre Wirtschaftlichkeit und Produktivität hin untersucht wurden.

5 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird der empirische Forschungsablauf in seiner tatsächlichen Gestaltung erläutert. Es wird auf die Rahmenbedingungen sowie auf die konkreten Methoden und auf das Material eingegangen, das im Forschungsverlauf zur Anwendung kam.

5.1 Rahmenbedingungen der Forschung

Die vorliegende Untersuchung wurde unter spezifischen Rahmenbedingungen vorgenommen, die im Folgenden im Detail ausgeführt werden.

5.1.1 Forschungskontext

Die Forschung fand im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Jungbunzlauer Austria AG in Pernhofen im Jahr 2011 statt. Das Unternehmen ermöglichte dem Diplomanden ein Forschungspraktikum mit permanenter Anwesenheit im Jungbunzlauerwerk in Pernhofen, in dessen Rahmen die externe Betreuung der Diplomarbeit übernommen wurde. Veranschlagt war ein Forschungszeitraum von 7 Monaten.

5.1.2 Aussagenreichweite

Ziel der Erkenntnisproduktion war es die innerhalb der Kooperation mit der Firma Jungbunzlauer Austria AG genannte Aufgabenstellung zu erfüllen. Im Rahmen der Forschungsarbeit wurden offerierte Fragestellungen bearbeitet. Dies ermöglichte dem Diplomanden eine gezielte Ausrichtung der Arbeitsschritte und somit eine stufenweise Annäherung an die Aufgabe der Forschungsarbeit.

5.1.3 Forschungsbedingungen

Die Firma Jungbunzlauer Austria AG produziert Erythritol im großtechnischen Maßstab. Die Forschungsarbeit wurde in den Räumlichkeiten der Abteilung Produktentwicklung im Jungbunzlauerwerk Pernhofen durchgeführt. Im

Rahmen dieses Praktikums war der uneingeschränkte Zugang zu umfassender Laborausstattung, was sowohl Gerätschaften, Chemikalien und Räumlichkeiten betrifft, gegeben. Ebenso bestand die Möglichkeit auf bereits bestehendes Wissen und vorhandene Ressourcen aufzubauen. Die hervorragende Unterstützung durch den externen Betreuer beinhaltete sowohl Vorschläge und Anleitungen zu Versuchen als auch Hilfestellungen bei Problemen.

5.2 Forschungsablauf

Monat	Tätigkeit	Beschreibung	Dimension
1. Monat	Literaturrecherche; Theorie der Mutation; Versuche zu Medium und Belüftung; Dokumentation der Daten	Versuche zu unterschiedlichen Glucosekonzentrationen des Ganzkornmais-Hydrolysat (GKMH); Versuche zu Belüftung über das Füllvolumen der Fermentationseinheit (Mikrotiterplatte, Kolben)	Mikrotiterplatten; Kolben
2. Monat	Mutationsrunde; Screenen von neuen Mutanten; Bestimmung der Generationszeit einer Mutante; Dokumentation der Daten	Erste Mutationsrunde; ein vorhandener Keim (<i>Moniliella pollinis</i>) wird mittels N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG, MNNG) mutiert; Bestimmung der Generationszeit einer neuen Mutante	Mikrotiterplatten; Kolben
3. Monat	Vergleich der Mutanten mit bewährten Keimen im Hauptkulturmedium; Dokumentation der Daten	Bewährte, vorhandene Keime werden mit den vielversprechendsten Mutanten im Hauptkulturmedium (GKMH inkl. N-Quelle) verglichen	Mikrotiterplatten; Kolben
4. Monat	Vergleich der Mutanten mit bewährten Keimen unter verschiedenen Bedingungen; Dokumentation der Daten	Vergleiche finden unter verschiedenen Bedingungen statt: Vorkultur (VK); Glucosekonzentration, pH-Wert und Belüftung der Hauptkultur (HK)	Kolben
5. Monat	Vergleich der Mutanten mit bewährten Keimen unter verschiedenen Bedingungen; Versuche zu Vorkultur und Hauptkultur; Dokumentation der Daten	Vergleiche finden unter verschiedenen Bedingungen statt: Vorkultur; Glucosekonzentration, pH-Wert und Belüftung der Hauptkultur; Versuche zu VK und HK: Konzentration der VK, Menge des Inoculums	Kolben
6. Monat	Mutationsrunde; Screenen von neuen Mutanten; Versuche zu Zusätzen zum Fermentationsmedium; Dokumentation der Daten	Weitere, deutlich umfangreichere Mutationsrunde, diesmal unterschiedliche Konzentrationen an NTG; deutlich umfangreicheres Screenen der Mutanten; Versuche zur Optimierung des HK-Mediums durch div. Versuchsreihen	Kolben
7. Monat	Vergleich der Mutanten mit bewährten Keimen unter verschiedenen Bedingungen; Versuche zu Zusätzen zum Fermentationsmedium; Dokumentation der Daten	Bewährte, vorhandene Keime werden mit den vielversprechendsten Mutanten der 2. Mutationsrunde im Hauptkulturmedium (GKMH inkl. N-Quelle und anderer Zusätze) verglichen; Versuche zur Optimierung des HK-Mediums durch div. Versuchsreihen	Kolben; Fermenter

5.3 Bestimmung der Generationszeit von *Moniliella pollinis*

Als eine wichtige Maßnahme im Vorfeld eines Mutationsversuches gilt die Ermittlung der Generationszeit des verwendeten Hefestammes. Mit der Generationszeit wird der Zeitraum bezeichnet, in welchem sich die Mikroorganismen einmal teilen und es in Folge dessen zu einer Verdoppelung der Biomasse kommt. Durch das Bestimmen der Generationszeit kann das Alter einer Kultur vorausgesagt werden. Dieses Erkenntnis ist vonnöten, da gewährleistet werden muss, dass sich eine am Vortag beimpfte⁷ Kultur am Folgetag noch in der Wachstumsphase befindet. Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass die Hefen beim Zusatz des Mutagens in einem möglichst „fitten“ Zustand sein sollen. Eine als „fit“ bezeichnete Kultur hat die anfängliche Lag-Phase⁸ im neuen Medium bereits überwunden und befindet sich noch in der Wachstumsphase. Es wurde angenommen, dass eine sich im Wachstum befindende Kultur „fitter“ sei als eine, die sich in der folgenden Produktionsphase befindet. Das vermehrte Vorkommen von jungen Hefen soll das Überleben einiger Zellen nach der Behandlung mittels NTG gewährleisten.

Die Ermittlung der Generationszeit eines Stammes soll in einem möglichst klaren und wenig trüben Medium erfolgen, da zur Bestimmung der Biomasse neben dem Auszählen mittels Neubauer-Zählkammer vor allem die Messung der optischen Dichte (OD) zum Einsatz kommt. Das Messen der OD hat den Vorteil, dass es schnell und unkompliziert vonstattengeht. Die Analyse der OD wird bei einer Wellenlänge von 600nm durchgeführt (OD₆₀₀).

Zur Bestimmung der Generationszeit der Hefe *Moniliella pollinis* wurde ein Medium bestehend aus 10% Glucose und 1% Hefeextrakt hergestellt. Als Wasser wurde Mischbettwasser (entionisiert) verwendet. Die Lösung wurde bei

⁷ **Beimpfen:** Kulturmedien wurden wie VK-Medien mit 1ml Inoculum beimpft. Versuche, bei denen mit einem anderen Volumen beimpft wurde, werden extra ausgewiesen.

⁸ Als Lag-Phase wird der Zeitraum nach dem Beimpfen bezeichnet, in dem die Zellen weder wachsen noch Erythritol produzieren, sondern sich „an das neue Medium gewöhnen“. Erkennen kann man eine Lag-Phase am anfänglich verzögerten Wachstum der Biomasse.

121°C für 30 min. autoklaviert⁹. Nach der Abkühlung des Wachstumsmediums wurde dieses mit einer einen Tag alten Kultur beimpft. Die Probenahmen fanden in den ersten 8 Stunden alle 2 Stunden statt. Die letzte Probe wurde nach 24 Stunden genommen. Bei jeder Probenahme wurde dem Medium 1 Milliliter entnommen. Nachdem das gewonnene Medium 1:20 verdünnt wurde, wurde die OD₆₀₀ bestimmt und mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Keime ausgezählt.

Es wurde ermittelt, dass die Generationszeit von *Moniliella pollinis* im oben genannten Medium knapp unter 4 Stunden beträgt.

Aus den gewonnenen Daten konnte für die vorliegende Forschung geschlossen werden, dass sich eine am Nachmittag des Vortages beimpfte Kultur am folgenden Vormittag noch in der Wachstumsphase befindet und somit „fit“ genug für eine Mutation unter den oben genannten Gesichtspunkten ist.

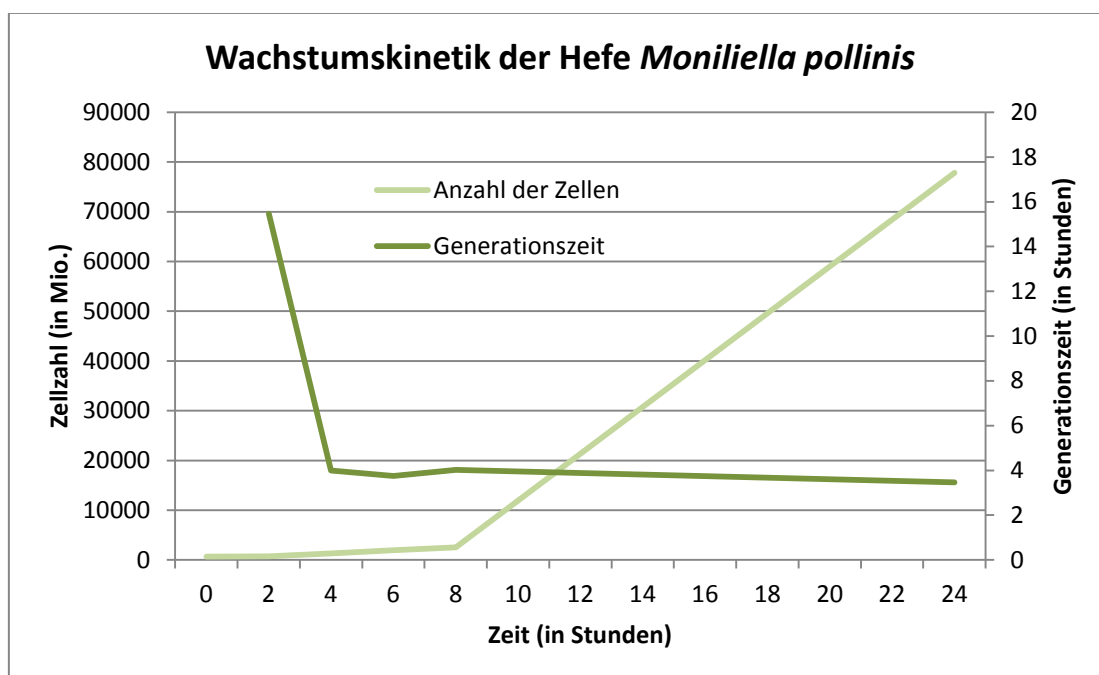


Abb. 5 Wachstumskinetik der Hefe *Moniliella pollinis*

⁹ **Autoklavieren:** Alle verwendeten Kulturgefäße, Gerätschaften, welche in Kontakt mit einer zu untersuchenden Kultur kamen, sowie Nährmedien (VK, HK) und Chemikalien wurden bei 121°C für 30min im gesättigten Dampf autoklaviert. Wurde eine Chemikalie nicht autoklaviert, sondern etwa sterilfiltriert, wird dies jeweils beim entsprechenden Versuch angeführt. Wurde ein Schüttelkolben autoklaviert, so wurde dieser nicht nur mit Filmulin, sondern auch mit handelsüblicher Aluminiumfolie verschlossen. Dieser Zusatz sollte ein völliges Durchnässen des unterhalb liegenden Zellstoffs verhindern.

In Abbildung 5 lässt sich der Generationszeit der Hefe *Moniliella pollinis* erkennen. Sie beträgt nach Überwindung der Lag-Phase (nach etwa 4 Stunden) knapp unter 4 Stunden. Zwischen Stunde 8 und 24 wurde keine Probe genommen. Daher lässt sich der tatsächliche Verlauf der Kurve (exponentiell) nicht naturgetreu wiedergeben.

5.4 Mutieren mittels NTG (MNNG)

Im die Forschungsarbeit begleitenden Unternehmen wird Erythritol mit Mutanten der Hefe *Moniliella pollinis* großtechnisch erzeugt. Das verwendete Fermentationsmedium wurde bereits für die verwendeten Mutanten angepasst. In einem ersten Schritt zur Optimierung der Erythritolproduktion musste daher eine neue Mutante aus einem bestehenden und bewährten Stamm erschaffen werden.

5.4.1 Vorbereitungen zum Mutieren

Für das Mutieren mittels N-Methyl-N'-Nitro-Nitrosoguanidin (NTG oder MNNG) sind einige Vorbereitungen zu treffen. Neben der oben erwähnten Bestimmung der Generationszeit des zu mutierenden Stammes und folglich dem Bereitstellen einer im Wachstum befindlichen Hefekultur gilt es mehrere Lösungen herzustellen. So muss etwa eine NTG Stocklösung hergestellt werden, um die gleichmäßige Verdünnung des Mutagens zu gewährleisten. Weiters wird neben einem Natriumcitrat- auch ein Kaliumphosphatpuffer benötigt.

Vorbereiten einer Kultur, deren Zellen mutiert werden sollen

Am Vortag wird ein Nährmedium mit 10% Glucose und 1% HE hergestellt. 100ml dieser Lösung werden in einen 500ml Weithalsschüttelkolben¹⁰ überführt und mit Filmulin und handelsüblicher Silberfolie verschlossen. Das Wundauflagematerial sorgt später dafür, dass der Gasaustausch des inkubierten Schüttelkolbens gewährleistet ist. Die Silberfolie soll hingegen verhindern, dass sich das Filmulin beim Autoklavieren vollständig mit Wasser ansaugt. Anschließend wird der verschlossene Kolben bei 121°C für 30min autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wird der Kolben mit 1ml einer Kultur eines bewährten Stammes der Hefe *Moniliella pollinis* beimpft. Am Vormittag des Folgetages steht somit eine optimale, sich im Wachstum befindende Kultur zur Verfügung.

Herstellen eines Natriumcitratpuffers (0,1 M)

Das Molgewicht von Zitronensäure beträgt 192,13g, das von NaOH 40g. Der pH Wert des Natriumcitratpuffers soll auf ca. 5,5-5,7 eingestellt werden. So wurden 1,93g CAA (Zitronensäure Anhydrat) eingewogen, das entspricht ca. 0,1 mol/100ml. Um das gewünschte Gesamtvolumen von 100ml nicht nennenswert zu überschreiten, wird die benötigte Menge an NaOH errechnet, die gebraucht wird um einen pH von 7 einzustellen. Der pH-Wert soll mit einer 1,0 M NaOH eingestellt werden. Tatsächlich wurden 27,38ml der 1 M NaOH verbraucht um einen pH Wert von 5,6 zu erreichen. Die Pufferlösung wurde mit Mischbettwasser (entionisiert) auf 100ml aufgefüllt und anschließend in einer 100ml Laborglasflasche autoklaviert.

Für das Waschen der Hefezellen wurden für die Mutation 3ml pro Ansatz dieses Puffers benötigt. Im vorliegenden Fall waren es 12 Ansätze, welche sich aus

¹⁰ **Schüttelkolben:** Während der gesamten Forschungszeit dienten Weithalsschüttelkolben mit einem Volumen von 500ml als das Mittel der Wahl. Wurde bei einem Versuch ein anderer Schüttelkolben verwendet, so wird das für jeden Versuch separat angeführt. Beispielsweise wurden beim Screenen nach dem Mutieren aufgrund der großen Anzahl an benötigten Schüttelkolben auf jene mit 100ml zurückgegriffen. Verschlossen wurden die verwendeten Kolben durch in passende Quadrate geschnittenes Filmulin. Dieser Zellstoff, welcher eigentlich als Wundaufgabe dient, gewährleistete einen passenden Gasaustausch zwischen dem Kolbeninneren und der Umgebung. Mikroorganismen und Schmutz konnten dadurch hingegen nicht in den Kolben eindringen. Befestigt wurde der Zellstoff mittels handelsüblichen Gummiringen. Vor dem Autoklavieren wurde zusätzlich noch eine handelsübliche Aluminiumfolie über das Filmulin gegeben.

der Anzahl der Zeitpunkte der Probenahmen (0'-30'-60'-100') und der Anzahl der unterschiedlichen NTG Konzentrationen ergaben. Es waren 4 Zeitpunkte bei 3 unterschiedlichen NTG Konzentrationen (40, 50, 60µg NTG/ml), was gesamt 12 Ansätze ergab. Gesamt wurden also 36ml Natriumcitratpuffer für das Mutieren und weitere 45ml für das dreimalige Waschen der Hefezellen vor dem Mutieren benötigt.

Anzumerken ist, dass auch für die Herstellung der NTG-Lösung ein Natriumcitratpuffer benötigt wird. (Siehe dazu *Herstellen der NTG-Lösung*, Seite 64)

Herstellen eines Kaliumphosphatpuffers (0,1 M)

Das Molekulargewicht von Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) ist 174,18g, das Molekulargewicht von Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) beträgt 136,09g. Von den beiden Salzen werden jeweils 0,01mol eingewogen und mit 100ml Mischbettwasser aufgefüllt, wodurch ein Puffer mit pH 7 hergestellt wurde. Die Einwaagen (EW) betragen für K_2HPO_4 1,7481g und für KH_2PO_4 1,3603g. Die EW wird auf 100ml aufgefüllt suspendiert und anschließend autoklaviert. Für das Waschen der Hefezellen wurden für die Mutation 2ml pro Ansatz dieses Puffers benötigt. Was bei 12 Ansätzen in Summe 24ml Kaliumphosphatpuffer ausmacht.

Herstellen der NTG-Lösung

Zur Herstellung der NTG-Stocklösung wird NTG in 0,1M Natriumcitratpuffer gelöst. Die NTG Konzentration sollte etwa 1mg/ml Natriumcitratpuffer betragen. Es wurden 18,24mg NTG eingewogen, da das NTG aber, um Staubentwicklung zu vermeiden, leicht benetzt ist, enthält die Einwaage nur zu 97% reines NTG. Die gelb-orange erscheinenden Kristalle werden mit 20ml 0,1M Natriumcitratpuffer suspendiert. Da sich NTG nur schwer in (kaltem) Wasser löst, wird der Lösungsprozess mit Hilfe eines Magnetrührers beschleunigt. Sobald sich die Kristalle aufgelöst haben, wird die Lösung mittels Einwegspritze

und Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert (Porengröße 0,22µm) und in 40 Eppis¹¹ zu je 500µl abgefüllt. Somit hat man für folgenden Mutationsrunden immer die gleiche Konzentration an NTG zur Verfügung. 500µl NTG-Lösung erscheint als viel, da man bei den geplanten Mutationen, zu je 3 Ansätzen, 30-60-100min jeweils nur 120-150µl (je Ansatz 40-60µl) benötigt. Jedoch soll man auf etwaige Wiederholungen oder dergleichen vorbereitet sein und zusätzlich kann man jederzeit, so es die Absterbekinetik erfordert, die Mutationsrunden auf 4 (20-40-60-80 min) oder mehr Ansätze ausdehnen. Alle nicht sofort benötigten NTG-Eppis werden bei -40°C tiefgefroren.

Vorbereiten einer 10%igen Glucose und 1% Hefeextrakt (HE) Lösung:

Für die Herstellung von einem Kilogramm dieses Mediums werden 110g Glucose-Monohydrat und 10g HE eingewogen. [Anmerkung: 1mol Glucose-Monohydrat hat eine Masse von 198g; zusammengesetzt ist diese aus 1mol Glucose (180g) und 1mol H₂O (18g)]. Die beiden Feststoffe werden mit Hilfe eines Magnetrührers mit Heizfunktion in 880g Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Diese Lösung dient einerseits als Medium der heranwachsenden Hefen vor der Mutation und andererseits um die Hefezellen nach dem Mutieren und Waschen mittels Kaliumphosphatpuffer wieder zu resuspendieren. In weiterer Folge dient es auch als Hauptbestandteil der Verdünnungsreihen nach dem Mutationsvorgang. Im Falle von Zeitmangel zwischen dem Waschen zu den einzelnen Zeitpunkten an denen die Einwirkdauer des NTGs unterbrochen werden muss, können die Hefezellen nach dem zweimaligen Waschen mit Kaliumphosphatpuffer für eine gewisse Zeit in diesem Medium verbleiben, wo sie sich dann ein wenig von der Einwirkung des Mutagens „erholen“ können.

5.4.2 Mutieren inkl. Absterbekinetik

Als Mutagen wurde NTG verwendet. Diese Chemikalie hat die Eigenschaft die Nukleinbasen Guanin und Thymin zu alkylieren und wirkt daher mutierend.

¹¹ Eppi ist die im Laborjargon gebräuchliche Kurzform für ein Mikroreaktionsgefäß der Firma Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz. Die in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendeten Eppis hatten ein Volumen von 1,5ml.

Vor Beginn des eigentlichen Mutationsvorgangs wird von der Kultur vom Vortag unter sterilen Bedingungen die OD_{600} bei verschiedenen Verdünnungen bestimmt. Empfohlen wird eine Bestimmung bei den Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:20 und 1:50, wobei jeweils mit Mischbettwasser zu verdünnen ist. Die Kulturlösung muss so verdünnt oder konzentriert werden, dass eine Verdünnung mit einer OD_{600} von 2 entsteht. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass 1ml einer Hefelösung mit der OD_{600} von 2 etwa $1 \cdot 10^8$ Keime enthält. Mit folgender Formel lassen sich die gesuchten Größen errechnen:

$$x * \frac{V}{y} = Vb$$

x = gewünschter Wert für OD_{600} (in diesem Fall 2)

y = OD_{600} -Wert, den die vorliegende Suspension hat

V = gewünschtes Volumen (ml) von der Lösung der gewünschten OD_{600} (in diesem Fall x=2)

Vb = benötigtes Volumen (ml) der vorliegenden Suspension (mit OD_{600} von y)

Die Hefekultur vom Vortag wurde 1:50 verdünnt, wobei eine OD_{600} von 0,537 gemessen werden konnte. Für den Mutationsversuch werden bei Probenahmen zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (0', 30', 60', 100') bei 4 unterschiedlichen NTG Konzentration (0, 40, 50, 60µg NTG/ml) mindestens 12ml einer Suspension mit einer OD_{600} von 2 benötigt ($3 \cdot 4 + 1 = 13$), wobei es leichtsinnig wäre keine Reservemenge einzuplanen. Im konkreten Fall wurden 15ml dieser Hefesuspension mit einer OD_{600} von 2 als für nötig erachtet. In die oben genannte Formel eingesetzt ergab das:

$$2 * \frac{15}{0,537} = Vb$$

Somit betrug das benötigte Volumen der vorliegenden Lösung aus der 1:50 Verdünnung 55,9ml, aufgerundet 56ml.

Diese 56ml der Hefesuspension ($OD_{600}=0,537$) wurden unter sterilen Bedingungen in ein Blue-Cap transferiert und bei 4000 rpm (revolutions per minute) für 4min zentrifugiert. Die Hefezellen finden sich zu einem Paket

gepresst am unteren Ende des Blue-Caps. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne die Hefezellen zu berühren, abgenommen. In weiteren Schritten wurde die Biomasse zweimal mit je 15ml des oben erwähnten Natriumcitratpuffers gewaschen, wobei die ebenfalls oben erwähnte Zeit (4min) und Drehzahl (4000) gleich blieben.

Nach dem 2. Waschen wurde das Zellpaket erneut mit 15ml des Natriumcitratpuffers resuspendiert und für etwa 1 Minute gevortext. Die so gut vermischte Lösung wurde nun nach folgendem Plan in Eppis verteilt:

Konzentration	Zeit			
	0 min	30 min	60 min	100 min
0µl NTG Lsg.	0µl NTG	0µl NTG	0µl NTG	0µl NTG
	1ml	1ml	1ml	1ml
40µl NTG Lsg.		40µl NTG Lsg.	40µl NTG Lsg.	40µl NTG Lsg.
		960µl	960µl	960µl
50µl NTG Lsg.		50µl NTG Lsg.	50µl NTG Lsg.	50µl NTG Lsg.
		950µl	950µl	950µl
60µl NTG Lsg.		60µl NTG Lsg.	60µl NTG Lsg.	60µl NTG Lsg.
		940µl	940µl	940µl

Abb. 6 Füllplan für das Mutieren mittels NTG

Entsprechend dem Plan wurden die Eppis mit den entsprechenden Volumina der vorbereiteten NTG-Lösung befüllt, so dass jedes Eppi einen Milliliter Inhalt aufwies. Die Behältnisse wurden noch unter sterilen Bedingungen verschlossen und bei 30°C leicht schüttelnd inkubiert.

Das Eppi, welches für 0min inkubiert wurde, wurde umgehend entnommen und unter weiterhin sterilen Bedingungen weiterverwendet.

Der entnommene Behälter wurde bei 14000 rpm für 3min zentrifugiert. Die Hefezellen waren erneut gepackt am unteren Ende des Eppis zu finden. Der Überstand wurde sorgsam abgenommen und verworfen. Die im Behältnis verbliebenen Zellen wurden mit 1ml des oben genannten Kaliumphosphatpuffers resuspendiert und kurz gevortext. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde die verbleibende Biomasse mit der oben genannten Glucoselösung (10% Glucose und 1% HE) resuspendiert und kurz gevortext. Diese Wasch- und

Resuspendierungstätigkeiten wurden auch mit den übrigen Mutations-Gefäßen durchgeführt. Beim Verwerfen der Überstände war jedoch auf die NTG-haltigen Flüssigkeiten zu achten. Diese wurden gesondert gesammelt, in den Abzug gestellt und mit einer verdünnten HCl-Lösung überdeckt, wodurch sich NTG zersetzt und giftige nitrose Gase bildet.

Mit den Hefelösungen aus den Eppis wurden folgende Verdünnungsreihen gemacht:

Verdünnung	1	1 zu 10	1 zu 100	1 zu 1.000	1 zu 10.000	1 zu 100.000	1 zu 1.000.000
Probe	Probe 0'						
entn. Vol.		10ul		10ul		100ul	100ul
Vor-Füllung			990ul		990ul	900ul	900ul
Probe		Probe 30'					
entn. Vol.			100ul	10ul		100ul	100ul
Vor-Füllung			900ul		990ul	900ul	900ul
Probe			Probe 60'				
entn. Vol.				10ul		100ul	100ul
Vor-Füllung					990ul	900ul	900ul
Probe				Probe 100'			
entn. Vol.					10ul	100ul	100ul
Vor-Füllung					990ul	900ul	900ul
erw. Zellzahl	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²

Abb. 7 Verdünnungsreihe nach dem Waschen der Hefezellen nach der Mutation

In der Abbildung wird schematisch dargestellt, wie die Verdünnung vonstattenging. Die grauen Felder symbolisieren die Eppsi mit den Hefekulturen nachdem sie mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen und in der Glucoselösung resuspendiert wurden. Die grünen Felder zeigen die Menge an Glucoselösung die in die entsprechenden Eppis vorgelegt wurde, wohingegen die gelben Felder das zu überimpfende Volumen darstellt. Die roten Felder zeigen die gewünschten Verdünnungen mit der erwarteten Anzahl von Keimen pro Milliliter. Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten galt es die Eppis ausreichend zu vortexen.

Das oben dargestellte Schema zeigt die Probenahmen zu den gewählten Zeitpunkten (0', 30', 60', 100'). Dieses Muster war für alle Mutationsansätze (unterschiedliche NTG-Konzentration) gültig.

Ermitteln der Absterbekinetik mittels Koch'schem Plattengußverfahren

Aus den Eppis [in Abb. 9 durch die roten Felder markiert], wurden 100ml entnommen und mittels Drigalskispatel auf vorbereiteten Agarplatten¹² gleichmäßig verteilt. Durch die Entnahme von 100ml kam es erneut zu einer 1:10 Verdünnung, wodurch eine realistische und zählbare Anzahl von Kolonien auf den Agarplatten zu erwarten war. Die bestrichenen Petrischalen wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Auf den ausgestrichenen Platten wurden 10^1 bis 10^3 Kolonien gefunden. Durch dieses Ergebnis konnten einige Hypothesen aus der Vorbereitung bestätigt werden. So zeigte sich, dass man mit der Annahme, dass sich bei einer OD_{600} von 2 etwa 10^8 Zellen in einem Milliliter Kulturmedium befinden, richtig lag. Weiters bestätigte sich die Annahme, dass eine 30 minütige Einwirkzeit einer NTG-Lösung bis zu 90% der Hefezellen absterben lässt. Auch die Annahme, dass nach sowohl 60 als auch 100 Minuten 99% der Keime abgestorben waren, konnte bestätigt werden.

Ausgezählt wurden nur Agarplatten auf denen sich zwischen 30 und 300 Kolonien befanden. Für die 3 unterschiedlichen NTG-Konzentrationen konnten folgende Absterbekurven ermittelt werden:

¹² **Agarplatten:** Die verwendeten Agarplatten wurden selbst hergestellt. Der Nährboden bestand aus dem zur Verfügung stehenden Maissirup, welcher mittels Rotavapor aufkonzentriert wurde, sodass er 30% Glucose enthielt. Aufgrund des hohen Glukosegehaltes und des niedrigen pH-Wertes von 4, mussten 2% Agar-Agar zum polymerisieren des Sirups verwendet werden. Die Bestandteile wurden unter leichtem Erwärmen mittels Magnetrührer gemischt. Das flüssige Medium wurde in Laborflaschen aus Borosilikatglas gefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das heiße und somit noch flüssige Agar im sterilen Umfeld mittels Dispenser in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9cm gefüllt. 20ml dieses Agars reichten aus um den Boden einer Petrischale angemessen zu bedecken. Nach dem Festwerden wurden die Platten mit dem Nährboden nach oben im Kühlraum gelagert.

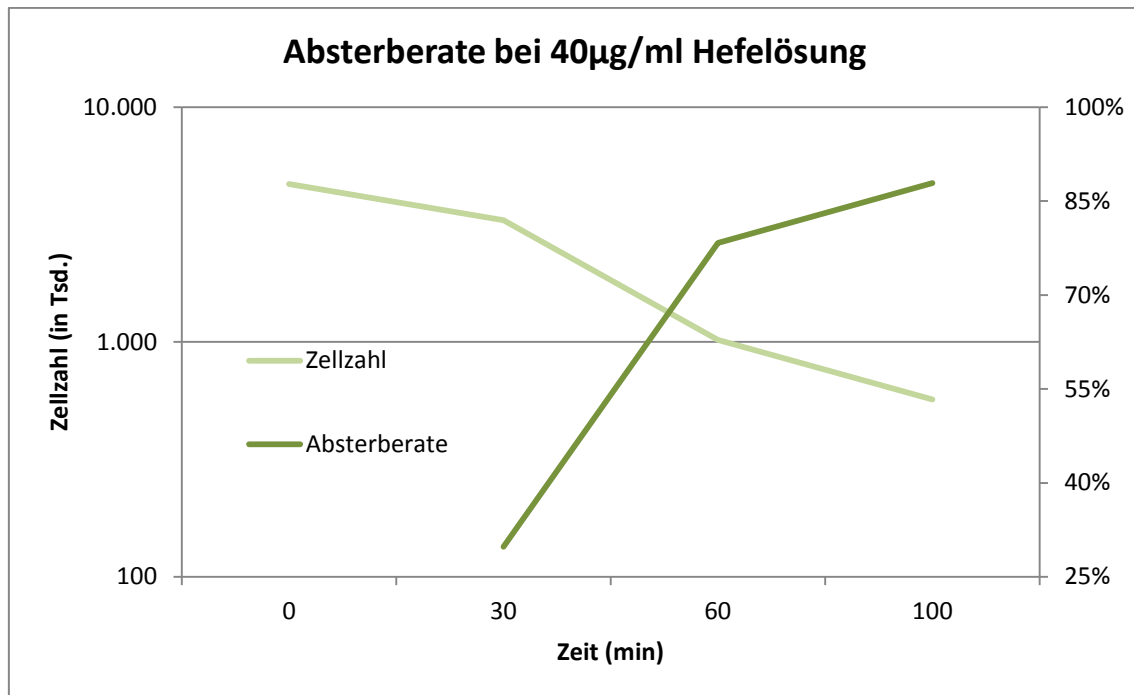


Abb. 8 Absterberate bei 40µg/ml Hefelösung

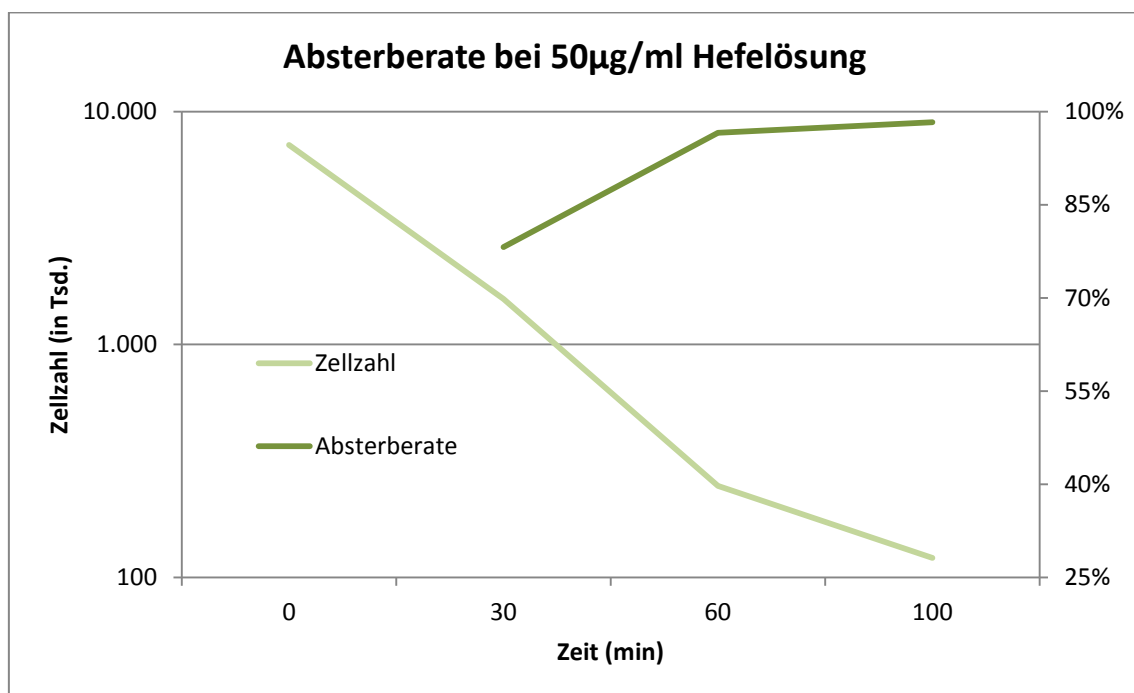


Abb. 9 Absterberate bei 50µg/ml Hefelösung

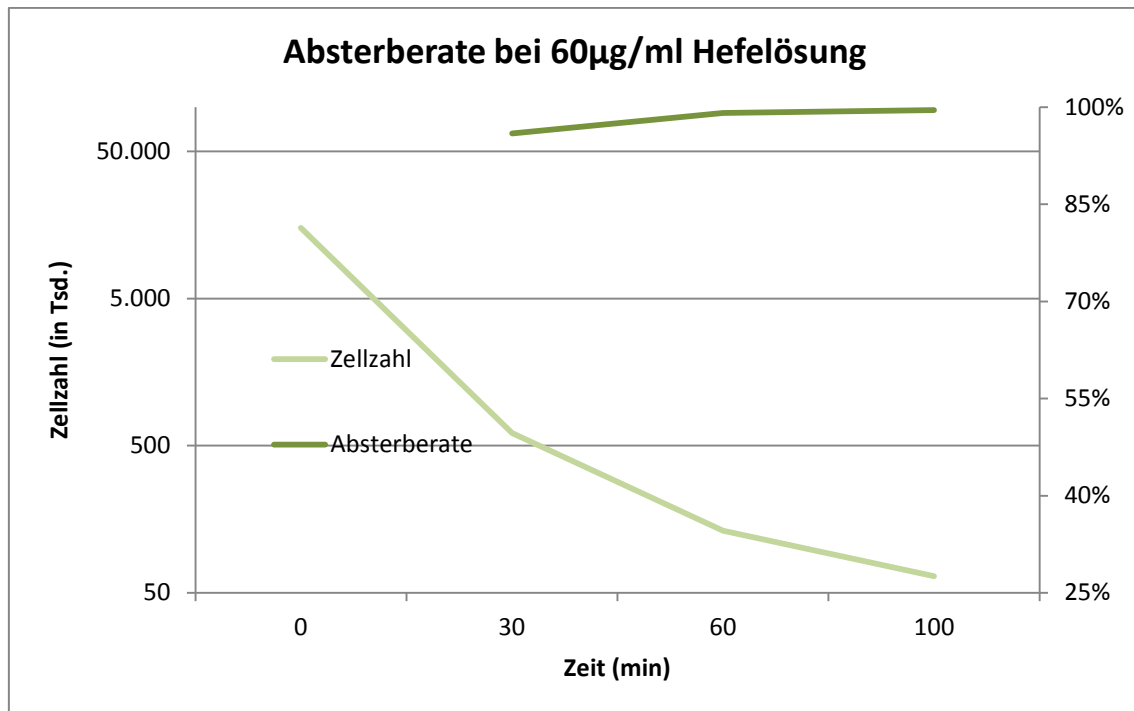


Abb. 10 Absterberate bei 60µg/ml Hefelösung

In den oben dargestellten Abbildungen lässt sich deutlich erkennen, dass sowohl durch den Einsatz einer höheren NTG-Konzentration, als auch durch die Verlängerung der Einwirkzeit von NTG eine höhere Absterberate erreicht wurde. Das Abflachen der Kurven zwischen der 60. und 100. Minute lässt darauf schließen, dass Zellen, die bis zur 60. Minute überlebt haben eher auch bis zur 100. Minute überleben, als jene zwischen der 30. und 60. Minute ist. In allen 3 Abbildungen lässt sich erkennen, dass, dass die allermeisten Zellen bis zur 30. Minute absterben.

5.4.3 Screenen und Selektieren der Mutanten

Nachdem die Kolonien auf den relevanten Platten ausgezählt waren, wurden sie erneut auf Agarplatten ausgestrichen und für weitere 3 Tage bei 30°C inkubiert. Durch diese Maßnahme konnte man ausschließen, dass eine Kolonie aus zusammenklebenden Zellen entstanden ist. Durch das weitere Ausstreichen konnte gewährleistet werden, dass eine sich bildende Kolonie nur aus einer Zelle hervorgegangen war. Aufgrund der Vielzahl an Petrischalen ist ein genauer und sorgsamer Umgang damit sicherzustellen, wobei vor allem auf

die genaue Bezeichnung der Platten zu achten war. Diese Maßnahmen mussten ergriffen werden, um eine eventuell erfolgreiche Mutante zu einem späteren Zeitpunkt eindeutig zurückverfolgen zu können. Nach dem Bebrüten wurden die Agarplatten gekühlt bei 5°C gelagert.

Nach den 3 Tagen wurden Kolonien ohne System gewählt und in einen 100ml Schüttelkolben mit Vorkulturmedium¹³ überführt. Die Kolben waren mit 16ml des VK-Mediums gefüllt. Die beimpften Kulturen wurden bei 32°C für 2 Tage mit einer Schüttelfrequenz von 200rpm bebrütet.

Nach den 2 Tagen wurden die Kulturen erneut in ein VK-Medium überimpft¹⁴. Bei diesen Kolben handelte es sich wieder um 100ml Schüttelkolben mit 16ml Füllung, inokuliert wurden jeweils 0,5ml.

Nach zweitägiger Bebrütung wurden mit den Vorkulturen Hauptkulturkolben¹⁵ beimpft. In diesem Fall setzte sich das HK-Medium aus dem zur Verfügung stehenden Maissirup (GKMH) mit einer Glucosekonzentration von 21%, Glucose-Monohydrat, mit welchem die Glucosekonzentration auf 25% aufgestockt wurde, 0,265% KNO₃ und 3ppm Thiamin-Hydrochlorid zusammen. Die HK-Kolben wurden für 4 Tage bei 32°C und 200rpm bebrütet. Pro Woche wurden 2 Chargen zu je 21 Kulturen bearbeitet. 20 dieser Kulturen waren mit

¹³ **Vorkultur:** Als Vorkultur bzw. Vorkulturmedium (VK) wird in dieser Untersuchung ein Fermentationsmedium bezeichnet, welches sich ausschließlich aus dem zur Verfügung stehenden Ganzkornmais-Hydrolysat (GKMH, Maissirup) zusammensetzt und keine Zusätze enthält. Aufgrund des unterschiedlichen Stärkegehaltes der Maiskörner konnte bei der Hydrolyse keine konstante Glucosekonzentration eingestellt werden. Somit betrug die Konzentration von Glucose in etwa 21%, war jedoch leichten Schwankungen von etwa 1% unterworfen. Der pH-Wert des Maissirups wurde bereits bei der Hydrolyse auf 4 eingestellt. Die VK dient dem Heranzüchten der Hefen. Nicht die Erythritolproduktion steht im Vordergrund, sondern das Heranwachsen und Vermehren der Biomasse.

¹⁴ **Überimpfen und Stammhaltung:** Parallel zu den Versuchen musste das Überleben der sich in Verwendung befindenden Hefekultur gewährleistet werden. Durch das tägliche Überimpfen der Stämme konnte sichergestellt werden, dass die benötigten Hefelösungen jederzeit vorhanden waren. Als Nährmedium dieser Kulturen wurde das VK-Medium ohne jegliche Zusätze verwendet. Das Volumen mit dem überimpft wurde betrug, wenn nicht anderes erwähnt immer 1ml, also etwa 1,25% des zu beimpfenden Mediums. Aufgrund der geringen Stickstoffmenge im VK-Medium war die Kultur auch nach 3 Tagen noch nicht am Ende der Fermentation angelangt d.h. es war noch genügend Restglucose im Medium vorhanden.

¹⁵ **Hauptkultur:** Als Hauptkultur bzw. Hauptkulturmedium (HK) wird in dieser Untersuchung ein Fermentationsmedium bezeichnet, welches sich vor allem aus dem zur Verfügung stehenden Ganzkornmais-Hydrolysat (GKMH) zusammensetzt aber Zusätze enthält. So bei einem Versuch nicht spezifisch anderes erwähnt, hat das HK-Medium eine Glucosekonzentration von etwa 25%. Diese Erhöhung der Glucosekonzentration wurde durch Aufkonzentrierung mit Hilfe eines Rotavapors erzielt. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des HK-Mediums ist eine Stickstoffquelle. Ist kein spezieller N-Zusatz genannt, so waren dem Medium 0,265% KNO₃ zugesetzt. Für die Berechnung der Ergebnisse wurde von jedem Ansatz eine Probe zum Zeitpunkt Null genommen und mittels HPLC analysiert. Dadurch ließ sich die genaue Glucosekonzentration ermitteln, welche etwa für die genaue Berechnung der Ausbeute von Nöten war.

Mutanten beimpft, eine Kultur pro Charge war als Referenz vorgesehen. Als Referenzstamm diente der Ausgangsstamm des Mutationsversuchs. Insgesamt wurden im Laufe der Mutationsrunde 160 Mutanten gescreent, wobei sich vor allem eine als interessant erwies. Dieser Mutante wurde der Name *DCR417* gegeben. Im Folgenden ist der Ansatz abgebildet, in welchem der *DCR417* entdeckt wurde. In der unteren Abbildung ist die Mutante noch mit dem Namen *M4 1-7* bezeichnet. Als Referenzkeim diente der Ausgangsstamm der Mutation mit der Bezeichnung als *M4 1-21*.

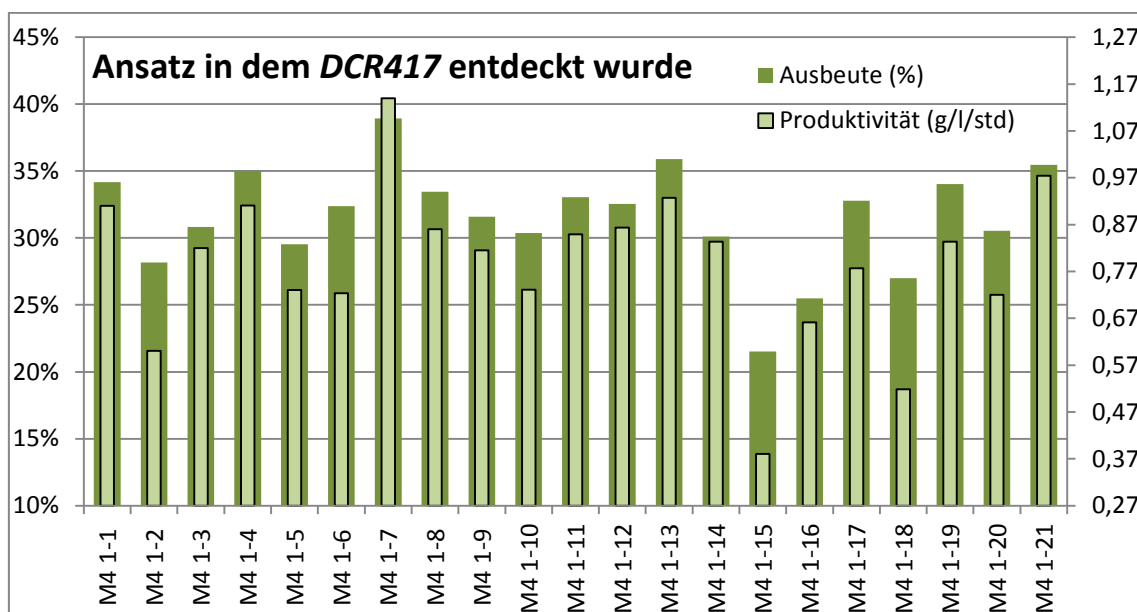


Abb. 11 Ansatz, in dem *DCR417* entdeckt wurde

5.5 Vergleich von Mutanten mit bewährten Stämmen

Verschiedene bewährte Fermentationsstämmen, die vom Unternehmen zur Verfügung gestellt wurden, sowie die vielversprechendsten Mutanten wurden in Versuchsreihen unter gleichen Bedingungen hinsichtlich ihrer Ausbeute und Produktivität bezüglich der Erythritolproduktion verglichen. Aus diesen vergleichenden Ministudien sollte eine Aussage über den Erfolg des Mutationsversuchs möglich werden. Ebenso dienen die Vergleiche dazu, die

erfolgversprechendste Mutante für die weitere Mediumsanpassung zu identifizieren. Hauptaugenmerk lag auf der Erythritolproduktion im HK-Medium. Einerseits wurden unterschiedliche Zusätze zum Fermentationsmedium beigemischt, wie etwa Vitamin B1 in Form von Thiamin-Hydrochlorid, zum anderen wurde untersucht, welche Auswirkungen es hat, wenn die Hefen in einem VK-Medium ohne zusätzliche N-Quelle herangezogen werden.

5.6 Versuchsreihen zur Optimierung des Mediums mit gewählter Mutante

Es wurden zahlreiche Versuchsreihen zur Ergründung optimaler Fermentationsbedingungen unternommen. Zum Einsatz kamen vor allem Versuche mittels Schüttelkolben, welche sich aufgrund des geringen Bedarfs an Medium und der Tatsache, dass man mehrere parallel durchführen kann, als praktisch erwiesen.

5.6.1 Schüttelkolbenversuche

Versuche mit Schüttelkolben folgten immer demselben Muster. Aufgrund empirischer Erkenntnisse empfahl es sich, das eingefüllte Volumen des Mediums von 100ml auf 80ml zu reduzieren. Dadurch konnte eine bessere Belüftung des Mediums garantiert werden, was sich in einer vermehrten Erythritolproduktion äußerte.

In Versuchen wurden den HK-Medien Zusätze in Form von Lösungen, etwa Mangan, Calcium oder Thiamin beigemischt. Entstanden in Bezug zu anderen Ansätzen der Versuchsreihe dadurch Volumensunterschiede, wurden diese durch den Zusatz von Mischbettwasser ausgeglichen, um in allen Kolben das gleiche Füllvolumen zu haben.

Die Kolben wurden bereits vor dem Autoklavieren mit dem Fermentationsmedium befüllt. Einzige Ausnahme bildete eine Versuchsreihe mit Thiamin, die den Unterschied zwischen der Zugabe von Vitamin B1 vor und nach dem Autoklavieren untersuchte.

In dieser Form wurden Versuche mit den Zusätzen: Kaliumnitrat, Natriumnitrat, Ammoniumnitrat, Calciumchlorid, Mangan(II)-Sulfat-Monohydrat, Thiamin-Hydrochlorid und Pyridoxin-Hydrochlorid vorgenommen.

Die Kolben wurden über die gesamte Fermentationsdauer mit 200rpm in Bewegung gehalten. Gleichzeitig belief sich die Fermentationstemperatur über die gesamte Versuchszeit konstant auf 32°C.

Die jeweiligen Probenahmen der einzelnen Kolben verliefen nach dem jeweils gleichen Schema. Im sterilen Umfeld wurde dem Kolben der Verschluss entfernt und mittels Kolbenhubpipette eine Probe von 1ml entnommen. Der über die Versuchsreihen entstandene Volumsverlust des Fermentationsmediums wurde in den Berechnungen von Ausbeute, Produktivität und Erythritolkonzentration berücksichtigt. Die Probe wurde in einen zuvor abgewogenen Erlenmeyerkolben überführt. Der Schüttelkolben wurde wieder verschlossen und zurück in den Kolbenschüttler gestellt. Nun wurde die Masse des Erlenmeyerkolben inkl. der Probe gemessen. Danach wurde der Kolben mit einer 0,01 N H_2SO_4 bis zur Ringmarke aufgefüllt und erneut die Masse gemessen. Dadurch ließen sich sowohl die Einwaage der Probe als auch jene der Verdünnung ermitteln. Der Erlenmeyerkolben wurde geschüttelt und mithilfe einer Einwegspritze mit Spritzenvorsatzfilter wurden etwa 1,5ml der Verdünnung in ein HPLC¹⁶ Vial gefüllt. Die Vials wurden gebördelt und, um den Innendruck abzubauen, für gewöhnlich mit einer Nadel beim Septum angestochen.

¹⁶ Der Standard der HPLC setzte sich aus folgenden Einwaagen zusammen:

HPLC-Standard - Einwagen			
Substanz	soll 0,25%	soll 0,5%	soll 0,75%
Maltose	0,2397g	0,4806g	0,7327g
CAA	0,2259g	0,5153g	0,7580g
Glucose	0,2569g	0,4562g	0,7003g
Fructose	0,2469g	0,5276g	0,7681g
Ribitol	0,2522g	0,5105g	0,7318g
Erythritol	0,3368g	0,5066g	0,7613g
Glycerin	0,2676g	0,5200g	0,7636g
Ethanol	0,2375g	0,5277g	0,7506g
Die dargestellten Zahlenwerte berücksichtigen bereits die Konzentration der eingewogenen Substanzen.			

Im Folgenden wurden die Vials auf den Sampler gestellt, Probenmasse und Masse der gesamten Verdünnung des Erlenmeyerkolbens eingegeben und die HPLC gestartet. Von den mittels HPLC gewonnenen Daten über die jeweilige Erythritolkonzentration der Verdünnung konnte auf die Konzentration an Erythritol in einem Schüttelkolben rückgerechnet werden.

Die Versuche erstreckten sich über einen Zeitraum von etwa 4 Tagen. Wobei vor allem das Vorhandensein der Restglucose im Fermentationsmedium als Anzeiger für die Beendigung der Versuche herangezogen wurde. Waren beispielsweise am 4. Tag der Fermentation in irgendeinem Ansatz nur mehr 1% oder weniger Glucose in der Kultur vorhanden, wurde der Versuch beendet. War hingegen noch reichlich Glucose vorhanden, wurde der Versuch fortgesetzt. Wenn sich herausstellte, dass ein Ansatz auch nach mehr als einer Woche nicht fertig werden würde, wurde der Versuch ebenfalls abgebrochen.

Folgende Daten wurden nach der Beendigung des Versuchs erhoben: die Masse des Schüttelkolbens inklusive Eigenmasse des Kolbens und die Masse des Fermentationsmediums; das Volumen des verbleibenden Mediums.

Zum Ermitteln der genauen Masse des verbliebenen Mediums wurde das Gewicht des gereinigten und gesäuberten Kolbens von der zuvor ermittelten gesamten Masse (Kolben, Inhalt) wieder abgezogen. Auf Basis der durch die HPLC festgestellten Konzentration an Erythritol und der dokumentierten Masse eines Kolbens ließ sich die Masse an Erythritol im jeweiligen Schüttelkolben ermitteln. Davon ausgehend war es möglich Aussagen zu Ausbeute und Produktivität der Mikroorganismen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen zu treffen.

6 Ergebnisse

Das vorliegende Kapitel liefert einen Überblick über die einzelnen Ergebnisse die im Lauf der empirischen Forschungstätigkeit ermittelt werden konnten.

Am Anfang der Versuchstätigkeit stand eine Vielzahl an Untersuchungen die der Einarbeitung in die Thematik dienten. Die Handhabung der spezifischen Laborgerätschaft sowie der optimale Ablauf von Untersuchungen musste in Basisversuchen gezielt herausgefunden und gefestigt werden. Da labortechnische Erfahrungswerte, etwa was Belüftung oder Verschlussarten mit Folien betraf, fehlten, halfen anfängliche Orientierungsversuche diesem Mangel Abhilfe zu schaffen und ihn durch praktische Sicherheit zu ersetzen. Ergebnisse dieser Versuche werden in diesem Kapitel nicht extra dargestellt.

An dieser Stelle ebenso ausgespart bleiben die Erkenntnisse, die bei der Bestimmung der Generationszeit sowie in den Mutationsrunden produziert werden konnten. Diese Versuche brachten Ergebnisse, die Bedeutung für das weitere Vorgehen im Forschungsverlauf hatten. Die Resultate dieser ersten Versuche wurden im Forschungsprozess berücksichtigt und verarbeitet. Sie wurden daher bereits im Methodenkapitel abgehandelt.

Im Zentrum dieses Ergebniskapitels stehen Erkenntnisse, die aus den Vergleichen der gefundenen Mutanten mit bereits bewährten erythritolproduzierenden Stämmen resultierten. Des Weiteren soll an dieser Stelle berichtet werden, welche Wirkung die Beimischung unterschiedlicher Zusätze zum Fermentationsmedium auf die Erythritolproduktion hatte. Die hier aufbereiteten Ergebnisse stellen eine Auswahl der unternommenen Untersuchungen dar. Sie bilden jeweils eine Zusammenfassung vollzogener Versuchsreihen ab, wobei die Versuchsbedingungen identisch waren. Nicht relevante Untersuchungen werden nicht extra dargestellt.

Aus den ermittelten Daten wurden Ausbeute und Produktivität unter Berücksichtigung der Verdunstung ermittelt. Bei Probennahmen zum Zeitpunkt 0 wurde pro Versuch die genaue Glucosekonzentration des Mediums festgestellt. Die Grobeinschätzung erfolgte mittels eines Refraktometers. Auf Basis des Brechungsindex wurde der Glucosegehalt der Fermentationslösung vor Beginn der Versuchsreihen grob auf 25% eingestellt. Die Ermittlung der

tatsächlichen Glucosekonzentration bei der ersten Probennahme zum Zeitpunkt 0 mit der HPLC ergab jedoch meist einen Wert zwischen 23% und 25%. Der Grund hierfür lag in der Trübe des verwendeten Mais-Hydrolysats. Der mittels HPLC ermittelte Glucosegehalt diente als Grundlage für die genauen Berechnungen von Ausbeute, Produktivität und Erythritolkonzentration.

Wichtig ist anzumerken, dass jeder Versuch mindestens in doppelter Ausführung erfolgt ist. Die in den Grafiken veranschaulichten Ergebnisse stellen einen gemittelten Wert aus den erhobenen Daten dar.

6.1 Vergleich von Hefestämmen

In den Versuchen zum Vergleich von Hefestämmen wurden zwei im Rahmen dieser Diplomarbeit gescreente Mutanten (*DCR01* und *DCR417*) mit bewährten und zum Teil in Produktion befindlichen erythritolproduzierenden Keimen verglichen. Weiters wurde die Auswirkung der Zugabe von Thiamin auf die Erythritolproduktion untersucht.

Das Fermentationsmedium setzte sich in diesem Versuch aus dem HK-Medium mit einer Konzentration von 23% Glucose und 0,265% KNO_3 zusammen. Bei den parallel durchgeführten Versuchen wurden jeweils 3ppm Thiamin-Hydrochlorid vor dem Autoklavieren zugegeben, das entspricht 0,24mg Thiamin pro Kolben. Die Fermentationszeit betrug 115 Stunden.

Bei der Fermentation ohne Thiamin kann man erkennen, dass die Stämme *BC95* und *30G019* weder bei der Produktivität noch bei der Ausbeute mit den anderen Hefestämmen mithalten konnten. Bei der Fermentation mit Thiamin konnte bei den Stämmen *BC95* und *30G019* eine Steigerung von Produktivität und Ausbeute erkannt werden. Die Erythritolproduktion der Stämme *90K014*, *DCR01* und *DCR417* blieben von der Thiaminzugabe praktisch unbeeinflusst, jedoch auf hohem Niveau. Erfolgreichster Stamm in der Versuchsreihe mit Thiamin war die Mutante *DCR417* mit einer Produktivität an Erythritol von 1,025 g/l/h und einer Ausbeute von 46%.

Aus den Ergebnissen des vorliegenden Versuchs muss geschlossen werden, dass Thiamin keinen nennenswerten Einfluss auf Ausbeute und Produktivität der untersuchten Stämme hat. Die Bedeutung von Thiamin blieb dabei unter

den Erwartungen. Als mögliche Erklärungen dafür wurde vermutet, dass das Thiamin die Temperaturen des Autoklavierens nicht schadlos überstanden hat.

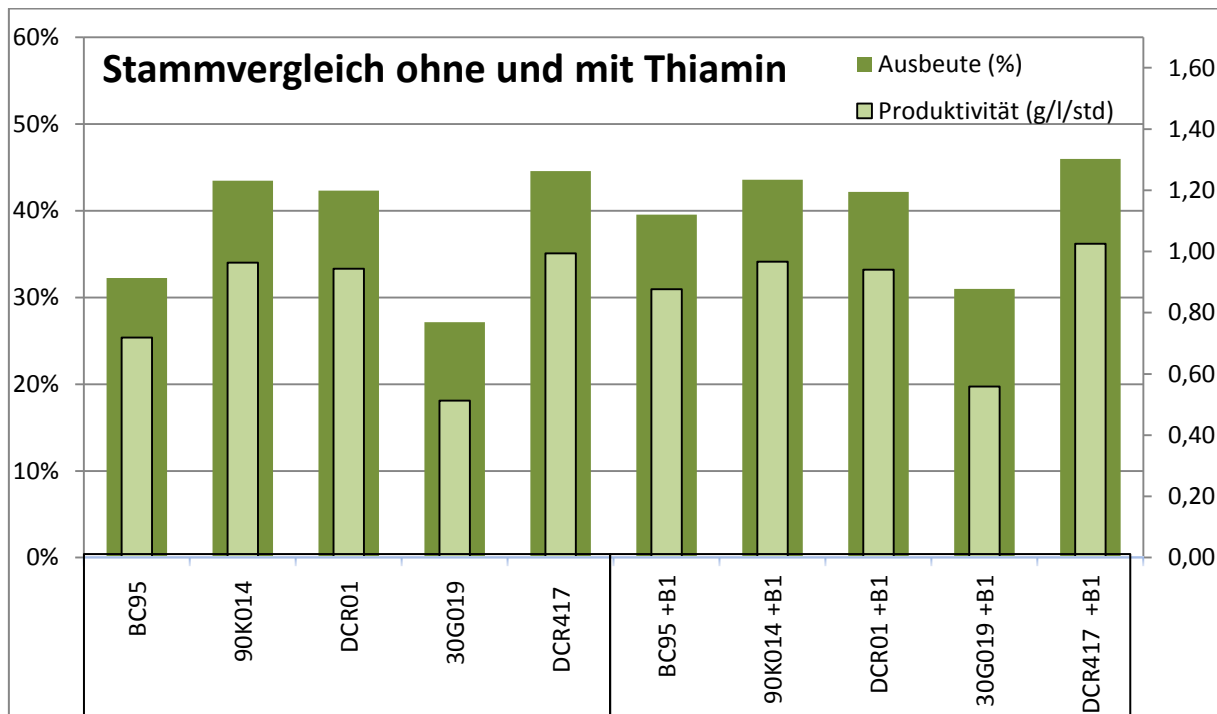


Abb. 12 Stammvergleich ohne und mit Thiamin

6.2 Thiaminreihe

Bei der Thiaminreihe wurde versucht zu klären, ob es eine optimale Konzentration an Thiamin im HK-Medium gibt. Der verwendete Fermentationsstamm war die *Moniliella pollinis* Mutante DCR417. Das Fermentationsmedium setzte sich aus dem HK-Medium mit einer Glucosekonzentration von 25% und einer KNO_3 Konzentration von 0,265% zusammen. Die Thiaminzugabe erfolgte vor dem Autoklavieren. Den Kolben wurde Thiamin in steigender Konzentration beigemengt, von 0ppm bis 30ppm, was einer Konzentration von 0-2,4mg pro Kolben entsprach. Der Versuch wurde nach 93 Stunden beendet.

Die Untersuchung konnte keine klaren Ergebnisse bezüglich eines optimalen Thiaminwertes liefern. Zwar zeigten die Maximalwerte an Ausbeute zwischen 6 und 9ppm einen leichten Anstieg, dieser kann aber nicht als ausreichend beschrieben werden, sodass von keinem eindeutigen Ergebnis gesprochen

werden konnte. Noch weniger Einfluss als auf die Ausbeute scheint Thiamin auf die Produktivität der Hefen zu haben. Die ermittelten Werte unterlagen zwischen der minimalen und maximalen Thiaminkonzentration nur geringen Schwankungen. Der Kolben mit den höchsten gemessenen Werten enthielt 6ppm Thiamin (Ausbeute 36%, Produktivität 1,09 g/l/std). Auch hier konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Thiaminkonzentration und der Produktivität des erythritolproduzierenden Stammes festgestellt werden.

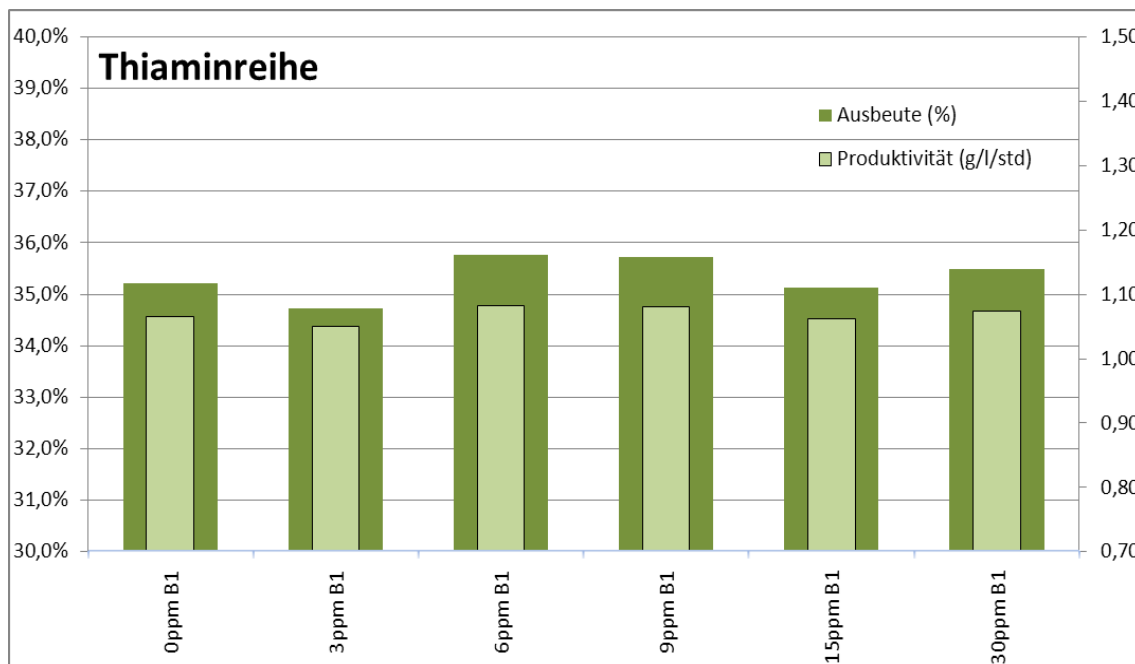


Abb. 13 Thiaminreihe mit Reihe mit der Mutante DCR417

6.3 KNO₃ Reihe

Die Versuchsreihe mit Kaliumnitrat sollte zeigen, welche die optimale Konzentration der Stickstoffquelle KNO₃ für das verwendete Medium sei.

Die Fermentation für den Versuch wurde in einem HK-Medium mit einer Glucosekonzentration von 25% durchgeführt. Der Zusatz von KNO₃ erfolgte in gelöster Form, wobei 2ml der KNO₃-Lösung 0,265% der Masse entsprachen.

Dem Medium wurden 10 unterschiedliche Volumina von der Kaliumnitratlösung in steigendem Ausmaß beigemengt. Beginnend bei 0ml wurden verschiedene

Konzentrationen in 0,5ml KNO_3 -Zugabe-Schritten hergestellt. Im letzten Ansatz der Versuchsreihe erhielt das Medium 10ml KNO_3 -Lösung, im Versuch davor wurden 4ml der Lösung beigegeben. Nach der Zugabe der Lösung wurden alle Kolben mit Mischbettwasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Beimpft wurden die Kolben mit 0,5ml einer VK der Mutante *DCR417*. Die Fermentation wurde nach 67 Stunden beendet.

Die Versuchsreihe ließ eine optimale Konzentration von KNO_3 erkennen. Es zeigte sich, dass die Optimalwerte für Ausbeute und Produktivität voneinander abweichen. Für die Ausbeute scheint die optimale Konzentration von KNO_3 bei etwa 0,13% zu liegen. Vor und nach diesem Wert nimmt die Ausbeute ab. Die optimale Menge an KNO_3 liegt für die Produktivität bei 0,265%. Vor und nach diesem Wert nimmt die Produktivität ab.

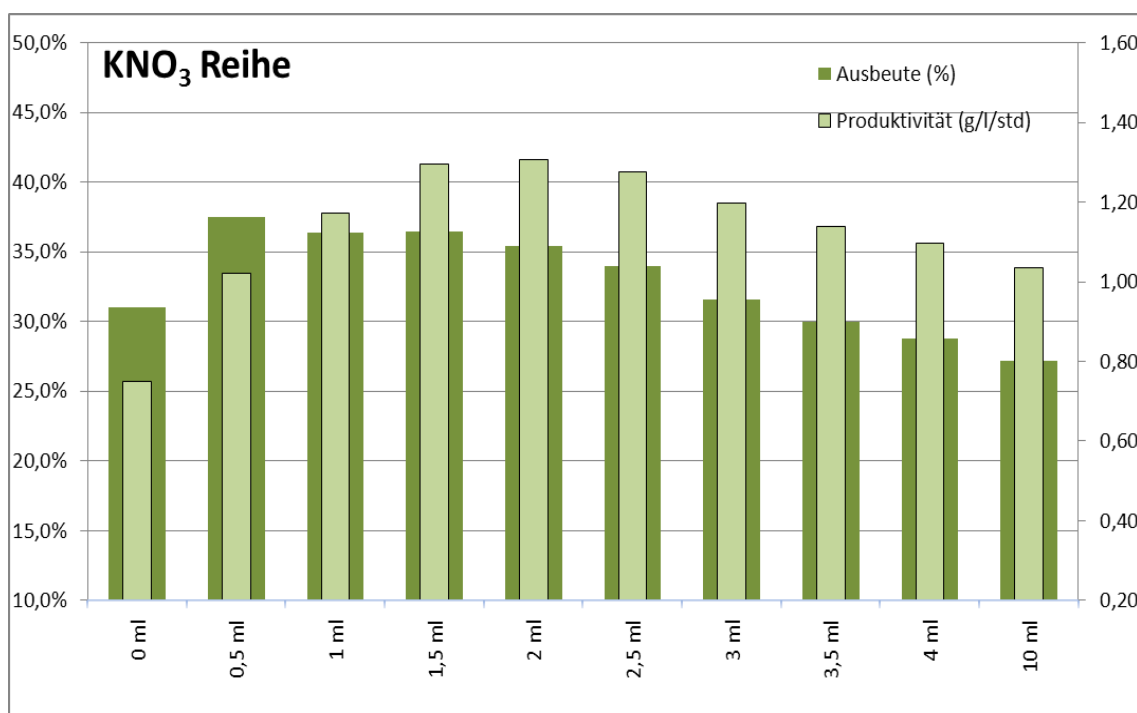


Abb. 14 KNO_3 Reihe mit der Mutante *DCR417*

6.4 NaNO_3 Reihe

Eine Versuchsreihe mit Natriumnitrat wurde gestartet um zu klären, welche Konzentration der Stickstoffquelle NaNO_3 optimale Ergebnisse für die Erythritolproduktion im verwendeten Medium zuließ.

Die Fermentation wurde in einem HK-Medium mit einer Glucosekonzentration von 25% durchgeführt. NaNO_3 wurde dem Medium in gelöster Form beigegeben, wobei mit 2ml der NaNO_3 -Lösung die gleiche Menge an Stickstoff eingebracht wird, wie mit 0,265% KNO_3 . Die Einwaage an NaNO_3 wurde unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes vorgenommen. Somit entsprachen 2ml dieser Lösung 0,227% des Fermentationsmediums. Nach der Zugabe der Lösung wurden alle Kolben mit Mischbettwasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Die Kolben mit 0,5ml einer VK der Mutante *DCR417* beimpft. Die Versuchsreihe wurde nach 67 Stunden abgeschlossen.

Die Auswertung der Versuchsreihe mit Natriumnitrat zeigte eine optimale Konzentration von NaNO_3 für das verwendete Medium. Jedoch wichen auch in diesem Fall die Optimalwerte für Ausbeute und Produktivität leicht voneinander ab. Für die Ausbeute lag die optimale Konzentration von NaNO_3 bei etwa 0,17%. Die Versuchsgrafik verdeutlicht, dass die Ausbeute mit der Mutante *DCR417* bis zu diesem Wert steigt. Nach der Konzentration von 0,17% beginnt die Ausbeute wieder zu sinken, was darauf hinweist. Die optimale Menge an NaNO_3 im verwendeten Medium liegt für die Produktivität bei einer Konzentration von 0,227%.

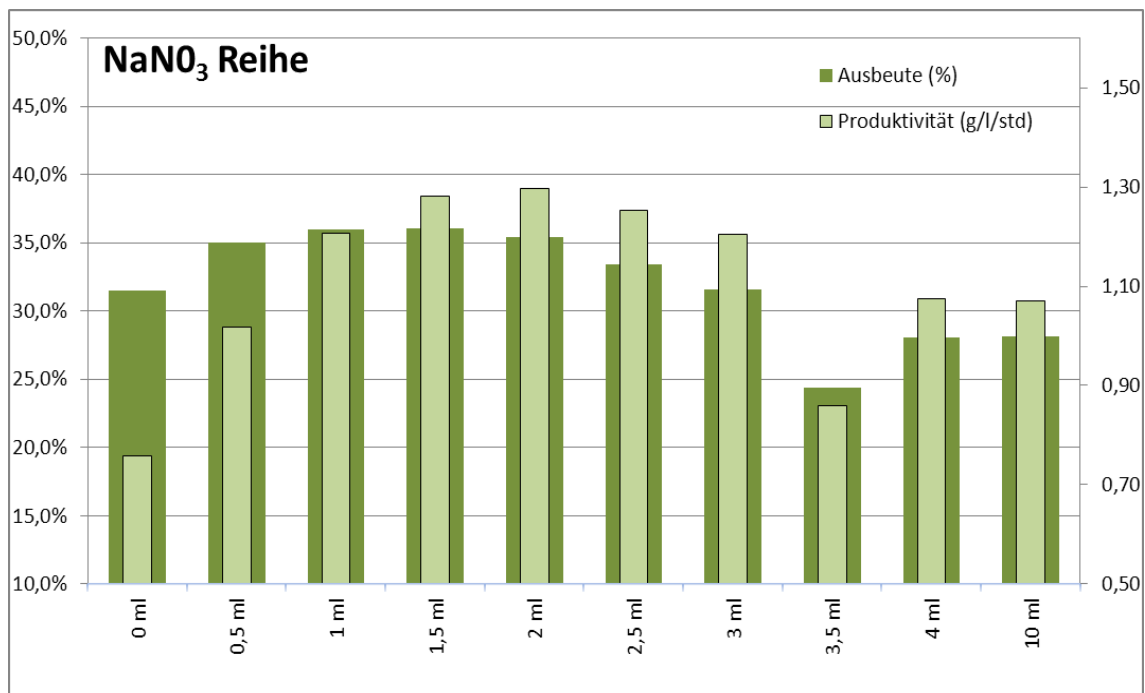


Abb. 15 NaNO_3 Reihe mit der Mutante *DCR417*

6.5 NH_4NO_3 Reihe

Eine weitere Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Konzentration einer Stickstoffquelle wurde durchgeführt. Bei der beforschten Stickstoffquelle handelte es sich um Ammoniumnitrat.

Die Fermentation wurde in einem HK-Medium mit einer Glucosekonzentration von 25% durchgeführt. Dem Medium wurde stufenweise NH_4NO_3 in gelöster Form zugesetzt, wobei 2ml der NH_4NO_3 -Lösung der Menge an Stickstoff entsprachen, die 0,265% an KNO_3 lieferten. Die Stickstoffquelle wurde in 0,5ml Schritten beigemischt. Auf diese Weise konnten 10 unterschiedliche Versuchsansätze für einen Vergleich gemacht werden. Bei der Einwaage von NH_4NO_3 wurde das Molekulargewicht berücksichtigt, wodurch 2ml der Lösung 0,107% des Fermentationsmediums entsprachen.

Nach Zugabe der Lösung wurden alle Kolben mit Mischbettwasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Beimpft wurden die Kolben mit 0,5ml einer VK der Mutante *DCR417*. Nach 67 Stunden wurde die Versuchsreihe beendet.

Im Zuge der Versuchsreihe mit Ammoniumnitrat konnte für diese Stickstoffquelle eine optimale Konzentration für das verwendete Medium ermittelt werden. Wiederum stimmten die Optimalwerte für Ausbeute und Produktivität nicht überein. Für die Ausbeute ergab sich eine optimale Konzentration von NH_4NO_3 bei etwa 0,027%. Die Produktivität des *DCR417* im ammoniumnitrathaltigen Medium erreichte bei einer Konzentration von 0,054% der NH_4NO_3 -Lösung einen optimalen Wert.

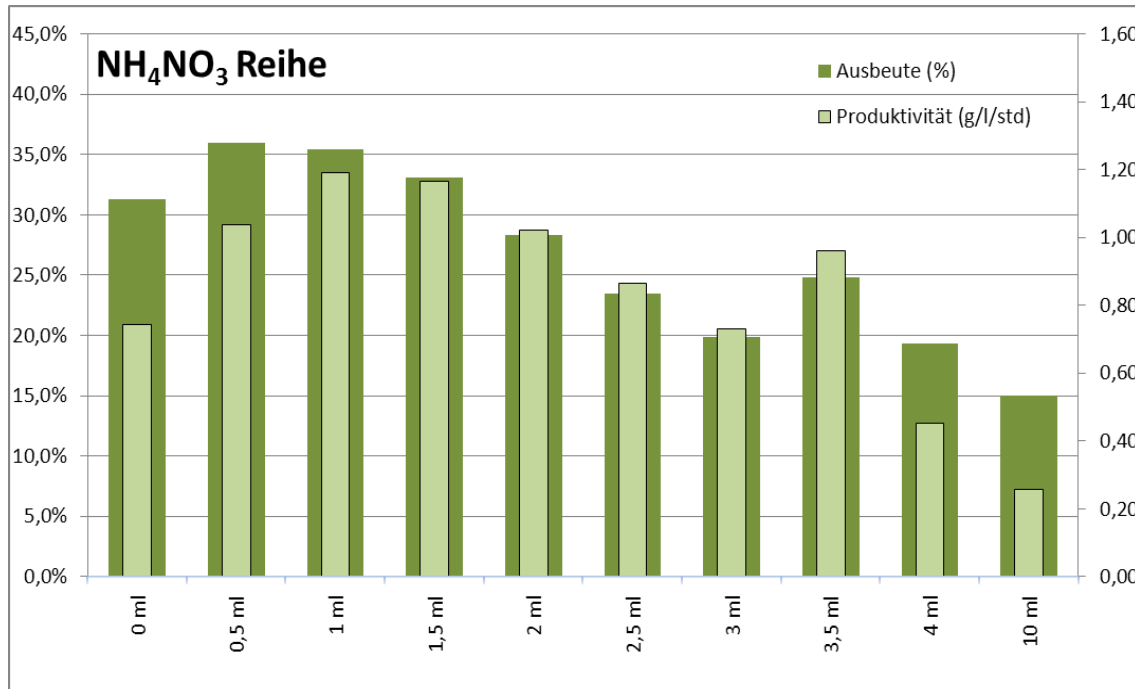


Abb. 16 NH_4NO_3 Reihe mit der Mutante DCR417

6.6 Manganreihe

Eine Versuchsreihe wurde mit dem Schwermetall Mangan unternommen. Es sollte geklärt werden, ob es eine optimale Konzentration an Mangan im HK-Medium gibt. Der verwendete Fermentationsstamm für die Versuchsreihe war die *Moniliella pollinis* Mutante DCR417. Das Fermentationsmedium setzte sich aus dem HK-Medium mit einer Glucosekonzentration von 23% und einer KNO_3 Konzentration von 0,265% zusammen. Mangan wurde in Form von Mangansulfat zugegeben. Der Zusatz von Mangan erfolgte mittels einer Lösung, wobei 1ml dieser Mangan-Lösung 5ppm Mangan entsprachen. Den Kolben wurde die Manganlösung in steigender Konzentration zugesetzt, von 0ppm bis 50ppm. Der Versuch wurde nach 69 Stunden beendet.

Die Untersuchung konnte keine klaren Ergebnisse bzgl. einer optimalen Mangankonzentration liefern. Die Ausbeute war zwischen 20 und 35 ppm leicht erniedrigt, jedoch kann nicht von einer klaren Tendenz gesprochen werden. Ebenso ließen die Werte für die Produktivität der Hefen keine eindeutigen

Aussagen über einen Zusammenhang von Mangan und der Erythritolproduktion des *DCR417* im verwendeten Medium zu. Sowohl für die Ausbeute als auch für die Produktivität unterlagen die ermittelten Daten zwischen der minimalen und maximalen Mangankonzentration zu unterschiedlichen Schwankungen, als dass daraus klare Erkenntnisse abgeleitet werden konnten.

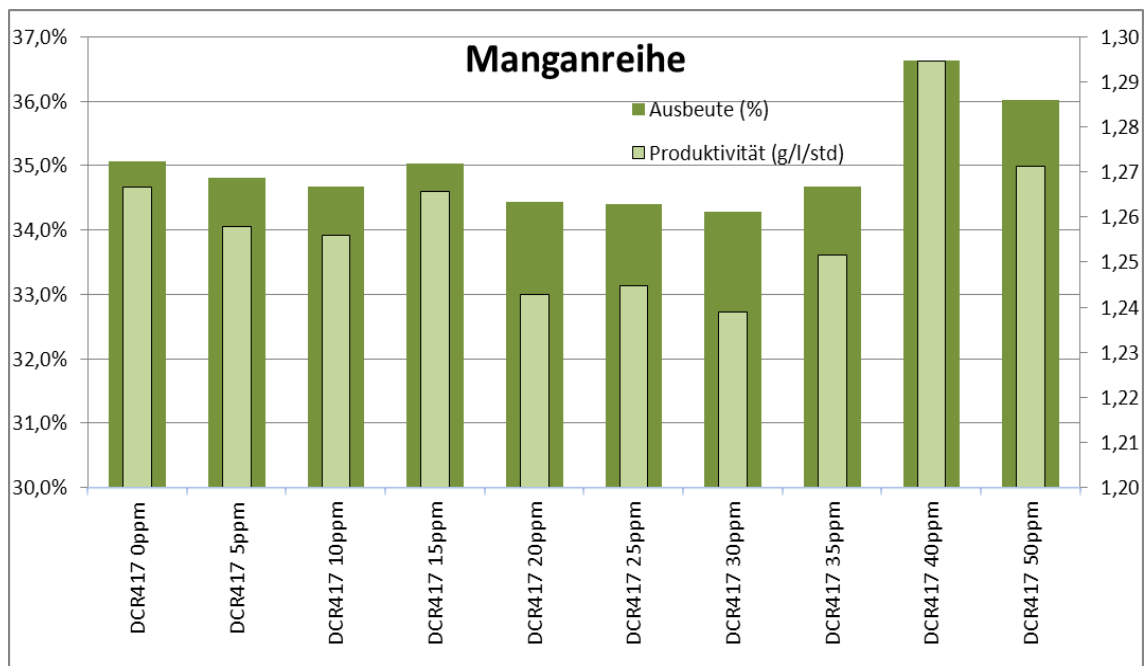


Abb. 17 Manganreihe mit der Mutante *DCR417*

7 Diskussion

Die Versuchsreihen zum Stammvergleich der erythritolproduzierenden Stämme sollte einerseits überprüfen, ob die Mutanten brauchbar seien und sollten andererseits zeigen, ob sie eine langfristige Alternative zu den vorhandenen bewährten Stämmen sein können.

Es zeigte sich, dass die Mutanten *DCR01* und *DCR417* unter den verschiedensten Bedingungen eine gute Alternative zu den verwendeten Stämmen darstellten. Nach der Mutation wurden die Mutanten vor allem auf eine hohe Osmotoleranz hin gescreent. Weiters wurden die Mutanten danach ausgewählt, ob sie mit weniger Stickstoff auskommen und vor allem im Ganzkornmais-Hydrolysat gut wachsen konnten. Folglich bestand der Nährboden der verwendeten Agarplatten, mittels denen die erste Auswahl getroffen werden sollte, zwar aus aufkonzentriertem GKMH mit einer Glucosekonzentration von 30%, jedoch wurde keine externe N-Quelle zugesetzt. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die angewachsenen und koloniebildenden mutierten Hefezellen neben dem hohen osmotischen Druck und der wahrscheinlichen N-Knappheit auch die anderen im GKMH vorliegenden und ebenfalls aufkonzentrierten Substanzen akzeptieren würden.

Die Versuchsreihen zum Stammvergleich hatten einen gemeinsamen Start, indem am Vortag des Versuchsbeginns alle verwendeten Stämme in das gleiche VK-Medium überimpft wurden. Dieses VK-Medium bestand ausschließlich aus dem zur Verfügung stehenden Hydrolysat aus dem ganzen Maiskorn, welches von Charge zu Charge leicht schwankend etwa 20-21% Glucose beinhaltete. Es wurde keine externe N-Quelle zugesetzt. Im anschließenden HK-Versuch zeigte sich, dass die Mutanten der *DCR*-Reihe einen Vorteil gegenüber den sich in Verwendung befindenden Stämmen hatten. Sowohl Ausbeute als auch Produktivität lagen in der Versuchsreihe teilweise weit über denen der verglichenen Stämme.

Aus den beobachteten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die im Rahmen der Forschungstätigkeit in oben beschriebener Weise gescreenten Mutanten einen leichten Vorteil gegenüber anderen Stämmen haben können,

wenn sie in einer gewöhnlichen Ganzkornmais-Hydrolysat Vorkultur, ohne jegliche Zusätze, herangezüchtet worden sind.

Bei den Versuchen zur Thiaminreihe sollte geklärt werden, ob ein Zusatz von Thiamin im Umfang von 5 bis 50ppm vor dem Autoklavieren die Erythritolproduktion steigern kann. In der Literatur wird häufig auf einen positiven Einfluss von Thiamin auf die Entstehung von Erythritol hingewiesen. Die Steigerung der Erythritolproduktion durch einen Zusatz von Vitamin B1 liegt in der Tatsache begründet, dass Thiamin einen maßgeblichen Anteil am Stoffwechsel der Kohlehydrate hat. Das in der vorliegenden Forschung verwendete Fermentationsmedium bestand aus dem Hydrolysat von Maiskörnern. Im Gegensatz zu einem synthetisch hergestellten Medium konnte im Mais-Hydrolysat der genaue Thiamingehalt nicht festgelegt werden. Durch die Versuchsreihen wurde versucht eine optimale Konzentration an Thiamin zu finden. In den Versuchen zeigte sich aber, dass der Zusatz von Thiamin zum verwendeten Maissirup keinen klaren Vorteil hatte. Diese Resultate können darin begründet sein, dass Thiamin bei der Hydrolyse der Maisstärke und beim Autoklavieren durch die thermische Einwirkung zerstört wird. Die Größenordnung dieser Zerstörung konnte jedoch nicht ermittelt werden. Somit kann gesagt werden, dass der Zusatz von Thiamin zum Fermentationsmedium, welches aus dem Hydrolysat des ganzen Maiskorns besteht, für die *Moniliella pollinis* Mutante *DCR417* keinen entscheidenden Vorteil bringt.

Die Versuchsreihen mit den Stickstoffquellen KNO_3 , NaNO_3 und NH_4NO_3 sollten zeigen, ob es ein für die Mutante *DCR417* eine optimale Konzentration einer der untersuchten Stickstoffquellen gibt. Alternativ konnte erkannt werden, ob eine der beforschten N-Quellen gegenüber den anderen einen Vorteil bezüglich Ausbeute oder Produktivität hat. Da sowohl NaNO_3 als auch NH_4NO_3 bezüglich des angebotenen Stickstoffs eine geringere Molmasse aufweisen, können sie als gute Alternative zu KNO_3 gesehen werden. Bei den unternommenen Versuchsreihen konnten jeweils Peaks sowohl für die Ausbeute als auch für die Produktivität dokumentiert werden. Es stellte sich heraus, dass der Zusatz von KNO_3 gegenüber NaNO_3 und NH_4NO_3 leichte Vorteile bei beiden relevanten Werten hat. Eine weitere Erkenntnis, die aus den

Stickstoffversuchen gezogen werden konnte, war, dass ein Zuviel an Stickstoff sich negativ auf die Erythritolproduktion der Hefen auswirkt. Aufgrund des überschüssigen Stickstoffs kommt es zu einem vermehrten Biomassewachstum, welches sich negativ auf sowohl Ausbeute als auch Produktivität auswirkt. Auf Basis der Daten dieser Untersuchung kann gesagt werden, dass KNO_3 bei einer Konzentration von etwa 0,2% bei der Fermentation der Mutante *DCR417* in einem Ganzkornmais-Hydrolysat eine hervorragende N-Quelle ist.

Bei Versuchen, die den Einsatz von Mangan untersuchten, sollte geklärt werden, ob dieses Schwermetall einen positiven Einfluss auf die Erythritolproduktion haben kann. In der wissenschaftlichen Literatur wird auf einen positiven Einfluss von Mangan auf die Produktion von Erythritol hingewiesen [LEE JK et al., 2000]. Mangan soll eine positive Wirkung auf die Permeabilität der Hefezellen haben, wodurch das Erythritol leichter durch die Zellwand ausgeschleust werden kann. Die Mangankonzentrationen im Versuch waren bewusst hoch angesetzt, da das Ganzkornmais-Hydrolysat geringe Mengen an Mangan beinhaltet und auch ein möglicher negativer Effekt einer sehr hohen Mangankonzentration ermittelt werden sollte. In den Ergebnissen konnte mit steigender Mangankonzentration eine geringe Abnahme von sowohl Erythritol ausbeute als auch Produktionsrate von Erythritol erkannt werden. Die Ansätze mit 40 und 50ppm Mangan zeigen hohe Werte für Ausbeute und Produktivität. Diese Ergebnisse überraschen angesichts des bis dahin beobachteten negativen Zusammenhangs zwischen der Zugabe von Mangan und der Ausbeute und Produktivitätsrate von Erythritol. Schenkt man den hohen Werten bei den letzten beiden Ansätzen Glauben, würde dies bedeuten, dass die Ausbeute und Produktivität von Erythritol ab einem Zusatz von 40ppm Mangan zu einem Fermentationsmedium wieder stark ansteigt. Da es sich bei Mangan um ein Schwermetall handelt und auch in der wissenschaftlichen Literatur nichts über einen derart hohen Einsatz von Mangan zu finden ist, muss jedoch an dieser These gezweifelt werden. Eher kann bei den beiden beobachteten Werten von Ausreißern ausgegangen werden. Hier könnte eine Versuchswiederholung Klarheit bringen.

Unter der Annahme, dass es sich bei den Ansätzen mit 40 und 50ppm Mangan um Ausreißer handelt, kann gesagt werden, dass der Einsatz von Mangan bei der Fermentation mittels der *Moniliella pollinis* Mutante DCR417 zu keiner Steigerung der Erythritolproduktion führt. Mit zunehmender Konzentration ist eher mit einer Abnahme von sowohl Ausbeute als auch Produktivität zu rechnen.

Unter die unternommene Forschungstätigkeit zur Optimierung der Erythritolproduktion mit einer Mutante der Hefe *Moniliella pollinis* im Ganzkornmais-Hydrolysat kann das Resümee gezogen werden, dass vor allem das Mutieren erythritolproduzierender Stämme Ressourcen bietet, um größere Schritte in Richtung einer erfolgreicherer Ausbeute und Produktivität machen zu können. Das Medium aus Ganzkornmais-Hydrolysat scheint hinsichtlich der Stickstoffquelle und der Glucosekonzentration in seiner Verwendung zum Zeitpunkt des Praktikums optimal eingestellt. Der Weg mittels unterschiedlicher Zusätze zum Fermentationsmedium „Meilensteine“ in der Produktionssteigerung zu erzeugen, erwies sich als langwierig und nicht immer aussichtsreich. Diese Methode scheint für eine Feinabstimmung der Produktionsoptimierung geeignet. Bedeutendere Ergebnisse können mit Hilfe von Mutationsrunden erzielt werden. Bringt eine erfolgreiche Mutante gute Eigenschaften hinsichtlich der Produktion von Erythritol mit, vermag sie die Ergebnisse bei gleichem Fermentationsmedium auf ein anderes Niveau zu heben. Erschwerend ist, dass im Gegensatz zur gentechnischen Veränderung eines Organismus, das Mutieren mittels NTG zufällig passiert. Es ist nicht möglich in einer Mutationsrunde gezielt Eigenschaften der Hefen zum Besseren hin zu verändern. Als Fazit aus den unternommenen Versuchen kann daher gesagt werden, dass dem Screenen von Mutanten in der Optimierung der Erythritolproduktion eine wichtige Rolle zukommt. Wenn es möglich ist, wie es die Ergebnisse aus den Stammvergleichen nahe legen, im Screenverfahren auf die Eigenschaften der Mutanten indirekt – durch die Kultivierungsbedingungen vermittelt – einzuwirken, scheint in dieser Vorgehensweise Potential für die Optimierung der Erythritolproduktion durch eine Mutante der Hefe *Moniliella pollinis* im Ganzkornmais-Hydrolysat zu liegen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der fermentativen Herstellung von Erythritol. Ziel war es die Erträge in der Herstellung zu optimieren. Zum Erreichen des Ziels wurden zwei unterschiedliche Ansätze unternommen. Zum einen wurde versucht aus einem bestehenden und ertragreichen Stamm der Hefe *Moniliella pollinis* eine Mutante mit besseren Eigenschaften zu erzeugen. Mutiert wurde mittels NTG. Im Screening-Verfahren konnten vielversprechende Mutanten gesichtet werden. Die mutierten Stämme der Hefe *Moniliella pollinis* wurden ausführlich mit dem Ausgangsstamm und anderen in Verwendung befindlichen Hefen verglichen. Die neuen Stämme, mit den Namen *DCR01* und *DCR417*, zeigten Vorteile gegenüber den bewährten Stämmen. Vor allem bei Versuchsansätzen, welche aus einer Vorkultur mit geringem Stickstoffgehalt beimpft wurden, zeigten sich Vorteile sowohl in Ausbeute als auch in Produktivität im Vergleich mit den bewährten Stämmen. Zum anderen wurde versucht neben dem Mutieren und Screenen einer erfolgreichen Mutante von *Moniliella pollinis* das verwendete Fermentationsmedium zu optimieren. Das Medium bestand aus Ganzkornmais-Hydrolysat. Wie der Name sagt, handelte es sich dabei um einen Sirup, der die gesamten Bestandteile des Maiskorns beinhaltet und sich somit von einem synthetischen Nährmedium unterschied. Es wurde versucht durch Zusätze die Ergebnisse von Ausbeute und Produktivität unter Beachtung der wirtschaftlichen Machbarkeit zu erhöhen. So wurde versucht durch den Zusatz von unterschiedlichen Stickstoffquellen die Erträge zu steigern. Die Auswirkungen von Thiamin und Mangan im Fermentationsmedium wurden ebenfalls beforscht. Es stellte sich heraus, dass sich durch den Zusatz von KNO_3 als externe Stickstoffquelle sowohl Ausbeute als auch Produktivität mehr steigern ließen als durch den Einsatz von NaNO_3 und NH_4NO_3 . Durch den Einsatz von Thiamin und Mangan konnten keine deutlichen Produktionssteigerungen erzielt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass die neu gescreenten Mutanten *DCR01* und *DCR417* der Hefe *Moniliella pollinis*, eine gute Alternative zu den bestehenden Fermentationsstämmen sein können. Als Fazit kann gesagt werden, dass im Erzeugen einer erythritolproduzierenden Mutante mehr Optimierungspotential steckt, als im Verbessern des verwendeten Fermentationsmediums.

Abstract

The present work deals with the fermentative production of erythritol. The aim of this study was to increase yield in production. In order to achieve that, two different approaches were undertaken. On the one hand it was planned to produce a mutant, which had better fermentation properties from an approved high-yielding *Moniliella pollinis* strain. The mutation was executed with NTG. In the following screening promising mutants could have been found. The new mutant strains of the yeast *Moniliella pollinis* were compared in detail with the original strain, and other in-use yeast. The new strains, which had been named *DCR01* and *DCR417*, showed advantages in comparison to the approved yeast. Especially in attempts, which were inoculated from a preculture which contained low nitrogen. Advantages were shown in both yield and in productivity compared with other erythritol forming strains. On the other hand one aim was to optimize, in addition to the mutation and screening of a successful mutant from the yeast *Moniliella pollinis*, the fermentation medium. The medium consisted of whole corn-hydrolyzate. As the name suggests, the used syrup contained all the properties of corn kernels and is therefore clearly different from a synthetic fermentation medium. It was attempted to increase the results of both yield and productivity based on economic feasibility by additives. For example, it was attempted to increase yields by addition of different nitrogen sources, but also the effects of thiamine or manganese in the fermentation medium were investigated. It turned out that the increase of both yield and productivity was higher after addition of KNO_3 as an external nitrogen source, than by the use of NaNO_3 and NH_4NO_3 . Due to the use of both manganese and thiamine no clear increase in production amount could be achieved. It turned out, however, that the newly screened mutants *DCR01* and *DCR417* from the yeast *Moniliella pollinis* could be a good alternative to the existing fermentation strains. As a conclusion it can be said that creating an erythritol forming mutant has more optimization potential than improving the fermentation medium.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Reiter

Geboren am 29.10.1979, in Schwarzach im Pongau

Ausbildung

- **2004** bis **2012** Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
- **2000** bis **2004** Studium der Internationalen Betriebswirtschaft an der Universität Wien, abgebrochen
- **1999** Reifeprüfung
- **1990** bis **1999** AHS St. Rupert in Bischofshofen, BORG St. Johann im Pongau
- **1986** bis **1990** Volksschule St. Johann im Pongau

Universitäre Tätigkeiten

- **02-08.2011** Diplomarbeitspraktikum Firma Jungbunzlauer Austria AG, Pernhofen
- **2010** Praktikum Firma Jungbunzlauer Austria AG, Pernhofen
- **2009** Praktikum bei Univ.-Prof. Dr. Jürgen König (Datenerhebung Nährwertkennzeichnung)
- **2009** bis **2012** ÖH-Tätigkeiten (FV-Journaldienste, Berufungskommission)
- **2009** bis **2011** Mandatar der Fakultätsvertretung Lebenswissenschaften

Geräte und Material

Geräte

<u>Autoklav:</u>	Webeco GmbH, 82472 (1987)
<u>Brutschrank:</u>	Binder, BD115 #04-72634
<u>Eppischüttler:</u>	EPPENDORF, Thermomixer comfort (1,5ml)
<u>Gefrierschrank:</u>	Thermo Electron Corporation, HFU 1185 SIBASIC-V35 (-80°C)
<u>HPLC:</u>	Dionex HPLC; Pumpe:P680 HPLC Pump; Sampler: ASI-100 Automated Sampler Injector; Säulenofen: Thermostated Column Compartment TCC-100; Chromatographiesäule: BIO-RAID HPLC Column for Fermentation Monitoring (150mm x 7,8mm); Detektoreinheit: Shodex RI-101;Software: Chromeleon Client, Version 6.8. SR10 Build 2818(166959)
<u>HPLC-Laufmittel:</u>	MMilipore, Synergy UV, Millipak Express (0,22µm)
<u>ICP-OES:</u>	SpectroGenesis, Modell: Genesis FEX; Autosampler: CETAC Technologies ASX-260; Software: Smart Analyzer of Spectro Smart Studie v. 3.01.0753, Build 2600
<u>Kolbenschüttler:</u>	Infors HAT (RC-TX); Sartorius, Certomat BS-1; Adolf Kühner AG, ISF-4-V
<u>Magnetrührer:</u>	IKAMAG, RET-G; IKAMAG, RCT
<u>Mikroskop:</u>	Reichert Diavar, 300416
<u>pH-Meter:</u>	Metrohm, 744 pH-Meter
<u>Photometer:</u>	Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 S UV-VIS Spectrometer
<u>Pipetten:</u>	Eppendorf Research 5000µl; Eppendorf Research plus 1000µl; Eppendorf Research 100µl
<u>Plattenschüttler:</u>	Infors HAT Microtron, Multitron II
<u>Refraktometer:</u>	ATAGO 1T, NAR 1T; ATAGO digital Thermometer
<u>Rotavapor:</u>	Büchi, Rotavapor R-215, Heating Bath B-491, Vakuumpumpe: ILMVAC,
<u>Membranpumpe:</u>	4200 132-03; Büchi, Rotavapor EL130, Vacuumbrand, Membranvacuumpumpe, MZ 2C
<u>Titrator:</u>	Metrohm, 665 Dosimat, 20ml; Metrohm, 682 Titroprocessor
<u>Vortex:</u>	Scientific Industries, Vortex-Genie 2
<u>Waagen:</u>	Sartorius, CP 324 S (d=0,1mg); Sartorius, CP 4202 S-ACE (d=0,01g); Sartorius, CP 423 S (d=0,001g); Sartorius, CP 8201 (d=0,1g)
<u>Wasserbad:</u>	Julabo, SW22
<u>Zentrifugen:</u>	Thermo Electron Corporation, Heralus, Multifuge 1L (4.000rpm); EPPENDORF, Centrifuge 5415C (14.000rpm)

Material

<u>Bluecaps:</u>	Greiner Bio-One 15 und 50ml
<u>Impfösen:</u>	Carl Roth, Einmal Impfösen 1µl
<u>Küvetten:</u>	Plastibrand, 1,5ml semi-micro
<u>Mikrotiterplatten:</u>	greiner bio one, Cellstar, 24 Well, sterile
<u>Petrischalen:</u>	Petrischalen mit Nocken, steril, DMR 90mm
<u>Spitzen:</u>	250µl VWR 53503-610; 1-250µl 960 per refill, West. Chester, PA; 2-200µl 960 per refill, West. Chester; 50-1000µl universal blue tips, 5000 Stk.
<u>Spritzen:</u>	SYRINGE without needle
<u>Spritzenvorsatzfilter:</u>	PALL, Life science, Acrodisc 32mm, Syringe Filter with 0,2 µm Super Membran
<u>Vial-Caps:</u>	VWR international, Cap alu cl 11ml, Rub red-orange, TEF transp.
<u>Vials:</u>	VWR International, Vial cr 1,5ml cl. gl. 32 x 11,6mm

Chemikalien

<u>Agar-Agar:</u>	Kobe I, pulv., Dichte 0,55, 1kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>Ammoniumnitrat:</u>	(reinst) 98,5%, 1kg, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
<u>Calciumchlorid Dihydrat:</u>	>99% p.a., ASC, 1kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>Citronensäure Anhydrat:</u>	für Lebensmittel, 25kg, Jungbunzlauer
<u>Dikaliumhydrogenphosphat:</u>	Ph. Eur., BP, wasserfrei, 1kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>D-Glucose-Monohydrat:</u>	99,5%, 5kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>Hefeextrakt:</u>	technisch, 25kg, GISTEX Standard Powder AGGL (Primary grown yeast extract)
<u>HPLC-Laufmittel:</u>	0,01 N H ₂ SO ₄ ; H ₂ SO ₄ 2 N, 2,5l, VWR Prolabo
<u>Kaliumdihydrogenphosphat:</u>	>99% p.a., ASC, 5kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>Kaliumnitrat:</u>	technisch
<u>Mangan(II)-Sulfat-Monohydrat:</u>	(rein), 1kg, E. Merck, Darmstadt
<u>NaOH:</u>	1N, 25l, Merck
<u>Natriumacid:</u>	reinst, 250g, Merck
<u>Natriumnitrat:</u>	>99% p.a. ACS, ISO, 1kg, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>NTG:</u>	1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin 97%, angefeuchtet mit Wasser, 10g, Sigma-Aldich
<u>Pyridoxinhydrochlorid:</u>	>99% f. Biochemie, 100g, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe
<u>Thiaminhydrochlorid:</u>	>98,5% f. Biochemie, 100g, Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe

Literatur

- AOKI M, PASTORE GM, PARK YK. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnology Letters* 1993; 15(4): 383-388
- ARRIGONI E, BROUNS F, AMANDO R. Human gut microbiota does not ferment Erythritol. *British Journal of Nutrition* 2005; 94.5: 643-646
- BARNHART JL, COMBES BB. Erythritol and mannitol clearances with taurocholate and secretin-induced cholereses. *The American journal of physiology* 1978; 234(2): 146-156
- BERNT WO, BORZELLECA JF, FLAMM G, MUNRO IC. Erythritol: A Review of Biological and Toxicological Studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1996; 24: 191-197
- BINKLEY WW, WOLFROM ML. Chromatographic Fractionation of Cane Blackstrap Molasses and of Its Fermentation Residue. *Journal of the American Chemical Society* 1950; 72(10): 4778-4782
- BIPPES MT, Verfahrensentwicklung zur mikrobiellen Herstellung von Erythrit. Dissertation 2007; Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- BORNET FRJ, BLAYO A, DAUCHY F, SLAMA G. Plasma and Urine Kinetics of Erythritol after Oral Ingestion by Healthy Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1996a; 24: 280-285
- BORNET FRJ, BLAYO A, DAUCHY F, SLAMA G. Gastrointestinal Response and Plasma and Urine Determinations in Human Subjects Given Erythritol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1996b; 24: 296-302
- BRAUN ML, NIEDERPRUEM DJ. Erythritol metabolism in wild-type and mutant of *Schizophyllum commune*. *Journal of bacteriology* 1969; 100(2): 625-634
- BURSCHAEPERS J, SCHUSTOLLA D, SCHUEGERL K, ROEPER H, DE TROOSTEMBERG JC. Engineering aspects of the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa var pollinis*. Part I. Batch and fed-batch operation in stirred tank. *Process Biochemistry* 2002; 38(4): 497-506
- BURSCHAEPERS J, SCHUSTOLLA D, SCHUEGERL K, ROEPER H, DE TROOSTEMBERG JC. Engineering aspects of the production of sugar alcohols with the osmophilic yeast *Moniliella tomentosa var pollinis*. Part II. Batch and fed-batch operation in stirred tank. *Process Biochemistry* 2002; 38(4): 559-570
- DE TROOSTEMBERGH JCMPG, GOOSSENS JFV. Verwendung des Erythrit als Anti-Karies-Mittel und dieses enthaltende orale Zusammensetzungen. Patent: DE69729404T2 07.10.04; 2004
- DEN HARTOG GJM, BOOTS AW, ADAM-PERROT A, BROUNS F, VERKOOIJEN IWCM, WESELER AR, HAENEN GRMM, BAST A. Erythritol is a sweet antioxidant. *Nutrition* 2010; 26: 449-458
- DUBERNET MO, BERTRAND A, RIBEREAU-GAYON P. Presence of erythritol , arabitol and mannitol in wines. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 1974; 279(18): 1561-1564
- DWIVEDI SP, DWIVEDI N, TYAGI A, SINGH RB, MISHRA S. Molecular Dynamics Simulation Studies on Effects of Erythritol on Alcohol Dehydrogenase Folding. *The Open Nutraceuticals Journal* 2010; 3: 213-219

EDLAUER R, TRIMMEL S. Process for producing Erythritol using *Moniliella tomentosa* strains in the presence of neutral inorganic nitrates, such as potassium nitrate, ammonium nitrate or sodium nitrate, as nitrogen source. Patent: Pub. No.: US 2009/0246843 A1

European Food Safety Authority. Statement in Relation to the safety of Erythritol (E 968) in light of new data, including a new paediatric study on the gastrointestinal tolerability of erythritol. EFSA Journal 2010; 8(7): 1650-1668

GONZE MHA, DE SADELEER J. Erythritol-Zusammensetzungen. Patent: DE69204701T2 22.02.1996

GONZE MHA. Verwendung von Erythrit in Getränken. Patent: DE69707326T2 02.05.2002

HAJNY GJ, SMITH JH, GARVER JC. Erythritol Production by a Yeastlike Fungus. Applied and Environmental Microbiology 1964; 12(3): 240-246

HALLSWORTH JE, MAGAN NN. Culture Age, Temperature, and pH Affect the Polyole and Trehalose Contents of Fungal Propagules. Applied and environmental microbiology 1996; 62(7): 2435-2442

HANSSEN L, VAN REGENMORTEL A, VERACHTERT H. pH-Dependent Polyol Production in *Moniliella tomentosa*. Applied Microbiology 1972; 24(5): 831-833

HASSELBECK G, HENKE W. Erbslöh-Weinkompodium Enzyme. ERBSLÖH Geisenheim AG 2007; 6

HATTORI K, SUZUKI T. Large Scale Production of Erythritol and Its Conversion to D.Mannitol Production by n-Alkane-grown *Candida zeylanoides*. Agricultural and Biological Chemistry 1974; 38(6): 1203-1208

HIELE M, GHOOS Y, RUTGEERTS P, VANTRAPPEN G. Metabolism of Erythritol in humans: comparison with glucose and lactitol. The British journal of nutrition 1993; 69(1): 169-176

HIRATA Y, IGARASHI K, EZAKI S, ATOMI H, IMANAKA T. High-level production of erythritol by strain 618A-01 isolated from pollen. Journal of bioscience and bioengineering 1999; 87(5): 630-635

HOOTMANN U, BISPING B, REHM H-J. Physiology of polyol formation by free and immobilized cells of the osmotolerant yeast *Pichia farinose*. Applied Microbiology and Biotechnology 1991; 35(2): 258-263

ISHIZUKA H, WAKO K, KASUMI T. Breeding of a mutant *Aureobasidium sp.* with high erythritol production. Journal of Fermentation and Bioengineering 1989; 68(5): 310-314

ISHIZUKA H, TOKUOKA K, SASAKI T, TANIGUCHI H. Purification and some properties of an erythrose reductase from an *Aureobasidium sp.* Mutant. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 1992; 56(6): 941-945

JEYA M, LEE KM, TIWARI MK, KIM JS. Isolation of a noval high Erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of Erythritol fermentation to industrial level. Applied and Environmental Microbiology 2009; 83: 225-231

KAWANABE J. Non-cariogenicity of erythritol as a substrate. Nihon University journal of oral science 1990; 16(1): 27-36

KIM HJ, LEE DY, LEE DH, PARK YC, KWEON DH, PYU YW, SEO JH. Strategic proteome analysis of *Candida magnolia* with an unsequenced genom. PROTEOMICS 2004; 4(11): 3588-3599

- KIM KA, NOH BS, KIM SY, OH DK. Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula sp* and erythritol production. Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 1999; 27(2): 91-95
- KIM KA, NOH BS, LEE JK, KIM SY, PARK YC, OH DK. Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula sp.*. Journal of microbiology and biotechnology 2000; 10(1): 69-74
- KIM SY, LEE KH, KIM JH, OH DK. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. Biotechnology Letters: 1997; 19(8): 727-729
- KIM Y, PARK SC, WOLF BW, HERTZLER SR. Combination of Erythritol and fructose increases gastrointestinal symptoms in healthy adults. Nutrition Research 2011; 31(11): 836-841
- KOH ES, LEE TH, LEE DH, KIM HJ, RYU YW. Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. Biotechnology Letters 2003; 25(24): 2103-2105
- KOUTINAS AA, WANG RH, WEBB C. The biochemurgist – Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 2007; 1: 24-38
- KRISTOFIKOVA L, ROSENBERG M, MIKOVA H. Erythrol – a new sweetener. Bulletin Potravinarskeho Vyskumu 1997; 36(1): 41-49
- LARSSON C, MORALES C, GUSTAFSSON L, ADLER L. Osmoregulation of the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii* Grown in a Chemostat at Different Salinities. Journal of Bacteriology 1990; 172(4): 1769-1774
- LEE DH, LEE Y, RYU Y, SEO J. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel erythrose reductase from *Candida magnolia JH110*. Microbial Cell Factories 2010; 9:43
- LEE JK, HA SJ, KIM SY, OH DK. Increased Erythritol production in *Torula sp.* By Mn^{2+} and Cu^{2+} . Biotechnology Letters 2000; 22(12): 983-986
- LEE JK, HA SJ, KIM SY, OH DK. Increased Erythritol production in *Torula sp.* with inositol and phytic acid. Biotechnology Letters 2001; 23(7): 497-500
- LEE JK, KOO BS, KIM SY. Fumarate-Mediated Inhibition of Erythrose Reductase, a Key Enzyme for Erythritol Production by *Torula corallina*. Applied and Environmental Microbiology 2002; 68(9):4534-4538
- LEE JK, KIM SY, RYU YW, SEO JH, KIM JH. Purification and Characterization of a Novel Erythrose Reductase from *Candida magnoliae*. Applied and Environmental Microbiology 2003a; 69(7): 3710-3718
- LEE JK, JUNG HM, KIM SY. 1,8-Dihydroxynaphtalene (DHN)-Melanin Biosynthesis Inhibitors Increase Erythritol Production in *Torula corallina*, and DHN-Melanin Inhibits Erythrose Reductase. Applied and Environmental Microbiology 2003b; 69(6):3427-3434
- LEE JK, HONG KW, KIM SY. Purification and properties of a NADPH-dependent erythrose reductase from the newly isolates *Torula corallina*. Biotechnology progress 2003c; 19(2): 495-500
- LEE KJ, LIM JY. Optimized Conditions for High Erythritol Production by *Penicillium sp. KJ-UV29*, Mutant of *Penicillium sp. KJ 81*. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2003; 8: 173-178
- LIN SD, HWANG CF, YEH CH. Physical and Sensory Characteristics of Chiffon Cake Prepared with Erythritol as Replacement for Sucrose. Journal of Food Science 2003; 68(6): 2107-2110

LIN SJ, WEN CY, LIAU JC, CHU WS. Screening and production of Erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. *Process Biochemistry* 2001; 36(12): 1249-1258

LIN SJ, WEN CY, WANG PM, HUANG JC, WEI CL, CHANG JW, CHU WS. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella sp.*. *Process Biochemistry* 2010; 45(6): 973-979

MAGNUSSON I, EINARSSON K, ANGELIN B, NYBERG B, BERGSTRM K. Effects of somatostatin on hepatic bile formation. *Gastroenterology* 1989; 96(1): 206-212

MÄKINEN KK. Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Medical principles and practice* 2011; 20(4): 303-320.

MARGULIES M, VISHNIAC W. Dissimilation of Glucose by the *MX* Strain of *Rhizopus*. *Journal of Bacteriology* 1961; 81(1): 1-9

MEIJER S, PANAGIOTOU G, OLSSON L, NIELSEN J. Physiological characterization of xylose metabolism in *Aspergillus niger* under oxygen-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 2007; 98(2): 462-475

MOON HJ, JEYA M, KIM IW, LEE JK. Biotechnological production of Erythritol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 86: 1017-1025

MUNRO IC, BERNT WO, BORZELLECA JF, FLAMM G, LYNCH BS, KENNEPOHL E, BÄR EA, MODDERMAN J. Erythritol: An Interpretive Summary of Biochemical, Metabolic, Toxicological and Clinical Data. *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36: 1139-1174

MÜLLER-ESTERL W, Biochemie. Pentosephosphatweg – ein adaptives Stoffwechselmodul. In: Ders., Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kieß, Katrin Rädinger und Michael Plenikowski. Spektrum Akademischer Verlag 2007; Heidelberg: 522-527

OH DK, CHO CH, LEE JK, KIM SY. Increased Erythritol production in fed-batch cultures of *Torula sp.* by controlling glucose concentration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2001; 26(4): 248-252

OHMORI S, OHNO Y, MAKINO T, KASHIHARA T. Characteristics of erythritol and formulation of a novel coating with erythritol termed thin-layer sugarless coating. *International journal of pharmaceutics* 2004; 278(2): 447-457

OKU T, NODA K. Influence of chronic ingestion of newly developed sweetener, Erythritol on growth and gastrointestinal function of the rats. *Nutrition Research* 1990; 10(9): 987-996

OKU T, OKAZAKI M. Laxative threshold of sugar alcohol erythritol in human subjects. *Nutrition Research* 1996; 16(4): 577-589

ONISHI H, SHIROMURA Y. Physiological changes induced by salt stress in a salt-tolerant soy-yeast, *Saccharomyces rouxii*. *FEMS Microbiology Letters* 1984; 25(2-3): 175-178

OOKURA T, AZUMA K, ISSHIKI K, TANIGUCHI H, KASUMI T, KAWAMURA Y. Primary Structure Analysis and Functional Expression of Erythroreductases from Erythritol-producing Fungi (*Trichosporonoides megachiliensis* SNG-42). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2005; 69(5): 944-951

OOKURA T, KASUMI T. Yeast *Gcy1p* Reduces Erythrose and Erythrose-4-phosphate. *Report of National Food Research Institute* 2007; 71: 57-60

PAPANIKOLAOU S, FAKAS S, FICK M, CHEVALOT I, GALIOTOU-PANAYOTOU M, KOMAITIS M, MARC I, AGGELIS G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy* 2008; 32: 60-71

PARK J, SEO B, KIM J, PARK Y. Production of Erythritol in Fed-Batch of *Trichosporon* sp.. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998; 86(6): 577-580

PARK YC, LEE DY, LEE DH, KIM HJ, RYU YW, SEO JH. Proteomics and physiology of erythritol-producing strains. *Journal of Chromatography B* 2005; 815: 251-260.

PARK YK; KOO MH, OLIVEIRA IM. Biochemical characteristics of osmophilic yeast isolated from pollen and honey. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1996; 60(11): 1872-1873

PEREIRA MA, KHOURY MM, GLAUERT HP DAVIS RA. Screen of five alkyl carbamates for initiating and promoting activity in rat liver. *Cancer Letters* 1991; 57(1): 37-44

PFEIFER VF, SOHNS VE, CONWAY HF, LANCASTER EB, DABIC S, GRIFFIN EL jr. Two-Stage Process for Dialdehyd Starch Using Electrolytic Regeneration of Periodic Acid. *Industrial and Engineering Chemistry* 1960; 52(3): 201-206

RAO RS, JYOTHI CP, PRAKASHAM RS, RAO CS, SARMA PN, RAO LV. Strain Improvement of *Candida tropicalis* for the Production of Xylitol: Biochemical and Physiological Characterization of Wild-type and Mutant Strain CT-OMV5. *The Journal of Microbiology* 2006; 44(1): 113-120

RICHTER H, VLAD D, UNDEN G. Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the Erythritol and acetate production. *Archives of Microbiology* 2001; 175(1): 26-31

RÖPER H, GOOSSENS J. Erythritol, a New Raw Material for Food and Non-food Applications. *Starch - Stärke* 1993; 45(11): 400-405

RYMOWICZ W, RYWINSKA A, ZAROWSKA B, JUSZCZYK P. Citric Acid Production from Raw Glycerol by Acetat Mutans of *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Papers* 2006; 60(5): 391-394

RYMOWICZ W, RYWINSKA A, GLADOWSKI W. Simultaneous production of citric acid and Erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* *Wratistavia K1*. *Chemical Papers* 2008; 62(3): 239-246

RYMOWICZ W, RYWINSKA A, MARCINKIEWICZ M. High-yield production of Erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 2009; 31: 377-380

RYU YW, PARK CY, PARK JB, KIM SY, SEO JH. Optimization of Erythritol production by *Candida magnolia* in fed-batch culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2000; 25(2): 100-103

SAVERGAVE LS, GADRE RV, VAIDYA BK, NARAYANAN K. Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from *Candida magnolia* mutant R23. *Biochemical Engineering Journal* 2011; 55(2): 92-100

SAWADA K, TAKI A, YAMAKAWA T, SEKI M. Key role for transketolase activity in Erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009; 108(5): 385-390

Scientific Committee on Food, European Commission; Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Food on Erythritol; 2003

SEO JH, RYU YW, JUNG SR, KIM SY. Fermentation process for preparing erythritol by a high salt tolerant mutant of *Candida* sp. Patent 2001: EP 1 092 781 A1

SLOAN JW, HOFREITER BT, MEHLTRETTER CL, WOLFF IA. Hydrogenolysis of Dialdehyd Starch to Erythritol and Ethylene Glycol. United States Patent Office 1957: Nr. 2,783,283

SPENCER JFT, SALLANS HR. Production of Polyhydric Alcohols by Osmophilic Yeast. Canadian Journal of Microbiology 1956; 2(2): 72-79

TALJA RA, ROOS YH. Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. Thermochimica Acta 2001; 380: 109-121

TAROCCO F, LECUONA RE, COUTO AS, ARCAS JA. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. Biotechnological Products and Process Engineering 2005; 68: 481-488

TETZLOFF W, DAUCHY F, MEDIMAGH S, CARR D, BÄR A. Tolerance to subchronic, high-dose ingestion of erythritol in human volunteers. Regulatory toxicology and pharmacology 1996; 24(2): 286-295

TOKUOKA K, ISHIZUKA H, WAKO K, TANIGUCHI H. Comparison of three Forms of Erythrose Reductase from an *Aureobasidium* sp. mutant. The Journal of General and Applied Microbiology 1992; 38: 145-155

VEIGA-da-CUNHA M, FIRME P, SAN ROMAO MV, SANTOS H. Application of super(13)C nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58(7): 2271-2279

VEIGA-da-CUNHA M, SANTOS H, VAN SCHAFTINGER E. Pathway and regulations of erythritol formation in *Leuconostoc oenes*. Journal of Bacteriology 1993; 175(13):3941-3948

WHELAN AP, VEGA C, KERRY JP, GOFF HD. Physiochemical and sensory optimization of a low glycemic index ice cream formulation. International Journal of Food Science and Technology 2008; 43(9): 1520-1527

YANG SW, PARK JB, HAN NS, RYU YW, SEO JH. Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of *Candida magnolia*. Biotechnology Letters 1999; 21(10): 887-890

YAO J, ZHANG JL, WU YQ, LU ZJ. Contrasting study of erythritol and xylitol on *Streptococcus mutans*. West China journal of stomatology 2009; 27(6): 603-605

YPSILOS IK, MAGAN N. Impact of water-stress and washing treatments on production, synthesis and retention of endogenous sugar alcohols and germinability of *Metarhizium anisopliae* blastospores. Mycological Research 2004; 108(11): 1337-1345

YUILL JL. Production of i-erythritol by *Aspergillus niger*. Nature 1948; 162.4121: 652

Internetseiten zur Erythritolbestellung, abgerufen am 27.9.2012:

http://sandos-naturkost.de/product_info.php/info/p352_Erythritol---Wiezucker-E.html

<http://minapo.com/onlineshop/erythrit-erythritol-dose.html>

<http://www.novasweet.de/Online-Shop/sweetERY-Erythritol/sweetERY-3-x-800g-Erythritol-Erythrit-Zucker-Ersatz.html>

<http://www.low-carb-shop.cc/pi7/pi20/pd21.html>

<http://www.amazon.de/Wiezucker-%C2%AE-Kg-Erythrit->

[Erythritol/dp/B005M9IOHA/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-1](http://www.amazon.de/Wiezucker-%C2%AE-Kg-Erythrit-Erythritol/dp/B005M9IOHA/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-1)

<http://www.amazon.de/SUKRIN-4x500g-ZuckerErsatz-Erythritol->

[Einf%C3%BChrungsangebot/dp/B006QS8P9I/ref=sr_1_4?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-4](http://www.amazon.de/SUKRIN-4x500g-ZuckerErsatz-Erythritol-Einf%C3%BChrungsangebot/dp/B006QS8P9I/ref=sr_1_4?ie=UTF8&qid=1348780038&sr=8-4)

<http://www.zuckerersatz-shop.de/index.php?cPath=2>

http://shop.null-kalorien.de/index.php?cat=c9_Grossgebinde---Sackware-Erythritol-9.html

<http://www.alibaba.com/showroom/erythritol.html>