



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK  
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

# PATENTSCHRIFT 148 437

Wirtschaftspatent  
Erteilt gemäß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

(11) 148 437 (45) 27.05.81 Int. Cl.<sup>3</sup> 3(51) A 23 J 1/04  
A 23 J 3/00  
(21) WP·A 23 J / 216 915 (22) 15.11.79

- 
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
- (72) Limonta, Basiliano A., Dr. Dipl.-Chem., CU; Behnke, Ulrich, Dr. Dipl.-Chem., DD; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem., DD
- (73) siehe (72)
- (74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Ernährung, Büro für Schutzrechte und Neuererwesen, 1505 Bergholz-Rehbrücke, Arthur-Scheunert-Allee 114-116
- 

(54) Herstellung von Fischproteinhydrolysat

---

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Fischproteinhydrolysates, insbesondere aus Haifischfleisch, unter Verwendung von proteolytischen Enzymen, insbesondere Thermitase, einer Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*. Ziel der Erfindung ist die bessere Verwertbarkeit von wenig genutzten Fischrohstoffen für die menschliche Ernährung. Hierbei besteht die Aufgabe, durch geeignete Vorbehandlung unerwünschte Bestandteile des Fischfleisches (z.B. Harnstoff und Ammoniak bei Haifischfleisch, Lipide, Amine u.a.) zu entfernen und funktionelle Eigenschaften des Fischproteins (z.B. Löslichkeit, Emulgierbarkeit, Verschäumbarkeit) durch enzymatische Partialhydrolyse zu verbessern. Zur Vorbehandlung wird das Fischfleisch zunächst mit verdünnter Säure gerührt und danach unter jeweiligem Abtrennen des unlöslichen Niederschlages dieser mit schwacher äthanolischer Natronlauge und mit Äthanol extrahiert. Das erhaltene Fischprotein wird entweder nach Zwischentrocknung oder direkt enzymatisch partiell hydrolysiert und getrocknet. Die Trocknung kann insgesamt oder einzeln nach Trennung in den löslichen und unlöslichen Anteil vorgenommen werden. Bei Hydrolysegraden bis 10% tritt kein bitterer Geschmack auf. Die Hydrolysate können für Lebensmittel- oder Diätlebensmittel-Zubereitungen eingesetzt werden.

-1- 216915

Anmelder: Akademie der Wissenschaften der Republik Kuba,  
Institut für Chemie und experimentelle Biologie,  
Havanna<sup>1</sup>  
Akademie der Wissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik, Zentralinstitut für Ernährung,  
Bergholz-Rehbrücke<sup>2</sup>

Erfinder: Dr. Basiliano Aldana Limonta<sup>1</sup>  
Dr. Ulrich Behnke<sup>2</sup>  
Prof. Dr. Heinz Ruttloff<sup>2</sup>

#### Herstellung von Fischproteinhydrolysat

#### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Fischproteinhydrolysat (FPH), das aus Haifischfleisch oder anderen Fischarten oder Fischabfällen durch enzymatische Hydrolyse mit guten sensorischen, ernährungsphysiologischen und funktionellen Eigenschaften hergestellt werden kann. Diese Hydrolysate können für Lebensmittel- oder Diätlebensmittel-Zubereitungen eingesetzt werden.

#### Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Herstellung von FPH werden saure, alkalische und enzymatische Hydrolysen angewandt. Diese Verfahren weisen verschiedene Vor- und Nachteile auf. Mittels Säurehydrolyse (Salzsäure, Schwefelsäure) kann man Gemische freier Aminosäuren herstellen; hierbei werden aber wichtige Aminosäuren, insbesondere Tryptophan, zerstört. Weiterhin enthält das End-

produkt eine relativ große Menge Säure, deren Eliminierung oder Neutralisierung aufwendig ist bzw. zu einem hohen Salzgehalt des Produktes führt; andererseits entstehen auf Grund der Hydrolysebedingungen unerwünschte Huminstoffe.

Die alkalische Hydrolyse kann die Racemisierung einiger Aminosäuren zur Folge haben, und das Endprodukt enthält eine größere Menge an Alkali, dessen Entfernung ebenfalls nicht ohne weiteres möglich ist bzw. eine hohe Salzbelastung des Präparates zur Folge hat. Wegen der Racemisierung und der möglichen Umwandlung von Cystein in Lanthionin wird die Nahrungsqualität verschlechtert.

Die enzymatische Hydrolyse kann durch Entstehung bitterer Peptide eine negative Geschmacksbeeinflussung bewirken. Daneben haben derartige Hydrolysate zuweilen einen unangenehmen Geruch, wodurch ihre Anwendung beeinträchtigt werden kann. Andererseits erhält man aber durch die Hydrolyse mit Enzymen ein FPH mit hoher biologischer Wertigkeit und besseren funktionellen Eigenschaften. Aus diesem Grund wird an dieser Problematik gearbeitet mit dem Ziel, ein Hydrolysat mit besserem Geschmack und Geruch zu erhalten, das für einen Einsatz in Lebensmitteln geeignet ist. Gemäß der bekannten Literatur- und Patentbeschreibungen zur Herstellung von FPH sind verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden, die fast alle auf folgendem Prinzip beruhen:

Als Ausgangsmaterial dient eine wäßrige Aufschlämmung, die 20 - 30 % Fisch oder Fischprodukte enthält, deren pH-Wert für die Hydrolyse durch Zugabe von Alkali oder Säure (enzymabhängig) eingestellt wird. Die Hydrolyse mit tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Proteasen erfolgt beim pH- und Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms. Das Gemisch wird nach der Hydrolyse mit einem Lösungsmittel behandelt, bis das entfettete Fischhydrolysat praktisch geruch- und geschmacklos ist, und danach wird getrocknet. Die Trockensubstanz besteht im wesentlichen

aus Peptiden und Aminosäuren.

Der Proteingehalt von FPH und die Werte der essentiellen Aminosäuren sind ähnlich wie beim Fischproteinkonzentrat. Insbesondere ist ein hoher Lysinwert ( $\approx 10,5$  g/16 g N) zu verzeichnen. Im allgemeinen sind die funktionellen Eigenschaften von FPH günstiger als diejenigen von FPK. Ein Nachteil des Produktes ist die Bitterkeit, die vor allem vom Hydrolysegrad abhängig ist.

Über die Verwendung von Haifischfleisch für die Herstellung von FPH liegen bisher keine Kenntnisse vor.

Als für die menschliche Ernährung wichtigsten Bestandteil enthält Fischfleisch biologisch hochwertiges Eiweiß, das zusammen mit demjenigen aus Säugetier- und Geflügelfleisch sowie Milch und Eiern im Vergleich zu anderen Proteinen an der Spitze steht. Haifischfleisch und Fleisch von anderen Knorpelfischen stehen in dieser Hinsicht den genannten Proteinen nicht nach. Der Proteingehalt, bezogen auf das Rohprotein (N . 6,25), liegt bei 18,1 %, und hat im Vergleich zu Ei- und Milchprotein einen hohen Lysin- und Tryptophangehalt. Daneben enthält der Haifischmuskel noch andere N-haltige Bestandteile (Nicht-Protein-Stickstoff, insbesondere Harnstoff), die sowohl für den Geschmack als auch für den Verderb von Bedeutung sein können. Auf Grund des hohen Harnstoffgehaltes wird nach dem Tod des Tieres sehr schnell Ammoniak gebildet. In der Fischindustrie werden aus bestimmten Haifischarten z. T. Erzeugnisse hergestellt, deren Bezeichnung ihre Herkunft nicht erkennen läßt. Verkaufspsychologische Überlegungen haben hierfür an Stelle des abschreckend wirkenden Namens "Haifisch" zu anderen Bezeichnungen geführt, die beim Verbraucher gut angekommen sind (z. B. "Schillerlocke" und "Seeaal" aus Dornhai; "Kalbsfisch" aus Heringshai; "Speckfisch" aus Grauhai). Auf Grund der genannten Nachteile wird die Hauptmenge des Haifischfanges (300 - 400 kt pro Jahr) der Tierernährung zugeführt. Das FPH bietet eine Möglichkeit, um das Haifischprotein für die menschliche

Ernährung zu verwerten.

### Ziel der Erfindung

Zweck der Erfindung ist die Herstellung von FPH mit neutralem, insbesondere nicht bitterem Geschmack, hohem Nährwert und günstigen funktionellen Eigenschaften, vorzugsweise aus Haifischfleisch.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde die speziellen Bedingungen für die Gewinnung derartiger FPH aufzuzeigen. Bei der Gewinnung von FPH kann direkt von Haifischfleisch oder anderen Fischfleischarten ausgegangen werden, oder es wird zunächst entsprechend den ersten Vorbehandlungsstufen Fischproteinkonzentrat (FPK) hergestellt und gelagert, worauf anschließend die Enzymeinwirkung erfolgt. Für die Vorbereitung des Fischfleisches, die Hydrolyse und die Aufarbeitung hat sich folgende erfindungsgemäße Verfahrensweise als besonders geeignet herausgestellt:

Das zerkleinerte Fischfleisch wird zur Entfernung unerwünschter Verbindungen (z. B. Harnstoff, Ammoniak, Amine, Geruchs- und Geschmacksstoffe u. a.) mit der 2 - 5fachen, vorzugsweise 3 - 4fachen Menge 0,05 - 1 %iger, vorzugsweise 0,1 - 0,25 %iger Phosphorsäure bei Temperaturen von 50 - 70 °C, vorzugsweise bei 60 °C, 1 - 5 h, vorzugsweise 2 - 4 h, in Bewegung gehalten und danach der Rückstand abgetrennt. Letzterer wird zur Entfernung von Lipiden mit 0,01 - 1 %iger, vorzugsweise 0,05 - 0,1 %iger, äthanolischer Natronlauge erneut 0,5 - 5 h, vorzugsweise 1 - 3 h, gerührt und der unlösliche, abgetrennte Proteinanteil wird 1 - 3, mal, vorzugsweise 2 mal, während 10 - 60 min, vorzugsweise 15 - 45 min, mit Äthanol bei 30 - 60 °C, vorzugsweise 40 - 50 °C, extrahiert. Das so erhaltene FPK kann nach Abtrennung aus der Suspension im Vakuum getrocknet und als lagerfähiges

Zwischenprodukt aufbewahrt werden.

Der Rückstand bzw. das FPK werden mit 0,05 %iger Natronlauge auf einen Proteingehalt von 4 - 10 %, vorzugsweise 6 - 8 %, gebracht und mit Salzsäure auf einen für das zu verwendende Enzym geeigneten pH-Wert (für Thermitase z. B. pH 9) eingestellt. Nach dem Mischen wird eine Protease, z. B. Thermitase (eine Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*; DD-WP 112 662, DD-WP 106 130), Bromelin oder eine andere Protease zugegeben, und es wird unter Rühren bei einer für das verwendete Enzym geeigneten Temperatur (40 - 70 °C, für Thermitase z. B. 50 - 60 °C) 0,5 - 3 h, vorzugsweise 1 - 1,5 h, bebrütet. Die Enzymmenge wird erfindungsgemäß so dosiert, daß das Hydrolysat einen Hydrolysegrad (Anteil der hydrolysierten Peptidbindungen des Ausgangsproteins; Bestimmung freigesetzter NH<sub>2</sub>-Gruppen z. B. mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) von 0,5 - 10 %, je nach gewünschten funktionellen Eigenschaften (z. B. Löslichkeit, Verschäumbarkeit und Schaumstabilität, Emulgierbarkeit und Emulsionsstabilität, Wasserbindungsvermögen u. a. die alle vom Hydrolysegrad abhängig sind) aufweist. Zur Inaktivierung der Enzymaktivität wird innerhalb von 30 min auf 100 °C erhitzt. Man erhält ein Gemisch eines Eiweißpräzipitates und eines löslichen FPH-Anteils, die gemeinsam oder getrennt getrocknet (z. B. Vakuumtrocknung, Sprühtrocknung, Gefriertrocknung) und gelagert werden. Die gegebenenfalls erwünschte Trennung des Hydrolyсата in einen löslichen und einen unlöslichen Anteil erfolgt bei einem vorgegebenen pH-Wert, z. B. pH 4,0. Fischprotein-Partialhydrolysate mit Hydrolysegraden über 10 % weisen zunehmende Bitterkeit auf. Die erhaltenen Produkte sind weiß bis hell-cremefarbig, geruchlos und von neutralem, nicht bitterem Geschmack und sind für den Einsatz in Lebensmitteln oder Diätlebensmitteln vorgesehen.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1

25 kg zerkleinertes Haifischfleisch ( $\approx 3,9$  kg Protein) werden mit der 3,5fachen Menge 0,2 %iger Phosphorsäure bei  $60^{\circ}\text{C}$  3 h in kontinuierlicher Bewegung gehalten und danach zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit 0,05 %iger äthanolischer Natronlauge 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der nach erneutem Zentrifugieren erhaltene unlösliche Proteinanteil zweimal 30 min mit Äthanol bei  $40^{\circ}\text{C}$  extrahiert. Der Rückstand wird mit einer 0,05 %igen Natronlauge auf einen Proteingehalt von 8 % eingestellt, mit 1 N und 0,1 N Salzsäure auf pH 9,0 gebracht und 10 min bei  $50^{\circ}\text{C}$  gerührt. Danach wird die erforderliche Menge Thermitase zugegeben, und es wird 1 h unter Rühren bei  $50^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Zur Inaktivierung der Enzymaktivität wird im Verlauf von etwa 30 min auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Durch Zentrifugieren erhält man ein Eiweißpräzipitat und das lösliche FPB im Überstand. Das Proteinsediment wird im Vakuum getrocknet und in einer Kolloidmühle pulverisiert ( $\approx 2,2$  kg Protein). Der Überstand wird nach Einengung im Vakuum sprühgetrocknet ( $\approx 1,3$  kg Protein).

### Beispiel 2

Gleiche Arbeitsweise wie im ersten Beispiel, aber nach der Inaktivierung des Enzyms, wird die Mischung im Vakuum konzentriert und gefrier- oder sprühgetrocknet.

### Beispiel 3

Gleiche Arbeitsweise wie im ersten Beispiel, aber nach der Inaktivierung des Enzyms wird die Mischung mit 1 N und 0,1 N Salzsäure auf pH 4 eingestellt und danach 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Sediment und löslicher Anteil werden getrocknet.

Beispiel 4

Das aus Haifischfleisch hergestellte FPK wird mit einer 0,05 %igen Natronlauge auf etwa 8 % Protein eingestellt und gemischt. Dann wird der Prozeß wahlweise nach Beispiel 1, 2 oder 3 fortgesetzt.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Fischproteinhydrolysates, dadurch gekennzeichnet, daß Fischfleisch, insbesondere Haifischfleisch, nacheinander einer sauren, alkalischen und äthanolischen Vorbehandlung unter jeweiligem Abtrennen des unlöslichen Proteinanteils unterworfen und dieser anschließend mit einer Protease, vorzugsweise Thermitase, hydrolysiert wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die saure Vorbehandlung mit einer 0,05 bis 1 %igen, vorzugsweise 0,1 bis 0,25 %igen Phosphorsäure in 2 bis 5facher, vorzugsweise 3 bis 4facher Menge bei 50 bis 70 °C, vorzugsweise bei 60 °C, während 1 bis 5 h, vorzugsweise 2 bis 4 h, unter Rühren vorgenommen wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach Abzentrifugieren des Niederschlages der sauren Vorbehandlung dieser 0,5 bis 5 h, vorzugsweise 1 bis 3 h, bei Raumtemperatur mit 0,01 bis 1 %iger, vorzugsweise 0,05 bis 0,1 %iger, äthanolischer Natronlauge vorbehandelt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß der abzentrifugierte Niederschlag der alkalischen Vorbehandlung 1 bis 3 mal, vorzugsweise 2 mal, während 10 bis 60 min, vorzugsweise 15 bis 45 min, mit Äthanol bei 30 bis 60 °C, vorzugsweise bei 40 bis 50 °C, extrahiert wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß das mit Äthanol extrahierte Fischprotein mit 0,05 %iger Natronlauge auf einen Proteingehalt von 4 bis 10 %, vorzugsweise 6 bis 8 %, und danach mit Salzsäure auf den für das jeweilige Enzym erforderlichen pH-Wert, vorzugsweise für Thermitase auf pH 9, einge-

stellt wird.

6. Verfahren nach Punkt 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Hydrolyse während 0,5 bis 3 h, vorzugsweise 1 bis 1,5 h, bei 40 bis 70 °C, für Thermitase vorzugsweise bei 50 bis 60 °C, unter Rühren durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Punkt 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymmenge so dosiert wird, daß der Hydrolysegrad im Bereich von 0,5 bis 10 % liegt.
8. Verfahren nach Punkt 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inaktivierung des Enzyms innerhalb von 30 min auf 100 °C erhitzt und danach auf Zimmertemperatur abgekühlt wird.
9. Verfahren nach Punkt 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrolysat wahlweise insgesamt getrocknet wird, oder daß nach Trennung des Hydrolysats bei einem vorgegebenem pH-Wert, z. B. 4,0, in den löslichen und den unlöslichen Anteil jeweils beide erhaltenen Fraktionen einzeln getrocknet werden.