



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 284 110 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 23 J 1/18

DEUTSCHES PATENTAMT

(21) DD A 23 J / 231 591 1

(22) 20.07.81

(45) 07.11.90

(71) Humboldt-Universität zu Berlin, Unter den Linden 6, Berlin, 1086, DD

(72) Lippert, Eberhard, Doz. Dr. agr.; Kretschmar, Utta, Dipl.-Chem., DD

(73) Humboldt-Universität zu Berlin, Sektion Nahrungsgüterwirtschaft/Lebensmitteltechnologie, Bereich Gärungstechnologie, Berlin, 1040, DD

(74) siehe (71)

(54) Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus Mikroorganismen

(57) Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Extraktion von mikrobiellem Protein für die Herstellung von Nahrungsmitteln. Das Ziel der Erfindung ist es, das mikrobielle Protein mit einer hohen Ausbeute und hohen Reinheit des Proteinisolats zu gewinnen, die hinsichtlich des Nucleinsäuren- und Lipidgehalts unter 2% liegt. Gleichzeitig ist die Aufgabe gestellt, die oben genannten Ziele unter Vermeidung einer alkalischen Belastung des Proteins zu erreichen, da diese zu negativen Proteinmodifizierungen hinsichtlich ernährungsphysiologischer und verarbeitungstechnologischer Eigenschaften führt. Das Wesen der Erfindung besteht aus diesem Grunde darin, daß das biologische Material in einer sauren Vorbehandlungsstufe einerseits auf einen hocheffektiven Extraktionsprozeß vorbereitet wird und andererseits einer fast vollständigen Nucleinsäurenextraktion unterliegt. Dieser Vorbehandlungsstufe folgt dann nach einer Waschstufe ohne wesentliche Hilfsstoffzusätze die saure Extraktion.



Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von mikrobiellem Protein mit dem Ziel, einen proteinogenen Ausgangsrohstoff zur Erzeugung von Produkten für die menschliche Ernährung zu erhalten, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Mikroorganismen, sowohl Hefen als auch Bakterien, nach einer Vorbehandlung mit äthanolischer Mineralsäurelösung bei einem pH-Wert von vorzugsweise 0,7–1,5, einer Temperatur von vorzugsweise 50–80°C und einer Zeit von 30–70 min und anschließender Waschung mit Leitungswasser die Extraktion mit einer anorganischen Säure oder einem organisch-anorganischen Säuregemisch bei einem pH-Wert von vorzugsweise 1,0–2,0 unter Druck bei 110–160°C und einer Zeit von 0,5–6 min erfolgt und nach Abtrennung der Zellreste die Fällung des extrahierten Proteins an IP durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Vorbehandlungsstufe die Äthanolanwendungskonzentration 10–35 Vol.-% beträgt und als Mineralsäure vorzugsweise Schwefelsäure eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Vorbehandlungsstufe die Mikroorganismen nur mit Mineralsäure behandelt werden.
4. Verfahren nach Punkt 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zur Vorbehandlung angewandten Chemikalien wiederholt in dieser Prozeßstufe eingesetzt werden können.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zur Proteinextraktion angewandte anorganische Säure Phosphorsäure ist und das Säuregemisch aus Essigsäure und Phosphorsäure im Verhältnis 1:2 bis 2:1 besteht.
6. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pH-Wert am Ende des Waschprozesses nach der äthanolisch-sauren Vorbehandlung etwa 1,3 beträgt, um mit der für die Erreichung des Extraktions-pH erforderlichen Phosphorsäuremenge für den Fall der Rezirkulation des Ablaufs zur Gewinnung der gleichen Menge an Ausgangsbiomasse des P₂O₅-Bedarf deckend arbeiten zu können.
7. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die vorbehandelten Zellen durch den Waschvorgang auf solch einen pH-Wert gebracht werden, der einen zusätzlichen Säureeinsatz für die Extraktion erübrigt.
8. Verfahren nach Punkt 1–7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das biologische Material Hefen, insbesondere der Gattungen *Candida* und *Saccharomyces*, bzw. Bakterien, insbesondere thermophile oder methanolverwertende Mikroorganismen, in Form des nativen biologischen Materials bzw. getrockneter Biomasse sind.
9. Verfahren zur Gewinnung des mikrobiellen Proteins, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Erreichung desselben optimalen Extraktionseffektes in der sauren Stufe die Vorbehandlung unter äthanolisch-alkalischen Bedingungen (pH 9–10) bei 50°C 5–10 min lang durchgeführt wird, wobei im Falle der Äthanolanwendung die Konzentration 30 Vol.-% beträgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von mikrobiellem Protein für die Herstellung von Nahrungsmitteln.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Gewinnung des mikrobiellen Proteins kann bekanntlich durch chemische, physikalische oder mechanische Aufschlußverfahren bzw. -methoden erreicht werden. Bei den chemischen Verfahren überwiegt der alkalische Aufschluß, bei dem vorbehandelte bzw. nichtvorbehandelte Mikroorganismen einstufig bzw. zweistufig im alkalischen Bereich zwischen pH 8,0 bis 12,0 und Temperaturen von 70–170°C behandelt werden. Die meisten dargestellten Verfahren enthalten nicht alle Angaben, die für eine umfassende Einschätzung des jeweiligen Verfahrensprinzips notwendig sind. Doch wird bei den bekannten Verfahren der Nachteil deutlich, daß beschriebene Lösungswege auf der eine Seite zu guten Ergebnissen hinsichtlich des Anteils an extrahiertem Protein führen, die daraus gewonnenen Proteinisolate aber nicht den Anforderungen genügen, auf der anderen Seite die Anforderungen an ein Proteinisolat erfüllt werden, die Ausbeuten an gefällttem Protein gegenüber der Reinproteinmenge im biologischen Ausgangsmaterial aber unbefriedigend sind. Nur solche Verfahren zur Gewinnung von Protein aus Mikroorganismen kann man als optimal bezeichnen, deren Bedingungen nicht nur zu hohen Anteilen an extrahiertes Protein an sich führen, sondern wo dieses Protein auch weitgehend isoelektrisch fällbar ist und letztendlich eine hohe Ausbeute an gefällttem Protein gegenüber der Reinproteinmenge im biologischen Ausgangsmaterial von über 70% bei relativ geringer Stufenzahl des Verfahrens erreicht wird und wo die Produkte nicht nur einen hohen Reinproteingehalt von über 85%, sondern auch niedrige Nucleinsäuren- und Lipidgehalte von jeweils unter 2% haben.

Durch die überwiegend angewandten alkalischen Reaktionsbedingungen ist nicht auszuschließen, daß Proteinmodifizierungen durch Vorgänge wie Racemisierung, Maillard-Reaktion, Dephosphorylierung, NH_3 - und H_2S -Abspaltung und Lysinoalaninbildung auftreten, die die Qualität des Proteinmaterials herabsetzen. Die Anwendung extremer alkalischer Bedingungen führt nicht nur zu einer unvermeidbar hohen Proteinhydrolyse, sondern auch zu einer Verschlechterung der Proteinlöslichkeit. Weitere Belastungen am Protein treten auch durch sich hinsichtlich der Lipidreduzierung notwendig machender Maßnahmen zur Vorbehandlung des biologischen Ausgangsmaterials bzw. zur Nachbehandlung des gefällten Proteins auf.

Neben der bisher betonten alkalischen Extraktion bietet auch der saure Extraktionsvorgang eine Möglichkeit zur Gewinnung des mikrobiellen Proteins. Allerdings sind noch nicht solche Verfahren bekannt, die zur gleichzeitigen Erfüllung der oben genannten Kriterien für ein optimales Proteingewinnungsverfahren führen.

So führt eine Säurebehandlung von *Torula*-Hefen (US 3833 552) bei einer Molarität von 0,25–0,5, bei einer Temperatur von 60–100°C, einer Reaktionszeit bis zu 30 min und Anwendung verschiedener Mineralsäuren zu nicht annähernd vertretbaren Proteinausbeuten und nach experimenteller Überprüfung beim Einsatz von Salzsäure (1,0 M) zu einer Proteinextraktion, die 65% nicht überschreitet. Außerdem erwies sich der extrahierte Proteinanteil als nicht fällbar. Es kann angenommen werden, daß der Nucleinsäuregehalt den Anforderungen nicht genügt.

In einem weiteren Verfahren (DP 2042 571) ist die Wirkung der sauren Extraktion abhängig von einer kurzzeitigen Vorbehandlung im extrem alkalischen Bereich (pH 13,0). Die Erreichung eines pH-Wertes von 1,0 erfordert dann nicht nur hohe Säuremengen, sondern führt auch noch zu einer hohen Salzbelastung. Außerdem sind die aufgeführten Bedingungen der kombinierten Wirkung für Hefen nicht übertragbar, wobei auch schon die mit bakterieller Biomasse als Ausgangsorganismus erreichten Proteinstickstoffkonzentrationen des Isolats von 12% nicht ausreichend sind. Die ungenügenden Reinheitsgrade können z. T. durch unvermeidbar hohe Nucleinsäuregehalte des Isolats erklärt werden und dadurch, daß die im Alkalischen durch Nucleinsäuren- und Lipidhydrolyse entstehenden Reaktionsprodukte vor der sauren Extraktion nicht durch einen Separationsschritt abgetrennt werden und somit ein Teil bei der Proteinfällung mitgefällt wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung eines Proteinisolates aus Mikroorganismen für die Herstellung von Nahrungsmitteln. Das Verfahren ermöglicht eine maximale Ausbeute an Reinprotein, eine sehr hohe Reinheit des Proteinisolats und damit die Einhaltung der Grenzwerte für Restnucleinsäuren und Restlipide von unter 2%, ohne daß eine Nachbehandlung des Isolats erfolgen muß. Dabei wird das Protein unter Bedingungen gewonnen, die eine mit negativen Veränderungen des Proteins verbundene alkalische Belastung gänzlich ausschließen bzw. nur in einer der eigentlichen Proteinextraktion vorangestellten Vorbehandlungsstufe eine betont milde Alkalibeeinflussung bewirken.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, bei der Proteinextraktion aus Mikroorganismen ein Verfahren zu erreichen, das eine hohe Reinproteinausbeute und eine hohe Reinheit des Isolats garantiert, wobei durch Alkalien induzierte negative Proteinmodifizierungen weitestgehend ausgeschlossen sind. Die negativen Proteinmodifizierungen, ausgelöst insbesondere durch Alkalieinwirkung bei höheren Temperaturen, umfassen vorwiegend Racemisierung, Proteinhydrolyse, Maillard-Reaktion, Dephosphorylierung, Verringerung der Proteinlöslichkeit, NH_3 - und H_2S -Abspaltung und Bildung von Lysinoalanin. Gleichzeitig liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Proteinisolate mit niedrigen Restlipidgehalten von unter 2% zu erreichen, ohne daß eine diesbezügliche Vorbehandlung am biologischen Material bzw. eine Nachbehandlung am Isolat erfolgen muß. Die Zielstellungen sollen auch gleichzeitig unter dem Gesichtspunkt erreicht werden, daß eine hohe Fällbarkeit des extrahierten Proteins, eine optimale Koagulatbildung beim Fällvorgang und ein geringer Hilfsstoffeinsatz bei der Extraktion gesichert sind. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß das biologische Material zur Vorbereitung auf die Proteinextraktion und zur weitestgehenden Nucleinsäurenreduzierung bei einem pH von 0,7–1,5 mit einer äthanolischen Mineralsäurelösung bei 50–80°C 30–70 min vorbehandelt wird, wobei die Äthanolkonzentration 10–35 Vol.-% beträgt. Anschließend erfolgt eine Waschung des Sediments mit Leitungswasser. Das nach weiterer Zentrifugation erhaltene Sediment wird auf eine bevorzugte Trockensubstanzkonzentration von 6–7% suspendiert und mit einer anorganischen Säure oder einem anorganisch-organischen Säuregemisch bei einem pH-Wert von 1,0–2,0 und einer Temperatur von 110–160°C während einer Zeit von 0,5–6 min zur Extraktion gebracht. Nach Abkühlung erfolgt die Trennung der Zellreste von der Proteinlösung, der dann eine isoelektrische Fällung, entweder bei Raumtemperatur oder in der Hitze (80°C), folgt. Zur Verringerung des Salzgehaltes kann das Isolat am IP mit phosphorsaurem Wasser nachgewaschen werden. Die Mengen an Phosphorsäure bei der Extraktion des mikrobiellen Proteins sind dann optimal, wenn sie den P_2O_5 -Mengen der bei diesem Prozeß eingesetzten Hefen entsprechen, um somit im Falle einer Rezirkulation dieses Ablaufs in die Fermentation den Phosphatbedarf damit decken zu können. Das Ziel der Erfindung kann hinsichtlich der sehr guten Ausbeuten und hohen Reinheit und unter Umgehung negativer Proteinmodifizierungen auch dann erreicht werden, wenn die Vorbehandlung unter äthanolisch-alkalischen Bedingungen bei pH 9–10, 50°C, 5–10 min lang durchgeführt wird.

Ausführungsbeispiel 1

Saccharomyces cerevisiae mit einem Reinproteingehalt von 32,9% in der Trockensubstanz sowie 5,1% Nucleinsäuren und 6,4% Lipiden wird mit Wasser, Äthanol und Schwefelsäure so suspendiert, daß Bedingungen von einer Biomassetrockensubstanzkonzentration von 23,3 g/100 ml bei einer Anwendungskonzentration von 20 Vol.-% Äthanol und pH 0,7 erhalten und bei 70°C 50 min wirksam werden. Nach dieser Vorbehandlung und Abkühlung wird das durch Zentrifugation erhaltene Sediment mit Leitungswasser auf einen pH von 1,9 gewaschen und das nach erneuter Zentrifugation erhaltene Sediment in Wasser so suspendiert, daß eine Trockensubstanzkonzentration von 6,3% erhalten wird. 10 Volumenteile dieser

Suspension und 0,3 Volumenteile eines Säuregemisches von Essigsäure und Phosphorsäure ($v/v = 2:1$) werden innerhalb von 75s getrennt auf etwa 160°C erhitzt und nach Vereinigung zur Extraktion des Proteins 40s bei dieser Temperatur belassen. Im Anschluß daran erfolgt die Abkühlung und Abtrennung des Überstandes von den Zellresten. Die Fällung des Proteins erfolgt durch Zugabe von Natronlauge zur sauren Proteinlösung bis zum Erreichen des Isoelektrischen Punktes beim pH etwa 4,4. Zur Herabsetzung des Salzgehaltes schließt sich eine Waschung am IP mit phosphorsaurem Wasser an. Das auf diese Weise erhaltene Proteinisolat hat einen Reinproteingehalt von 91,5%, einen Restnucleinsäuren- und Restlipidgehalt von 0,9 bzw. 1,9%. Der Wirkungsgrad der Proteinextraktion beträgt 87%. Die Menge an gefällttem Protein bezogen auf die Menge an extrahiertem Protein wurde zu 89% ermittelt.

Ausführungsbeispiel 2

Unter Beibehaltung der im Ausführungsbeispiel 1 dargelegten Vorbehandlung und anschließenden Waschung kann die Proteinextraktion auch bei alleiniger Anwendung von Phosphorsäure durchgeführt werden. Zu 10 Volumenteilen einer 6,8%igen Hefesuspension werden 0,08 Volumenteile konzentrierte Phosphorsäure gegeben. Nach einer Aufheizzeit von 75s erfolgt die Extraktion bei etwa 160°C und einem pH-Wert von 1,5 35s lang. Der Wirkungsgrad der Proteinextraktion beträgt 83% und der fällbare Anteil 84%. Das nicht nachgewaschene Isolat enthielt 1,1% Nucleinsäuren und 1,8% Lipide.

Ausführungsbeispiel 3

Saccharomyces cerevisiae mit einem Reinproteingehalt von 28,0% in der Trockensubstanz sowie 8,1% Lipiden wird mit äthanolischer Natronlauge suspendiert, so daß eine Äthanolanwendungskonzentration von 30 Vol.-% und ein pH-Wert von 10,0 resultieren. Die Vorbehandlung bei 50°C dauert 5min. Nach anschließender Zentrifugation wird das Sediment mit Leitungswasser auf pH 9,0 gewaschen und nach weiterer Zentrifugation mit Wasser suspendiert. 10 Volumenteile dieser Suspension und 0,8 Volumenteile des Säuregemisches Essigsäure/Phosphorsäure ($v/v = 2:1$) werden getrennt innerhalb von 60s auf etwa 160°C erhitzt und reagieren während 45s bei pH 1,5 miteinander. Nach Abkühlung und Zentrifugieren wird das Protein aus dem sauren Überstand am IP gefällt. Der Wirkungsgrad der Proteinextraktion beträgt 92% und der fällbare Anteil 75%. Das Isolat enthielt 0,4% Lipide und 0,8% Nucleinsäuren.