



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 236 448 A1

4(51) A 23 J 1/14

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 23 J / 275 451 4

(22) 23.04.85

(44) 11.06.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Schwenke, Klaus D., Dr. Dipl.-Chem., DD; Nitocka, Elzbieta, Dr. Dipl.-Chem., PL; Kujawa, Manfred, Dr. sc. Dipl.-Chem., DD; Macholz, Rainer, Dr. sc. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen für Nahrungszwecke

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen für Nahrungszwecke. Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einfaches, allgemein anwendbares Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen für die Verwendung in Lebensmitteln zu entwickeln. Wesentlich für das erfindungsgemäße Verfahren ist, daß die Proteine bei eingestelltem pH-Wert in Gegenwart von Amino- und/oder Sulfhydrylgruppen enthaltenden Verbindungen oder speziellen Reduktionsmitteln extrahiert, durch Salzfällung niedergeschlagen, bis zu einem Modifizierungsgrad von 10 bis 70%, vorzugsweise 10 bis 40%, acyliert und von niedermolekularen Stoffen befreit werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen für Nahrungszwecke, **dadurch gekennzeichnet**, daß Rapssamen durch Grobzerkleinerung, Windsichtung, Fettextraktion, Siebung und Flotation zu einem fettarmen, schalenfreien Mehl verarbeitet, daraus die Proteine in nativem Zustand mit wäßrigen Salzlösungen bei pH-Werten zwischen 5 und 10, vorzugsweise zwischen 6,0 und 9,5, in Gegenwart einer Aminogruppen enthaltenden Komponente und/oder eines Reproduktionsmittels extrahiert, die Proteine durch Zugabe von Neutralsalzen ausgefällt und entweder in verschiedene Fraktionen zerlegt oder als Gesamtproteinfraktion weiterverarbeitet, die isolierten Proteine mit Carbonsäureanhydriden, vorzugsweise Bernsteinsäure- oder Acetanhydrid, bis zu einem Acylierungsgrad von 10 bis 70%, vorzugsweise 15 bis 40%, modifiziert und schließlich die acylierten Proteine durch Dialyse oder Ultrafiltration, gegebenenfalls in Verbindung mit dem Aufkonzentrieren der wäßrigen Lösungen, von Nebenprodukten der Reaktion und anderen niedermolekularen Bestandteilen befreit und in Form ihrer Natriumsalze getrocknet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Reduktionsmittel Sulfhydrylgruppen enthaltende Verbindungen, wie β -Mercaptoethanol oder Cystein, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Aminogruppen enthaltende Verbindungen Aminosäuren, insbesondere ϵ -Aminocapronsäure, β -Alanin oder Cystein, oder niedermolekulare wasserlösliche aliphatische Amine, insbesondere Mono-, Di- oder Triäthanolamin, eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fällung der Proteine durch partielle Sättigung der Proteinextrakte mit Ammonium- oder Natriumsulfat durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nach Salzfällung erhaltenen Proteine in Gegenwart des Fällungsmittels in Wasser oder Puffer gelöst oder suspendiert werden und die Acylierung bei einer Konzentration von 1 bis 10% Protein erfolgt.

Hierzu 1 Seite Tabellen

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen mit gewünschten funktionellen Eigenschaften aus Rapsmehl für Nahrungszwecke.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Pflanzenproteine sollen, um als Eiweiß für Nahrungszwecke in Lebensmittel eingearbeitet werden zu können, bestimmte funktionelle Eigenschaften aufweisen. Die ernährungsphysiologisch hochwertigen Rapsproteine haben in Form ihrer Konzentrate oder Isolate zumeist eine sehr stark herabgesetzte Löslichkeit und eine verminderte Funktionalität.

(A. M. Hermansson, D. Ohlson und B. Hohenberg, Lebensmittel-wiss. und Technologie **7**, 176 [1974]; R. Ohlson und K. Anjou, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **56**, 431 [1979]), die nur nach tiefgreifender Modifizierung, wie chemischer oder enzymatischer Hydrolyse, entscheidend verbessert werden kann. Die niedrige Stickstofflöslichkeit kommerzieller Rapsproteinkonzentrate konnte selbst nach chemischer Modifizierung durch Azylierung, die im allgemeinen die Proteinlöslichkeit erhöht, nur unbedeutend verbessert werden (L. U. Thompson und Y. S. Cho, J. Food Sci. **49**, 771 [1984]).

In dem WP 215693 wird ein Verfahren zur Gewinnung von Proteinen einschließlich von Rapsproteinen beschrieben, in dem mit dem Ziel der Erhöhung der Proteinausbeute und der Herstellung von Proteinen mit verbesserten funktionellen Eigenschaften die Proteinextraktion mit einer Azylierung kombiniert wird. Funktionelle Eigenschaften werden dort jedoch nicht nachgewiesen. In weiteren Veröffentlichungen wird nachgewiesen, daß eine Azylierung von Rapsproteinen unerwünschte Wechselwirkungen derselben mit Phytinsäure verhindert (L. U. Thompson und Y. S. Cho, J. Food Sci. **49**, 771 [1984]) und daß azylierte Rapsproteine günstige funktionelle Eigenschaften, wie Emulgier- und Schaumbildungsvermögen, aufweisen (L. U. Thompson und Y. S. Cho, J. Food Sci. **49**, 1584 [1984]). Es werden dort jedoch weder Zusammenhänge zwischen bestimmten funktionellen Eigenschaften und dem Azylierungsgrad noch die spezifische Beeinflussung funktioneller Eigenschaften der Rapsprotein-Fraktion im Zusammenhang mit für Rapsproteine charakteristischen qualitätsbeeinflussenden Verfahrensschritten beschrieben. Die Problematik der Gewinnung für Nahrungszwecke funktionell akzeptabler Rapsproteine besteht im wesentlichen in folgendem:

- Die Rapsproteine werden bereits im Schrot durch die zur Myrosinase-Inaktivierung übliche thermische Behandlung stark geschädigt und verlieren so bereits vor der Extraktion ihre natürlichen funktionellen Eigenschaften.
- Die Extraktion aus thermisch unbehandeltem Schrot kann zur Reaktion der Proteine mit Spaltprodukten der Thio glycoside führen.
- Die Proteinextraktion aus unbehandeltem oder behandeltem Rapsmehl oder -schrot unter Verwendung alkalisch wäßriger Lösungen führt zu einer Wechselwirkung der Proteine mit Nichtprotein-Inhaltsstoffen (z. B. Phenolen), die die Proteine dunkel färbt und deren physikochemische Eigenschaften verändern kann.
- Die isoelektrische Fällung der Proteine aus Extrakten führt in der Regel zu irreversibler Aggregation, die durch Wechselwirkung mit Nichtprotein-Inhaltsstoffen begünstigt wird. Die funktionellen Eigenschaften der stark aggregierten Proteine lassen sich auch nach chemischer Modifizierung nur begrenzt verbessern.
- Rapsproteine bestehen aus zwei nach Zusammensetzung und Struktur verschiedenen Hauptfraktionen, die die funktionellen Eigenschaften von Proteinisolaten oder -konzentraten sehr unterschiedlich beeinflussen können.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einfaches, allgemein anwendbares Verfahren zur Gewinnung von acylierten Rapsproteinen für die Verwendung in Lebensmitteln unter Beseitigung der genannten Mängel im Stand der Technik zu entwickeln. Der Erfindung liegt demzufolge die Aufgabe zugrunde, die speziellen Bedingungen für ein derartiges Verfahren aufzuzeigen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß kann diese Aufgabe gelöst werden, indem die nachfolgend genannten Verfahrensschritte und -bedingungen nacheinander durchgeführt und erfüllt werden:

Zunächst wird ein von Fett und Schalen befreites Rapsmehl durch Kombination von Grobzerkleinerung, Entfettung, Windsichtung und Feinmahlung hergestellt. Nach einer Vortrocknung bei 50 bis 60°C werden die Rapssamen in einem Walzenstuhl einer Grobzerkleinerung unterworfen. Nachfolgende Windsichtung entfernt den Hauptteil der Schalen, Wichtig ist, daß nach dem anschließenden Entfetten mit Petrolether oder Diethylether eine Fraktionierung des Mehles durch Siebung zu einer feinen Mehlfraction (Partikeldurchmesser $\leq 160 \mu\text{m}$) vorgenommen wird. Letztere kann durch Flotation in Hexan von Schalenresten befreit werden.

Danach folgt eine Extraktion der Proteine im nativen Zustand mit wäßrigen Salzlösungen bei pH-Werten zwischen 5 und 10, vorzugsweise zwischen 6 und 9,5, in Gegenwart eines Reduktionsmittels und einer Aminogruppen enthaltenden Komponente bzw. in Gegenwart von Sulfhydrylgruppen enthaltenden Komponenten oder Alkalisulfiden bzw. Hydrosulfiden, die zugleich die Rolle des Reduktionsmittels übernehmen.

Die Myrosinase der Rapssamen wird bei der erfindungsgemäßen Verfahrensweise nicht durch Hitzebehandlung inaktiviert, sondern die Spaltprodukte der Thioglucoside werden so abgefangen, daß eine Reaktion mit den funktionellen Gruppen der Proteine weitgehend unterbleibt. Die Proteinextraktion wird deshalb in Gegenwart von Aminogruppen tragenden Verbindungen durchgeführt. Als solche sind wasserlösliche niedermolekulare aliphatische Amine, z. B. Mono-, Di- oder Triethanolamine, oder Aminosäuren geeignet. Der Einsatz von ϵ -Aminocapronsäure, die in einfacher Weise aus technischen Caprolactam gewonnen werden kann, hat den Vorzug, daß die ϵ -Aminogruppen derselben eine ähnliche Reaktionsfähigkeit besitzt wie die ϵ -Aminogruppe des Lysins, die als eine der reaktionsfähigsten Gruppen der Proteine Angriffsstelle für zahlreiche reaktive Sameninhaltsstoffe ist. Eine weitere hierfür gut geeignete, als Puffersubstanz verwendete ω -Aminosäure ist β -Alanin. Der alternative Einsatz von D, L-Cystein hat den Vorteil, daß hier sowohl eine reaktionsfähige Aminogruppe als auch eine reaktionsfähige Sulfhydrylgruppe im Molekül vorliegen. Letztere besitzt ähnliche Wirkungen wie eine Aminogruppe, fungiert darüber hinaus aber noch als Reduktionsmittel, das die Oxydation phenolischer zu chinoiden Verbindungen und damit eine weitere Reaktion von Nichtprotein-Sameninhaltsstoffen mit Proteinen verhindert. Alternativ eignen sich für diesen Zweck Sulfid-Ionen, die auch zur Extraktion von Pflanzenproteinen eingesetzt werden, oder andere Sulfhydryl-Verbindungen, wie das üblicherweise in der Proteinchemie verwendete 2-Mercaptoethanol.

Als nächster Verfahrensschritt folgt die Fällung der Proteine als Globuline und Albumine enthaltende Gesamtproteinfraktion unter Vermeidung einer Isoelektrischen Fällung durch Aussalzen mittels Neutralsalzen und nachfolgende Trennung in Albumin- und Globulinfraktionen durch fraktioniertes Lösen und Fällern nach an sich bekannter Arbeitsweise oder Isolierung der Gesamtproteinfraktion. So läßt sich bei 90%iger Sättigung des Proteinextraktes mit Ammoniumsulfat, mit Natriumsulfat oder anderen Neutralsalzen ein Gemisch der gelösten Proteine niederschlagen. Die Trennung in Globulin- und Albuminfraktion wird, wie in der Literatur beschrieben, (B. Raab und K. D. Schwenke, Nahrung 28, 863 [1984]) durch fraktioniertes Lösen und Fällern mit Salz vorgenommen. In Verbindung mit der erfindungsgemäß beschriebenen Verfahrensweise der Proteinextraktion resultieren bei dieser Fällung und Fraktionierung native Proteine mit guten funktionellen Eigenschaften (s. Tabelle). Diese lassen sich durch Succinylierung in einer Weise modifizieren, die die Proteine für bestimmte Einsatzzwecke geeignet macht.

An die Proteingewinnung schließt sich die Acylierung mit einem Carbonsäureanhydrid an. Die nach Salzfällung erhaltenen Proteine können entweder vor der Acylierung vom anhaftenden Salz befreit und danach in Wasser oder Puffer in gewünschter Konzentration gelöst oder aber sofort in Wasser oder Puffer suspendiert und nach pH-Einstellung auf einen pH von 7 bis 8 durch Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid, Acetanhydrid oder anderen Carbonsäureanhydriden acyliert werden. Dieser Verfahrensweise hat den Vorteil, daß bei höheren Proteinkonzentrationen, nämlich im Bereich von 1 bis 10%, gearbeitet werden kann.

Die zunächst suspendiert vorliegenden Proteine lösen sich mit fortschreitender Reaktion bei zunehmendem Acylierungsgrad. Erfindungsgemäß wird die Modifizierung mit einer vorgegebenen Menge an Carbonsäureanhydrid bis zu einer Acylierung von 5 bis 70%, vorzugsweise von 15 bis 40% der Proteinaminogruppen vorgenommen. Es wurde gefunden, daß die Albumin- und die Globulinfraktion ein sehr unterschiedliches Reaktionsvermögen mit den Carbonsäureanhydriden aufweisen. So erfolgt beispielsweise die Blockierung von 90% der Aminogruppen der sehr reaktiven Albuminfraktion bereits mit einem 6fachen molaren Überschuß an Bernsteinsäureanhydrid. Die entsprechende Modifizierung des 12-S-Globulins erfordert dagegen einen 600fachen molaren Überschuß des Reagens. Die erschöpfende Succinylierung des Gesamtprotein-Präparates gelingt entsprechend dem Verhältnis beider Proteinfraktionen mit einem 100- bis 300fachen molaren Überschuß.

Nach erfolgter Succinylierung wird die als Nebenprodukt durch Hydrolyse von überschüssigem Reagens entstandene Carbonsäure gemeinsam mit unerwünschten niedermolekularen Substanzen, wie Phytinsäure und Salze, durch Dialyse gegen Wasser entfernt. In einfacher Weise erfolgt diese Dialyse in einer Ultrafiltrationszelle in Kombination mit dem Aufkonzentrieren der Proteinlösung. Da die Succinylierung insbesondere mit alkalischer Lösung bei pH 7 bis 8 erfolgt, liegt das Reaktionsprodukt als Alkali-Proteinat (vorzugsweise Natrium-Proteinat) vor. In dieser Form bleibt es während der Dialyse erhalten und wird der Gefrier- oder Sprühtrocknung unterworfen.

Es wurde weiter gefunden, daß die Hitzeaggregierbarkeit mit steigendem Grad der Modifizierung abnimmt (Abb.). Ebenso verschlechtern sich Emulgier- und Schaumbildungsvermögen bei hohen Acylierungsgraden.

Dagegen wurde für beide Rapsproteinfraktionen ein günstiger Bereich der Succinylierung gefunden, in dem die gewünschten funktionellen Eigenschaften ausgebildet werden. Dieser liegt zwischen 10 und 70%, vorzugsweise aber zwischen 15 und 40%, Acylierung. In diesem Bereich erhalten die Proteine durch die Abnahme der Hitzeaggregierbarkeit (Abb.) die Fähigkeit zur Bildung hitzebeständiger, klarer Lösungen und somit günstige Voraussetzungen für die Bildung von Gelstrukturen in

konzentrierten Systemen. Gleichzeitig erreicht die emulsionsstabilisierende Wirkung eines derartig succinylierten Rapsglobulins ein Maximum (Tab.), während die hohe Stabilität der Schäume beider Proteine unverändert bleibt. Die geringe Emulsionsstabilität der Albuminfraktion fällt jedoch bereits bei einem Modifizierungsgrad von 30% weiter ab. Die Schaumstabilität beider Proteine oder ihres Gemisches (Gesamtproteinpräparat) fällt erst bei Acylierungsgraden über 70% stark ab. Eine Modifizierung bei 70% der Proteinaminogruppen kann also für die Erzeugung stabiler Rapsproteinschäume ebenso in Kauf genommen werden wie für die Herstellung gelierender Rapsproteinsysteme.

Durch Einstellung des genannten Bereiches der Modifizierungsgrade gelingt es somit, einen Zustand günstiger funktioneller Eigenschaften zu erzeugen. Da darüber hinaus beide Hauptproteinfraktionen sich ähnlich verhalten, ist das Verfahren ebenso auf die Gesamtproteinfraktion anwendbar. Voraussetzung für diese Regulierbarkeit der Eigenschaften und darüber hinaus für die Gewinnung sensorisch akzeptabler Proteinpräparate ist die erfindungsgemäß beschriebene, der chemischen Modifizierung vorgeschaltete Durchführung der Samenvorbehandlung, der Proteinextraktion und schädigender Wechselwirkungen der Proteine mit anderen Sameninhaltsstoffen herabsetzt. So wird gleichzeitig erreicht, daß mit den herkömmlichen analytischen Methoden Thioglucoside und deren Spaltprodukte in den Proteinpräparaten nicht mehr nachweisbar sind. Die Erfindung soll anhand der folgenden Ausführungsbeispiele erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Rapssamen der Sorte Sollux wurden 12h bei 50 bis 60°C vorgetrocknet und danach in einem Walzenstuhl gebrochen. Mittels Luftklassierung wurde der Großteil der Schalen abgetrennt und das resultierende schalenarme Schrot mit Diethylether entfettet. Das entfettete, getrocknete Schrot wurde gesiebt und eine Hauptfraktion mit einem Partikeldurchmesser 160 µm gewonnen. Diese wurde durch Flotation in Hexan vollständig von Schalenresten befreit und das resultierende Mehl zur Proteinextraktion eingesetzt.

Diese erfolgte durch einstündiges Rühren von 300g Rapssamen mit 3l Sörensen-Phosphatpuffer vom pH8 (0,05 M Phosphat, Ionenstärke mit Natriumchlorid auf 1,0 eingestellt) in Gegenwart von 0,1% 2-Mercaptoethanol. Der klarzentrifugierte Extrakt wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zu 90%iger Sättigung versetzt, wobei sich ein Gesamtproteinpräparat abschied. Daraus wurde mit 35%iger gesättigter Ammoniumsulfatlösung die Albuminfraktion und mit 20%ig gesättigter Ammoniumsulfatlösung die Globulinfraktion extrahiert.

Die Proteine wurden mit Wasser unter Zugabe von Natronlauge bei einem pH-Wert von 8 oder alternativ mit dem natriumchloridhaltigen Extraktionspuffer gelöst und auf eine Konzentration von 5g Protein pro 100ml eingestellt. Zu 200ml der wäßrigen Albuminlösung wurde 1g festes Bernsteinsäureanhydrid portionsweise unter Rühren zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Natronlauge konstant auf 7,5 bis 8,0 gehalten. Nach beendeter Reaktion wurde die Lösung über Nacht gegen Wasser dialysiert und danach gefriergetrocknet. Es wurden 9,8g eines zu 25% succinylierten Albuminpräparates erhalten. Darin waren Thioglycoside und deren Aglucone mittels HPLC, Dünnschicht- und Gaschromatographie nicht mehr nachweisbar. In analoger Weise wurden 200ml einer 5%igen Lösung von Rapsglobulin in 0,5M Natriumchlorid enthaltenden Phosphatpuffer von pH8,0 durch Zugabe von 1,5g Bernsteinsäureanhydrid succinyliert. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurden 9,9g eines 30%igen succinylierten Globulinpräparates erhalten.

Beispiel 2

100g nach Beispiel 1 gewonnenes Rapsmehl wurden mit 1l einer 5% Natriumchlorid, 0,5% Natriumsulfit und 0,1% Aminocaprinsäure enthaltenden Lösung 1h bei 25°C extrahiert. Ein pH-Wert von 8,5 wurde dabei durch Zugabe von 0,5%iger Natronlauge konstant gehalten. Der klarzentrifugierte Extrakt wurde mit Natriumsulfat bei 90%iger Sättigung versetzt, wobei wie im Beispiel 1 ein aus Albumin und Globulin bestehendes Proteingemisch ausfiel. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurde dieses als hellcremefarbenes Proteinpräparat erhalten, das, wie im Beispiel 1 beschrieben, mit Bernsteinsäureanhydrid succinyliert wurde. Aus 10g Protein wurden nach Umsetzung mit 1g Bernsteinsäureanhydrid 8g eines 24%igen succinylierten Gesamtproteinpräparates erhalten.

Die aus der Proteinfällung stammende, Natriumsulfat enthaltende Überstandsflüssigkeit kann nach Verdünnen mit Wasser und zweckmäßigerweise durchgeführter Entfärbung mit Aktivkohle erneut zur Extraktion von Protein eingesetzt werden.

Beispiel 3

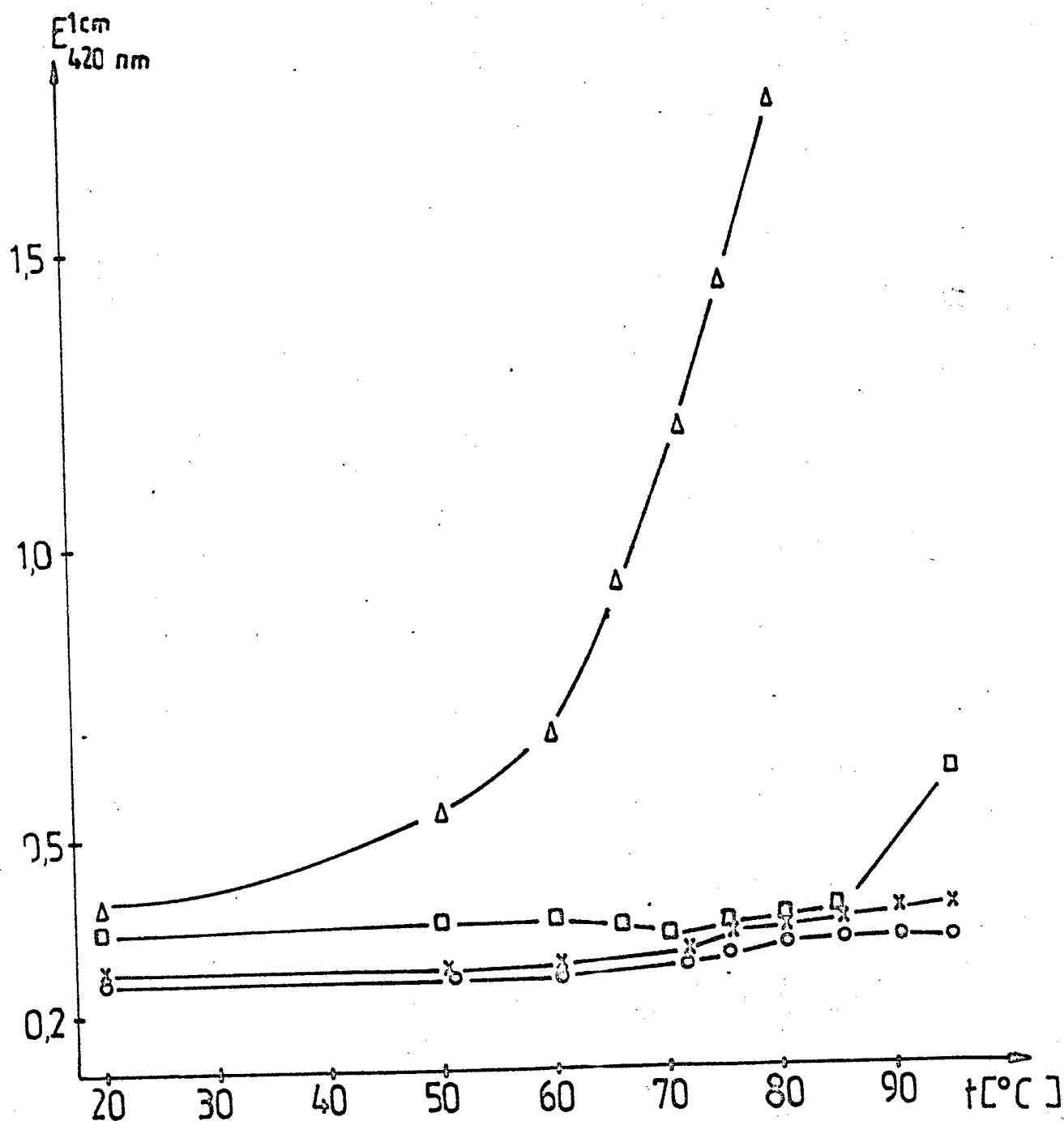
5g eines nach Beispiel 1 erhaltenen Rapsproteinpräparates wurden als Globulin-Albumin-Gemisch bei pH 7,5 bis 8,0 durch Zugabe von 0,3g Acetanhydrid acetyliert. Das resultierende modifizierte Protein wies einen Acetylierungsgrad von 28% auf. Seine Schaumstabilität in 3%iger Lösung betrug bei pH 5,5%, seine Emulsionsstabilität 88%.

Tabelle

Schaum- und Emulsionsstabilität der Rapsglobulin- und Rapsalbumin-Fraktion in Abhängigkeit vom Grad der Succinylierung

Succinylierungs- grad	Schaumstabilität (%)		Emulsionsstabilität	
	Globulin pH 7,0	Albumin pH 5,5	Globulin	Albumin
0	90	89	69	63
17 - 18	95	92	78	70
31 - 34	92	86	95	64
61	93		60	
88		9		58

Temperaturabhängigkeit der Hitzeaggregation der Raps- globulin-Fraktion vor und nach Succinylierung



Δ - Δ unmodifiziertes, $\square$ - $\square$ 18%ig, $\times$ - $\times$ 31%ig, $\circ$ - $\circ$ 61% ig
modifiziertes Protein

Trübungsmessung 0,1% iger Lösungen