



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 267 659 A1

4(51) A 23 J 1/18
C 12 P 21/06

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 23 J / 310 227 3	(22)	10.12.87	(44)	10.05.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Duwe, Hannelore, Dipl.-Chem.; Kreuter, Theodor, Dr. sc.; Lehwald, Ulrike, Dipl.-Chem.; Maltzer, Martina, DD

(54)	Verfahren zur Herstellung eines bitterfreien, völlig wasserlöslichen und durch Säuren nicht fällbaren mikrobiellen Proteinpartialhydrolysates
------	---

(55) Mikroorganismen, Zellwandrückstände, Abprodukte, Partialhydrolyse, Endopeptidase, Bitterstoff, Funktionalität, Nahrungsmittelzusatz

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Proteinpartialhydrolysaten für Nahrungsmittel und Pharmaka. Das Wesen der Erfindung besteht darin, ein bitterfreies Proteinpartialhydrolysat mit hohem Hydrolysegrad aus proteinhaltigen Zellresten von Mikroorganismen darzustellen. Das hergestellte Proteinpartialhydrolysat ist völlig wasserlöslich und am isoelektrischen Punkt nicht mehr fällbar. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, zu einer wesentlichen Verbesserung der Ökonomie von Verfahren zur Gewinnung weiterer Wertstoffe aus Einzellern beizutragen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines bitterfreien, völlig wasserlöslichen und durch Säure nicht fällbaren mikrobiellen Proteinpartialhydrolysates durch enzymatische Hydrolyse von proteinhaltigem Material mittels Endopeptidasen, **gekennzeichnet** dadurch, daß bei der Aufarbeitung mikrobieller Biomassen anfallende proteinhaltige Zellwandrückstände mit 20 000 bis 30 000 Tyrosineinheiten Endopeptidase/kg zu hydrolysierendes Rohprotein bei einem pH-Wert von 7 bis 8,5 und einer Temperatur von 40 bis 70°C während einer Zeit von 100 bis 150 Minuten hydrolysiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** dadurch, daß als Endopeptidase die aus *Thermoactinomyces vulgaris* gewonnene Thermitase als alleiniges Enzym eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von bitterfreiem, völlig wasserlöslichen und durch Säure nicht fällbarem funktionellem Proteinpartialhydrolysat, welches in Nahrungsmitteln und Pharmaka eingesetzt werden kann.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei der Beurteilung der bekannten technischen Verfahren zur Gewinnung bitterfreier Proteinpartialhydrolysate ist auf das Zielprodukt zu orientieren. Die Herstellung von mikrobiellem Proteinisolat und deren enzymatischer Abbau zu Produkten, die nicht die im Patentanspruch geforderten Eigenschaften haben, ist nicht Gegenstand der vorliegenden Erfindung. So sind eine ganze Reihe von Patenten bekannt, die die Herstellung von mikrobiellem Protein und deren enzymatischen Abbauprodukten beschreiben. Eine enzymatische Behandlung des mikrobiellen Proteins durch Proteasen erfolgt stets mit dem Ziel, die funktionellen Eigenschaften des mikrobiellen Proteins zu verbessern und damit die lebensmitteltechnologischen Voraussetzungen für den Proteineinsatz in Nahrungsmitteln zu gewährleisten. Ganz entscheidend für die Verwendung völlig wasserlöslicher und durch Säure nicht fällbarer mikrobieller Proteinabbauprodukte in Nahrungsmitteln ist deren Geschmack, der keinesfalls bitter sein darf.

Die Hydrophobität des mikrobiellen Proteins, die sich aus seiner Aminosäurezusammensetzung ergibt, bringt es mit sich, daß man normalerweise entweder völlig wasserlösliche und nicht säurefällbare, jedoch bittere Produkte erzielt, oder aber man erhält Produkte, die nicht bitter, dann aber auch nicht völlig wasserlöslich sind.

So kann z. B. nach dem DD-WP 154 190 durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen, die alle notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthalten, ein Proteinpartialhydrolysat für Diätnahrungen erhalten werden. Unter Verwendung von Fleisch als Proteinquelle erhält man nach dem genannten Verfahren tatsächlich ein bitterfreies, völlig wasserlösliches und durch Säuren nicht fällbares Produkt, weil das verwendete Protein nur eine geringe Hydrophobizität hat. Verwendet man aber ein Protein höherer Hydrophobizität, wie z. B. das im Patent ebenfalls ausdrücklich empfohlene Kasein oder das zwar im Patent nicht ausdrücklich erwähnte, jedoch ebenfalls in den Schutzanspruch fallende mikrobielle Protein, dann erhält man nur stark bittere Proteinpartialhydrolysate. Bei dem Einsatz dieses Proteinpartialhydrolysates in Elementardiäten ist der bittere Geschmack dieses Hydrolysates jedoch nicht von Bedeutung, da die Elementarnahrung durch eine Sonde verabreicht wird. Für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie wäre dieses Produkt jedoch nicht brauchbar.

Im DE-OS 3 143 947 wird ein Verfahren zur Herstellung von funktionellem Proteinhydrolysat aus mikrobiellem Bakterienproteinisolat beschrieben, welches einen hohen Proteingehalt, hervorragende funktionelle Eigenschaften und ein vorbestimmtes Molekulargewichtsspektrum aufweisen soll. Das Hydrolysat ist bitterfrei und die enzymatische Hydrolyse erfolgt ohne weitere Zusatzstoffe. Für die Durchführung dieses Verfahrens, daß von einem bereits gereinigten Eiweißisolat ausgeht, erfordert die Bitterfreiheit eine Einschränkung des Hydrolysegrades auf Werte, die noch unterhalb des lebensmitteltechnologischen Optimums liegen, die erhaltenen Partialhydrolysate sind sowohl durch Säuren fällbar als auch durch Hitze koagulierbar. Damit ist der Einsatz in der Lebensmittelindustrie von vornherein eingeschränkt, z. B. ist der Einsatz in der Getränkeindustrie nicht möglich. Das Anwendungsgebiet ist auf Nahrungsmittel allgemein festgelegt und wird am Beispiel von Baisers und Mayonnaise erläutert.

In DE-OS 3 008 900 wird ein Verfahren zur Herstellung eines gereinigten Proteinhydrolysates unter Anwendung der Ultrafiltration als Reinigungsmittel beschrieben. Ausgangsproteine können tierische, pflanzliche oder auch mikrobielle Proteine sein, die Hydrolyse kann sauer oder enzymatisch erfolgen. Zweifellos hat die Ultrafiltration einen hohen Reinigungseffekt, man erhält dabei Hydrolysate mit einem Molekulargewichtsspektrum zwischen 1 000 und 10 000. Allerdings geht diese Reinigung auf Kosten eines hohen Verlustes durch das hochmolekulare Retenat. Die Zurückführung des Retenats in eine Hydrolysestufe, wie im Patent beschrieben, ist aber nicht möglich, da gerade durch die Zurückhaltung des genannten Retenats die Bitterfreiheit bewirkt wird. In DE-OS 2 745 954 wird ein Verfahren zur Herstellung von modifiziertem Protein für Nahrungsmittel patentiert, wobei neben pflanzlichem und tierischem Protein auch mikrobielles Protein Einsatz finden soll. Gekennzeichnet ist das Verfahren dadurch, daß die enzymatische Behandlung möglichst kurzzeitig (max. 30 Minuten) und bei Temperaturen zwischen 20 und 65°C unter Zusatz mikrobieller, pflanzlicher oder tierischer Protease erfolgt. Die Umwandlung „des denaturierten Proteins in funktionelles Protein innerhalb von 30 Minuten ohne widerwärtige Bitterkeit im fertigen Proteinprodukt“ wird vorausgesetzt. Tatsächlich aber ist das nur eine Wunschvorstellung. Man erkennt aus den in der Patentschrift angeführten Vergleichsbeispielen, daß das im nativen Zustand bereits wesentlich bessere lösliche Molkenprotein bei dem beschriebenen Verfahren ein nur ungenügend lösliches Produkt liefert. Ersatz des Molkenprotein durch mikrobielles Protein führt mit Bestimmtheit zu wesentlich ungünstigeren Werten.

Der sich stereotyp an fast jedes der 29 Beispiele für die Anwendung der Molkenproteinhydrolysate anschließende Satz: „Funktionelle Hefeproteinbestandteile, wie in Beispiel 8 hergestellt, können an die Stelle von funktionellen Molkenproteinbestandteilen in dieser Rezeptur gesetzt werden.“ ist nicht glaubhaft: Wenn schon in einzelnen Fällen ein Ersatz des Molkenproteinhydrolysates durch Hefeproteinhydrolysat möglich sein mag, dann aber nur bei einer spezifischen Änderung der Rezeptur. Es existiert weiterhin eine Reihe von Patenten, die Möglichkeiten aufzeigen, um die Entstehung von Bitterpeptiden als Folge der enzymatischen Proteinhydrolyse zu vermeiden. So werden in DE-OS 3003679 während der enzymatischen Hydrolyse Kohlehydrate unterschiedlicher Art zugesetzt und es gelingt so, bitterfreie Hydrolysate mit einem um 10% höheren Proteinanteil als ohne Kohlehydratzusatz zu erzielen. Dieses so erzeugte Protein hat jedoch eingeschränkte Anwendungsmöglichkeiten auf dem Nahrungsmittelsektor. Aus den aufgezeigten Beispielen von Verfahren zur Herstellung enzymatischer Proteinpartialhydrolysate wird deutlich, daß bei Einsatz mikrobieller Proteinisolate als Ausgangsmaterial entweder bitterfreie Partialhydrolysate mit zu geringem Hydrolysegrad erhalten werden, falls nicht durch Zusatz weiterer Hilfsstoffe die Bildung von Bitterstoffen vermieden wird (DE-OS 3003679; DE-OS 330609).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines ernährungsphysiologisch hochwertigen und geschmacklich neutralen Proteinpartialhydrolysates, welches sich auf Grund seiner vollständigen Löslichkeit im neutralen und sauren pH-Bereich überall dort einsetzen läßt, wo diese Eigenschaften auf dem Lebensmittel- und Arzneimittelsektor eine Grundvoraussetzung darstellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein solches Ausgangsmaterial auszuwählen, mit welchem es möglich wird, ein bitterfreies Proteinpartialhydrolysat mit hohem Hydrolysegrad (> 10%) ohne Zusatz von Kohlehydraten oder anderen Stoffen herzustellen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß proteinhaltige Zellwände von Mikroorganismen, vorzugsweise Zellwandreste, die als Neben- bzw. Abfallprodukte bei der Gewinnung von Proteinisolaten anfallen, mit einem Proteingehalt von 10 und 50% Rohprotein in der Trockensubstanz mittels einer Peptidbindungen gegenüber unspezifischen Endoprotease, vorzugsweise Thermitase (Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*) der enzymatischen Hydrolyse unterworfen werden. Das enzymatisch zu hydrolysierende Material wird in wäßriger Suspension bei pH = 7,0 bis 8,5 und bei einer Temperatur von 40 bis 70°C unter Zusatz von 20 000 bis 30 000 Tyrosineinheiten Thermitase (1 Tyrosineinheit entspricht der Aktivität des Enzyms, die in 1 Minute bei 55°C aus Casein als Substrat 1 Mikromol Tyrosin freisetzt) 1 bis 3 Stunden hydrolysiert. Unmittelbar nach Ablauf der Hydrolysezeit erfolgt durch Erhitzen der Mischung für 10 Minuten auf 95 bis 100°C eine Inaktivierung des Enzyms. Nach Abtrennung des löslichen Überstandes und anschließender Lyophilisierung oder Sprühtrocknung wird ein farbloses, wasserlösliches und bitterfreies Proteinpartialhydrolysat erhalten. Nach einer Hydrolysezeit von etwa 2 Stunden ist der Rohproteingehalt des unlöslichen Rückstandes nahezu auf die Hälfte gesunken, der Hydrolysegrad des erhaltenen Hydrolysates beträgt 15 bis 20%, entsprechend einer mittleren Peptidkettenlänge von 6,6 bis 5,0. Auf Grund dieser Kettenlänge ist das erhaltene Produkt vorzugsweise für solche Einsatzgebiete auf dem Lebensmittelsektor und der Pharmazie anwendbar, wo die durch diese Kettenlänge bewirkten funktionellen Eigenschaften eine entscheidende Rolle spielen (z. B. für Getränke, Backwaren, Kaffeeaufheller, Schäume, Kindernährmittel, diätetische Nahrungsmittel u. a.). Speziell in der Pharmazie lassen sich mit kleinen Mengen mitunter wesentliche Wirkungen erzielen. Ein sehr großer Vorzug des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Verbesserung der Wirtschaftlichkeit der Verfahren zur Herstellung von Proteinisolaten aus Einzellerprotein. Die dabei anfallenden, zellwandhaltigen Rückstände der Mikroorganismen lassen als Sekundär- bzw. Abprodukte bei ihrer Verwertung (z. B. in der Schweinemast) nur einen geringen Gewinn erzielen, während bei der erfindungsgemäßen Aufarbeitung ein Produkt entsteht, dessen Wert demgegenüber vielfach höher ist.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Saccharomyces cerevisiae-Frischhefe wurde bei 95°C wäßrig extrahiert und anschließend einer zweimaligen Nukleinsäure-Extraktion mit 10%iger Kochsalzlösung bei 95°C unterzogen. Nach Zentrifugation wurde das Sediment mechanisch nach bekanntem Stand der Technik desintegriert und das Protein bei pH = 11 bis 12,5 in zwei Stufen aus dem aufgeschlossenen Sediment extrahiert. Der Extraktionsrückstand, d. h. die Zellreste enthielten 6,35% Stickstoff in der Trockensubstanz. Nach Zusatz von 22 Tyrosineinheiten pro Gramm Rohprotein erfolgte bei pH = 8 und 55°C unter pH-Stat-Bedingungen die Hydrolyse des Proteins in den Zellwandresten im Verlaufe von 120 Minuten. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch zehnminütiges Erhitzen des Ansatzes im siedenden Wasserbad. Nach anschließender Zentrifugation wurden Sediment und Überstand lyophilisiert. Der Stickstoffgehalt des Sedimentes war von 0,35% auf 4,2% in der Trockensubstanz gesunken. Der Hydrolysegrad der Peptide im Hydrolysat betrug 16,4% (bestimmt nach der TNBS-Methode) gegenüber dem Ausgangswert von 1,55% vor der Hydrolyse. Das entspricht einer mittleren Peptidkettenlänge des Hydrolysates von 6,1 und das erhaltene Produkt war absolut bitterfrei, klar löslich in Wasser und im sauren pH-Bereich nicht flockend.

Beispiel 2

Saccharomyces cerevisiae-Frischhefe wurde wie in Beispiel 1 zunächst mit Wasser bei 95°C extrahiert, die Nukleinsäuren wurden jedoch durch eine saure Extraktion bei pH = 2 und 95°C sowie eine nachfolgende alkalische Extraktion bei pH = 8 und 80°C entfernt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte analog Beispiel 1. Der Stickstoffgehalt des gewaschenen und getrockneten Rückstandes der Proteinextraktion betrug 7,15% N in der TS und sank nach 120 Minuten Hydrolyse mit 22 Tyrosineinheiten Thermitase pro g Rohprotein auf 4,45%. Der Hydrolysegrad des gelösten Proteins stieg von 0,76% auf 18,2% entsprechend einer mittleren Peptidkettenlänge von 5,4. Trotz dieser niedrigen Peptidkettenlänge wies auch dieses Produkt keinen bitteren Geschmack auf und zeigte neben guter Wasserlöslichkeit gute Schaumbildungskapazität (150% nach der Methode von SCHWENKE [1983] ermittelt).

Beispiel 3

Getrocknete Bakterienbiomasse von *Acetobacter methanolicus* wurde bei pH = 2 sauer extrahiert und das Sediment zweistufig bei pH = 8 und 80°C einer Nucleinsäureextraktion unterzogen. Während die direkte Hydrolyse des proteinreichen Extraktionsrückstandes mit einem Stickstoffgehalt von 12,8% in der TS unter Zusatz von 22 Tyrosineinheiten Thermitase/g Protein zu einem zwar klar löslichen, erwartungsgemäß jedoch bitteren Produkt mit einem Hydrolysegrad von 19,2% führte, konnte erfindungsgemäß nach vorheriger Abtrennung der nicht zellwandgebundenen Proteine ein bitterfreies Produkt mit sonst gleichen Eigenschaften erhalten werden.