



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 23 J / 280 498 4 (22) 11.09.85 (44) 19.11.86

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

(72) Mieth, Gerhard, Dr. Dipl.-Lebensmittelchem.; Lange, Erika, Dipl.-Lebensmittelchem.; Proll, Jürgen, Dr. Dipl.-
Biol.; Marzillger, Karin, DD

(54) Verfahren zur Gewinnung chemisch modifizierter Proteine

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung chemisch modifizierter Proteine aus pflanzlichen, tierischen und/oder mikrobiellen proteinhaltigen Rohstoffen durch Acetylierung und Succinylierung. Die bifunktionellen Proteinmodifikate sind als Zusatzstoffe für die Lebensmittelindustrie, vorzugsweise zur Herstellung von Wasser-in-Fett- und/oder Fett-in-Wasser-Emulsionen sowie Fett- und Nichtfett-Schäumen, bestimmt. Erfindungsgemäß werden pflanzliche, tierische und/oder mikrobielle Proteine in den Rohstoffen oder als Proteinisolate einer 2stufigen oder einer gleichzeitigen Acylierung mit Bernsteinsäure- und Acetanhydrid unterworfen. Die Reaktionsprodukte können in an sich bekannter Weise aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung chemisch modifizierter Proteine aus pflanzlichen, tierischen und/oder mikrobiellen proteinhaltigen Rohstoffen, vorzugsweise in Form von Proteinisolaten, durch Extraktion, Fällung und Acylierung der Proteine, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Proteine unter an sich bekannten Reaktionsbedingungen einer sukzessiven 2stufigen Acetylierung und Succinylierung oder Succinylierung und Acetylierung oder einer gleichzeitigen Acetylierung und Succinylierung unterworfen werden, und das Reaktionsprodukt gegebenenfalls durch isoelektrische Präzipitation, Aussalzen, Copräzipitatbildung, Komplexbildung oder Ultrafiltration abgeschieden wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Acylierung mit einem der beiden Acylierungsmitteln in der 1. Reaktionsstufe bis auf einen Acylierungsgrad von 10 bis 90% und mit dem zweiten Acylierungsmittel in der 2. Reaktionsstufe auf einen Acylierungsgrad von 90 bis 10% hinsichtlich dieser Acylgruppen bezogen auf den Anteil an verfügbarem Lysin oder Gesamtaminogruppen, mit Acetanhydrid oder Bernsteinsäureanhydrid bei pH-Werten von 6,0 bis 9,0, Ionenstärken von 0,1 bis 2,0, Temperaturen von 5 bis 30°C und Reaktionszeiten von 10 bis 30 min durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Gesamtacylierungsgrad 20 bis 80%, vorzugsweise 30 bis 40%, beträgt.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Acylierung entweder mit einer Proteinextraktion gekoppelt oder nach vorheriger Isolierung der Proteine durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die acylierten Proteine durch Einstellung eines isoelektrischen Bereiches von pH 3,0 bis 4,0 oder durch Zusatz von Ammoniumsulfat, Salzen der Erdalkali- bzw. Schwefelammoniumgruppe oder polyanionischen Komplexbildnern abgeschieden oder durch Ultrafiltration und/oder Diafiltration abgetrennt und gegebenenfalls nach pH-Regulation auf 6,0 bis 8,0 getrocknet werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung chemisch modifizierter Proteine, vorzugsweise in Form von Proteinisolaten, aus pflanzlichen, tierischen und/oder mikrobiellen proteinhaltigen Rohstoffen durch Acetylierung und Succinylierung. Die Proteinmodifikate sind vorzugsweise als grenzflächenaktive Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie, vorzugsweise zur Herstellung von Wasser-in-Fett- und/oder Fett-in-Wasser-Emulsionen sowie Fett- und Nichtfett-Schäumen einsetzbar.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Acylierungsreaktionen spielen bekanntlich bei der chemischen Modifizierung von Proteinen im Hinblick auf die Erzielung bestimmter funktioneller Eigenschaften, insbesondere einer Verbesserung der Löslichkeit und Grenzflächenaktivität, eine Rolle, wobei im allgemeinen eine Umsetzung mit Acetanhydrid oder Bernsteinsäureanhydrid im schwach sauren bis alkalischen Milieu vorgenommen wird.

Die Acylierung wird weiterhin zwecks Erhöhung des extrahier- oder fällbaren Anteils und damit der Ausbeute bei der Proteingewinnung aus pflanzlichen Rohstoffen angewandt (acylierende Extraktion).

Darüber hinaus ermöglichen solche Reaktionen eine Blockierung reaktiver funktioneller Gruppen von Proteinen, wodurch ihre Umsetzung mit antinutritiven oder andersartigen unerwünschten Verbindungen, im Falle von Rapssamen beispielsweise von Glucosinolaten und bei Sonnenblumensamen von Phenolsäuren, eingeschränkt oder verhindert werden kann.

Mit der Acylierung ist auch eine vom Acylierungsgrad abhängige Aufspaltung polymerer Proteinmoleküle in ihre Untereinheiten verbunden. Dabei erfolgt in der Regel mit zunehmendem Acylierungsgrad ein Zerfall bis in die Bereiche monomerer Proteine und Polypeptide, der einerseits mit einer Erhöhung der Löslichkeit, andererseits mit einer Abnahme an verfügbarem Lysin einhergeht. Letztgenannte Effekte sind insbesondere bei Acylierungsgraden über 50% gravierend.

Mit der Acylierung von Proteinen ist im weiteren eine Zunahme der Oberflächenhydrophilie verbunden, die zu einer mehr oder weniger markanten Erhöhung der Grenzflächenaktivität von Proteinpräparaten führt, so daß diese als Zusatzstoffe für Lebensmittelemulsionen und -schäume prädestiniert sind.

Ein wesentlicher Nachteil bekannter Acylierungsverfahren besteht jedoch darin, daß ausschließlich durch Acetylierung gewonnene Proteine infolge der Einführung von Essigsäuregruppen relativ hydrophob sind, wogegen durch Succinylierung gewonnene Proteine bedingt durch die Einführung von Bernsteinsäuregruppen als relativ hydrophil anzusehen sind, wodurch deren Einsatzmöglichkeiten jedoch limitiert werden. Bevorzugtes Einsatzgebiet erstgenannter Proteine sind demzufolge Wasser-in-Fett-Emulsionen und Fettschäume, das von letztgenannten Proteinen demgegenüber Fett-in-Wasser-Emulsionen und Nichtfettschäume.

Eine Verbesserung der Grenzflächenaktivität von Proteinpräparaten bedarf zudem eines relativ hohen Acylierungsgrades, wodurch die biologische Wertigkeit stark eingeschränkt wird. Darüber hinaus wirkt sich der dazu erforderliche hohe Einsatzbedarf an Acylierungsmitteln kostengünstig auf den Herstellungsprozeß aus.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht demzufolge in der Entwicklung eines Verfahrens zur Gewinnung chemisch modifizierter Proteine mit einem der Klassifikation oberflächenaktiver Lipide entsprechenden variablen HLB-Wert und Acylierungsgrad, d.h. einem bestimmten Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Acylgruppen, zum anderen von freien und veresterten ϵ -Aminogruppen, von Proteinen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die eine gelenkte Einführung von Essig- und Bernsteinsäuregruppen in Proteine ermöglichen und solchermassen das Applikationsfeld der modifizierten Proteine als grenzflächenaktive Verbindungen erweitern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß entweder die proteinhaltigen pflanzlichen, tierischen und mikrobiellen Rohstoffe oder die daraus bereits isolierten Proteine unter an sich bekannten Reaktionsbedingungen einer sukzessiven zweistufigen Acetylierung und Succinylierung oder in umgekehrter Weise einer Succinylierung und Acetylierung oder einer gleichzeitigen Acetylierung und Succinylierung unterworfen werden, und das Reaktionsprodukt gegebenenfalls durch isoelektrische Präzipitation, Aussalzen, Kopräzipitatbildung, Komplexbildung oder Ultrafiltration abgeschieden wird.

Wie nämlich gefunden wurde, unterscheiden sich die Reaktions- und Hydrolysegeschwindigkeiten von Proteinen bei der Acylierung mittels Acet- oder Bernsteinsäureanhydrid nur unerheblich voneinander, so daß sowohl eine sukzessive, als auch gleichzeitige Umsetzung mit genannten Acylierungsmitteln möglich ist.

In diesem Zusammenhang wurde weiterhin gefunden, daß sich solchermaßen bifunktionell modifizierte Proteine in ihrem grenzflächenaktiven Verhalten an das von nichtionogenen und amphoteren lipidischen Emulgatoren anpassen lassen, da sich diese im Vergleich zu unmodifizierten oder monofunktionellen, d. h. ausschließlich acetylierten oder succinylierten Proteinen im verstärkten Maße auch in Grenzflächen einlagern.

Das Verhältnis an relativ hydrophoben Essigsäuregruppen und das an relativ hydrophilen Bernsteinsäuregruppen — im Folgenden in Anlehnung an die Nomenklatur grenzflächenaktiver Lipide gleichfalls als HLB-Wert bezeichnet — ist dabei über die Reaktionsbedingungen, speziell die Einsatzkonzentrationen der beiden Acylierungsmittel steuerbar und bestimmt deren Applikationsmöglichkeiten als grenzflächenaktive Verbindungen bei der Herstellung von Lebensmittelemlusionen und -schäumen.

Im Rahmen der Erfindung erfolgt je nach dem Applikationszweck in der ersten Reaktionsstufe eine Acetylierung oder Succinylierung bis auf einen Acylierungsgrad von 10 bis 90% und in der 2. Reaktionsstufe eine Succinylierung oder Acetylierung bis auf einen Acylierungsgrad von 90 bis 10% hinsichtlich der zweiten eingeführten Acylgruppen, bezogen auf den Anteil an verfügbarem Lysin oder Gesamtaminogruppen in den modifizierten Proteinen. Die Einsatzkonzentrationen von Acet- und Bernsteinsäureanhydrid richten sich dabei nach dem angestrebten HLB-Wert und dem Gesamtacylierungsgrad der Proteine; sie sind darüber hinaus substratabhängig, so daß die günstigen Reagenzmengen in Vorversuchen zu ermitteln sind. Die im weiteren für eine hohe Umsetzung erforderlichen Reaktionsbedingungen sind als unkritisch anzusehen, sofern pH-Bereiche von 6,0 bis 9,0, Ionenstärken von 0,1 bis 2,0, Temperaturen von 5 bis 30°C und Zeiten von 10 bis 30 min eingehalten werden.

Die acylierten Proteine werden sofern erforderlich, durch isoelektrische Fällung bei pH 3,0 bis 4,0, oder Aussalzung mittels Ammoniumsulfat, oder Kopräzipitatbildung mit Salzen der Erdalkali- oder Schwefelammoniumgruppe, beispielsweise von Calcium, Aluminium und Eisen, oder Komplexbildung mit polyanionischen Verbindungen, beispielsweise Natriumalginat, Carragenat und Polyphosphat, oder durch Ultrafiltration und Diafiltration abgeschieden bzw. abgetrennt und gegebenenfalls nach pH-Regulation auf 6,0 bis 8,0 getrocknet.

Der Vorteil der Erfindung besteht hauptsächlich darin, daß Proteine gewinnbar sind, die speziellen Verbrauchererwartungen in besonderem Maße angepaßte funktionelle Eigenschaften, insbesondere eine hohe Löslichkeit und Grenzflächenaktivität, aufweisen und wahlweise als Zusatzstoffe für Emulsionen vom Typ Fett-in-Wasser oder Wasser-in-Fett sowie Nichtfett- und Fettschäume prädestiniert sind.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist darin zu sehen, daß auch der Gebrauchswert mit unzureichenden funktionellen Eigenschaften ausgestatteter Proteine, wie der von Globulinfraktionen aus Sonnenblumen- und Rapssamen oder Ackerbohnen und Lupinen, durch die Einführung von Essigsäure- und Bernsteinsäuregruppen in Verbindung mit einem mehr oder weniger weitgehenden Zerfall polymerer Proteine in ihre Untereinheiten erheblich verbessert wird.

Die Erfindung wird anhand nachstehender Ausführungsbeispiele näher erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

100g entfettetes Mehl aus konditionierten und geschälten Sonnenblumen-Samen (Rohproteingehalt i. T. 50,8%) werden bei 20°C in 800 ml 5%ige wäßrige Kochsalzlösung bei einem pH-Wert von 6,3 suspendiert. Unter Rühren werden innerhalb von 10 min sukzessive 2,4 ml Acetanhydrid sowie 9,9 g feinzermörstertes Bernsteinsäureanhydrid zugefügt, wobei der pH-Wert über einen Zeitraum von insgesamt 20 min konstant gehalten wird. Die Proteinsuspension wird durch Zentrifugation in einen wäßrigen proteinhaltigen Extrakt und einen Rückstand getrennt. Aus dem Extrakt werden die acylierten Proteine durch isoelektrische Präzipitation mit verdünnter Schwefelsäure bei pH 3,0 abgeschieden. Das Präzipitat wird bei pH 5,5 mit der 10fachen Menge gewaschen und gefriergetrocknet.

Es resultieren 31 g eines modifizierten Proteinisolates (Rohproteingehalt i. T. 86,9%), entsprechend einer Ausbeute, bezogen auf den Stickstoffgehalt des Rohstoffes, von ca. 62%. Der Gesamtacylierungsgrad des Modifikates beträgt ca. 60%, und das prozentuale Verhältnis von Essigsäure- zu Bernsteinsäuregruppen liegt bei ca. 30 zu 70, entsprechend einen HLB-Wert von 2,3. Das Produkt — nähere Angaben über seine funktionellen Eigenschaften finden sich in Tab. 1 — ist vorzugsweise zur Herstellung von Emulsionen des Typs Fett-in-Wasser geeignet.

Beispiel 2

100g zerkleinertes industrielles Raps-Extraktionsschrot (Teilchengrößen $\leq 0,2$ mm) (Rohproteingehalt i. T. 35,6%) werden in 1000 ml 0,25%ige wäßrige Natriumsulfatlösung bei 25°C und pH 9,0 suspendiert. Die Suspension wird unter Rühren unter pH-Wert-Konstanthaltung über einen Zeitraum von 20 min innerhalb von 5 min mit 2,3 g in Aceton gelöstem Bernsteinsäureanhydrid und 1,2 ml Acetanhydrid versetzt. Aus der Suspension werden durch Zentrifugation die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der proteinhaltige Extrakt wird durch Ultrafiltration mittels Membranen, die ein Retentionsvermögen für Moleküle mit einer Molmasse = 10000 aufweisen, bis auf einen Rohproteingehalt von ca. 5% aufkonzentriert. Das Retenat wird einer Diafiltration unterworfen bis das Verhältnis der Gesamtmenge an zugeführtem Waschwasser zur Retenatmenge 10:1 und der Aufkonzentrierungsgrad ca. 7% beträgt. Das gewaschene Retenat wird sprühgetrocknet.

Es resultieren 29 g eines Proteinmodifikates (Rohproteingehalt i. T. 90,1 %), entsprechend einer Ausbeute von 82 %. Der Gesamtacylierungsgrad des acylierten Proteines beträgt ca. 25 %, und das prozentuale Verteilungsverhältnis von Essigsäure- zu Bernsteinsäuregruppen liegt bei ca. 50:50, was einem HLB-Wert von 1,0 entspricht.

Das Produkt — Angaben über dessen funktionelle Eigenschaften finden sich in Tab. 1 — ist sowohl zur Herstellung von Fett-in-Wasser-, als auch Wasser-in-Fett-Emulsionen prädestiniert.

Beispiel 3

100 g Mehl aus konditionierten und geschälten Sojabohnen (Rohproteingehalt i. T. 46,0 %) werden bei 20 °C in 500 ml Wasser bei einem pH-Wert von 7,0 suspendiert. Unter Konstanthaltung des pH-Wertes über einen Zeitraum von insgesamt 20 min werden innerhalb von 15 min unter Rühren gleichzeitig 6,0 ml Acetanhydrid und 3,0 g zermörstertes Bernsteinsäureanhydrid zugegeben.

Die Suspension wird mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt, und es wird zentrifugiert. Der unlösliche Rückstand (Proteinkonzentrat) wird mit der 5fachen Wassermenge bei pH 3,5 gewaschen sowie nach erneuter Zentrifugation und pH-Wert-Regulierung mittels verdünnter Natronlauge auf pH 7,0 wirbelschichtgetrocknet.

Es resultieren 72 g eines modifizierten Proteinkonzentrates (Rohproteingehalt i. T. 67,4 %), das einen Gesamtacylierungsgrad von ca. 50 % und ein prozentuales Verteilungsverhältnis von Essigsäure- zu Bernsteinsäuregruppen von ca. 75:25, entsprechend einen HBL-Wert von 0,3, aufweist.

Das Produkt — Angaben über die funktionellen Eigenschaften enthält Tab. 1 — ist vorzugsweise für Emulsionen vom Typ Wasser-in-Fett einsetzbar.

Tabelle 1: Funktionelle Eigenschaften chemisch modifizierter Proteinpräparate

Protein- präparate	Löslichkeit % ¹⁾		spontane Wasser- aufnahme %		Oberflächen- spannungs- ¹⁾ Erniedrigungs- potential mN/m pH 7,0 45 °C	Emulsions- ¹⁾ bildungs- vermögen % pH 7,0	Emulsions ¹⁾ stabili- sierungs- vermögen % pH 7,0	Schaum- ²⁾ bildungs- vermögen % pH 7,0	Schaum- ²⁾ stabili- sierungs- vermögen % pH 7,0
	pH 7,0	pH 8,0	20 °C	80 °C					
Beispiel 1	95	100	272	200	12	94	100	265	98
Beispiel 1 K	70	98	180	167	18	46	35	0	0
Beispiel 2	100	100	250	284	11	100	100	317	100
Beispiel 2 K	86	100	235	256	14	81	73	268	78
Beispiel 3	100	100	460	427	14	100	100	398	100
Beispiel 3 K	91	100	612	648	16	94	98	395	37

K nichtmodifiziertes Vergleichsprotein

1 1%ige Dispersionen

2 10%ige Dispersionen