(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Oktober 2017 (12.10.2017)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/174699 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
A23L 11/30 (2016.01) *A23J 3/34* (2006.01)
A23L 25/00 (2016.01) *A23J 1/00* (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01) *A23J 1/14* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/058187

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. April 2017 (06.04.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 106 465.3 8. April 2016 (08.04.2016) DE

(71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E. V.** [DE/DE]; Hansastr. 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: **MURANYI, Isabel**; Bahnhofstr. 36, 85417 Marzling (DE). **PICKARDT, Claudia**; Ringstr. 7, 12203 Berlin (DE). **SUSSMANN, Daniela**; Ludwig-Dom-Str. 9, 86641 Rain (DE). **MEINLSCHMIDT, Pia**; Gießaufgasse 4/10-16, A-1050 Wien (AT). **EISNER, Peter**; Prälat-Michael-Höck-Str. 57, 85354 Freising (DE). **SCHWEIGGERT-WEISZ, Ute**; Max-Lehner-Str. 28, 85354 Freising (DE). **KEITZEL, Arne**; Alsenplatz 1, 22769 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **GAGEL, Roland**; Landsberger Str. 480a, 81241 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)*

(54) Title: TECHNO-FUNCTIONAL PLANT PROTEIN FRACTION FROM LEGUMINOUS OR OIL SEEDS

(54) Bezeichnung : TECHNO-FUNKTIONELLE PFLANZENPROTEIN-FRAKTION AUS LEGUMINOSEN ODER ÖLSAATEN

(57) Abstract: The present invention relates to a plant protein fraction from leguminous or oil seeds for use in foodstuffs or in feedstuffs and to a process for producing the plant protein fraction. In the process a first protein fraction is separated from comminuted leguminous seeds or oil seeds using a solvent to leave behind a second protein fraction and a water-containing protein fraction obtained by this fractionating step directly or after addition of water is subjected to treatment with enzymes one or more times, a heating to a temperature > 70°C one or more times, optionally a fermentation one or more times and a pressure and/or shear treatment one or more times. The plant protein fraction produced with the process exhibits a reduced immune reactivity and has good techno-functional and organoleptic properties.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten für den Einsatz in Lebensmitteln oder in Futtermitteln sowie ein Verfahren zur Herstellung der Pflanzenprotein-Fraktion. Bei dem Verfahren wird aus zerkleinerten Leguminosensamen oder Ölsaaten mit Hilfe eines Lösemittels eine erste Proteinfraktion abgetrennt wird, wobei eine zweite Proteinfraktion zurück bleibt, und eine durch diesen Fraktionierungsschritt direkt oder nach Zugabe von Wasser erhaltene wasserhaltige Proteinfraktion einer ein- oder mehrmaligen Behandlung mit Enzymen, einer ein- oder mehrmaligen Erhitzung auf eine Temperatur > 70 °C, optional einer ein- oder mehrmaligen Fermentation und einer ein- oder mehrmaligen Druck- und/oder Scherbehandlung unterzogen. Die mit dem Verfahren hergestellte Pflanzenprotein-Fraktion weist eine reduzierte Immunreaktivität auf und verfügt über gute techno-funktionelle und organoleptische Eigenschaften.

WO 2017/174699 A1

Techno-funktionelle Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft eine Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten, die eine oder mehrere Teilfraktionen von Proteinen einer oder mehrerer Spezies von Leguminosen oder einer oder mehrerer Spezies von Ölsaaten enthält, für den Einsatz in Lebensmitteln oder in Futtermitteln sowie ein Verfahren zur Herstellung der Pflanzenprotein-Fraktion.

Stand der Technik

Pflanzliche Proteine erfreuen sich bei den Konsumenten zunehmender Beliebtheit. Heute kommt in Lebensmitteln bereits eine Vielzahl unterschiedlicher pflanzlicher Proteine aus Leguminosen, Ölsaaten oder Getreide als texturgebende Komponenten zum Einsatz. Sie dienen der Stabilisierung von Emulsionen, Schäumen oder der Ausbildung von Gelen oder werden als meist gut lösliche Komponente Lebensmitteln oder Getränken zur Anreicherung mit Proteinen zugesetzt. Die Vielzahl der am Markt verfügbaren Proteinpräparate zeigt aber erhebliche Defizite bei techno-funktionellen Eigenschaften, vor allem bei der Emulgierkapazität, der Löslichkeit oder der Gelbildungseigenschaften. Ein weiterer Nachteil von pflanzlichen Proteinen ist der Umstand, dass viele Konsumenten eine starke Immunantwort oder sogar eine allergische Reaktion beim Verzehr pflanzlicher Proteine z.B. aus Soja, Erdnuss oder Lupine zeigen, was einen breiten Einsatz dieser Zutaten bisher erschwert. Auch die sensorischen Eigenschaften vieler pflanzlicher Proteine entsprechen nicht den Wünschen der Konsumenten. Viele Pflanzensamen zeigen aufgrund von enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen oder Lipidoxidationsprodukten unerwünschte Geschmacks- und Aromaprofile. So werden viele Präparate aus Soja, Erbse oder Lupine als bitter, bohnig, grasig oder grün beschrieben.

Aus diesem Grund werden in der Forschung vermehrt Anstrengungen unternommen, mit Hilfe von neuen Verfahren die Pflanzenproteine so zu verändern, dass sowohl ihre sensorischen als auch ihre techno-funktionellen und immunreaktiven Eigenschaften den Wünschen der Verbraucher entsprechen. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, alle genannten Attribute gleichermaßen zu verbessern. Vielmehr geht eine Reduktion der Immunreaktivität meist einher mit der Verschlechterung der sensorischen Eigenschaften oder mit der Abnahme der Emulgier- oder Schäumungseigenschaften. Im Folgenden wird der Stand der Technik der Modifikation von Proteinen kurz vorgestellt und gezeigt, welche Schwächen bislang noch bestehen. Die Methoden zur Bestimmung der dabei genannten funktionellen Eigenschaften werden im hinteren Teil dieser Anmeldung beschrieben.

Die Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen ist ein bekanntes Verfahren zu Veränderung der Eigenschaften von Proteinen wie der Techno-Funktionalität (z.B. Proteinlöslichkeit, Emulgierwirkung, Schaumbildung) oder auch der Allergenität der Präparate. Beschrieben sind Protein-Hydrolysate auf Basis pflanzlicher Proteine und auf Basis von Molkenproteinen.

Hierfür wird beispielsweise eine Proteindispersion durch den Einsatz von einzelnen Enzymen oder Enzymkombinationen hydrolysiert und die Enzyme durch eine Hitzebehandlung inaktiviert. Anschließend werden unterschiedliche Proteinfraktionen, primär das Permeat, in einem Downstream-Prozess durch eine Ultrafiltration und/oder lösliche und unlösliche Proteine durch eine Separation gewonnen. Optional folgen weitere Verarbeitungsschritte wie ein anschließender Trocknungsprozess (z.B. Gefriertrocknung) der Produkte.

In den Druckschriften JP11178512, JP2001211851, KR20090119204 und CN101974589 wird die Behandlung von pflanzlichen Proteinen und Molkenproteinen mit einzelnen Enzymen beschrieben, jedoch weisen die hergestellten Hydrolysate

Nachteile in ihren sensorischen oder techno-funktionellen Eigenschaften auf. Des Weiteren ist die Senkung der Allergenität durch den Einsatz von einer Protease meist nicht ausreichend, um allergische Reaktionen wirkungsvoll zu unterdrücken. Darüber hinaus sind die sensorischen Eigenschaften nach der Hydrolyse mit einer Protease, besonders eine hohe Bitterkeit, negativ zu bewerten.

Für pflanzliche Proteine wie z.B. aus Soja, Reis, Sesam, Raps, Ackerbohne oder Erbse wurden ähnliche Verfahren in der WO9215696 und der WO9215697 beschrieben. Dabei wird das pflanzliche Protein, Proteinkonzentrat oder -isolat mit einem Proteingehalt von mind. 65% mit Wasser zu einer Slurry mit einem Proteingehalt von 7-20% verarbeitet. Vor der Hydrolyse wird die Slurry auf >60 °C erhitzt. Die enzymatische Hydrolyse wird unter optimalen pH- und Temperatur-Bedingungen mit Hilfe von mind. zwei Proteasen bis zu einem Hydrolysegrad von 15 - 35% ohne pH-Regulierung durchgeführt und die Enzyme nach einer Hydrolysedauer von >14 Std. durch eine Hitzebehandlung inaktiviert. Zum Einsatz kommen bspw. Alcalase (Bacillus licheniformis) und/oder Neutrase (Bacillus subtilis), wobei die Hydrolyse als zweistufiger Prozess durchgeführt wird. Anschließend wird das hydrolysierte Protein als Permeat durch eine Ultrafiltration mit einem cut-off von >5.000 Da (Da: Dalton) gewonnen. Optional folgen weitere Verarbeitungsschritte wie die Sprühtrocknung zur Aufkonzentrierung und Trocknung der Produkte. Jedoch wird nicht auf die techno-funktionellen Eigenschaften und die Immunreaktivität eingegangen. Aufgrund des hohen Hydrolysegrades, der langen Behandlungsdauer bei Einsatz von Alcalase und der nachfolgenden Ultrafiltration ist davon auszugehen, dass die techno-funktionellen Eigenschaften wie die Emulgierkapazität, die Schaumstabilität und die Gelbildung im Vergleich zu unbehandelten Proteinen deutlich schlechter sind. So haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung versucht, die Verfahren der WO9215696 und der WO9215697 zu wiederholen und haben dabei festgestellt, dass

die Emulgierkapazität im Vergleich zu einem unbehandelten Protein um rund 30-50% reduziert ist.

In der WO9324020 wird ein Molkenprotein-Hydrolysat mit guten organoleptischen Eigenschaften und einer geringen Allergenität beschrieben. Zusätzlich zu den in der WO9215696 und der WO9215697 erwähnten Schritten wird das Molkenprotein zuvor durch eine saure Fällung aus Casein gewonnen. Zudem wird bei der Separation mittels Ultrafiltration durch Auswahl der Membranen ein cut-off von >10.000 Da, bevorzugt >50.000 Da eingestellt. Durch dieses Verfahren werden Molkenproteine mit einer geringen Allergenität erhalten. Aufgrund der Tatsache, dass bei diesem Verfahren eine Enzymkombination bestehend aus Alcalase und Neutrase eingesetzt wird, sind die techno-funktionellen Eigenschaften wie die Emulgier- und Schaumbildungseigenschaft nach der Behandlung sehr schlecht.

In der EP0421309 wird ein Verfahren zur Herstellung eines Molkenprotein-Hydrolysates und Kombinationen aus diesem mit Sojaprotein oder Casein beschrieben. Vor der enzymatischen Hydrolyse werden große Proteine (>50.000 Da) mit Hilfe der Ultrafiltration abgetrennt. Anschließend an die enzymatische Hydrolyse mit Hilfe einer Enzymkombination wird eine Ultrafiltration mit einem cut-off von 1.500-15.000 Da eingesetzt, um ein niedermolekulares Permeat zu erhalten. Durch den Einsatz der beschriebenen Enzymkombination, Vorhydrolyse mit Pepsin und anschließender Hydrolyse mit Trypsin-Chymotrypsin-Elastase 2, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die sensorischen und die techno-funktionellen Eigenschaften deutlich verschlechtert sind.

Die EP1236405 beschreibt einen Prozess zur Herstellung hypoallergener, sojabasierter Produkte, deren Antigenität um den Faktor 100 reduziert ist (Inhibition-ELISA). Hierbei wird ein moderater Hydrolysegrad von <25%, vorzugsweise zwischen 10-20%, angestrebt. Es können sowohl einzelne Enzyme mikrobiellen als auch pflanzlichen Ursprungs verwendet oder eine

Kombination aus diesen eingesetzt werden. Das Enzym-zu-Substrat Verhältnis (E/S) liegt zwischen 0,1-10% und die Hydrolyse findet zwischen 0,5-10 Stunden statt. Wenn eine Enzymkombination - als zwei-stufiger Prozess durchgeführt - eingesetzt wird, muss zwischen der Enzymzugabe immer ein Inaktivierungsschritt des jeweiligen Enzymes erfolgen. Nach einem finalen Inaktivierungsschritt kann das entstandene Hydrolysat optional durch Ultrafiltration oder Separation von unlöslichen Proteinen getrennt werden. Über die techno-funktionellen sowie sensorischen Eigenschaften der Produkte wird nicht berichtet. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von höheren E/S-Verhältnissen und der Einsatz von Alcalase abermals zu einer verschlechterten Techno-Funktionalität der Produkte kommt. Zudem ist bekannt, dass eine Alcalase-Behandlung zu einer hohen Bitterkeit führt, was wiederum die Akzeptanz bei den Konsumenten verringert.

Ein Verfahren zur Herstellung löslicher Sojaproteine mit hoher Funktionalität und geringer Bitterkeit wird in der EP1512328 beschrieben. Für die Hydrolyse einer „Sojapaste" mit 10-20% Sojaprotein, wird eine Pilz-Protease oder eine Kombination als einstufiger Prozess aus Pilz-Proteasen, die sowohl endo- als auch exoproteolytische Aktivitäten besitzen, eingesetzt. Hier werden Corolase PN-L (Aspergillus sojae) und Flavourzyme 500L (Aspergillus oryzae) aufgeführt. Nach einer Behandlungsdauer von 0,5-5 Stunden werden die Enzyme durch einen thermischen Schritt inaktiviert und die lösliche und unlösliche Proteinfraktion mittels Zentrifugation voneinander getrennt und anschließend getrocknet. Über die Immunreaktivität bzw. Allergenität wird nicht berichtet. Zudem wird nur die lösliche Proteinfraktion mit ihrer hohen Funktionalität hervorgehoben. Die unlöslichen (modifizierten) Proteine oder die gemischte Proteinfraktion werden nicht weiter beschrieben.

Die EP0406598A1 beschreibt ein Verfahren zur Reduktion der

Bitterkeit von enzymatisch hydrolysierten Proteinen. Hierbei werden Proteinhydrolysate einer anschließenden Fermentation bis zu 30 Stunden bei konstantem pH-Wert zur Abschwächung der Bitterkeit unterzogen. Der Herstellungsprozess sowie die physikochemischen Eigenschaften des Ausgangsrohstoffes (Protein Hydrolysat) für die Fermentation werden nicht beschrieben. Nach der Inaktivierung der Enzyme bei 65-80°C und anschließender Kühlung, können die „entbitterten" Proben entweder direkt im Lebensmittel verarbeitet oder zuvor getrocknet werden. Da jedoch bekannt ist, dass sich sowohl die enzymatische Hydrolyse als auch die Fermentation negativ auf die techno-funktionellen Eigenschaften ausüben können und diese nicht beschrieben werden, ist anzunehmen, dass die techno-funktionellen Eigenschaften deutlich verschlechtert wurden. Alle kommerziell erhältlichen Hydrolysate weisen bislang eine sehr schlechte Techno-Funktionalität im Sinne der Emulgier- und Gelbildungseigenschaften auf, weshalb auch hier angenommen werden kann, dass diese für den Einsatz im Lebensmittel essentiellen Eigenschaften deutlich verschlechtert wurden.

Am Beispiel von Sojaproteinen konnte von P. Meinlschmidt et al. (2017), "High pressure processing assisted enzymatic hydrolysis - An innovative approach for the reduction of soy immunoreactivity", Innovative Food Science & Emerging Technologies: 40, 58-57, gezeigt werden, dass eine Hochdruck-unterstützte enzymatische Hydrolyse von Sojaproteinisolaten sowohl die techno-funktionellen als auch die sensorischen Eigenschaften nicht verbessert. Aus diesem Grund würde ein Fachmann keine Druckbehandlung in Kombination mit Enzymen zur Herstellung funktioneller und gut schmeckender Sojaproteine heranziehen.

In der Literatur ist zudem beschrieben, dass die Fermentation einen negativen Einfluss auf die Emulgiereigenschaften von Leguminosenproteinen hat. Am Beispiel von Lupinenproteinen wurde in P. Eisner, „Extraktive Fraktionierung von

Leguminosensamen zur Gewinnung von funktionellen Lebensmittelzutaten am Beispiel der Lupine", Habilitation, 2014, Technische Universität München, gezeigt, dass die Emulgierkapazität bei Lupinenproteinisolaten von 510 mL/g auf Werte zwischen 385 und 230 mg/L abfällt, wenn das Protein mit Lb. perolens, Pc. pentosaceus, Lb. plantarum oder Lc. paracasei fermentiert wird.

Ebenfalls zeigten in P. Meinlschmidt et al., "Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate", Food Chemistry 205: 229-238, weitere Versuchsreihen am Beispiel von Sojaproteinen, dass eine Fermentation mit unterschiedlichen Mikroorganismen (Milchsäurebakterien, Schimmelpilze, Hefezellen) zu einer Minderung der techno-funktionellen Eigenschaften, insbesondere der Emulgierkapazität und der Proteinlöslichkeit bei neutralem pH-Wert, führt. Hierbei fiel die Emulgierkapazität von 660 mL/g auf Werte zwischen 475-483 mL/g ab, die Proteinlöslichkeit bei pH 7 fiel von 44,0% auf Werte zwischen 16,5-18,2% ab, wenn das Protein mit Lb. helveticus für 24 und 48 Stunden fermentiert wurde. Ein Fachmann, der ein hochfunktionelles Proteinpräparat mit guten Emulgiereigenschaften bereitstellen möchte, würde daher versuchen, eine Fermentation als Verarbeitungsschritt unbedingt zu vermeiden.

Nach Stand der Technik kommen zur Behandlung von Proteinen somit sehr häufig Enzymkombinationen zum Einsatz. Aus den dabei entstehenden Hydrolysaten wird z.B. durch eine Ultrafiltration eine niedermolekulare Fraktion erhalten, deren Immunreaktivität als reduziert beschrieben wird. Dabei zeigt sich aber eine deutliche Verschlechterung der Funktionalität, da die abgetrennten kleinen Molekülbruchstücke kaum noch emulgieren, keine stabilen Schäume ausbilden und vielfach auch einen sehr bitteren und nahezu abstoßenden Geschmack aufweisen.

Es ist bislang nicht bekannt, ob und wie aus Leguminosen und

Ölsaaten Proteinpräparate hergestellt werden können, die vergleichbar gute techno-funktionelle Eigenschaften hinsichtlich der Stabilisierung von Emulsionen und Schäumen und der Ausbildung von Gelen aufweisen wie die entsprechenden unbehandelten Proteine, dabei organoleptisch ansprechend sind und gleichzeitig eine reduzierte Allergenität bzw. IgE-Immunreaktivität aufweisen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Pflanzenprotein-Fraktion sowie ein Verfahren zur Herstellung der Pflanzenprotein-Fraktion aus Proteinen von Leguminosen (z.B. Soja, Erbse, Lupine, Bohne, Kichererbse, Linse oder Erdnuss) oder Ölsaaten (z.B. Sonnenblume, Raps, Camelina oder Lein) anzugeben, die eine reduzierte Immunreaktivität aufweist und dabei gleichzeitig über gute techno-funktionelle und organoleptische Eigenschaften verfügt. Die hergestellten Proteinfraktionen sollten insbesondere eine helle Farbe und gute Emulgiereigenschaften zeigen, nahezu neutral schmecken, dabei besonders eine geringe Bitterkeit und einen kaum wahrnehmbaren bohnigen Geschmack aufweisen. Zudem sollte das hierfür genutzte Verfahren kostengünstig sein und eine hohe Ausbeute zeigen, da nach Stand der Technik vielfach nur kleine Fraktionen der Proteine aus den Rohstoffen verwertbar sind, was zu sehr hohen Kosten führt.

Darstellung der Erfindung

Die Aufgabe wird mit dem Verfahren und der Pflanzenprotein-Fraktion gemäß den Patentansprüchen 1 und 16, 18 und 20 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens und der Pflanzenprotein-Fraktion sind Gegenstand der abhängigen Patentansprüche oder lassen sich der nachfolgenden Beschreibung sowie dem Ausführungsbeispiel entnehmen.

Unter einer Proteinfraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten wird im Folgenden eine Mischung unterschiedlicher Proteine aus Samen von Leguminosen oder Ölsaaten verstanden, die nicht der Proteinzusammensetzung (Mengenverhältnis unterschied-

licher Proteine) aus den entsprechenden Pflanzensamen entspricht, sondern eine davon abweichende Proteinzusammensetzung aufweist, bei der insbesondere ein oder mehrere der in den Samen enthaltenen Proteine nicht mehr oder nur noch in Spuren enthalten sind und die auch aus den Proteinen abgetrennte Peptidstränge enthalten kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch folgende Schritte ausgehend von zerkleinerten Leguminosensamen oder Ölsaaten gekennzeichnet:

a) Mechanische Abtrennung einer ersten Proteinfraktion oder Abtrennung einer ersten Proteinfraktion mit Hilfe eines Lösemittels oder Kombination aus mechanischer und lösemittelbasierter Abtrennung von einer zweiten Proteinfraktion der zerkleinerten Pflanzensamen in einem Fraktionierungsschritt, im Folgenden auch als erster Fraktionierungsschritt bezeichnet,

b) optional, falls im ersten Fraktionierungsschritt kein Wasser als Lösemittel zum Einsatz kommt: Zusatz von Wasser zu der ersten oder zweiten Proteinfraktion unter Bildung einer wasserhaltigen Proteinfraktion,

c) Hydrolyse der wasserhaltigen Proteinfraktion mittels Säure, Lauge und/oder Hitze, oder durch Behandlung mit Enzymen, vorzugsweise mit Proteasen oder Peptidasen, besonders vorteilhaft mit Enzymkombinationen bestehend aus mind. einer Endo- und mind. einer Exopeptidase, durchgeführt als ein- oder zweistufiger Prozess,

d) ein- oder mehrmalige Erhitzung der wasserhaltigen Proteinfraktion bei einer Temperatur über 70 °C, vorteilhaft über 80°C, besonders vorteilhaft über 90°C,

e) optional: Fermentation der enzymatisch, chemisch oder thermisch hydrolysierten Proteinfraktion, vorzugsweise nach Zugabe von Mikroorganismen (mindestens 10^8 kbE pro Gramm Protein, besser ≥ 10^9 kbE pro Gramm Protein, vorteilhaft ≥ 10^{10} kbE pro Gramm Protein; KbE: Kolonie-bildende Einheit) und unter Anwesenheit von Glukose oder einem anderen einfach zu fermentierendem Kohlenhydrat,

f) Druck- und/oder Scherbehandlung der wasserhaltigen Proteinfraktion, besonders vorteilhaft nach der (optionalen) Fermentation und nach der Erhitzung.

g) Optional: Reduktion des Wassergehalts der wasserhaltigen Proteinfraktion durch ein Membranverfahren oder ein destillatives Verfahren zu Erhöhung des Trockensubstanzgehaltes auf einen Wert <12 Mass-%, vorteilhaft <15 Mass-% Trockensubstanz.

Die erfindungsgemäße, nach den obigen Schritten a)-g) erhaltene Proteinfraktion zeichnet sich durch hervorragende technofunktionelle und sensorische Eigenschaften aus. Überraschenderweise zeigte sich, dass ein weiterer Schritt

h) Trennung der (modifizierten) wasserhaltigen Proteinfraktion nach Größe oder Sedimentierbarkeit, bspw. mittels Zentrifugation oder Membranfiltration mit einem geeigneten Cut-off,

der nach der (optionalen) Fermentation (Schritt e)) bzw. - ohne Fermentation - nach der Hydrolyse (Schritt c)) durchgeführt wird, einen deutlichen Effekt auf das allergene Potential der durch diesen Trennungsschritt erhaltenen neuen Fraktionen (Sediment- bzw. Retentatfraktion sowie Überstands- bzw. Permeatfraktion) aufweist. Die Trennung nach Größe kann beispielsweise durch verschiedene Filtrationsverfahren erfolgen wie z.B. Membranfiltration (z.B. Filter, Mikro-, Ultrafiltration), die Trennung nach Sedimentierbarkeit durch Verfahren, die die Massenträgheit ausnutzen wie z.B. Zentrifuge, Dekanter, Separatoren. Die Trennung wird vorzugsweise so durchgeführt, dass in einer der aus dieser Trennung resultierenden Fraktionen eine Molekulargewichtsverteilung erhalten wird, bei der Molekülgrößen vorzugsweise entweder zu mehr als 50% kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt zu mehr als 70%, besonders vorteilhaft zu mehr als 90% (Überstands- bzw. Permeatfraktion), oder weniger als 60% kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt weniger als 50%, besonders bevorzugt weniger als 20% (Sediment- bzw. Retentatfraktion).

Besonders gute Proteineigenschaften werden erhalten, wenn die Trennung bei Schritt h) mittels Membranfiltration mit einem Cut-off durchgeführt wird, der kleiner 30kDa, vorteilhaft <6kDa besonders vorteilhaft <3kDa ist.
Besonders vorteilhaft ist es, wenn die Trennung der Proteinfraktion nach Größe bzw. Sedimentierbarkeit in Kombination mit der Scherbeanspruchung vor oder nach der Scherbeanspruchung erfolgt.

Die unter a) beschriebene mechanische und/oder lösemittelbasierte Abtrennung einer Proteinfraktion ist für das erfindungsgemäße Verfahren von großer Bedeutung. Die mechanische Abtrennung kann beispielsweise folgendermaßen durchgeführt werden: Die Pflanzensamen werden zerkleinert und dann mittels Siebung und/oder Sichtung in größere und kleinere bzw. leichtere oder schwerere Partikel aufgetrennt. Mit einer oder beiden Partikel-Fraktion/en wird dann der unter b)-h) beschriebene Prozess durchlaufen.
Alternativ oder in Kombination zur mechanischen Abtrennung kann eine lösemittelbasierte Abtrennung erfolgen. Die Samen oder eine mechanisch vorbehandelte Fraktion der Samen (im folgenden Rohstoff genannt) werden mit polaren oder unpolaren Lösemitteln in Kontakt gebracht, wodurch eine Proteinfraktion in das Lösemittel gelangt und eine andere Proteinfraktion im Rohstoff verbleibt. Als Lösemittel zum Einsatz kommen können dabei z.B. Wasser, mit Säure versetztes Wasser, überkritisches CO2, Ethanol, Wasser-Ethanol-Mischungen und Hexan. Mindestens eine der Proteinfraktionen (erste oder zweite Proteinfraktion) wird dann dem unter b)-h) beschriebenen Prozess unterzogen.

Die erfindungsgemäße, mit dem Verfahren erhaltene wasserhaltige (Pflanzen-)Proteinfraktion kann nach Durchführung der genannten Verfahrensschritte im feuchten Zustand direkt in Lebensmitteln oder Futtermitteln als Proteinzutat zum Einsatz kommen. Unter der erfindungsgemäßen Proteinfraktionen werden

dabei - wie auch im Folgenden - sowohl die nach den Schritten a)-g) erhaltene Proteinfraktion als auch die nach den Schritten a)-h) erhaltenen Proteinfraktionen (Sediment- bzw. Retentatfraktion sowie Überstands- bzw. Permeatfraktion) angesehen.

Es ist jedoch vorteilhaft, die erfindungsgemäße Proteinfraktion vor einer Anwendung zu trocknen. Hierfür sollte vorteilhaft eine Sprüh-, Wirbelschicht- oder Walzentrocknung zum Einsatz kommen, möglich ist auch eine Trocknung im Vakuum. Eine Gefriertrocknung sollte möglichst vermieden werden, da sich in Versuchen gezeigt hat, dass gefriergetrocknete Proteinfraktionen schlechtere Eigenschaften zeigen als Proteinfraktionen aus der Sprühtrocknung.

Die Verfahrensschritte der Hydrolyse, Fermentation, Druckbehandlung, Erhitzung, Druck- und/oder Scherbeanspruchung und Filtration/Zentrifugation können erfindungsgemäß mehr als einmal in unterschiedlicher Reihenfolge eingesetzt werden, um die sensorischen und funktionellen Eigenschaften weiter zu verbessern. Vorzugsweise folgt die Fermentation der Enzymbehandlung und die Druck- und/oder Scherbehandlung der Fermentation, wobei die Erhitzungsschritte an beliebigen Stellen dieser Reihenfolge, d.h. auch zwischen Fermentation und Enzymbehandlung und/oder zwischen Druck- und/oder Scherbehandlung und Fermentation, durchgeführt werden können. In Versuchen zeigten sich besonders gute Ergebnisse bei drei Erhitzungsschritten auf eine Temperatur von über 80 °C. Bei dieser Verfahrenskombination konnte neben der Verbesserung der Technofunktionalität und Sensorik auch die Immunreaktivität deutlich gesenkt werden.

Die unter f) angegebene Druck- und/oder Scherbehandlung ist beim erfindungsgemäßen Verfahren bei einem Druck oberhalb von $2*10^5$ Pa (2 bar) durchzuführen, vorteilhaft oberhalb von $5*10^5$ Pa (5 bar), besonders vorteilhaft bei einem Druck oberhalb von $150*10^5$ Pa (150 bar). Es zeigt sich in

Versuchen, dass bei zunehmendem Druck bis zu einem maximalen Druck von $1000*10^5$ Pa (1000 bar), der zum Erhalt der Proteinfunktionalität nicht überschritten werden sollte, und gleichzeitiger Scherung (z.B. mit Hilfe eines Homogenisators) die Löslichkeit und meist auch die Emulgiereigenschaften der wasserhaltigen Proteinfraktion verbessert werden können.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Filtration/Zentrifugation bei Schritt h) kann im Falle einer bei dem Verfahren durchgeführten Fermentation der Anteil der abgetrennten Mikroorganismen herangezogen werden. Bei erfolgreichem Trennverfahren werden vorzugsweise im Rückstand mehr als 50 Mass-% der ursprünglich für die Fermentation eingebrachten Mikroorganismen DNA gefunden und im Überstand weniger als 20 Mass-%.

Unter zerkleinerten Leguminosensamen oder Ölsaaten, die im erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommen, werden Partikel oder Stücke von Samen verstanden, die mit einem mechanischen Verfahren (z.B. Mühle, Walzenstuhl o.ä.) derart verändert werden, dass sie nach der Behandlung ihre natürliche Form nicht mehr aufweisen.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren finden die meisten Verfahrensschritte in wässriger Umgebung statt. Der Umgang mit dem eingesetzten Wasser ist für den Erfolg des Verfahrens wichtig. Wenn z.B. im ersten Fraktionierungsschritt Wasser als Lösemittel zum Einsatz kommt, sollte angestrebt werden, dass vor der Fermentation dieses Wasser nicht durch ein Trocknungsverfahren wieder aus der Proteinfraktion abgetrennt wird. In Versuchen hat sich gezeigt, dass die Fermentation einer zuvor getrockneten Proteinfraktion zu schlechteren Eigenschaften der Emulgierkapazität und Wasserlöslichkeit führt, als wenn die in Wasser befindliche Proteinfraktion ohne Trocknung direkt fermentativ behandelt wird und die Proteine während des gesamten Vorgangs von Wasser umgeben sind. Die Fermentation wird dabei erfindungsgemäß mit Hilfe

von Mikroorgansimen im aeroben oder anaeroben Milieu durchgeführt. Vorzugsweise kommen Mikroorganismen aus den Gruppen Milchsäurebakterien (Lb. perolens), Hefen (z.B. Saccharomyces cerevisiae) oder Pilzkulturen (z.B. Rhizopus oryzae, Actinomucor elegans) zum Einsatz.

Überraschenderweise ist ohne vorherige Trocknung der Proteinfraktion auch die Veränderung der Immunreaktivität im Verlauf der Fermentation eine andere, obwohl dieselben Mikroorganismen zum Einsatz kommen. Daher sollte darauf geachtet werden, dass nach Zugabe des Wassers bis zum Abschluss der Fermentation das Massenverhältnis von Wasser zu Protein möglichst höher als 1:1, besser höher als 8:1, besonders vorteilhaft höher als 16:1 liegt. Ein Trocknungsschritt sollte erst im Anschluss an die erfindungsgemäße Druck-/Scherbehandlung erfolgen.

Die mittels enzymatischer und/oder fermentativer Verfahren behandelten Proteine aus den genannten Rohstoffen sollten wasserlöslich oder zumindest in Wasser gut dispergierbar sein, damit die enzymatische Behandlung kontrolliert durchgeführt werden kann. Besonders vorteilhaft wird das Verfahren durchgeführt, wenn mindestens 35% der Proteinbestandteile bei pH 7 gelöst oder stabil dispergiert vorliegen. Hierfür werden die Rohstoffe mit Wasser vermengt, gelöst bzw. dispergiert und die Enzyme in entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Unter stabil dispergiert wird der Anteil der dispergierten Partikel einer Dispersion verstanden, der sich nach einer Sedimentationsdauer von 10 Minuten noch im Überstand über einem abgetrennten Sediment befinden.

Das Lösemittel zur Abtrennung der ersten Proteinfraktion kann aus Wasser oder wässrigen Lösungen bestehen oder aus organischen Lösemitteln wie Ethanol, Hexan, überkritischem CO_2 oder dergleichen oder aus Mischungen von organischen Lösemitteln mit Wasser.

Überraschenderweise zeigt sich, dass durch diesen ersten Fraktionierungsschritt sowohl Einfluss auf die Immunreaktivität als auch auf die Sensorik und Technofunktionalität der ersten und der zweiten Proteinfraktion genommen werden kann. So kann zum Beispiel bei Soja, wenn die Immunreaktion von Patienten auf den Kunitz-Trypsin-Inhibitor besonders stark ausfällt, durch wässriges Abtrennen einer ersten Fraktion, die große Teile des Kunitz-Trypsin-Inhibitors enthält, das immunreaktive Potential der zweiten Proteinfraktion reduziert werden, wohingegen mit einem derartigen Trennschritt die emulgierenden Eigenschaften der zweiten Proteinfraktion erhöht werden können.

Bei Arbeiten mit Lupine zeigt sich, dass bei Abtrennen einer gut löslichen Proteinfraktion mittels Lösemittel auch andere Komponenten, die z.B. einen Bittereindruck oder Adstringenz hervorrufen, reduziert werden können. So können durch diesen Fraktionierungsschritt die Adstringenz und der Bittereindruck in der zweiten Fraktion reduziert und gleichzeitig die spezifische Immunreaktivität verändert werden. Die nach der ersten Extraktion im Raffinat verbleibende zweite Fraktion des Lupinenproteins wird anteilig mehr alpha- und beta-Conglutin enthalten als die Ausgangssaat und zeigt verbesserte emulgierende Eigenschaften als die erste.

In Untersuchungen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bei Sojaproteinen zeigt sich zudem, dass sich Speicherproteine, die in hohen Konzentrationen in der Sojabohne enthalten sind, wie die Glycinin- und Conglycinin-Fraktionen, für das vorgeschlagene Verfahren besonders gut eignen. Diese Fraktionen werden im Stand der Technik von anderen Sojaproteinfraktionen vielfach abgetrennt, da diese eine besonders hohe Immunreaktivität zeigen. Da diese Fraktionen den größten Anteil der Proteine in der Sojabohne ausmachen, ist der erfindungsgemäße Prozess sehr wirtschaftlich durchführbar, da ein sehr großer Anteil der Speicherproteine genutzt werden kann, was mit einem niedrigen spezifischen Rohstoffeinsatz einhergeht.

Durch Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, die Bitterkeit (von einem geschulten Panel in einer Skala von 1 bis 10 bewertet), die bei einem nativen Sojaprotein nach Extraktion und isoelektrischer Fällung bei einem Wert von über 2 liegt, auf Werte unter 1 zu reduzieren und gleichzeitig ansprechende Aromanoten in der Proteinfraktion zu generieren.

Das Verfahren ist besonders vorteilhaft, wenn die mechanische Druck- und Scherbeanspruchung und damit Zerkleinerung von Proteinaggregaten nach der Fermentation erfolgt. Durch diesen Behandlungsschritt wird das Mundgefühl der Proteinfraktion, die nach der Fermentation vielfach als rau und sandig beschrieben wird, als weicher und angenehmer beschrieben.

Vorteilhafte techno-funktionelle Eigenschaften bei gleichzeitig deutlicher Reduktion der Immunreaktivität ergeben sich, wenn nach dem ersten Fraktionierungsschritt mit der wasserhaltigen Proteinfraktion eine 2-stufige enzymatische Hydrolyse mittels Endo- und Exopeptidasen erfolgt, anschließend eine Fermentation vorzugsweise mit Milchsäurebakterien erfolgt, dann die Proteinfraktion mit einem Druck von über $2*10^5$ Pa (2 bar) behandelt und anschließend vorzugsweise im Sprühtrockner getrocknet wird, wobei im Verlauf des Prozesses wenigstens 2 Erhitzungsschritte über 85°C durchgeführt werden. Durch diese Verfahrenskombination wird die Proteinlöslichkeit bei pH 7 auf Werte von zum Teil über 50% erhöht bei gleichzeitiger Minimierung der Immunreaktivität und Reduktion der Bitterkeit. Vor allem die Reduktion des Bittereindrucks ist überraschend, da bisher eine Steigerung der Löslichkeit von Proteinpräparaten durch enzymatische Hydrolyse immer mit einem Anstieg der Bitterkeit beschrieben wurde (vgl. Seo et al., „Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis", Journal of Food Science, 73(1), 2008, S. 41-46).

Da vielfach eine hohe Druckbelastung aus wirtschaftlichen oder energetischen Überlegungen nicht erwünscht ist, können auch einfachere Verfahren zu einem guten erfindungsgemäßen Produkt führen. So zeigt sich, dass auch bei niedrigen Drücken nahe am Umgebungsdruck zufrieden-stellende Ergebnisse erzielt werden, wenn eine intensive Scherbeanspruchung sichergestellt ist. Diese kann beispielsweise an schnell durchströmten Spalten auftreten, an beweglichen Kanten, an den Kontaktstellen von Rührwerken in Flüssigkeiten oder auch in leistungsstarken Pumpen. In Versuchen zeigte sich, dass eine erfindungsgemäße Scherbeanspruchung dann erreicht wird, wenn Scherraten auftreten, die größer $10s^{-1}$, vorteilhaft größer $100s^{-1}$, besonders vorteilhaft größer $500s^{-1}$ sind.

In einigen Anwendungen kann es vorteilhaft sein, eine Erhitzung der entsprechenden Proteinfraktion auf über 90 °C durchzuführen, besser sogar auf Temperaturen über 100 °C. Hierbei können neben einer weitgehenden Reduktion der Keimbelastung in der Proteinfraktion auch weitere sensorische Effekte durch thermisch induzierte Reaktionen erzielt werden, die sich positiv auf die Verbraucherakzeptanz auswirken. Ähnlich positive Effekte können bei mehreren Erhitzungsschritten erzielt werden. Vorteilhaft wird die Proteinfraktion im Verlauf der Behandlung mehr als 1-mal auf Werte über 80°C erhitzt, besonders vorteilhaft mehr als 3-mal.

Besondere Vorteile hinsichtlich ausgewählter techno-funktioneller Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit oder Emulgierkapazität ergeben sich, wenn nach der Hydrolyse und (optionalen) Fermentation ein Trennschritt nach Größe oder Löslichkeit bzw. Sedimentierbarkeit erfolgt, wie z.B. eine Zentrifugation oder Filtration. Dabei zeigt sich, dass die Proteinfraktion im Sediment im Vergleich zur Proteinfraktion im Überstand nach der Zentrifugation trotz ähnlicher sensorischer Eigenschaften große Unterschiede in der Funktionalität und Immunreaktivität aufweisen. Während die Proteinfraktion im Sediment deutlich bessere Eigenschaften

als Emulgator aufweist als die Proteinfraktion im Überstand, erzeugt sie in Prick-Tests bei entsprechenden Allergikern eine stärkere allergische Reaktion als die Proteinfraktion des Überstands. Ähnliches gilt für die Retentat- und Permeatproteinfraktionen nach der Ultrafiltration. Auch hier ist die Retentatfraktion besser als Emulgator geeignet, erzeugt aber stärkere allergische Reaktionen in Prick-Tests in der menschlichen Haut.

Die bei Einbeziehung des Trennungsschrittes h) in das Verfahren erhaltenen erfindungsgemäßen Proteinfraktionen sind die Retentatfraktion oder Sedimentfraktion und die Permeat-fraktion oder Überstandsfraktion.

Die erfindungsgemäße Proteinfraktion enthält mehr als 25 Mass-% Protein, bevorzugt mehr als 60 Mass-%, besonders vorteilhaft über 90 Mass-%. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Teilfraktionen der Proteine einer oder mehrerer Spezies von Leguminosen oder einer oder mehrerer Spezies von Ölsaaten enthalten sind. Dabei sind unter dem Begriff Leguminosen Samen von Soja, Erbsen, Lupinen, Kichererbsen, Linsen, Bohnen, Ackerbohnen und Erdnuss zu verstehen und unter dem Begriff Ölsaaten Samen von Sonnenblumen, Raps, Camelina und Lein. Die erfindungsgemäße Proteinfraktion kann aus einer oder aus einer Mischung von mehreren Teilfraktionen der jeweiligen Gesamtheit der Proteine aus den genannten Rohstoffen bestehen.

Erfindungsgemäß weist die Proteinfraktion nach Fermentation einen Anteil an Biomasse aus Mikroorgansimen auf, die vorteilhaft inaktiviert vorliegen. Dieser Anteil ist im Trockensubstanzgehalt bezogen auf den Trockensubstanzgehalt der Proteinfraktion größer als 0,05 Mass-%, besser größer als 0,5 Mass-%, besonders vorteilhaft größer als 1 Mass-%. Es zeigt sich, dass eine Anreicherung der Biomasse aus Milchsäurebakterien bis zu einem Anteil von 1 Mass% an Mikroorganismen-Trockenmasse die Proteinfraktion als

sensorisch zunehmend ansprechend empfunden wird. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Beliebtheit wieder ab.

Die erfindungsgemäße Proteinfraktion besteht vorzugsweise aus einem Anteil an Protein, das bei pH 7 löslich ist und aus einem Anteil an Protein, das bei pH 7 unlöslich ist. Der lösliche Anteil der Proteinfraktion weist überraschenderweise eine enge Molekulargewichtsverteilung auf. Die Molekülgrößen sind dabei zu mehr als 30% kleiner als 25 kDa, bevorzugt zu mehr als 50%, besonders bevorzugt zu mehr als 90%. Daher sind die Eigenschaften der Proteine des löslichen Anteils sehr einheitlich. Es wäre somit möglich, die lösliche Fraktion bei einem pH-Wert von 7 von der unlöslichen zu trennen und beide Proteinfraktionen getrennt voneinander einzusetzen. Besonders für die lösliche Fraktion gibt es eine Vielzahl von Applikationsmöglichkeiten in Lebensmitteln, wie z.B. ein Einsatz in Getränken oder Gelen.
Bei Einbeziehung des Trennungsschrittes h) bei der Herstellung wird die erfindungsgemäße Proteinfraktion nur durch die Permeat- bzw. Überstandsfraktion oder durch die Retentat- bzw. Sedimentfraktion gebildet und weist dann eine Molekulargewichtsverteilung auf, bei der Molekülgrößen entweder zu mehr als 50% kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt zu mehr als 70%, besonders vorteilhaft zu mehr als 90%, oder bei der weniger als 60% der Molekülgrößen kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt weniger als 50%, besonders bevorzugt weniger als 20%.

Die erfindungsgemäße Proteinfraktion weist vorteilhaft eine Schaumaktivität (bezogen auf eine Ausgangslösung) von größer als 1000%, bevorzugt größer 1500%, besonders bevorzugt größer als 2000% auf. Die Emulgierkapazität beträgt vorzugsweise >200 ml Öl/g Protein, besonders vorteilhaft >500 ml Öl/g Protein und hat vorzugsweise - nach ausreichender Druck- und Scherbehandlung - eine Löslichkeit von >25% bei pH 7.

Zur Steigerung der Verbraucherakzeptanz weist die für die

Applikation im Lebensmittel zum Einsatz kommende Proteinfraktion neben ansprechenden Eigenschaften in Bezug auf Aroma und Geschmack auch eine ausgeprägte Helligkeit auf. Diese wird in der für die Farbcharakterisierung zum Einsatz kommenden L*a*b-Bestimmung durch den L-Wert angegeben. Bei der erfindungsgemäßen Proteinfraktion liegt dieser Wert über 70, bevorzugt über 80, besonders vorteilhaft über 90.

Die Farbe der Proteinfraktion fällt damit erfindungsgemäß sehr hell aus und reicht je nach überwiegend enthaltenem Rohstoff von Weiß über cremefarben, hellgrau, hellgelb oder hellorange. Folgendes sind typische Werte für L*, a* und b*

L* >= 80, -5 < a* < +5, -5 < b* < +20; vorteilhaft
L* >= 85, -3 < a* < +3, - 2 < b* < +15; besonders vorteilhaft
L* >= 90, -1 < a* < +1, 0 < b* < +10.

Zudem enthält die Proteinfraktion vorteilhaft einen Anteil von Aromakomponenten, die aus der Fermentation stammen, wie z.B Diacetyl oder andere Metaboliten der fermentativen Behandlung.

Die Immunreaktivität des erfindungsgemäßen Produktes ist im Vergleich zu einem nativen Protein aus derselben Pflanze um mindestens 50%, besser um >80% reduziert. Bestimmt wird dieser Wert über die Auswertung eines Western Blots.

Mit dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren sind Proteinfraktionen aus Pflanzenproteinen mit folgenden weiteren Eigenschaften herstellbar:

Techno-funktionelle Eigenschaften:
Es wurde erkannt, dass die techno-funktionellen Eigenschaften der Proteinfraktion durch die erfindungsgemäßen Verfahrensschritte deutlich verbessert wurden. Folgende Werte wurden in den Proteinfraktionen typischerweise gefunden:

- Proteinlöslichkeit bei pH 4:
  Die Proteinlöslichkeit, bestimmt nach Morr et al. (Morr et al. 1985, "A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure", Journal of Food Science 50:1715-1718), ist größer als 5%, bevorzugt größer als 20%. Typischerweise liegt die Proteinlöslichkeit im Bereich von >5-90%.

- Proteinlöslichkeit bei pH 7:
  Die Proteinlöslichkeit, bestimmt nach Morr et al. 1985 ist vorzugsweise größer als 25%, bevorzugt größer als 50%. Typischerweise liegt die Proteinlöslichkeit im Bereich von >35-90%.

- Emulgiereigenschaften:
  Die Emulgierkapazität, bestimmt nach der Konduktivitätsmessungs-Methode, betragt mindestens 200 ml Öl/g, bevorzugt mindestens 500 ml Öl/g.

- Wasser- und Ölbindevermögen:
  Die Wasserbindung, bestimmt nach dem AACC-Bestimmungsverfahren, beträgt mindestens 2 ml/g, bevorzugt mindestens 3 ml/g.
  Die Ölbindung, bestimmt nach dem Fettbinde-Bestimmungsverfahren, beträgt mindestens 1 ml/g, bevorzugt mindestens 2 ml/g.

- Schaumbildende Eigenschaften:
  Die Schaumaktivität beträgt mindestens 1000%. Vergleichsmessungen mit frischem Hühnereiklar bei Aufschlag während 3 min auf Stufe 3 in einer Hobart 5ON Standard-Küchenmaschine mit Rührbesen zeigen, dass die Schaumaktivität der Proteinfraktion mindestens 60% der Schaumaktivität von Hühnereiklar entspricht. Die Schaumdichte liegt im Bereich von 30 bis 220 g/l. Die Schaumstabilität beträgt mindestens 2%, vorzugsweise mindestens 50%.

Sensorische Eigenschaften:

Neben der hellen Farbe ist die Proteinfraktion im Wesentlichen geruchsfrei und geschmacksneutral. Insbesondere fehlen weitgehend die pflanzen- oder saateigenen Aromen. So sind im Wesentlichen kein „bohniger" und „grün/grasiger" Geruch und Geschmack sowie im Wesentlichen kein Bittergeschmack wahrnehmbar.

Sensorische Tests mit einem geschulten Sensorik Panel zeigten, dass der Proteinfraktion ein Wert von 2 oder weniger (typischerweise ein Wert von 0 bis 1) zugeordnet wird. Farbe, Eigengeschmack und Eigengeruch der Proteinfraktion sind so, dass bei der Einarbeitung in Lebens- und Futtermittel im Wesentlichen keine mit üblichen statistischen Methoden ermittelte signifikante, als negativ zu wertende Veränderung des arteigenen Aussehens, Geruchs und Geschmacks der fertigen Zubereitung auftritt.

Farbe, Eigengeschmack und Eigengeruch der Proteinfraktion sind so, dass bei der Einarbeitung in Lebens- und Futtermittel im Wesentlichen keine mit üblichen statistischen Methoden ermittelte signifikante, als negativ zu wertende Veränderung des arteigenen Aussehens, Geruchs und Geschmacks der fertigen Zubereitung auftritt.

Sensorische Tests zeigen, dass die Geschmacks- und Aromaänderung, die in einer Lebensmittelzubereitung durch den Einsatz der Proteinfraktion hervorgerufen wird, gegenüber der Lebensmittelzubereitung ohne die Proteinfraktion auf ein derartiges Maß begrenzt ist, dass ein geschulter Prüfer eine Abweichung eines der oben genannten Geschmacks- oder Aromamerkmale auf einer Skala von 1-10 von maximal 3 Stufen, besser maximal 1 Stufe (fast nicht mehr erkennbare Abweichung) erkennen

kann.

Die erfindungsgemäße Proteinfraktion kann daher eine oder mehrere der obigen techno-funktionellen und sensorischen Eigenschaften aufweisen.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Proteinfraktion als Lebensmittelzutat eingesetzt. Da neben der verbesserten Funktionalität und Sensorik auch die Immunreaktivität der erfindungsgemäßen Proteinfraktion deutlich reduziert ist, kann die Proteinfraktion aus einem Rohstoff (z.B. Soja oder Sonnenblume) oder Mischungen aus verschiedenen Rohstoffen vorteilhaft als hypoallergene oder allergen-reduzierte Proteinzutat in Lebensmitteln verwendet werden.

Aufgrund der hohen Funktionalität der Proteinfraktion kann zudem die Einsatzmenge zur Erzielung der gewünschten Textureffekte (z.B. Stabilisierung einer Emulsionen) im Vergleich zu bislang am Markt verfügbaren Proteinzutaten weiter reduziert werden, so dass eine geringere Immunreaktivität der Proteinfraktion zusammen mit einer geringeren Einsatzmenge der Zutat zu einer geringeren Immunreaktion bei potenziell allergischen Menschen führen wird. Es sind Anwendungen möglich, wie Emulsionen (z.B. pflanzlicher Ersatz für Milch, Sahne, Joghurt, Käse, Wurst, Mayonnaise,…), pflanzliche Back-, feine Back- und Teigwaren, in denen auf den Zusatz von Ei verzichtet wird oder extrudierte nasse oder trockene Proteinprodukte (wie z.B. pflanzliche Fleischalternativen aus der Kochextrusion oder pflanzliche Trockenextrudate).

Ausführungsbeispiel

Es wurde eine Sojaproteinfraktion gewonnen, die mittels wässriger Extraktion bei pH 8 aus zermahlenen und mit Wasser vorextrahierten Sojabohnen extrahiert und mit einer Fällung am isoelektrischen Punkt aufkonzentriert wurde. Die dabei erhaltene Suspension wurde neutralisiert und auf ein

Protein:Wasser-Verhältnis von 1:20 eingestellt. Danach wurden folgende Prozessschritte durchgeführt:

- enzymatische Hydrolyse (zweistufige Enzymkombination aus Endopeptidase und Exopeptidase) bei 30°C, gefolgt von einer
- Erhitzung auf 85 °C, gefolgt von einer
- aeroben Fermentation mittels Milchsäurebakterien (Lb. perolens), unter vorheriger Zugabe von 2% Glukose, gefolgt von einer
- Homogenisation der jeweiligen Fraktionen bei einem Druck von $200*10^5$ Pa (200 bar) und einer Temperatur von 30°C und einer
- anschließenden Sprühtrocknung.

Die dabei erhaltene Proteinfraktion hat eine fast weiße Farbe, einen sehr neutralen Geschmack und zeigt im Sandwich ELISA und Western Blot mit spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern und Humanseren von Soja-Allergikern keine oder im Vergleich zum nativen Protein nur noch eine sehr geringe Immunreaktivität, aber gleichzeitig Funktionalitätswerte hinsichtlich Emulgierkapazität von 700 mL Öl/g und 50% Löslichkeit bei pH 7.

Bestimmungsverfahren:

Zur quantitativen Charakterisierung der hergestellten Proteinfraktion wird auf folgende Bestimmungsverfahren zurückgegriffen:

- Proteingehalt:

Der Proteingehalt ist definiert als der Gehalt, der sich aus der Bestimmung des Stickstoff (N) und dessen Multiplikation mit dem Faktor 6,25 errechnet. Der Proteingehalt wird z. B. in Prozent bezogen auf die Trockenmasse (TS) angegeben.

- Farbe: Die wahrnehmbare Farbe ist mittels CIE-L*a*b*-Farbmessung definiert (vgl. DIN 6417). Dabei gibt die L*-Achse die Helligkeit an, wobei Schwarz den Wert 0 und Weiß

den Wert 100 hat, die a*-Achse beschreibt den Grün- oder Rotanteil und die b*-Achse den Blau- oder Gelbanteil.

- Proteinlöslichkeit (bei pH 7 oder pH 4):
Die Proteinlöslichkeit ist mittels Bestimmungsverfahren nach Morr bestimmt (Morr et al., "A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure", Journal of Food Science 50:1715-1718). Dabei wird die Proteinfraktion zu einem Masse-Volumenanteil von 1:25 bis 1:50 (w/v) (d. h. 1-2 g der Proteinfraktion auf 50 ml Lösung) in einer 0,1 M NaCl-Losung bei Raumtemperatur suspendiert und unter Verwendung von 0,1 M HCl- oder NaOH-Lösung ca. 60 min bei einem pH-Wert von pH 7 (oder pH 4) gehalten und mit ca. 200 U/mm gerührt und das unlösliche Sediment danach für 15 min bei 20.000 x g abzentrifugiert. Die Proteinlöslichkeit wird z.B. in Prozent angegeben, wobei eine Proteinlöslichkeit von x% bedeutet, dass x% des in der Proteinfraktion vorhandenen Proteins im geklärten Überstand wiedergefunden werden, wenn die genannte Methode angewendet wird.

- Wasserbindung:
Das Wasserbindevermögen ist mittels Bestimmungsverfahren (hier AACC-Bestimmungsverfahren genannt) definiert, wie es angegeben ist in: American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the AACC". 10th ed., AACC. St. Paul, MN, 2000; Method 56-20. "Hydration capacity of pregelatinized cereal products". Das Wasserbindevermögen ist z. B. in ml/g angebbar, d.h. Milliliter gebundenes Wasser pro Gramm Proteinfraktion, und wird gemäß dem AACC-Bestimmungsverfahren bestimmt über das Gewicht des mit Wasser gesättigten Sediments abzüglich der Einwaage der trockenen Proteinfraktion nach Mischung von ca. 2 g Proteinfraktion mit ca. 40 ml Wasser für 10 Minuten und Zentrifugation bei 1000g für 15 Minuten bei 20°C.

- Ölbindung:
Das Ölbindevermögen ist mittels Bestimmungsverfahren (hier

Fettbinde-Bestimmungsverfahren genannt) definiert, wie es angegeben ist in: Ludwig I. et al., "Eine Mikromethode zur Bestimmung der Fettbindkapazität". Nahrung/Food, 33(1), 99. Das Ölbindevermögen wird z.B. in ml/g angegeben, d. h. Milliliter gebundenes Öl pro Gramm Proteinfraktion, und wird gemäß o.g. Bestimmungsverfahren gemessen als Volumen des ölbindenden Sediments nach Mischung von 1,5 g Proteinfraktion mit 15 ml Maiskeimöl für 1 Minute und Zentrifugation bei 700g für 15 Minuten bei 200C.

- Emulgierkapazität:
Die Emulgierkapazität ist mittels Bestimmungsverfahren (hier Konduktivitätsmessungs-Methode genannt) bestimmt, bei welchem einer 1 %igen Suspension der Proteinfraktion von 100 ml, pH 7, Maiskeimöl zugegeben wird bis zur Phaseninversion der Öl-in-Wasser-Emulsion. Die Emulgierkapazität ist definiert als das maximale Ölaufnahmevermögen dieser Suspension, bestimmt über die spontane Abnahme der Leitfähigkeit bei der Phaseninversion (Wäsche A. et al.,"New processing of lupin protein isolates and functional properties". Nahrung/Food 45:393-395) und wird z.B. angegeben in ml Öl/g, d. h. Milliliter emulgiertes Öl pro Gramm Proteinfraktion.

- Schaumaktivität:
Die Schaumaktivität ist angegeben in Prozent, gemessen als Volumenzunahme einer 5 %igen Proteinlösung, pH 7, bei Aufschlag wahrend 8 min auf Stufe 3 (591 U/mm) in einer Hobart 5ON Standard-Küchenmaschine (Stahlkessel mit 5 Liter Inhalt) mit Rührbesen (Drahtbesen).

- Schaumdichte:
Die Schaumdichte ist angegeben in g/l, d. h. Masse des Schaums pro Volumeneinheit, und wird gemessen nach Aufschlag einer 5 %igen Proteinlösung, pH 7, von 8 min auf Stufe 3 (591 U/min) in einer in einer Hobart 5ON Standard-Küchenmaschine (Stahlkessel mit 5 Liter Inhalt) mit Rührbesen (Drahtbesen) .

- Schaumstabilität:
Die Schaumstabilität ist angegeben in Prozent, gemessen als übrig gebliebenes Volumen von 100 ml Schaum innerhalb einer Stunde nach Aufschlag einer 5 %igen Proteinlösung, pH 7, 8 min auf Stufe 3 (591 U/min) in einer Hobart 5ON Standard-Küchenmaschine (Stahlkessel mit 5 Liter Inhalt) mit Rührbesen (Drahtbesen).

- Gelbildungskonzentration:
Die Gelbidlungskonzentration ist mittels Bestimmungsverfahren definiert, wie es angegeben ist in: Sathe SK et al., "Functional-properties of Winged Bean 620 [Psophocarpus-Tetragonolobus (L) Dc] Proteins". Journal of Food Science 47(2):503-621 509.

- Molekulargewichtsverteilung:
Die Molekulargewichtsverteilung ist mittels Bestimmungsverfahren (hier SDS-PAGE Analyse genannt) definiert, wie es angegeben ist in: Laemmli, „Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4". Nature, 227, 680). Die Auftrennung der Proteine wird mittels 4-20% midi CriterionTM TGX Stain-FreeTM precast Fertiggele (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) in der CriterionTM Cell (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) durchgeführt und die Visualisierung und Auswertung erfolgt dabei mit Hilfe des Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, München).

- Hydrolysegrad:
Der Hydrolysegrad ist mittels Bestimmungsverfahren (hier DH-Wert Analyse genannt) definiert, wie es angegeben ist in: Nielsen P. M. et al., „Improved method for determining food protein degree of hydrolysis". Journal of Food Science 66:642-646.

- Immunreaktivität:
Die Immunreaktivität ist mittels Bestimmungsverfahren

(Sandwich ELISA und Western Blot) definiert, wie es angegeben ist: Meinlschmidt P. et al., "Immunoreactivity, sensory and physicochemical properties of fermented soy protein isolate", Food Chemistry 205: 229-238.

- Sensorische Eigenschaften:
Sensorische Tests, in welchen geschulte Prüfer einen bestimmten Geschmacks- oder Aromaeindruck der Proteinfraktion und einer geeigneten Referenzsubstanz vergleichen und auf einer Skala von 1 bis 10 (1 = nicht wahrnehmbar, 10 = stark wahrnehmbar) bewerten, wobei zwei Referenzsubstanzen so gewählt sind, dass bei ihr der zu prüfende Geschmacks- oder Aromaeindruck mit 5 und 10 bewertet werden.

- Die Quantifizierung der Mikroorganismen kann mit Hilfe von mikroskopischen Verfahren erfolgen oder durch Quantifizierung der in der Proteinfraktion enthaltenen DNA-Stränge der Mikroorganismen. Die Quantifizierung der DNA-Stränge erfolgt mit einer molekularbiologischen Methode, die unter dem Begriff "Quantitative PCR" bekannt ist. Im Rückstand wird die Menge an DNA über die quantitative PCR ermittelt und kann folglich mit der ursprünglich eingesetzten Zellzahl korreliert werden, wobei die Zellzahl mit den KbE gleichgesetzt wird.

Beispiele von zu testenden Geschmacks- oder Aromaeindrucken sind:
- bohniger Geschmack im Vergleich zu Sojabohnen;
- Grüner bis grasiger Geschmack im Vergleich zu grünem Paprika oder grünen Erbsen;
- Bittergeschmack im Vergleich zu zwei wässrigen 1,0 und 2,5%igen wässrigen Alcalase-Hydrolysat Lösungen (Herstellungsbedingungen: E/S = 0,5%, 180 min, pH 8,0, 60°C, ohne pH-Wert Regulierung).
Das Panel wurde zuvor mittels eines sensorischen Schwellentests zur Erkennung von „Bitter und nicht Bitter Schmeckern" mit Hilfe von Koffein-Lösungen ausgewählt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten, bei dem in einem Fraktionierungsschritt aus zerkleinerten Leguminosensamen oder Ölsaaten mit Hilfe eines mechanischen Verfahrens und/oder mit Hilfe eines Lösemittels eine erste Proteinfraktion abgetrennt wird, wobei eine zweite Proteinfraktion zurück bleibt, und eine durch den Fraktionierungsschritt direkt oder nach Zugabe von Wasser erhaltene wasserhaltige Proteinfraktion
- einer ein- oder mehrmaligen Hydrolyse,
- einer ein- oder mehrmaligen Erhitzung auf eine Temperatur > 70 °C,
- optional einer ein- oder mehrmaligen Fermentation und
- einer ein- oder mehrmaligen Druck- und/oder Scherbehandlung unterzogen wird,
um die Pflanzenprotein-Fraktion zu erhalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Hydrolyse im weiteren Verlauf des Verfahrens eine Trennung der wasserhaltigen Proteinfraktion nach Größe oder Sedimentierbarkeit in eine Retentat- oder Sedimentfraktion und eine Permeat- oder Überstandsfraktion erfolgt, um die Pflanzenprotein-Fraktion zu erhalten.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Lösungsmittel im Fraktionierungsschritt Wasser oder ein wässriges Lösungsmittel eingesetzt wird, wodurch als erste Proteinfraktion direkt die

wasserhaltige Proteinfraktion erhalten wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Lösungsmittel im Fraktionierungsschritt kein Wasser oder wässriges Lösungsmittel eingesetzt und die wasserhaltige Proteinfraktion durch Zugabe von Wasser zu der ersten oder zweiten Proteinfraktion erhalten wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Wassergehalt der wasserhaltigen Proteinfraktion durch ein Membranverfahren oder ein destillatives Verfahren zur Erhöhung des Trockensubstanzgehaltes auf einen Wert bis zu 12 Mass-%, vorteilhaft bis zu 15 Mass-% Trockensubstanz reduziert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Hydrolyse der wasserhaltigen Proteinfraktion mit Proteasen oder Peptidasen erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Hydrolyse der wasserhaltigen Proteinfraktion mit Enzymkombinationen bestehend aus mindestens einer Endo- und mindestens einer Exopeptidase erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Hydrolyse der wasserhaltigen Proteinfraktion durch eine 2-stufige enzymatische Hydrolyse mittels Endo- und Exopeptidasen erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Fermentation nach Zugabe von Mikroorganismen

für die Fermentation mit einer Dosierung von ≥ 10^{10} KbE pro Gramm Protein und unter Anwesenheit von Glukose oder einem anderen einfach zu fermentierendem Kohlenhydrat erfolgt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Druck- und/oder Scherbehandlung nach der Fermentation und nach der Erhitzung durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserhaltige Proteinfraktion oder eine daraus erhaltene Retentat- oder Sedimentfraktion oder Permeat- oder Überstandsfraktion nach Durchführung der Schritte der Enzymbehandlung, Erhitzung, Fermentation und Druck- und/oder Scherbehandlung getrocknet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Druck- und/oder Scherbehandlung bei einem Druck oberhalb von $5*10^5$ Pa, vorzugsweise bei einem Druck oberhalb von $150*10^5$ Pa durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Scherbehandlung so durchgeführt wird, dass Scherraten von größer $10s^{-1}$, vorteilhaft größer $100s^{-1}$, besonders vorteilhaft größer $500s^{-1}$ auftreten.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass ein Wassergehalt der wasserhaltigen Proteinfraktion so gewählt wird, dass bis zum Abschluss der Fermentation ein Massenverhältnis von Wasser zu Protein in der wasserhaltigen Proteinfraktion höher als 1:21, vorteilhaft höher als 8:1, besonders vorteilhaft höher

als 16:1 liegt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die wasserhaltige Proteinfraktion mehr als zweimal auf eine Temperatur > 80°C erhitzt wird.

16. Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten, die
- eine oder mehrere Teilfraktionen von Proteinen einer oder mehrerer Spezies der Leguminosen oder einer oder mehrerer Spezies der Ölsaaten enthält,
- einen Proteingehalt von mehr als 25 Mass-% Protein, vorteilhaft höher als 60%, besonders vorteilhaft höher als 90%, und
- eine Molekulargewichtsverteilung aufweist, bei der mehr als 30% der Molekülgrößen kleiner 25 kDA sind, bevorzugt mehr als 50%, besonders bevorzugt mehr als 90%,
- aus einem Anteil an Protein besteht, das bei pH 7 zu mind. 25%, bevorzugt zu mind. 50%, besonders bevorzugt zu mind. 60% löslich ist, und
- eine Schaumaktivität von größer als 1000%, bevorzugt größer als 1500%, besonders bevorzugt größer als 2000% aufweist.

17. Pflanzenproteinfraktion nach Anspruch 16, die DNA-Stränge von Mikroorganismen enthält, die einer Mikroorganismen-Konzentration von mehr als 10^8 KbE pro g Protein, bevorzugt mehr als 10^9 KBE pro Gramm Protein, besonders bevorzugt mehr als 10^{10} KBE pro Gramm Protein entsprechen.

18. Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten, die
- eine oder mehrere Teilfraktionen von Proteinen einer oder mehrerer Spezies der Leguminosen oder einer oder

mehrerer Spezies der Ölsaaten enthält,
- einen Proteingehalt von mehr als 50 Mass-% Protein, vorteilhaft höher als 60%, und
- eine Molekulargewichtsverteilung aufweist, bei der Molekülgrößen zu mehr als 50% kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt zu mehr als 70%, besonders bevorzugt zu mehr als 90%,
- eine Löslichkeit aufweist, die bei pH 7 mehr als 60%, bevorzugt mehr als 70%, besonders bevorzugt mehr als 80% beträgt, und
- eine Schaumaktivität von größer als 1000%, bevorzugt größer als 1500%, besonders bevorzugt größer als 2000% aufweist.

19. Pflanzenproteinfraktion nach Anspruch 18, die DNA-Stränge von Mikroorganismen enthält, die einer Mikroorganismen-Konzentration von mehr als 10^6 KbE pro g Protein, bevorzugt mehr als 10^7 KbE pro g Protein entsprechen.

20. Pflanzenprotein-Fraktion aus Leguminosen oder Ölsaaten, die
- eine oder mehrere Teilfraktionen von Proteinen einer oder mehrerer Spezies der Leguminosen oder einer oder mehrerer Spezies der Ölsaaten enthält,
- einen Proteingehalt von mehr als 50 Mass-% Protein, vorteilhaft höher als 60%, besonders vorteilhaft höher als 90%, und
- eine Molekulargewichtsverteilung aufweist, bei der weniger als 60% der Molekülgrößen kleiner als 25 kDa sind, bevorzugt weniger als 50%, besonders bevorzugt weniger als 20%,
- eine Löslichkeit aufweist, die bei pH 7 weniger als 60%, bevorzugt weniger als 50%, besonders bevorzugt weniger als 40% beträgt, und

- eine Schaumaktivität von größer als 1000%, bevorzugt größer als 1500%, besonders bevorzugt größer als 2000% aufweist.

21. Pflanzenproteinfraktion nach Anspruch 20, die DNA-Stränge von Mikroorganismen enthält, die einer Mikroorganismen-Konzentration von mehr als 10^8 KBE pro g Protein, bevorzugt mehr als 10^9 KBE pro g Protein, besonders bevorzugt mehr als 10^{10} KBE pro g Protein entsprechen.

22. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 17, 19 und 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Anteil an Biomasse aus Mikroorgansimen inaktiviert vorliegt.

23. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 17, 19, 21 und 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Anteil an Biomasse aus Mikroorgansimen bezogen auf den Trockensubstanzgehalt der Pflanzenprotein-Fraktion größer als 0,5 Mass-% ist.

24. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 17, 19 und 21 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Biomasse aus Mikroorgansimen bis zu einem Anteil von 1 Mass% bezogen auf den Trockensubstanzgehalt der Pflanzenprotein-Fraktion mit Milchsäurebakterien oder Hefen oder Schimmelpilzen angereichert ist.

25. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet,
dass die Pflanzenprotein-Fraktion eine Emulgierkapazität von >200 ml Öl/g Protein aufweist.

26. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 16 bis 25, dadurch gekennzeichnet,
dass die Pflanzenprotein-Fraktion eine mittels CIE-L*a*b-Farbmessung ermittelte Helligkeit mit einem L-Wert > 70 aufweist.

27. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 16 bis 26, dadurch gekennzeichnet,
dass die Pflanzenprotein-Fraktion einen Anteil von Aromakomponenten aus einer Fermentation enthält.

28. Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 16 bis 27, dadurch gekennzeichnet,
dass eine über eine Auswertung eines Western Blots ermittelte Immunreaktivität der Pflanzenprotein-Fraktion im Vergleich zu einem nativen Protein aus derselben Pflanze um mindestens 50% reduziert ist.

29. Verwendung der Pflanzenprotein-Fraktion nach einem der Ansprüche 16 bis 28 oder der mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erhaltenen Pflanzenprotein-Fraktion als Zutat für Lebensmittel oder Futtermittel.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/058187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L11/30 A23L25/00 A23J3/14 A23J3/34 A23J1/00 A23J1/14
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. MEINLSCHMIDT ET AL: "Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 71, 18 March 2016 (2016-03-18), pages 202-212, XP055393305, United Kingdom ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.026 abstract page 203, right-hand column, paragraph 1 - page 204, left-hand column, paragraph 3 page 206, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 4 page 211, left-hand column, paragraph 2-4 figures 1, 2; table 5 ----- -/--	1-29

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 July 2017	08/08/2017

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Stiegler, Petra

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PIA MEINLSCHMIDT ET AL: "Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties", FOOD SCIENCE & NUTRITION, vol. 4, no. 1, 29 June 2015 (2015-06-29), pages 11-23, XP055393278, ISSN: 2048-7177, DOI: 10.1002/fsn3.253 abstract page 12, right-hand column, paragraph 1 - page 13, left-hand column, paragraph 1 page 15, right-hand column, paragraph 1 - page 17, left-hand column, paragraph 2 page 20, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2 figures 1, 4; tables 1, 3, 4	1-29
X Y	US 2005/176936 A1 (NEUMULLER WALDEMAR [DE]) 11 August 2005 (2005-08-11) paragraphs [0001], [0002], [0010], [0011]; claim 1; figure 1; examples 1, 4	1-8, 10-15,29 9
X	CN 103 436 577 A (SHANDONG RUITAI CHEMICALS CO LTD) 11 December 2013 (2013-12-11) abstract claim 1; examples 1-5	1-15,29
X	GB 509 495 A (CHARLES WEIZMANN) 17 July 1939 (1939-07-17) page 1, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1 examples 1-2	1-15,29
X	WO 98/27828 A1 (GIST BROCADES BV [NL]; SCHOENMAKER ARIE CORNELIS [NL]; PLIJTER SCHUDDE) 2 July 1998 (1998-07-02) page 2, line 8 - page 3, line 6 examples 8, 12	1-15,29
X Y	JP H11 178512 A (FUJI OIL CO LTD) 6 July 1999 (1999-07-06) claim 1; examples 1, 2	1-6,10, 11,14,29 9
Y	DE 690 07 556 T2 (NESTLE SA [CH]) 30 June 1994 (1994-06-30) example 5	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/058187

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP2017/058187

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-15 (in full); 29 (in part)

Process for producing a plant protein fraction.

---

2. Claims 16-28 (in full); 29 (in part)

Plant protein fraction having a defined molecular weight distribution.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/058187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005176936 A1	11-08-2005	AT 383081 T	15-01-2008
		AU 2003232741 A1	19-12-2003
		DE 10224257 A1	18-12-2003
		EP 1565066 A2	24-08-2005
		US 2005176936 A1	11-08-2005
		WO 03101573 A2	11-12-2003
CN 103436577 A	11-12-2013	NONE	
GB 509495 A	17-07-1939	NONE	
WO 9827828 A1	02-07-1998	AU 5860498 A	17-07-1998
		CA 2275423 A1	02-07-1998
		EP 0946107 A1	06-10-1999
		JP 2001507223 A	05-06-2001
		WO 9827828 A1	02-07-1998
JP H11178512 A	06-07-1999	JP 3417461 B2	16-06-2003
		JP H11178512 A	06-07-1999
DE 69007556 T2	30-06-1994	AR 243936 A1	30-09-1993
		AT 103141 T	15-04-1994
		AU 624004 B2	28-05-1992
		CA 2019850 A1	07-01-1991
		DE 69007556 D1	28-04-1994
		DE 69007556 T2	30-06-1994
		DK 0406598 T3	04-07-1994
		EP 0406598 A1	09-01-1991
		ES 2033174 A1	01-03-1993
		IE 902234 A1	16-01-1991
		IN 170690 B	02-05-1992
		JP 3142001 B2	07-03-2001
		JP H0349651 A	04-03-1991
		NO 902791 A	08-01-1991
		NZ 234383 A	28-05-1991
		PT 94614 A	20-03-1991
		SG 91794 G	14-10-1994
		ZA 9004929 B	24-04-1991

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/058187

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. A23L11/30 A23L25/00 A23J3/14 A23J3/34 A23J1/00 A23J1/14
ADD.
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
A23L A23J

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	P. MEINLSCHMIDT ET AL: "Soy protein hydrolysates fermentation: Effect of debittering and degradation of major soy allergens", LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, Bd. 71, 18. März 2016 (2016-03-18), Seiten 202-212, XP055393305, United Kingdom ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.026 Zusammenfassung Seite 203, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 204, linke Spalte, Absatz 3 Seite 206, linke Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 4 Seite 211, linke Spalte, Absatz 2-4 Abbildungen 1, 2; Tabelle 5 ----- -/--	1-29

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. Juli 2017	08/08/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Stiegler, Petra

2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PIA MEINLSCHMIDT ET AL: "Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties", FOOD SCIENCE & NUTRITION, Bd. 4, Nr. 1, 29. Juni 2015 (2015-06-29), Seiten 11-23, XP055393278, ISSN: 2048-7177, DOI: 10.1002/fsn3.253 Zusammenfassung Seite 12, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 13, linke Spalte, Absatz 1 Seite 15, rechte Spalte, Absatz 1 - Seite 17, linke Spalte, Absatz 2 Seite 20, linke Spalte, Absatz 3 - rechte Spalte, Absatz 2 Abbildungen 1, 4; Tabellen 1, 3, 4	1-29

X	US 2005/176936 A1 (NEUMULLER WALDEMAR [DE]) 11. August 2005 (2005-08-11)	1-8, 10-15,29
Y	Absätze [0001], [0002], [0010], [0011]; Anspruch 1; Abbildung 1; Beispiele 1, 4	9

X	CN 103 436 577 A (SHANDONG RUITAI CHEMICALS CO LTD) 11. Dezember 2013 (2013-12-11) Zusammenfassung Anspruch 1; Beispiele 1-5	1-15,29

X	GB 509 495 A (CHARLES WEIZMANN) 17. Juli 1939 (1939-07-17) Seite 1, Spalte 1, Absatz 1 - Spalte 2, Absatz 1 Beispiele 1-2	1-15,29

X	WO 98/27828 A1 (GIST BROCADES BV [NL]; SCHOENMAKER ARIE CORNELIS [NL]; PLIJTER SCHUDDE) 2. Juli 1998 (1998-07-02) Seite 2, Zeile 8 - Seite 3, Zeile 6 Beispiele 8, 12	1-15,29

X	JP H11 178512 A (FUJI OIL CO LTD) 6. Juli 1999 (1999-07-06)	1-6,10, 11,14,29
Y	Anspruch 1; Beispiele 1, 2	9

Y	DE 690 07 556 T2 (NESTLE SA [CH]) 30. Juni 1994 (1994-06-30) Beispiel 5	9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/058187

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchengebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.

☐ Die zusätzlichen Recherchengebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.

☒ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/** 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-15(vollständig); 29(teilweise)

   Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenprotein-Fraktion

   ---

2. Ansprüche: 16-28(vollständig); 29(teilweise)

   Pflanzenprotein-Fraktion mit einer definierten Molekulargewichtsverteilung

   ---

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2017/058187

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2005176936 A1	11-08-2005	AT 383081 T	15-01-2008
		AU 2003232741 A1	19-12-2003
		DE 10224257 A1	18-12-2003
		EP 1565066 A2	24-08-2005
		US 2005176936 A1	11-08-2005
		WO 03101573 A2	11-12-2003
CN 103436577 A	11-12-2013	KEINE	
GB 509495 A	17-07-1939	KEINE	
WO 9827828 A1	02-07-1998	AU 5860498 A	17-07-1998
		CA 2275423 A1	02-07-1998
		EP 0946107 A1	06-10-1999
		JP 2001507223 A	05-06-2001
		WO 9827828 A1	02-07-1998
JP H11178512 A	06-07-1999	JP 3417461 B2	16-06-2003
		JP H11178512 A	06-07-1999
DE 69007556 T2	30-06-1994	AR 243936 A1	30-09-1993
		AT 103141 T	15-04-1994
		AU 624004 B2	28-05-1992
		CA 2019850 A1	07-01-1991
		DE 69007556 D1	28-04-1994
		DE 69007556 T2	30-06-1994
		DK 0406598 T3	04-07-1994
		EP 0406598 A1	09-01-1991
		ES 2033174 A1	01-03-1993
		IE 902234 A1	16-01-1991
		IN 170690 B	02-05-1992
		JP 3142001 B2	07-03-2001
		JP H0349651 A	04-03-1991
		NO 902791 A	08-01-1991
		NZ 234383 A	28-05-1991
		PT 94614 A	20-03-1991
		SG 91794 G	14-10-1994
		ZA 9004929 B	24-04-1991