

## Eiklarproteinfraktionierung zur Verbesserung der Verschäumungseigenschaften und Pasteurisierbarkeit der entstandenen Fraktionen

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie Prof. Dr. Ulrich Kulozik/Dipl.-Ing. Janina Brand
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn Bundesverband der Deutschen Eiprodukten-Industrie e.V. (BVEP), Bonn Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen Forschung an der TUM e.V., Freising
	Projektkoordinator: Klaus Mielke OVOBEST Eiprodukte GmbH Neuenkirchen-Vörden
<b>Laufzeit:</b>	2012- 2014
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 248.700,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Eiklar ist aufgrund seiner hervorragenden gel- und schaubildenden Eigenschaften ein häufig verwendeter multifunktionaler Rohstoff in der Lebensmittelindustrie. Der Trockenmassegehalt von Eiklar liegt bei 12,1 %, von dem die Proteine mit 10,6 % den größten Anteil stellen. Weitere Bestandteile sind 0,9 % Kohlenhydrate, 0,6 % Mineralstoffe sowie 0,03 % Lipide. Eiklar stellt damit eine äußerst reine Proteinquelle dar.

Eiklar wurde bisher als System synergistisch funktionierender Proteine angesehen, das wegen deren unterschiedlicher Struktur hervorragende Schaumeigenschaften aufweist. Erste Hinweise aus der Literatur weisen jedoch darauf hin, dass diese Auffassung in Frage gestellt werden muss, denn es wurde herausgefunden, dass der Entzug des Proteins Lysozym und eventuell zusätzlich von Ovotransferrin, die Schaumbildung der übrigen Fraktionen deutlich verbessert. Es besteht deshalb die Hypothese, dass die gute Schaumbildung nicht durch die Synergie der Proteine, sondern durch den geringen Gehalt an schaumschädlichen Substanzen (insbesondere von Lipiden) erklärt werden

kann. Abgesehen davon hat Lysozym als Einzel-fraktion bereits wertsteigernde Einsatzzwecke aufgrund seiner konservierenden Eigenschaften gefunden. Für Ovotransferrin liegt das Einsatzgebiet im Bereich der Eisensupplementation ebenfalls auf der Hand.

Die Stabilisierung des Eiklars in industriellen Eiklarprodukten wird vorrangig durch Pasteurisation erreicht, so dass ein Entzug von Lysozym die mikrobiologische Stabilität nicht beeinträchtigt. Bedingt durch den extremen Isoelektrischen Punkt (IEP) des Lysozyms sind hitzeinduzierte Interaktionen wahrscheinlich. Zusätzlich ist Ovotransferrin ein sehr hitzesensitives Protein, so dass die Pasteurisierbarkeit der Hauptfraktionen in Abwesenheit von Lysozym und Ovotransferrin sogar besser gegeben sein könnte.

Ein Weg, den Wert von Eiprodukten zu steigern bzw. das Potenzial von Komponenten mit Wertsteigerung zu bestimmen, liegt in der präparativen Fraktionierung von Lysozym, Ovotransferrin und der ovalbuminreichen Restfraktion mittels Membran-Adsorptions-Chromatographie (MAC). Dieses Verfahren hat sich in verschiedenen Ansätzen bereits als überlegene Trenntechnik er-

wiesen und zeigt auch für Eiklarproteine ein hohes Potenzial. Bei der MAC-Technologie werden die Bindungsstellen der IEC an Stelle der Gelkügelchen auf Membranen bzw. in die Membranporen von Mikrofiltrationsmembranen gekoppelt. Dies bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber konventionellen Chromatographiesäulen, insbesondere wesentlich höhere Flussraten, geringere Gegendrücke, deutlich kürzere Produktionszyklen und längere Standzeiten. Zusätzlich ist es möglich, durch den speziellen Aufbau der Direct-Capture-Membranadsorber mit partikelhaltigen Lösungen zu arbeiten. Eiklar weist mit seiner hohen Proteinkonzentration und Viskosität einige erschwerende Eigenschaften auf, die voraussichtlich durch eine entsprechende Vorprozessierung modifiziert werden müssen, um das System unterschiedlicher Proteine trennbar zu machen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, Eiklarproteine im präparativen Maßstab zu fraktionieren, Ovotransferrin und Lysozym in Reinform zu isolieren sowie die ovalbuminreiche Hauptfraktion zu gewinnen. Da sich Eiklar aufgrund seines hohen Proteingehalts und der hohen Viskosität als trenntechnisch schwieriges Produkt darstellt, war es ein weiteres Ziel, die Trennbarkeit in Bezug auf Fließverhalten und Stoffaustausch zu untersuchen und zu charakterisieren.

#### Forschungsergebnisse:

Als Vorbehandlung wurden sowohl Variationen der Ovomucinfällung durchgeführt als auch verschiedene mechanische Methoden. Weder die Fällung noch die Vorbehandlung mittels Kolloidmühle erwiesen sich hierbei als geeignet. Jedoch konnten durch die Vorbehandlung im Hochdruckhomogenisator (dreimaliger Durchlauf, 250 bar) in Kombination mit einer Verdünnung (1 : 2, 75 mM NaCl) alle Anforderungen (Viskositätssenkung, Filtrierbarkeit, Erhalt der Proteinnativität, Lysozymfreisetzung) erfüllt werden. Anschließend konnte das so modifizierte Eiklar für die Fraktionierung verwendet werden.

Die Untersuchungen zur Fraktionierung von Lysozym und Ovotransferrin aus Eiklar im Labormaßstab wurden mit einem Membranwickelmodul durchgeführt, dessen Bauart sich von dem im Pilotmaßstab unterscheidet. Während die Membrancharakteristika identisch sind,

liegt der wesentliche Unterschied im Strömungsprofil der Module. Beim Sartobind® nano, welcher im Labormaßstab eingesetzt wurde, wird die Probe in Folge einer Druckapplikation radial durch die Membranporen gezwungen. Es entsteht ein konvektiver Strom durch die poröse Membran. Dadurch kann es zwar zu Fouling und zur Porenverblockung kommen, der Vorteil dieser Bauweise ist aber, dass auch die funktionellen Gruppen innerhalb der Membranporen konvektiv angeströmt werden. Als Substrat wurde folglich mikrofiltriertes Eiklar (0,45 µm) verwendet. Zunächst wurde der pH des Eiklars auf 9,8 eingestellt, wodurch das Lysozym an den Kationenaustauscher band. Dieses wurde anschließend mittels eines Salzgradienten eluiert. Das nicht gebundene Eiklar (flow through) wurde im zweiten Fraktionierungsschritt auf pH 4,9 eingestellt und erneut auf den Kationenaustauscher gegeben, wodurch das Ovotransferrin adsorbierte, welches ebenso mittels eines Salzgradienten eluiert wurde. Lysozym konnte hierbei mit einer Reinheit von 95 % sowie einer Ausbeute von 98 % gewonnen werden. Aus dem Ovotransferrin-Prozess resultierte eine Reinheit von 81 % und eine Ausbeute von 93 %. Folglich wurde die Fraktionierung der relevanten Proteine im Labormaßstab erfolgreich umgesetzt.

Bei der Direct-Capture-Bauweise, welche im Pilotmaßstab verwendet wurde, strömt die Probe axial durch die Spalten zwischen der gewickelten Membran, d.h. tangential entlang beider Seiten der Membran. Die Spaltbreite beträgt aufgrund eines Spacernetzes konstant 250 µm. Der Vorteil liegt hierbei darin, dass mit partikelhaltigen, unfiltrierten Proben gearbeitet werden kann. Allerdings sind hierbei Einbußen bei der Bindungskapazität im Vergleich zu den radial durchströmten Membranadsorbern in Kauf zu nehmen, da die Bindung an die Liganden in den Poren durch diffusive Transportmechanismen limitiert ist. Zusätzlich mussten für eine bestmögliche Bindung des Proteins sowohl die Beladung als auch die Elution im Rezirkulationsmodus gefahren werden. In einem Langzeitversuch über sechs Zyklen ohne Zwischenreinigung konnte gezeigt werden, dass die Bindungskapazität pro Zyklus nur marginal abnahm, wodurch die Adsorber für eine Langzeitanwendung mit reduzierten Reinigungszyklen geeignet sind. Durch die große Anzahl anderer Proteine in der Lysozym-Feed-Lösung erwies sich der Ovotransferrin-Fraktionierungsprozess

bei direktem Vergleich der Bindungskapazität als effizienter.

Nach der erfolgreichen Fraktionierung im Pilotmaßstab wurde das Pasteurisierungsverhalten der ovalbuminreichen Fraktion untersucht. Es zeigte sich, dass dieses durch die Abreicherung der zwei hitzesensitiven Proteine Lysozym und Ovotransferrin deutlich intensiver erhitzt werden kann als das Eiklar in seiner natürlichen Proteinzusammensetzung. Bei der ovalbuminreichen Fraktion konnten bei einer Proteinkonzentration von 9,9 % und pH 9 beispielsweise 65,5 °C für 10 min verwendet werden, ohne Proteinveränderungen zu induzieren, wogegen bei gleichen Milieubedingungen beim Eiklar bereits nach 20 s eine geringe Denaturierung auftrat. Ebenso war es möglich, durch die Abreicherung höhere Temperaturen zu verwenden (z.B. 75 °C, 100 s).

Zusätzlich wurde das Verschäumungsverhalten der Lysozym-abgereicherten sowie der Lysozym- und Ovotransferrin-abgereicherten Fraktion im Vergleich zu der des Eiklars untersucht. Es wurde deutlich, dass hierbei keine allgemeingültigen Aussagen getroffen werden können, da die Aufschäumbarkeit und die Schaumstabilität enorm vom Aufschäumssystem, dem verwendeten pH-Wert sowie der Temperatur abhängen. Bei der Verwendung der Systeme dieser Arbeit wies das Rotor-Stator-System zwar geringere Aufschäumbarkeiten auf, jedoch wesentlich höhere Stabilitäten als die Schaumsäule. Allgemein wies das Lysozym-abgereicherte Eiklar bei pH 5 unabhängig vom Aufschäumssystem besonders gute Verschäumungseigenschaften auf. Bezüglich der Temperierung sollten niedrige Temperaturen bevorzugt werden, da diese die Stabilitäten positiv beeinflussten.

Zusammenfassend bietet die MAC-Technologie eine hervorragende Möglichkeit, die Proteine Lysozym und Ovotransferrin aus Eiklar zu isolieren, um diese in eigenständigen Einsatzzwecken zu verwenden. Zusätzlich erwies sich das abgereicherte Eiklar hierdurch als deutlich intensiver pasteurisierbar, was dessen Einsatz als Flüssigeiklar ermöglicht. Das industrielle Haupteinsatzgebiet des Eiklars als Schaumbildner ist durch diese Abreicherung nicht limitiert, sondern je nach Milieubedingungen sogar verbessert.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

In Deutschland werden von rund 800.000 t Eier pro Jahr rund 200.000 t in der Industrie weiterverarbeitet. Deutschland ist dabei zu einem der attraktivsten Märkte für Ei-Veredelungsprodukte geworden. Innovationen in diesem Bereich bezogen sich bis dato primär auf Eigelb, wodurch Eiklar zu einem Restprodukt wurde. Es galt daher, im Rahmen des Vorhabens das Potential einer Veredelung für das Proteinsystem Eiklar zu eruieren. Die wachsende Nachfrage nach Lysozym als natürlichem Konservierungsstoff war vor Projektstart bekannt und ist immer noch steigend. Für das Protein Ovotransferrin liegt das Potential im Bereich der Vermarktung als Eisensupplement sowie als Konservierungsstoff. Für das Fraktionieren der Komponenten Lysozym und Ovotransferrin wurde die MAC-Technologie verwendet, da diese gegenüber der klassischen IEC-Technologie, selbst wenn diese schon wirtschaftlich betrieben werden kann, einige deutliche Vorteile aufweist.

Ein weiteres wirtschaftliches Potential liegt in der Möglichkeit, das Eiklar durch die Fraktionierung sicher im flüssigen Zustand zu pasteurisieren. Zuvor war dies nur im trockenen Zustand unter einem erheblichen Energie- und Zeitaufwand möglich. Durch die Fraktionierung der hitzesensitiven Proteine Lysozym und Ovotransferrin aus dem Eiklar ist eine getrennte Pasteurisierung der drei Fraktionen bei gezielteren Einstellungen möglich, woraus sich eine enorme Energieeinsparung ergibt. Ebenso kann die Proteinzusammensetzung des Eiklars durch den Fraktionierungsprozess modifiziert werden, was einen gezielten Einsatz der resultierenden Schaumeigenschaften ermöglicht. Die Innovation dieses Projektes liegt darin, isolierte wertvolle Komponenten verfügbar zu machen und zusätzlich die Hauptfraktion im Wert zu steigern. Die erzielten Forschungsergebnisse können sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch von Membranadsorberherstellern und dem Anlagenbau genutzt werden.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Brand, J, Kulozik, U: Comparison of Different Mechanical Methods for the Modification of the Egg White Protein Ovomucin, Part A: Physical Effects. Food Bioproc. Technol. 9 (7), 1210–1218 (2016).

3. Brand, J., Silberbauer, A. und Kulozik, U.: Comparison of different mechanical methods for the modification of the egg white protein ovomucin, Part B: Molecular aspects. Food Bioproc. Technol. 9 (3), 501-510 (2016).
4. Brand, J., Voigt, K., Zochowski, B. und Kulozik, U.: Lysozyme fractionation from egg white at pilot scale by means of tangential flow membrane adsorbers: Investigation of the flow conditions. J. Chrom. A 1438, 143-149 (2016).
5. Brand, J., Dachmann, E., Pichler M., Lotz, S. und Kulozik, U.: A novel approach for egg white protein fractionation by usage of radial flow membrane adsorption chromatography in lab scale: Impact of relevant product and process parameters. Sep. Pur. Technol. 161, 44-52 (2016).
6. Brand, J. und Kulozik, U.; Einfluss der Eiklar-vorbehandlung auf die Lysozymfraktionierung mittels tangential überströmter Membran-Adsorptions-Chromatographie im Pilotmaßstab; Jahresber. zur Milchw. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2014, ISBN 978-3-939182-75-7, 88-89 (2015).
7. Brand, J.: Verbesserung der Pasteurisierbarkeit von Eiklar durch Abtrennung der Hitze-sensitiven Proteine. Jahresb. Milchw. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2014, ISBN 978-3-939182-89-4, 115-116 (2015).
8. Brand, J. und Kulozik, U.: Enabling pasteurization of liquid egg white by pre-fractionation of the heat-sensitive proteins; XVI Eur. Symp. Eggs Egg Prod., Proc., ISSN 0043-9339 EISSN 1743-4777, ID 100049 (2015).
9. Brand, J., Pichler, M. und Kulozik, U.: Enabling egg white protein fractionation processes by pre-treatment with high-pressure homogenization. J. Food Engin. 132, 48 - 54 (2014).
10. Brand, J., Strixner, T. und Kulozik, U.: Egg white pre-treatment by high-pressure homogenization to improve the processability. XV Eur. Symp. Qual. Eggs and Egg Prod., Book of Proc., EISSN 1743-4777 (2013).
11. Brand, J. und Kulozik, U.: Lysozymfraktionierung mittels Membranadsorptionschromatographie im Labormaßstab. Jahresb. Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2012, ISBN 978-3-939182-63-4, 115 - 116 (2013).
12. Brand, J. und Kulozik, U.: Neue mechanische Methoden zur Viskositätssenkung und Ermöglichung der Filtrierbarkeit von Eiklar. Jahresb. Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan 2011, ISBN 978-3-939182-52-8, 97-99 (2012).

**Weiteres Informationsmaterial:**

Technische Universität München  
 Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittel-  
 forschung, Abt. Technologie  
 Weihenstephaner Berg 1, 85350 Freising  
 Tel.: +49 8161 71-3535  
 Fax: +49 8161 71-4384  
 E-Mail: ulrich.kulozik@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
 Tel.: +49 228 3079699-0  
 Fax: +49 228 3079699-9  
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.