

Kontinuierliche Herstellung von standardisierten technofunktionellen Milchproteinhydrolysaten mittels Enzym-Membran-Reaktor-Technologie



| | |
|----------------------|---|
| Koordinierung: | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn |
| Forschungsstelle(n): | Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft Prof. Dr. Lutz Fischer/Dr. Timo Stressler |
| Industriegruppe(n): | Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Bundesverband der Hersteller von Lebensmitteln für eine besondere Ernährung e.V. – Diätverband, Bonn |
| Projektkoordinator: | Dr. Simon Bauer Bayerische Milchindustrie eG (BMi), Landshut |
| Laufzeit: | 2014 – 2018 |
| Zuwendungssumme: | € 249.850,-- |

Ausgangssituation

Die enzymatische Gewinnung von Proteinhydrolysaten erfolgt in der Lebensmittelindustrie bisher in diskontinuierlichen Batchprozessen. Dabei ist nachteilig, dass i) die Enzyme nur einmal zur Anwendung kommen und deshalb einen hohen Prozesskostenanteil ausmachen, ii) die resultierenden Peptide/Aminosäuren eine Produktinhibierung bewirken, die den Hydrolyseprozess verlangsamt und iii) die quantitative und qualitative Zusammensetzung des finalen Proteinhydrolysats von Batch zu Batch Schwankungen unterworfen ist.

Ein kontinuierlicher Prozess mittels Enzym-Membran-Reaktor-(EMR)-Technologie könnte diese Nachteile beheben, dieser ist allerdings bisher kaum erforscht. Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, einen kontinuierlichen Hydrolyseprozess von Milchproteinen in einem EMR zu entwickeln, der eine maximale Ausnutzung der Enzyme realisiert und durch eine kontinuierliche Permeation der Peptide/Aminosäuren aus dem Prozessraum die Inhibierung der Enzyme minimiert. Die im Permeat erhaltenen Proteinhydrolysate sollten eine definierte Zusammensetzung mit neuen technofunktionellen Eigenschaften aufweisen und sensorisch unauffällig, d.h. neutral, sein.

Forschungsergebnis

Aufgrund der angestrebten langen Betriebszeiten eines EMR von mehreren Tagen oder Wochen sollte eine mögliche Verkeimung des EMR durch die Wahl geeigneter Prozessparameter (pH-Wert, Temperatur) unterdrückt werden. Die mikrobielle Stabilität von Casein war bei einer Prozesstemperatur von 65 °C gewährleistet. Das Präparat Sternzym BP 25201 (thermolysin-ähnliche Peptidase) hatte geeignete Charakteristika für eine Caseinhydrolyse bei 65 °C (Restaktivität nach 24 h = 80 %). Für Molkenproteine kam aufgrund ihres Löslichkeitsverhaltens eine derart hohe Temperatur nicht in Betracht. Es wurde alternativ ein pH-Wert ≤ 3 für die Gewähr-

leistung der mikrobiellen Stabilität als geeignet ermittelt. Das Präparat Maxipro AFP (Aspergillopepsin I) konnte hierfür bei 45 °C und pH <3 eingesetzt werden (Restaktivität nach 24 h = 40-60 %). Der optimale Hydrolysegrad für technofunktionelle Eigenschaften von Na-Caseinat betrug ca. 2 % (Zunahme freier Aminogruppen). Bei diesem Hydrolysegrad waren die Schaumstabilität um 31 % und die Emulsionsstabilität um 210 % gesteigert. Der optimale Hydrolysegrad für eine gesteigerte Technofunktionalität von WPI betrug 1-2 %. Bei diesen Hydrolysegraden stieg die Emulsionsstabilität um bis zu 71 %. Beide Hydrolysate wurden jedoch sensorisch als „sehr bitter“ wahrgenommen. Eine Entbitterung der Hydrolysate war mit der bakteriellen Exopeptidase PepN aus *Lb. helveticus* oder mit einer vorbehandelten, endopeptidasefreien Flavourzyme-Fraktion möglich.

Bei der kontinuierlichen Hydrolyse im EMR gingen die Schaumeigenschaften des resultierenden Hydrolysats verloren, da die Membran schaumrelevante Peptide zurückhielt. Außerdem kam es im Retentat zu einer Anreicherung größerer Peptide, die eine Membranverblockung bewirkten und letztendlich zum Abbruch des EMR führten. Durch Immobilisierung der Peptidasen wurde die Anwendung in einem Enzym-Filter-Reaktor (EFR) ermöglicht, wodurch eine Verblockung auf Retentatseite vermieden wurde und ein stabiler, kontinuierlicher Hydrolyseprozess über 24 Tage möglich war. Im Unterschied zum EMR konnte der EFR auch mit höheren Substratkonzentrationen [10 % (w/v) anstatt 2,5 % (w/v)] betrieben werden. Die erzielte Raum-Zeit-Ausbeute des EFR-Prozesses war 53-mal höher als die im EMR und die Enzymproduktivität stieg um ein 4-faches. Gleichbleibende Produkteigenschaften wurden im EFR entweder durch eine tägliche Ergänzung des immobilisierten Enzyms oder durch eine Verlängerung der Verweilzeit der Substratlösung erreicht. Das auf diese Art erhaltene Hydrolysat hatte ähnliche technofunktionelle Eigenschaften wie das zuvor im Batch-Verfahren hergestellte Hydrolysat.

In einem abgewandelten zweistufigen EMR-Verfahren mit löslichen Enzymen wurde ein Na-Caseinat-Hydrolysat mit einem gesteigerten Hydrolysegrad von 18,5 % kontinuierlich und unter gleichbleibenden Prozessbedingungen produziert. In der ersten Stufe wurde Sternzym BP 25201 eingesetzt, um das Na-Caseinat bis zu einem maximal möglichen Hydrolysegrad von ca. 8 % zu hydrolysieren. Dieses bitterere Hydrolysat wurde in der zweiten Stufe durch vorbehandeltes, endopeptidase-freies Flavourzyme weiter hydrolysiert. Die Ausbeute dieses Prozesses lag bei nahezu 100 %. Durch den Prozess wurde die Enzymleistung maximal ausgenutzt. Das Hydrolysat aus dem zweistufigen Prozess wurde sensorischen Tests unterzogen und als „entbittert“ eingestuft. Es hatte im Vergleich zum Ausgangssubstrat Na-Caseinat jedoch keine gesteigerten Emulgier- oder Schaumeigenschaften mehr. Das antioxidative Potential des Hydrolysats stieg hingegen im Vergleich zu unbehandeltem Na-Caseinat um 40 %. Damit konnte das „proof of principle“ für eine kontinuierliche Proteinhydrolyse gezeigt werden.

Wirtschaftliche Bedeutung

Auf Grundlage der Ergebnisse können Milchproteinhydrolysate bzw. -fraktionen für spezifische Anforderungen kostengünstiger als bisher entwickelt und produziert werden. Das Prinzip des EFR sowie des zweistufigen EMR-Verfahrens und das im Projekt erarbeitete Know-how hinsichtlich Substrat, Enzym, Hydrolysegrad und Technofunktionalität ermöglichen eine Ausweitung der Enzymhydrolyse auf weitere Anwendungen in der Lebensmittelindustrie. Da Filtrationsanlagen in milchverarbeitenden Unternehmen bereits vorhanden sind, ist die Implementierung eines solchen kontinuierlichen Hydrolyseprozesses ohne größere technische Investitionen möglich.

Da gerade Milchproteinhydrolysate keine Massenware darstellen, eröffnet dieser Bereich insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen die Chance, neue Märkte zu erschließen und profitable Nischen zu besetzen. Technofunktionelle Hydrolysate können zudem in Lebensmittelformulierungen ohne besondere Kennzeichnung (Clean Label) eingesetzt werden.

Publikation (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2018.
2. Ewert, J., Claaßen, W., Stressler, T. & Fischer, L.: An innovative two-step enzymatic membrane bioreactor approach for the continuous production of antioxidative casein hydrolysates with reduced bitterness. *Biochem. Eng. J.*, DOI: 10.1016/j.bej.2019.107261 (2019).
3. Ewert, J., Schlierenkamp, F., Fischer, L. & Stressler, T.: Application of a technofunctional caseinate hydrolysate to replace surfactants in ice cream. *Chem. Ing. Tech.* DOI: 10.1002/cite.201800153 (2019).
4. Ewert, J., Luz, A., Volk, V., Stressler, T. & Fischer, L.: Enzymatic production of emulsifying whey protein hydrolysates without the need of heat inactivation. *J. Sci. Food Agric.* DOI: 10.1002/jsfa.9562 (2019).
5. Ewert, J., Schlierenkamp, F., Nesensohn, L., Fischer, L. & Stressler, T.: Improving the colloidal and sensory properties of a caseinate hydrolysate using particular exopeptidases. *Food Funct.* 9, 5989-5998. DOI: 10.1039/C8FO01749B (2018).
6. Ewert, J., Horstmann, G., Glück, C., Claaßen, W., Stressler, T. & Fischer, L.: Development and application of a bio-catalyst-filter reactor for the continuous production of caseinate hydrolysate surfactants. *Proc. Biochem.* 72, 13-22. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.06.004 (2018).
7. Ewert, J., Glück, C., Zeeb, B., Weiss, J., Stressler, T. & Fischer, L.: Modification of the interfacial properties of sodium caseinate using a commercial peptidase preparation from *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Hydrocoll.* 81, 60-70. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.036 (2018).
8. Ewert, J., Glück, C., Strasdeit, H., Fischer, L. & Stressler, T.: Influence of the metal ion on the enzyme activity and kinetics of PepA from *Lactobacillus delbrueckii*. *Enz. Microb. Technol.* 110, 69-78 (2017).
9. Braun, C., Ewert, J. & Stressler, T.: Characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of the fusion protein FUS-PepN_PepX and their application for milk protein hydrolysis. *Eur. Food Res. Technol.* 4. DOI:10.1007/s00217-017-2885-3 (2017).
10. Ewert, J., Claaßen, W., Glück, C., Zeeb, B., Weiss, J., Hinrichs, J., Stressler, T. & Fischer, L.: A non-invasive method for the characterisation of milk protein foams by image analysis. *Intern. Dair. J.* 62, 1-9. DOI:10.1016/j.idairyj.2016.06.012 (2016).
11. Stressler, T., Ewert, J., Merz, M., Glück, C. & Fischer, L.: Funktionelle Proteinhydrolysate - Potenzial von Peptidasen für die Proteinmodifikation in Lebensmitteln. *FOOD-Lab* 20-24 (2016).
12. Ewert, J., Baur, C., Merz, M., Zeeb, B., Weiss, J., Fischer, L. & Stressler, T.: Kontinuierliche Herstellung von standardisierten technofunktionellen Milchproteinhydrolysaten mittels Enzym-Membran-Reaktor-Technologie. *DMW, Milchw.* 41-43 (2015).
13. Stressler, T., Ewert, J., Eisele, T. & Fischer, L.: Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of PepX and PepN – Production, partial characterization and application of combi-CLEAs for milk protein hydrolysis. *BioCat. Agric. Biotech* 11, 4 (4). DOI:10.1016/j.bcab.2015.11.002 (2015).

Weiteres Informationsmaterial

Universität Hohenheim
 Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie,
 FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft
 Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart
 Tel.: +49 711 459-22311
 Fax: +49 711 459-24267
 E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
 Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
 Tel.: +49 228 3079699-0
 Fax: +49 228 3079699-9
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

Förderhinweis

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

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 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.

Bildnachweis - Seite 1: © Dr. Jacob Ewert

Stand: 28. November 2022