

Klärung der Ursachen des bitter-adstringierenden Fehlgeschmacks von pflanzlichen Proteinisolaten und Erarbeitung technologischer Parameter für eine Qualitätsverbesserung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, Freising Prof. Dr. Thomas Hofmann/Dr. Corinna Dawid
Forschungsstelle II:	Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV), Freising Prof. Dr. Horst-Christian Langowski/Dr. Peter Eisner
Industriegruppe:	Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP), Berlin
	Projektkoordinator: Dr. Jakob Ley Symrise AG, Holzminden
Laufzeit:	2015 - 2018
Zuwendungssumme:	€ 486.420,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Weltweit werden Proteinisolate aufgrund ihrer technofunktionellen Eigenschaften als Emulgatoren, Schaumbildner oder Wasserbinder bei der Herstellung verschiedener Lebensmittel, wie z. B. Backwaren, Suppen, Soßen, Aufstrichen und Wurstwaren, eingesetzt. Obwohl pflanzliche Proteine eine nachhaltigere Rohstoffquelle darstellen, eine hervorragende Technofunktionalität aufweisen und wirtschaftlich attraktiver sind, werden bislang vor allem tierische Proteine, wie Casein/Caseinate, Molkenproteine und Eipulver, eingesetzt. So ist es nicht verwunderlich, dass 2012 der Anteil an pflanzlichen Proteinen auf dem Weltmarkt mit ca. 1,7 Mio. Tonnen noch deutlich unter dem Anteil tierischer Proteine (2,3 Mio. Tonnen) lag.

Obwohl der Bedarf an hochwertigen Pflanzenproteinen als Lebensmittelzutat in Europa stetig wächst, sind ihre Einsatzmöglichkeiten gegenwärtig noch durch eine unbefriedigende Sensorik beschränkt. Den pflanzlichen Pro-

teinpräparaten werden neben bohigen oder grasigen Aromaeindrücken vielfach auch eine starke Bitterkeit und Adstringenz sowie generell ein im Vergleich zu tierischen Proteinen flacher oder unharmonischer Geschmackseindruck zugeschrieben. In Abhängigkeit der Lebensmittelapplikation können diese Fehlgeschmacksattribute derart in den Vordergrund treten, dass die Verwendung von pflanzlichen Proteinpräparaten in Lebensmitteln nur eingeschränkt bzw. nicht ohne maskierende Zusatzstoffe möglich ist.

Während die Ursachen für die bohig-grasigen Aromaeindrücke mittlerweile größtenteils aufgeklärt sind und erste Strategien zur Aromaverbesserung existieren, sind im Bereich der Geschmacksstoffforschung bislang kaum systematische Studien vorzufinden. Trotz fehlender molekular-sensorischer Betrachtungen wird die Bitterkeit bzw. die Adstringenz der pflanzlichen Proteine vielfach auf die Anwesenheit von nicht-kovalent bindenden, sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie beispiels-

weise von Saponinen oder Polyphenolen, zurückgeführt. Auch fehlen bislang Untersuchungen, in denen der intrinsische Geschmack von hochreinen Proteinen Forschungsgegenstand war. Sowohl für Hersteller von Proteinzutaten als auch für die Anwender aus dem Bereich der Lebensmittelindustrie besteht deshalb ein großes Interesse, einerseits die störenden geschmacksaktiven Verbindungen zu identifizieren und andererseits v.a. technologische Wege zu finden, diese zu entfernen oder deren Konzentrationen im Zielprodukt zumindest soweit zu verringern, dass sie in den entsprechenden Lebensmittelapplikationen unterhalb der Geschmacksschwelle liegen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, Proteinkonzentrate und -isolate aus Erbsen, Soja und Raps, die einen bitter/adstringierenden Fehlgeschmack aufweisen, hinsichtlich ihrer orosensorisch aktiven Verbindungen mittels fraktionierter Geschmacksverdünnungsanalysen zu untersuchen. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollten gezielt für eine Optimierung verfahrenstechnischer Prozesse (Entölung, Extraktion, Fällung/Filtration) zur Gewinnung der Proteinpräparate eingesetzt werden, um sensorisch verbesserte Proteinzutaten mit verringerter Bitterkeit bzw. Adstringenz zur Verfügung zu stellen. Applikationsstudien mit den neu entwickelten, organoleptisch verbesserten Proteinisolaten sollten darüber hinaus neue Einsatzgebiete in der Lebensmittelindustrie aufzeigen. Zudem sollten vereinfachte Analysemethoden entwickelt werden, die der mittelständischen Industrie anhand der Messung von bitteren bzw. adstringierenden Schlüsselgeschmacksstoffen eine schnelle und sichere Qualitätsbewertung von kommerziell erhältlichen Proteinpräparaten ermöglichen kann.

Forschungsergebnis:

Um den bitter-adstringierenden Off-Flavor auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden im Rahmen der Experimente die Geschmacksprofile verschiedener handelsüblicher Erbsen- und Sojaproteinisolate von einem geschulten Sensorikpanel der Forschungsstelle 1 vergleichend sensorisch beurteilt. Dabei wiesen alle verkosteten Proteinisolate der beiden Leguminosen sowohl bittere als auch adstringierende Noten auf. Sensorische Vorexperimente zeigten zudem, dass die zwei

Proteinisolate Nutralys S85F 5006541 (Erbsenproteinisolat) und Supro XT 219DIP 2013 (Sojaproteinisolat) bei pH 5,5 als geeignete Referenzen bei humansensorischen Studien herangezogen werden können. Der pH-Wert hat keinen signifikanten Einfluss auf die Geschmacksattribute bitter und adstringierend der zwei getesteten Proteinisolate.

Zur Abtrennung der Fehlgeschmacksstoffe vom Erbsenproteinisolat erwies sich ein Gemisch aus MeOH/H₂O^(1+1; v+v) als geeignet. Der unlösliche Rückstand konnte als weniger bitter eingestuft werden (3-AFC-Test und Befragung eines Konsenspanels). Der geschmacksaktive Extrakt wurde mittels MPLC-ELSD-Methoden in 13 Fraktionen aufgetrennt. Durch eine anschließende Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) konnte Fraktion 11 als geschmacksaktivste identifiziert werden. Diese wurde nachfolgend durch eine präparative HPLC-Methode weiter subfraktioniert. Diese 17 Subfraktionen wurden ebenfalls mittels GVA untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass vor allem die unpolaren Subfraktionen eine hohe Bitteraktivität aufweisen.

Um den Fehlgeschmack genau zu lokalisieren, wurden die bittersten Subfraktionen final chromatographisch aufgetrennt und die Struktur der isolierten Verbindungen mittels massenspektrometrischer (UHPLC-ToF-MS und MS/MS) und kernspektroskopischer Experimente (NMR) aufgeklärt. Für die Subfraktionen I-11-16 und I-11-17 konnte dabei eine geeignete HPLC-Trennmethode im semipräparativen Maßstab entwickelt werden. Aus Subfraktion I-11-16 konnten somit Isomere von 9-HODE und 13-HODE, sowie 1-Linoleoylglycerol, Linolensäure, 2-Hydroxypalmitinsäure, 2-Hydroxyölsäure und Linolsäure identifiziert werden. In Subfraktion I-11-17 konnte mit Octacosäure-6,9,19,22-tetraen eine nicht literaturbekannte Substanz postuliert werden. Für 2-Hydroxypalmitinsäure und 2-Hydroxyölsäure konnten humane Geschmacksschwellenwerte bestimmt werden. Dabei wurden Schwellenwerte von 0,22 mmol/l für 2-Hydroxypalmitinsäure und 0,06 mmol/l für 2-Hydroxyölsäure bestimmt.

Die funktionelle Charakterisierung kommerziell verfügbarer Isolate aus Erbse, Soja und Raps wurde mit an Forschungsstelle 2 etablierten Standardmethoden zur Beurteilung der Löslichkeit, der Emulgierkapazität, der Partikelgrößenverteilung sowie der Zusammen-

setzung und der thermischen Eigenschaften mittels DSC (Differential Scanning Calorimetry) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die kommerziellen Erbsenproteinisolate über den untersuchten pH-Bereich von pH 3 bis pH 9 sehr geringe Löslichkeiten von <20 % aufwiesen. Die Sojaproteinisolate wiesen ebenfalls niedrige bis mittlere Löslichkeiten von <20 % bis etwa 50 % bei pH 7 auf. Die untersuchten Rapsproteinisolate hatten hingegen sehr hohe Proteinlöslichkeiten von >80 % über den untersuchten pH-Bereich. Im Gegensatz zu den Löslichkeiten unterschieden sich die Emulgierkapazitäten der kommerziellen Isolate deutlich voneinander und es konnte kein eindeutiger Trend ermittelt werden. Die unterschiedlichen Funktionalitätsprofile sind dabei höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Herstellungsverfahren zurückzuführen.

Für die Gewinnung hochaufgereinigter Fraktionen aus Erbsen, Sojabohnen und Raps wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren hinsichtlich ihrer Eignung zur Fraktionierung und Gewinnung einzelner Proteinfractionen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die in der Literatur beschriebenen Verfahren zwar zu hochaufgereinigten Einzelproteinfractionen führen, dass aber der Proteingehalt der Fraktionen aufgrund anhaftender Nebenbestandteile, wie Salze, Zucker oder sekundäre Pflanzenstoffe, häufig nur bei 50-80 % lag, so dass die Verfahren entsprechend adaptiert werden mussten. Für die Fraktionierung von Erbsenproteinen konnte ein Verfahren bestehend aus alkalischer Proteinextraktion und anschließender säulenchromatographischer Auftrennung zur Gewinnung einer Convicillin-/Vicillin-reichen Fraktion und einer Legumin-reichen Fraktion entwickelt werden. Ebenso konnte mit einem bereits bekannten Verfahren aus Sojabohnen eine Glycinin-reiche Fraktion mit einer Reinheit von 94 % gewonnen werden. Für die Fraktionierung von Rapsproteinen in Napin und Cruciferin konnten keine Verfahren identifiziert werden, die zu einer ausreichenden Reinheit führten.

Weiterhin wurde an Forschungsstelle 2 die Optimierung des Herstellungsverfahrens zur Gewinnung sensorisch verbesserter Proteine vor allem aus Erbsen untersucht. Diese Fokussierung auf einen Rohstoff erfolgte, weil zahlreiche bitter-adstringierenden Substanzen in Erbsen identifiziert wurden, die bislang nicht in der Literatur beschrieben waren. Aus diesem Grund gestaltete sich die Optimierung als

schwieriger als zunächst angenommen und es wurde daher auf Erbse als Showcase fokussiert. Für die Optimierung wurden verschiedenste Verfahren ausgewählt und deren Einfluss auf die funktionellen und, bei ausgewählten Isolaten, auf die sensorischen Eigenschaften untersucht. Als Einflussparameter wurden die Vorbehandlung der Erbsenmehle mittels Lösungsmittel oder hydrothermischer Behandlung zur Enzyminaktivierung, der Einsatz einer oder mehrerer Vorextraktionen, die Extraktionsbedingungen (pH, Temperatur, s:l) sowie die Fällungs- und Konzentrierungsbedingungen (isoelektrische Fällung; Ultrafiltration, Ultrafiltration-Diafiltration; Ultrafiltration-thermische Fällung) untersucht und deren Einfluss auf die Ausbeute, die Zusammensetzung sowie die funktionellen und thermischen Eigenschaften bestimmt. Dabei zeigte sich, dass durch Lösungsmittelbehandlung die Farbe der Erbsenmehle signifikant verbessert werden konnte. Die funktionellen Eigenschaften waren vergleichbar mit dem vollfetten Referenzisolat. Lediglich durch Verwendung von Ethanol als alleiniges Lösungsmittel oder in Lösungsmittelmischungen verringerte sich die Ausbeute um knapp 20 %, was dem denaturierenden Effekt des Alkohols auf Proteine geschuldet ist. Da jedoch bei den sensorischen Bewertungen durch Forschungsstelle 1 gezeigt werden konnte, dass die Bitterkeit der vorbehandelten Isolate im Vergleich zur vollfetten Referenz deutlich anstieg, wurden die weiteren Versuche mit vollfettetem Erbsenmehl durchgeführt. Ebenso führten eine bzw. mehrere Vorextraktionen zu signifikanten Ausbeuteverringeringen, diese Ansätze wurden deshalb auch nicht weiterverfolgt. Anschließend wurde der Einfluss der Extraktionsbedingungen (pH-Wert, s:l, Temperatur) sowie der Isolierungsbedingungen (isoelektrische Fällung (pH, Temperatur), Ultrafiltration (pH, Temperatur), Ultrafiltration/Diafiltration und Ultrafiltration/thermische Fällung) variiert. Dabei zeigte sich, dass insbesondere der Extraktions-pH-Wert und der Fällungs-pH-Wert die Ausbeute und die funktionellen Eigenschaften deutlich beeinflussten. Bei der Ultrafiltration wurden geringere Proteinlöslichkeiten als bei der isoelektrischen Fällung erzielt. Durch thermische Fällung wurden die Erbsenproteine weitestgehend denaturiert und die Löslichkeit nahm auf etwa 16 % ab. Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Extraktion der Erbsenproteine zwischen pH 7,5 und 8,5 bei 20 °C und einem Feststoff:Flüssig-

keitsverhältnis von 1:8 bis 1:10 sowie eine isoelektrische Fällung die höchsten Ausbeuten und die besten Funktionalitäten lieferte. Bei diesen Bedingungen wurden ebenfalls Proteinisolate mit verringerter Bitterkeit und Adstringenz gewonnen. Weiterhin wurde der Einfluss einer hydrothermischen Vorbehandlung des Erbsenmehls untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Ausbeute durch die thermische Behandlung reduziert wurde. In den technischen Maßstab wurden die zwei vielversprechendsten Verfahren übertragen. So konnten bei beiden Verfahren mind. 10 kg Erbsenproteinisolat gewonnen werden. Diese Erbsenproteinisolate wurden analysiert und für Applikationsversuche verwendet.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Forschungsergebnisse dienen insbesondere Firmen, die an der Produktionskette (z. B. Ölmühlen) bzw. der Verarbeitung von Proteinisolaten (im B2B- sowie im B2C-Bereich) beteiligt sind. Es werden den Unternehmen neue Kenntnisse zu den Fehlgeschmackskomponenten, deren Herkunft und Wirkkonzentrationen in Lebensmitteln sowie über neue Ansätze zu einer gezielten technologischen Einflussnahme geliefert. Es ist zu erwarten, dass die neuentwickelten, geschmacksneutraleren Proteinisolate gegenüber den bisher verfügbaren Proteinisolaten zu einem konkurrenzfähigen Preis angeboten werden können. Dies bietet Lebensmittel- und Getränkeherstellern, die mit hohen Preisen für tierische Proteine konfrontiert sind, beachtliche Vorteile. Zusätzlich können durch innovative Lebensmittelapplikationen, die bislang durch sensorische Limitationen begrenzt waren, neue Absatzmärkte erschlossen werden.

Der weltweite Umsatz von Proteinpräparaten lag 2015 bei ca. 7,5 Mrd. US-Dollar. Neue Marktstudien bestätigen die Relevanz und das Potenzial des Forschungsvorhabens aufgrund der zu erwartenden erheblichen Nachfrage an pflanzlichen Proteinen. Als erfolgsbestimmend wird dabei die Verbesserung der sensorischen sowie technofunktionellen Eigenschaften pflanzlicher Proteinpräparate ausgewiesen. Der anwachsende Wellness- und Gesundheitstrend und das damit verbundene Ernährungsbewusstsein der Verbraucher verstärkt die Entwicklungen, so dass bereits kurzfristig mit einem Marktanteil von etwa 15 % (ca. 1,5 Mrd. US-Dollar) zu rechnen ist.

Anwendungs- und Kostenvorteile für die mittelständisch geprägte Lebensmittelindustrie ergeben sich durch die Vermeidung von bisher notwendigen Zusatzstoffen zur Maskierung störender Geschmacksstoffe und vor allem durch die zunehmende Substitution tierischer Proteine durch pflanzliche. Gegenwärtig werden in Europa rund 210 Mio. € an Eiklar- und Eigelbproteinen und rund 1,7 Mrd. € an Milchproteinen umgesetzt. Bereits bei Ersatz von 20 % der tierischen Proteine durch sensorisch optimierte pflanzliche Proteinisolate ließen sich für die deutsche Lebensmittelindustrie Einsparpotenziale von jährlich 60-150 Mio. € erzielen.

Auch eröffnet der Einsatz sensorisch attraktiver Proteinpräparate zusätzlich neue Möglichkeiten bei der Bewerbung der mit pflanzlichen Produkten verbundenen ethisch-ökologischen Vorteile sowie des für den Lebensmittelbereich mittlerweile stark nachgefragten Aspekts der Nachhaltigkeit.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Jahresbericht 2018.
2. Gläser, P., Dawid, C., Meister, S., Bader-Mittermaier, S., Schott, M., Eisner, P. & Hofmann, T.: Molecularization of Bitter Off-Taste Compounds in Pea Protein Isolates (*Pisum sativum* L.). J. Agric. Food Chem., DOI: 10.1021/acs.jafc.9b06663 (2020).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW)
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und
Molekulare Sensorik
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-2901
Fax: +49 8161 71-2949
E-Mail: thomas.hofmann@tum.de

Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik
und Verpackung (IVV)
Giggenhauser Str.35, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 491-100
Fax: +49 8161 491-111
E-Mail: langowski@ivv.fraunhofer.de
E-Mail: info@ivv.fraunhofer.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

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

gefördert durch/via



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.