

Einfluss der Proteinquelle auf die Struktur und Technofunktionalität elektrogenespinnener Protein-Polysaccharid- Konjugate

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	<p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittelphysik und Fleischwissenschaft Prof. Dr. Jochen Weiss/Dr. Monika Gibis</p> <p>Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik Prof. Dr. Corinna Dawid</p>
Industriegruppe(n):	<p>Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP), Berlin Weihenstephaner Förderverein für Brau-, Getränke- und Getreide- technologie e.V., Freising</p> <p>Projektkoordinator: Dr. Joachim Tretzel Döhler GmbH, Darmstadt</p>
Laufzeit:	2017 - 2019
Zuwendungssumme:	€ 499.110,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Weltweit werden Proteinisolate und Proteinkonzentrate als Emulgatoren, Schaum- oder Gelbildner bei der Herstellung von Lebensmitteln, wie z.B. Backwaren, Suppen, Soßen, Aufstrichen und Wurstwaren, eingesetzt. Dabei werden derzeit vorwiegend Proteine tierischen Ursprungs, wie z.B. Gelatine, Casein, Molkenproteine und Eiweiß- oder Eigelbproteine genutzt. Aufgrund von Veränderungen des Verbraucherverhaltens, wachsenden Engpässen in der Verfügbarkeit und Kostensteigerungen ist der Einsatz pflanzlicher Proteine von zunehmendem wirtschaftlichem Interesse. Nutzpflanzen, wie z.B. Soja, Raps, Erbsen, Weizen, Sonnenblumen und Kartoffeln, stellen nachhaltige und wirtschaftlich attraktive Rohstoffquellen dar. Der europäische Markt für Pflanzenproteine soll bis zum Jahr 2024 bei einer durchschnittlichen jährlichen Wachstumsrate von 7,4 % ein Gesamtvolumen von

2,6 Mrd. € erreichen. Hierbei spielen Nachhaltigkeitsaspekte eine große Rolle. Neben einer verbesserten CO₂-Bilanz werden zur Erzeugung pflanzlicher Proteine bis zu 80 % weniger Agrarflächen benötigt. Sojaprotein wird in großem Maße als Zutat in verarbeiteten Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln und Proteindrinks eingesetzt und stellt im europäischen Raum die gängigste Quelle pflanzlicher Proteine in der Lebensmittelindustrie dar. Andere Proteinquellen, wie Hülsenfrüchte (z.B. Erbsen), sind insbesondere aufgrund ihres geringen Fettgehalts und dem ausgeglichenen Aminosäureprofil interessante pflanzliche Proteinquellen. Das zentrale Problem, das derzeit einen umfassenden Einsatz pflanzlicher Proteine in Lebensmitteln begrenzt, sind deren unzureichende technofunktionelle Eigenschaften. So sind viele pflanzliche Proteine nur gering löslich und bilden bei pH-Wert- und Temperaturänderungen rasch Präzipitate, was mit einem Verlust ihrer emulgie-

renden und stabilisierenden Wirkung verbunden ist. Für gesäuerte und/oder hitzebehandelte Getränkeapplikationen werden daher neue Wege gesucht, die einen breiten Einsatz pflanzlicher Proteine in diesen Produkten ermöglichen. Zwar können chemische oder enzymatische Hydrolyseverfahren eine Löslichkeitsverbesserung bewirken, jedoch weisen die so gebildeten Proteinhydrolysate einen starken Fehlgeschmack (bitter, adstringierend) auf. Als alternativer Ansatz zur Hydrolyse bietet sich der Einsatz von Protein-Kohlenhydrat-Konjugaten an, die durch nicht-enzymatische Kopplung von Proteinen und Polysacchariden im Zuge der MAILLARD-Reaktion gebildet werden. Vorarbeiten wiesen darauf hin, dass die Konjugation von Proteinen mit Polysacchariden mittels eines Elektrospinnprozesses gefolgt von einer thermischen Behandlung stabile, wasserlösliche Endprodukte generiert.

Dieser Hypothese sollte im Rahmen des Forschungsvorhabens nachgegangen werden, indem folgende Aspekte zu untersuchen waren:

- die Herstellung und die Einflussfaktoren auf die Herstellung elektrogenespinnener Fasern aus verschiedenen pflanzlichen Proteinen mit verschiedenen Maltodextrinen,
- der Einfluss der Anzahl an funktionellen Lysin- und Carbonylgruppen in den Fasern auf die Konjugationsausbeute und Farbbildung nach der thermischen Behandlung der Fasern,
- der Einfluss der Temperatur und Dauer der thermischen Behandlung der Protein-Polysaccharid-Fasern auf die Konjugationsausbeute und Farbbildung,
- der Einfluss der Konjugation auf die physikochemischen und technofunktionellen Eigenschaften (Löslichkeit, Emulgierfähigkeit) der pflanzlichen Proteine,
- Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen von verschiedenen Proteinisolaten,
- der Konjugationsgrad auf Basis der Konzentrationen verschiedener AMADORI-Produkte nach saurer Hydrolyse,
- ungewollte Oxidationsreaktionen durch Bestimmung von oxidierten AMADORI-Produkten nach enzymatischer Hydrolyse,

- Aufklärung kovalenter Verknüpfungspunkte der Protein-Polysaccharid-Konjugate mittels Bottom-up-Proteomics.

Forschungsergebnis:

Von Forschungsstelle 1 wurden zunächst verschiedene pflanzliche Proteinpräparate auf ihre Elektrospinnbarkeit in Mischungen mit Maltodextrin untersucht. Es zeigte sich, dass insbesondere das Molekulargewicht und die damit zusammenhängende Lösungsviskosität der pflanzlichen Proteine entscheidend für einen erfolgreichen Spinnprozess sind. Proteine mit sehr hohem durchschnittlichen Molekulargewicht und einer großen unlöslichen Proteinfraction (z.B. Sojaprotein, Kürbisprotein) eigneten sich weniger zum Spinnen als niedermolekulare, lösliche Präparate (z.B. Kartoffelprotein, Erbsenprotein). Um die Anzahl der reduzierenden Carbonylgruppen in den Fasern und damit die Reaktionsausbeute der Glykation zu erhöhen, wurde untersucht, wie sich die Zugabe eines weiteren Maltodextrins mit einem höheren Dextrose-Äquivalent (DE 12 und 21) auf die Spinnbarkeit von Erbsenprotein-Maltodextrin-Dispersionen auswirkt. Obwohl die Zugabe eines weiteren Maltodextrins mit einem höheren DE-Wert für das Elektrospinnen wichtige Eigenschaften, wie die Viskosität und die elektrische Leitfähigkeit der Spinn dispersionen, beeinflusste, konnten erfolgreich akzeptable Mengen an Fasern produziert werden. Bei der anschließenden thermischen Behandlung der Fasern wurde untersucht, inwiefern die Maltodextrinzusammensetzung die Konjugationsreaktion beeinflusst. Bei der Abnahme der freien primären Aminogruppen wurde beobachtet, dass die Fasern mit der größten Menge an reduzierenden Carbonylgruppen die stärkste Abnahme aufwiesen. Die Glykation von Erbsenproteinisolat mit Maltodextrin in elektrogenespinnenen Fasern wurde außerdem unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht (12/24 h, 65/70 °C, 75 % relative Luftfeuchtigkeit). In keinem der Versuche kam es zur Bildung von MAILLARD-induzierten Bräunungsprodukten, was ein für die spätere industrielle Nutzung entscheidendes Merkmal der fasergestützten Glykation darstellt. Höhere Temperaturen und eine längere Erhitzung förderten die Glykation, d.h. es

konnte eine rasche Abnahme der freien Lysingruppen und die Bildung von AMADORI-Produkten beobachtet werden. Verbunden mit der Glykation war eine Veränderung grundlegender Eigenschaften der Stoffe. So sank z.B. der isoelektrische Punkt der glykierten Erbsenproteine von pH 4,05 auf pH 3,02, während die Proteinlöslichkeit stieg. Die Eigenschaftsänderungen wurden einer erhöhten Hydrophilizität der Moleküle aufgrund des kovalent verknüpften hydrophilen Polysaccharids zugeschrieben. Der Einsatz der Erbsenprotein-Maltodextrin-Konjugate als Emulgatoren in Öl-in-Wasser-Modellemulsionen wurde untersucht. Aufgrund der erhöhten Hydrophilizität nach der Glykation stieg die Grenzflächenspannung der erhitzten Fasern an der Öl-Wasser-Grenzfläche. Emulsionen, die mit glykiertem Erbsenproteinisolat hergestellt wurden, zeigten engere Tropfengrößenverteilungen und kleinere mittlere Tropfendurchmesser (36 - 55 μm) als Emulsionen, die mit nicht-glykiertem Erbsenprotein hergestellt wurden (72 - 259 μm). Emulsionen, die mit den unerhitzten Fasern hergestellt wurden, waren zudem anfälliger für eine Flockenbildung und Aufräumung, wobei hier als Grund ein Depletionsmechanismus identifiziert werden konnte, der durch einen Überschuss an Maltodextrin in der wässrigen Phase der Emulsionen nach einer Suspension der Fasern ausgelöst wurde. Die verbesserten Emulgiereigenschaften der erhitzten Erbsenproteinisolat-Maltodextrin-Fasern wurden sterischen Wechselwirkungen zugeschrieben, die auf das nunmehr kovalent gebundene Maltodextrin zurückzuführen waren.

Von Forschungsstelle 2 wurde zunächst die biologische Wertigkeit der Proteinisolate (Molke, Soja, Erbse, Kartoffel, Kürbis, Weizen und Reis) hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung untersucht. Hierzu wurde das Proteinisolat mittels saurer Hydrolyse in 24 h bei 110 °C in 6 M HCl in Aminosäuren gespalten und diese mittels LC-MS/MS quantifiziert. Es zeigte sich, dass vor allem im Molkenproteinisolat hohe Gehalte an essentiellen Aminosäuren (L-Leu, L-Lys, L-Ile, L-Thr und L-Met) vorlagen, gefolgt von Kartoffelproteinisolat und Erbsenproteinisolat. Die molekularen Veränderungen durch den Elektrospinnprozess und der nachfolgend durchgeführten Konjuga-

tion von Maltodextrin und Proteinisolat wurde anhand einer speziell dafür entwickelten LC-MS/MS-Methode aufgeklärt. Der Konjugationsgrad von Maltodextrin und Protein konnte auf Basis der Konzentration von AMADORI-Produkten (Furosin, Pyrralin, Carboxyethyllysin und Carboxymethyllysin), die teils während der sauren Hydrolyse (Furosin) aus reagierten Zuckern und Lysinresten gebildet wurden, bestimmt werden. Um einen Überblick über die Spinnbarkeit und der Konjugationsfähigkeit von Maltodextrin und Proteinisolat zu erhalten, wurden neben dem Proteinisolat und elektrogesponnenen Maltodextrin-Proteinfasern auch deren Konjugate bei unterschiedlichen Konjugationszeiten von 6 h, 12 h, 24 h und 48 h untersucht. Die höchsten Konzentrationen an AMADORI-Produkten wurden in 48 h konjugierten Maltodextrin-Molkenprotein-Fasern gefunden. Von den elektrogesponnenen und konjugierten Pflanzenproteinfasern wiesen die konjugierten Erbsenproteinfasern bereits bei 12 h hohe Konjugationsgrade auf. Im weiteren Verlauf des Vorhabens wurde zur Optimierung der Elektrospinnbarkeit Erbsenproteinisolat mit unterschiedlichen Zusammensetzungen von Maltodextrinen (DE 2, 12 und 21) bei verschiedenen Konjugationstemperaturen, Zeiten und Luftfeuchtigkeitsgehalten gesponnen und konjugiert. Die höchsten Konjugationsgrade konnten bei 70 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit und 6 h bzw. 12 h Konjugationszeit beobachtet werden. Auftretende Oxidationsreaktionen, Quervernetzungen von Lysinseitengruppen sowie Reaktionen des Maltodextrins mit Argininseitengruppen wurden nach enzymatischer Hydrolyse und massenspektrometrischer Bestimmung der Konzentrationen von MG-H1, MOLD und Argpyrimidin bestimmt. Neben einer mit der Konjugationszeit ansteigenden Oxidationsreaktion konnte ein deutlicher Anstieg der Quervernetzung und der Umsatz der Argininseitengruppen zwischen 6 h und 12 h Konjugationszeit nachgewiesen werden. Für Erbsenproteinisolat konnte eine Konjugationszeit von 6 h-12 h, eine Temperatur von 70 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 75 % als optimale Konjugationsbedingungen ermittelt werden. Die strukturelle Charakterisierung der elektrogesponnenen und konjugierten Maltodextrin-Proteinisolate erfolgte durch einen modifizierten Bottom-up-Proteomicansatz. Nach einer stufenweise Hydro-

lyse mit Amylase, Glucosidase und Trypsin bzw. Chymotrypsin erfolgte die Detektion der erhaltenen Peptidbruchstücke mittels hochauflösender Massenspektrometrie. Anhand dieser stufenweisen Hydrolyse war es möglich, einerseits die Lage der oxidierten Aminosäureseitengruppen (L-Met, L-His und L-Trp) und andererseits eine erfolgreiche Reaktion von Maltodextrin und dem Protein auf molekularer Ebene nachzuweisen. Somit war es möglich, im Molkenproteinisolat acht Proteine, vorwiegend Lactalbumin, Lactoglobuline und Caseine, und im Erbsenproteinisolat 11 Proteine, hauptsächlich Vicilline, Legumine und Albumine, zu identifizieren. Nachfolgend konnten Modifikationen durch den Elektrosprossprozess und der Konjugation an diesen identifizierten Proteinen untersucht werden. Es zeigten sich Oxidationsreaktionen an oben erwähnten Seitengruppen in α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und B (Molkenprotein) sowie in Legumin A2 und Albumin 2. Weiterhin war es möglich, Bindungen von Maltodextrin mit den Aminosäuren L-Lys, L-Arg, L-Ser und L-Thr in den Proteinen α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin A und B (Molkenprotein) sowie Vicilin und Convicilin (Erbsenprotein) nachzuweisen. Darüber hinaus konnten die Bindungsstellen in den entsprechenden Proteinen bestimmt werden, um so Informationen über die Interaktion der Maltodextrin- und Proteinfasern während des Elektrosprossprozesses zu erhalten.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Entwicklung neuer leicht löslicher, emulgierender und stabilisierender Protein-Kohlenhydrat-Konjugate ist in mehrfacher Hinsicht von wirtschaftlicher Relevanz. Die Verwendung von Protein-Kohlenhydrat-Konjugaten kann zum einen für die Lebensmittel- und Getränkeindustrie ein Mittel sein, um den pflanzlichen Proteingehalt in ihren Produkten zu erhöhen und bietet zum anderen Herstellern von Pflanzeneiweiß durch die verbesserten technofunktionellen Eigenschaften der Konjugate die Möglichkeit, in neue Märkte vorzustoßen. Da in den letzten Jahren verschiedene pflanzliche Proteine, wie z.B. Raps, als Novel Food zugelassen wurden, eröffnen sich neue Absatzmärkte; zugleich kann der ständig vorherrschende hohe Innovationsdruck in der

Lebensmittelindustrie bedient werden. Es ist zu erwarten, dass Proteinkonjugate gegenüber den bislang verfügbaren Produkten zu einem konkurrenzfähigen Preis angeboten werden können, da der notwendige zusätzliche Elektrosprossschritt mit nur geringen Investitions- und Betriebskosten (Stromverbrauch) verbunden ist. Der weltweite Umsatz von Proteinpräparaten lag allein im Jahr 2018 bei ca. 14 Mrd. US-Dollar. Am umsatzstärksten sind die Segmente „Sport- und Fitness-Ernährung“ (74,8 %) und „Functional Food“ (25,2 %).

Die im Rahmen des Vorhabens untersuchten Protein-Polysaccharid-Konjugate eröffnen den Herstellern die Möglichkeit, neue wohlschmeckende vegetarische und vegane Produkte mit höheren Proteinanteilen zu entwickeln, die unter verschiedenen Lagerbedingungen langfristig stabil bleiben. Der Lebensmittelindustrie, aber auch Unternehmen der Pharma- und Kosmetikindustrie, steht damit eine neue Klasse technofunktionaler Stoffe auf Pflanzenproteinbasis zur Verfügung, die über eine gute Wasserlöslichkeit und gute Emulgiereigenschaften verfügen. Die Stoffe können als Ergänzung zu tierischen Rohstoffen einen Beitrag zur Nachhaltigkeit und Sicherung der Rohstoffverfügbarkeit in den betroffenen Sektoren leisten. Zudem bietet der Einsatz pflanzlicher, technologisch optimierter Proteinpräparate die Möglichkeit, die mit pflanzlichen Produkten verbundenen ethisch-ökologischen Vorteile sowie den Aspekt der Nachhaltigkeit auszuloben. Die im Gegensatz zur traditionellen Glykierung in trockenen oder wässrigen Systemen im Zuge des Elektrosprossens pflanzlicher Glykoprotein-Konjugate zu erwartende geringere Schädigung essentieller Aminosäuren lässt zudem eine erhöhte ernährungsphysiologische Wertigkeit elektrosprossener Protein-Glykokonjugate erwarten. Darüber hinaus ist es auch denkbar, dass das allergene oder antinutritive Potential pflanzlicher Proteine durch die MAILLARD-bedingte Umsetzung reduziert wird.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Kutzli, I., Griener, D., Gibis, M., Schmid, C., Dawid, C., Baier, S.K., Hofmann, T. &

Weiss, J.: Influence of Maillard reaction conditions on the formation and solubility of pea protein isolate-maltodextrin conjugates in electrospun fibers. *Food Hydrocoll.* 101, 105535 (2020).

3. Kutzli, I., Griener, D., Gibis, M., Grossmann, L., Baier, S.K. & Weiss, J.: Improvement of emulsifying behavior of pea proteins as plant-based emulsifiers via Maillard-induced glycation in electrospun pea protein-maltodextrin fibers. *Food Funct.* DOI: 10.1039/d0fo00292e (2020).
4. Kutzli, I., Gibis, M., Baier, S.K. & Weiss, J.: Electrospinning of whey and soy protein mixed with maltodextrin - Influence of protein type and ratio on the production and morphology of fibers. *Food Hydrocoll.* 93, 206-214 (2019).
5. Kutzli, I., Beljo, D., Gibis, M., Baier, S.K. & Weiss, J.: Effect of Maltodextrin Dextrose Equivalent on Electrospinnability and Glycation Reaction of Blends with Pea Protein Isolate. *Food Biophys.* DOI <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09619-6> (2019).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und
Biotechnologie, FG Lebensmittelphysik und
Fleischwissenschaft
Garbenstraße 25
70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-24415
Fax: +49 711 459-24446
E-Mail: j.weiss@uni-hohenheim.de

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW)
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und
Molekulare Sensorik
Lise-Meitner-Str. 34
85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-2923
Fax: +49 8161 71-2949
E-Mail: corinna.dawid@tum.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:



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.