

Technologische Potenziale zur Fraktionierung von Milchproteinhydrolysaten

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie Prof. Dr. Lutz Fischer/Dr. Bertolt Kranz
Forschungsstelle II:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittel tierischer Herkunft Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs
Forschungsstelle III:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Technologie Prof. Dr. Ulrich Kulozik/Dr. Seronei Cheison/Dipl.-Ing. Elena Leeb
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Dr. Frank Wiens Danone Research Coordination, Human Milk Research/Nutricia Research, Utrecht
Laufzeit:	2010 – 2013
Zuwendungssumme:	€ 847.200,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Obwohl eine Vielzahl an gesundheitsfördernden oder technologisch nutzbaren Eigenschaften von Peptiden bekannt ist, ist deren gezielte Gewinnung mit Ausnahme des Caseinomakropeptids bis heute nicht im technischen Maßstab umgesetzt. Zudem sind enzymatische Prozesse zur Freisetzung funktioneller Peptide aus einem Vorläuferprotein nur unvollständig verstanden, so dass die Peptidzusammensetzung von Hydrolysaten stark variieren kann. Dabei können neben den gewünschten funktionellen Peptiden ebenfalls Peptide mit negativen Eigenschaften, wie z. B. bitterem Geschmack, im Hydrolysat enthalten sein. Die Weiterentwicklung von technologisch oder physiologisch nutzbaren Produktkonzepten auf Basis von Teilhydrolysaten oder Peptidfraktionen ist selbst für spezialisierte Unternehmen schwierig. Zwar können

mit modernsten Methoden bei großem Aufwand kleinste Mengen an Peptidgemischen für die Analyse oder für experimentelle Untersuchungen fraktioniert werden, jedoch sind wissenschaftliche Studien zur Fraktionierung von Peptidgemischen im größeren Maßstab äußerst lückenhaft. Durch die heute industriell etablierten Ultra- und Nanofiltrationsmembranen wird überwiegend nach dem Größenausschussprinzip getrennt, jedoch wird das physikochemische Fraktionierungspotenzial der Peptide bedingt durch ihre unterschiedliche Aminosäuresequenz noch nicht ausgeschöpft. Eine wesentliche Voraussetzung für neue marktfähige peptidhaltige Produkte mit spezifischen technofunktionellen oder biofunktionellen Eigenschaften ist daher eine verbesserte prozesstechnische Gewinnung einzelner Peptidfraktionen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, unter Berücksichtigung von Up-stream-Processing (Substrat und Vorbehandlung), Hydrolyseprozess (hochselektives Enzym und Hydrolyseparameter) und Down-stream-Processing (Fraktioniertechnik und Parameter) technologisches Potenzial zur Gewinnung definierter Peptidfraktionen zu erschließen. Wirtschaftlich attraktive Verfahren, wie die Membran-Adsorptions-Chromatographie (MAC) und Cross-Flow-Elektromembranfiltration (CFEMF), sollten weiter entwickelt werden, so dass beschriebene gesundheitsfördernde oder technologisch nutzbare Eigenschaften von Peptiden für neue Produkte nutzbar gemacht werden können. Das zentrale wissenschaftliche Ziel war, die Vorgänge und Reaktionen, die in komplexen Systemen der Fraktionierung von Peptiden auftreten, zu durchdringen und Standardprozesse zur Fraktionierung zu generieren.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurden Standardprozesse (up-stream) zur Gewinnung von hochreinem β -Lactoglobulin, micellarem Casein sowie reinem β -Casein entwickelt, optimiert und etabliert. Darüber hinaus wurde durch thermische Vorbehandlung die Zugänglichkeit der Schnittstellen im Substrat β -Lactoglobulin modifiziert und näher studiert. Als Enzyme wurden kommerzielles Trypsin sowie hochreines Trypsin und Lys-C, die im Projekt erzeugt und gereinigt wurden, für die Experimente genutzt. Mit der pH-Stat-Methode wurde eine standardisierte Hydrolyse der Substrate erreicht. Methoden zur Analyse der Hydrolysate wurden erarbeitet und etabliert (RP-HPLC, ESI-LC-MS/MS). Zur selektiven Fraktionierung von Peptiden (down-stream) wurden die Membran-Adsorptions-Chromatographie (MAC) und Cross-Flow-Elektromembranfiltration (CFEMF) entwickelt, aufgebaut und für die gezielte Gewinnung von Peptidfraktionen (< 10 Peptiden) optimiert. Zur statistischen Auswertung der Eignung verschiedener kombinierter Prozessparameter wurde eine ANOVA angewandt. Die gewonnenen Peptidfraktionen wurden hinsichtlich ihrer bio- und technofunktionellen Eigenschaften mit Hilfe verschiedener Methoden, z. B. ACE-Inhibitor-Test, Schaumbildungs- und Emulgiervermögen, charakterisiert. Unter anderem wurden die folgenden Ergebnisse in den Forschungs-

stellen in Hinblick auf das Forschungsziel erarbeitet:

An Forschungsstelle 1 wurde die Endopeptidase Lys-C rekombinant in *E. coli* hergestellt. Durch die Renaturierung der nicht aktiven Form wurde eine Lys-C-Aktivität von $896 \pm 2 \text{ nkat}_{\text{Tos-GPK-pNA}}/\text{L}_{\text{Kultur}}$ erreicht. Diese konnte durch die Bioreaktor-Kultivierung um das 150-fache im Vergleich zum Projektbeginn auf $9.340 \pm 555 \text{ nkat}_{\text{Tos-GPK-pNA}}/\text{L}_{\text{Kultur}}$ erhöht werden. Aufgrund der hohen Reinheit war eine weitere Reinigung nicht notwendig. Lys-C weist als Pulver bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 360 Tagen auf. Das kommerziell erhältliche Trypsin wurde mittels Affinitätschromatographie in chymotrypsin-freies Trypsin (Überprüfung mit LC-MSMS) gereinigt, die Ausbeute betrug 75 %, die Reinheit $\geq 99,98 \%$ bei einer spezifischen Enzymaktivität von $5.016 \text{ nkat}_{\text{tBz-VGR-pNA}}/\text{mg}_{\text{Protein}}$. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von Trypsin betrug als Pulver bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 360 Tage. Die Immobilisierung von Lys-C erbrachte nur Ausbeuten von 10 %, Trypsin hingegen konnte als Cross-Linked Enzyme-Aggregate mit einer Ausbeute von ca. 100 % immobilisiert werden. Das biochemische pH-Optimum verschob sich dabei von pH 7 auf pH 8 - 9 und das biochemische Temperatur-optimum von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $50 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$. Die maximalen Hydrolysegrade (DH) von Casein mit Lys-C und Trypsin beliefen sich auf 5,3 % bzw. 8,5 % für Trypsin.

An Forschungsstelle 2 wurde im Technikumsmaßstab die Gewinnung von micellarem Casein und β -Casein (Reinheit $> 80 \%$) entwickelt, optimiert und ein Protokoll erstellt. Die Caseine dienen als Ausgangssubstrate für die hydrolytische Umsetzung mittels des Enzyms Trypsin. Zur Fraktionierung der Totalhydrolysate mittels Ultrafiltration und Cross-Flow-Elektromembranfiltration wurden Prozessparameter variiert und deren Einfluss auf den Fraktionierprozess ermittelt (Flux, Permeationsleistung, spezifische Deckschichtmasse, Bestimmung des Proteingehalts). Die Peptide in Hydrolysat, Retentat und Permeat wurden identifiziert und ausgewählte Hauptpeptide durch eine dafür entwickelte HPLC-Methode quantifiziert. Abschließend wurde gezeigt, dass durch geeignete Prozessparameter bei der Elektromembranfiltration sechs biofunktionelle Peptide selektiv fraktioniert werden können.

An Forschungsstelle 3 wurde ein Prozess zur Gewinnung von β -Lactoglobulin im Technikumsmaßstab entwickelt und optimiert, wodurch Reinheiten von über 95 % erreicht wurden. Das reine native und unterschiedlich thermisch denaturierte β -Lactoglobulin diente als Ausgangssubstrat für die tryptische Hydrolyse. Indem die Freisetzung der Peptide während der Hydrolyse verfolgt wurde, zeigte sich, dass die Zugänglichkeit des Enzyms zu möglichen Schnittstellen durch die Wahl des Denaturierungs-pH-Werts und der damit verbundenen Aggregatform gesteuert werden kann. Anschließend wurden die Hydrolysate unter Einsatz eines membranbasierten Anionen- und Kationenaustauschers in 14 einzelne Fraktionen fraktioniert, in denen funktionelle Peptide angereichert vorlagen. Auf Basis der experimentellen Arbeiten wurden aktuelle Grenzen und Potenziale für die Fraktionierung von Hydrolysaten mittels Ultrafiltration (UF), Cross-Flow-Elektromembranfiltration (CFEMF) und Membran-Adsorptions-Chromatographie (MAC) aufgezeigt.

Die Resultate zum Einfluss der Enzymwahl, der hydrolytischen Umsetzung und der angewandten Trenntechnik auf die selektive Fraktionierung wurden aufbereitet, um Unternehmen die technologischen Potenziale zur Gewinnung bio- und technofunktioneller Peptide für maßgeschneiderte Peptid-Produkte zu erschließen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der milchverarbeitende Sektor erwirtschaftet in Deutschland mit knapp 37.000 Beschäftigten an etwa 100 Betriebsstätten einen Umsatz von jährlich etwa 22 Mrd. €. Die deutsche Milchwirtschaft ist nicht nur innerhalb der EU, sondern auch weltweit dem Wettbewerb ausgesetzt. Entsprechend wird in neue Technologien investiert und es finden sich neben den Standardmagermilch- und molkenpulvern inzwischen zahlreiche Spezialprodukte. Auf internationalen Märkten gibt es bereits einige „Functional Food“-Produkte wie Getränke, Kaugummi, Konfekt, bei denen mit biofunktionellen Peptiden aus Milch geworben wird. Der deutsche Markt für „Functional Food“ wird auf 5,1 Mrd. € mit einem jährlichen Wachstumspotenzial von 20 % geschätzt.

Die entwickelten Messmethoden ermöglichen es insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen (KMU), Peptidfraktionen für spezifische Anforderungen zu entwickeln und anschließend im technischen Maßstab zu produzieren. Durch die vorgestellten Versuche in Labormaßstab wird bei Variation der Technologie eine praxisrelevante Herstellung, eine beschleunigte Übertragung in den Technikumsmaßstab sowie das Einhalten eines engeren Zielbereichs der gewünschten funktionellen Eigenschaften garantiert. Die anhand verschiedener Varianten (definierte milchbasierte Substrate, ausgewählte Enzyme und die entsprechende Trenntechnik) erarbeiteten Prozess-Funktionsbeziehungen ermöglichen zudem eine gezielte und effiziente Herstellung neuer maßgeschneiderter Peptid-Produkte. Somit wird es KMU ermöglicht, durch diese Technologie Peptidfraktionen mit z. B. grenzflächenaktiven, langkettigen amphiphilen Peptiden in Lebensmittelformulierungen ohne besondere Kennzeichnung (Clean Label) für die Emulgierung und Schaumstabilisierung einzusetzen, um sich am Markt besser zu behaupten. Das erweiterte Angebot an maßgeschneiderten Peptid-Produkten erhöht die Absatzmärkte in der Lebensmittelindustrie, um in Lebensmittelformulierungen eingesetzt zu werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht (2013).
2. Stressler, T., Eisele, T., Meyer, S., Wangler, J., Hug, T., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L.: Heterologous expression and pro-peptide supported refolding of the high specific endopeptidase Lys-C. *J. Protein Expression and Purification* 118, 31-38 (2016).
3. Holder, A., Großmann, L., Weiss, J. and Hinrichs, J.: Electrochemical modification of dairy-based functional peptides by means of cross-flow electro membrane filtration. *Dair. Sci. Technol* 95, 47-62 (2015).
4. Holder, A., Merath, C., Kulozik, U. and Hinrichs, J.: Impact of diffusion, transmembrane pressure and the electrical field on peptide fractionation using cross-flow electro membrane filtration. *Int. Dair. J.* 46, 31-38 (2015).

5. Holder, A., Thienel, K., Klaiber, I., Pfannstiel, J., Weiss, J. and Hinrichs, J.: Quantification of bio- and techno-functional peptides in tryptic bovine micellar casein and β -casein hydrolysates. *Food Chem.* 158, 118-124 (2014).
6. Leeb, E., Holder, A., Letzel, T., Cheison, S.C., Kulozik, U. and Hinrichs, J.: Fractionation of dairy based functional peptides using ion-exchange membrane adsorption chromatography and cross-flow electro membrane filtration. *Int. Dair. J.* 38, 116-123 (2014).
7. Großmann, L., Holder, A. und Hinrichs, J.: Technofunktionelle Peptide als Emulgatoren in der Lebensmittelindustrie. *DMW* 4, 113-116. (2014).
8. Merath, C., Holder, A. und Hinrichs, J.: Erzeugen von elektrolysiertem Wasser mit desinfizierender Wirkung in einer Cross-Flow-Elektromembranfiltrationsanlage. *DMW* 5, 150-155 (2014).
9. Holder, A., Scholz, S., Hinrichs, J. and Kulozik, U.: Cross-Flow Electro Membrane Filtration: Theory and Application in the Dairy Industry. *Chem. Ing. Tech.* 85 (8), 1-9 (2013).
10. Leeb, A., Stressler, E., Fischer, L. Hinrichs, J. und Kulozik, U.: Technologische Potenziale zur Fraktionierung von Milchproteinhydrolysaten. *DMW* 22, 789-793 (2013).
11. Holder, A., Birke, A., Eisele, T., Klaiber, I., Fischer, L. and Hinrichs, J.: Selective isolation of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides from micellar casein and β -casein hydrolysates via ultrafiltration. *Intern. Dair. J.* 31, 34-40 (2013).
12. Post, A., Sampels, H., Holder, A. and Hinrichs, J.: A comparison of micellar casein and β -casein as sources of basic peptides through h tryptic hydrolysis and their enrichment using two-stage ultrafiltration. *Intern. Dair. Technol.* 65 (4), 486-489 (2012).
13. Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B. and Fischer, L.: Quantification of dabsylated di- and tri-peptides in fermented milk. *Food Chem.* 135, 2808-2813 (2012).
14. Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B. and Fischer, L.: Automated multi-step purification protocol for Angiotensin-I-Converting-Enzyme (ACE). *J. Chromatogr. B.* 911, 64-70 (2012).
15. Leeb, E., Kulozik, U. und Cheison, S.: Thermal pre-treatment of β -Lactoglobulin as a tool to steer enzymatic hydrolysis and control the release of peptides. *Proc. Food Sci.* 1, 1540-1546 (2011).
16. Leeb, E. und Cheison, S.: Fraktionierung des tryptischen β -Lactoglobulin Hydrolysats mittels Membranadsorptionschromatographie. *Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-939182-43-6, 140-142 (2011).
17. Leeb, E. und Cheison, S.: Einfluss einer thermischen Substratvorbehandlung auf die tryptische Hydrolyse von β -Lactoglobulin. *Jahresbericht Milchwiss. Forsch. ZIEL Weihenstephan*, ISBN 978-3-939182-34-4, 124-126, (2010).

Weiteres Informationsmaterial:

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

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Lebensmittel tierischer Herkunft
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-23792
Fax: +49 711 459-23617
E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, 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.