

Enzymatische Produktion von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Milch- und Eiklarproteinen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik Prof. Dr. Thomas Hofmann/Leb.chem. Andreas Dunkel
Forschungsstelle II:	Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Ralf Günter Berger/PD Dr. Ulrich Krings
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e. V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Dr. Michael Schmidt Hochland Deutschland GmbH, Heimenkirch
Laufzeit:	2012 - 2015
Zuwendungssumme:	€ 484.000,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Eine erhöhte Aufnahme von Natrium-Ionen mit der Nahrung stellt für genetisch disponierte Personen einen Risikofaktor für Bluthochdruck und Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Käse ist mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 22,8 kg in Deutschland eine wichtige Proteinquelle in der Ernährung, durch hohe Gehalte von bis zu 30 g/kg jedoch auch eine reiche Quelle für Kochsalz. Die Reduktion des Salzgehaltes von Milcherzeugnissen, wie Käse, hat jedoch von den Verbrauchern nicht akzeptierte Geschmackseinbußen zur Folge. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Strategien verfolgt, um den Salzgehalt von Lebensmitteln unter Beibehaltung des sensorischen Profils zu reduzieren. Einerseits wurde versucht, das in Lebensmitteln vorhandene Kochsalz partiell durch andere salzig schmeckende Stoffe, wie z.B. Mischungen von Alkali- und Erdalkalisalzen, zu ersetzen. Andererseits wurde versucht, salzgeschmacksverstärkende (SGV) Moleküle zu entwickeln. Die bislang verfügbaren Kochsalzsubstitute bzw. SGV-Systeme erweisen sich in der industriellen Praxis aufgrund zu geringer Wirksamkeit bzw. eines auftretenden Off-Flavours jedoch als wenig tauglich. Eine Reduk-

tion des Kochsalz-Gehalts von Lebensmitteln um mehr als 20 % bei gleichbleibendem Geschmackprofil ist hiermit nicht erreichbar.

Die Arbeitsgruppe HOFMANN et al. (Forschungsstelle 1) identifizierte kürzlich im Rahmen eines BMBF-Verbundprojekts in Hydrolysaten von Fischproteinen eine Reihe von L-Arginyl-Dipeptiden, die stark strukturabhängig salzgeschmacksverstärkende (SGV) Aktivitäten in NaCl-Lösungen bzw. salzigen Modellbrühen aufwiesen. Sensorische Voruntersuchungen mit Frischkäseproben, denen Arginylpeptide, z. B. Arg-Arg (10 mmol/kg) zugesetzt wurden, zeigten die erwartete Erhöhung der Salzigkeit, ohne einen fischigen Fehlgeschmack hervorzurufen. Bei der Analyse des Proteinhydrolysates konnten jedoch auch Fraktionen lokalisiert werden, die keine Arginyl-Dipeptide enthielten, aber dennoch salzmodulierende Eigenschaften aufwiesen. Diese Ergebnisse deuteten auf die Existenz weiterer bislang unbekannter SGV-Peptide hin. Caseine und Molkenproteine stellen interessante Substrate zur Produktion salzgeschmacksverstärkender Peptide bzw. Peptidfraktionen durch gezielte enzymatische Hydrolyse dar. Die Erschließung solcher geschmacksmodulierender Peptide durch gezielte

Proteinhydrolyse mittels spaltspezifischer Peptidasen stellt eine vielversprechende Lösung zur Herstellung salzreduzierter und sensorisch attraktiver Milchprodukte dar und kann entscheidend zur diätetischen Prävention von Bluthochdruck bei den Verbrauchern beitragen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, durch die Zusammenführung von molekular-sensorischer und enzymtechnologischer Expertise neue Peptidasen zur Herstellung salzgeschmacksverstärkender (SGV)-Peptide aus Milch- und Eiklarproteinen zu identifizieren und verfügbar zu machen. Durch Kombination von unspezifischen und selektiven Peptidasen aus *Lactobacilli* sowie Basidiomycota sollten Milchproteinfraktionen hydrolysiert und die Bildung bekannter SGV-aktiver L-Arginyldipeptide quantitativ bestimmt werden. Zudem sollten bislang unbekannte SGV-Peptide durch aktivitätsorientierte Fraktionierung aufgespürt und identifiziert werden. Aus den Proteinhydrolysaten gewonnene SGV-aktive Peptide bzw. Peptidfraktionen sollten anschließend in Käsemodelle eingearbeitet werden, um die SGV-Wirksamkeit der Peptide sensorisch und instrumentell-analytisch zu validieren.

Forschungsergebnis:

Da die im Vorfeld des Forschungsvorhabens beschriebenen Peptide jeweils Arginin als entscheidenden Bestandteil enthielten und die bedeutenden Milchproteine (Caseine, Molkenproteine) vergleichsweise geringe Gehalte an Arginin besitzen, wurde zusätzlich Eiklarprotein (Lysozym) als Ausgangsmaterial in die Forschungsarbeiten mit aufgenommen. Basierend auf den kommerziell erhältlichen Peptidasen Chymotrypsin, Trypsin und Flavourzyme konnte durch Vergleich verschiedener Hydrolysezeiten und Variation der Reihenfolge des Einsatzes der 3 Enzyme unter optimierten Bedingungen eine hohe Konzentration an salzgeschmacksverstärkenden Arginyldipeptiden aus Lysozym freigesetzt werden. Im Rahmen einer aktivitätsorientierten Fraktionierung konnten darüber hinaus weitere Arginin-haltige Peptide mit bis zu fünf Aminosäureresten identifiziert werden, die ebenfalls die salzige Geschmackswahrnehmung von würzigen Testlösungen erhöhten. In Anwendungsexperimenten in Käsematrix konnte mit optimierten Hydrolysatfraktionen ein Reduktionspotential für Kochsalz von bis zu 30 % ohne negative Beeinflussung anderer Geschmacksqualitäten erreicht werden.

Um darüber hinaus eine gezielte Freisetzung von Arginyldipeptiden aus den Ausgangsproteinen mit hinsichtlich der Spaltspezifitäten optimalen Enzymen zu erzielen, wurden an Forschungsstelle 2 Pilze (Basidiomyceten) hinsichtlich extrazellulärer Peptidasen untersucht. In 6 von 22 Basidiomyceten konnten hohe Enzymaktivitäten nachgewiesen und die Aktivitätsausbeuten durch Variation der Kultivierungsbedingungen optimiert werden. Die Kulturüberstände der sechs aktivsten Basidiomyceten wurden daraufhin konzentriert und als Peptidase-Gemische im semi-präparativen Maßstab gewonnen. 30 der enthaltenen Peptidasen wurden anschließend identifiziert und eine Übersicht ihrer Familien und Spaltspezifitäten erstellt. Alle Peptidase-Gemische zeigten maximale Peptidaseaktivitäten in einem breiten, leicht sauren pH-Bereich, die Peptidasen des besonders aktiven *Trametes versicolor* waren zudem im Säuren am stabilsten. Daher scheint ihr Einsatz in der Verarbeitung von Milchprodukten realisierbar.

Hydrolyse-Experimente mit diesen Peptidasegemischen und den Modellsubstraten Casein und Lysozym führten erwartungsgemäß zur Freisetzung niedermolekularer Hydrolyseprodukte, wie Aminosäuren und Dipeptide, nach 24 h wurden dabei Hydrolysegrade zwischen 14 und 29 % erzielt. Es konnte zwar keine arginylspezifische Dipeptidase nachgewiesen werden, dennoch wurden insbesondere in Lysozymhydrolysaten hohe Gehalte von bis zu 75 $\mu\text{mol/g}$ der salzgeschmacksverstärkenden Arginylpeptide nachgewiesen. Mit Peptidasegemischen aus den Pilzen *Phanerochaete chrysosporium* und *Trametes versicolor* konnten dabei rund 10 % der theoretisch möglichen Ausbeuten an Arginyl-Dipeptiden erhalten werden. Erste in Zusammenarbeit beider Forschungsstellen durchgeführte Applikationsexperimente zeigten beispielweise, das Lysozymhydrolysat von *Grifola frondosa* und *Trametes versicolor* den Salzgeschmack von salzhaltigem Quark als Modellsystem bei Einsatzmengen von 0,1 bis 0,5 % verstärken können. Für das Lysozymhydrolysat des *Trametes versicolor* wurde darüber hinaus in einer dem Geschmack von jungen Gouda-Käse nachempfundenen Modellmatrix ein mögliches Kochsalz-Reduktionspotential von bis zu 20 % nachgewiesen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutschen Molkereien verzeichnen einen Jahresumsatz von ca. 20 Mrd. €. Die Milch-

dustrie ist mittelständisch organisiert und beschäftigt ca. 36.000 Mitarbeiter. Käse stellt mit einer Gesamtproduktion von 2.350 kt und einem Pro-Kopf-Verbrauch von 22,8 kg in Deutschland eine wichtige Proteinquelle unserer Ernährung dar. Allerdings stehen der deutschen Milchindustrie, deren Unternehmen im Vergleich zu den europäischen Nachbarländern überwiegend klein und mittelständisch strukturiert sind, nur begrenzte Mittel zur Verfügung, um Lösungen zur Kochsalzreduktion in Milchprodukten durch eigene Forschungsressourcen zu erarbeiten. Andererseits erhalten insbesondere KMU wegen der zunehmenden Sensibilisierung der Verbraucher zum Thema Kochsalz durch innovative, natriumreduzierte Produkte mit hoher sensorischer Qualität eine einmalige Chance zur Profilbildung in Deutschland und zur Markenprägung in Europa.

Peptidgemische aus Milch- und Eiklarproteinhydrolysaten erlauben eine Kochsalzreduktion ohne Verstärkung aversiver Produkteigenschaften. Die gewonnenen Erkenntnisse zu effizienten Enzymen zur Generierung der salzgeschmacksverstärkenden Peptide können zur maßgeschneiderten Erzeugung von Milchfraktionen mit optimierter sensorischer Wirkung eingesetzt werden, die auch als Zutaten in anderen Produkten, wie Backwaren, Verbreitung finden können.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Harth, L., Krah, U., Linke, D., Dunkel, A., Hofmann, T. und Berger, R. G.: Salt Taste Enhancing *L-Arginyl* Dipeptides from Casein and Lysozyme Released by Peptidases of Basidiomycota. *J. Agric. Food Chem.*, DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02716 (2016).

Weiteres Informationsmaterial:

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

Universität Hannover
Institut für Lebensmittelchemie
Callinstraße 5, 30167 Hannover
Tel.: +49 511 762-4582
Fax: +49 511 762-4547
E-Mail: rg.berger@lci.uni-hannover.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.