

Die Eiweißprodukte aus Schlachttierblut für Lebensmittel

DREPPER, K. DREPPER, H. LUDWIG-BUSCH

Institut für Tierernährung und Futtermittelkunde, Universität Kiel, W-Germany

In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die jährliche Schlachtblutmenge 140 000 t (Drepper, 1978), das entspricht 25 000 t Rohprotein. Umweltschutz und Wirtschaftlichkeit erfordern die Blutverarbeitung auch die insgesamt bedrohliche Ernährungslage der Erde. Durch Zentrifugation des Gesamtblutes entstehen Plasma (60 Vol%, 7 % Rohprotein) und Blutkörperchenkonzentrat (40 Vol%, 38 % Rohprotein). Das Blutkörperchenkonzentrat wird einzelnen Lebensmitteln direkt bei der Produktion zugesetzt. Blutkörperchenkonzentrat (80 % des gesamten Blutrohproteins) wird wegen der Färbung und des Geschmacks sehr wenig zu Lebensmitteln verarbeitet, hauptsächlich wird es als Blutmehl für die Fütterung oder als Düngemittel verwendet.

In der Literatur wurden verschiedene Wege zur Blutkörperchenkonzentratverarbeitung für Lebensmittel beschrieben. Joep et al (1949) sowie Tybor et al (1973) fällen das Globin mit Salzsäure-Aceton. Für großtechnische Schlachttierblutverarbeitung sind diese Verfahren zu aufwendig. V.d. Oord und Wesdorp (1979) entfärben mit H_2O_2 . Der Niederschlag enthält 7 % des Blutrohproteins, die Oxydationsvorgänge können zur Zerstörung von Aminosäuren führen. Gleiches gilt für die Hydrolyse mit starker Salzsäure (Fretheim et al, 1979). Dagegen erfolgt bei der enzymatischen Hydrolyse keine Beeinträchtigung der Proteinwertigkeit (Haldenrøstensen, 1978; Drepper und Drepper, 1979 und 1981).

Das Prinzip der eigenen Untersuchungen basiert auf einer Hämolyse der Erythrozyten mit anschließender saurer enzymatischer Partialhydrolyse des Hämoglobins und Abtrennung eines farblosen Häm-Protein-Anteils von einem schwach gelblichen, schmackhaften Globinhydrolysat.

Während des gesamten Aufarbeitungsganges bis zum Zentrifugieren wird der Ansatz auf ca. 50°C erwärmt (vgl. unten) und langsam mechanisch durchgerührt.

Bei der Hämolyse wird das Blutkörperchenkonzentrat mit Wasser im Verhältnis 1:2 versetzt. Dieses enge Verhältnis wurde gewählt, um eine zu starke Verdünnung zu vermeiden. Beim angegebenen Blutkörperchenkonzentrat:Wasser-Verhältnis ergibt sich am Ende des Verfahrens ein Globinhydrolysat mit einem Rohproteingehalt von ca. 8 %, also einer dem Blutplasma vergleichbaren Rohproteinkonzentration. Größere Wasserzusätze zur Hämolyse bewirken eine gegenüber höherer Rohproteinmenge in dem Globinhydrolysat bei (natürlich) verringerter Rohproteinkonzentration. Dementsprechend müssen, wenn ein Trockenprodukt hergestellt werden soll, höhere Kosten für die Wasserentfernung in Kauf genommen werden.

Nach 10 Minuten nach Beginn der Hämolyse wird mit 1 n Salzsäure ein pH-Wert von 3,9 - 4,0 eingestellt und das Ferment, die Pilzproteinase S (Drepper und Drepper, 1981) hinzugefügt. Diese Proteinase hat ein Wirkungsoptimum zwischen pH 4 - 5. Während der 12-stündigen Einwirkung des Fermentes unter den angegebenen Reaktionsbedingungen steigt nun durch die Proteolyse der pH-Wert auf ca. 5,0 an, ohne daß eine weitere pH-Wertregulation erforderlich ist. Somit ist der optimale pH-Bereich für die Pilzproteinase S während der gesamten Reaktionszeit gewährleistet und außerdem am Ende ein pH-Wert erreicht, der eine optimale Abtrennung der ausgefallenen, dunkelbraun gefärbten Häm-Protein-Anteile ermöglicht.

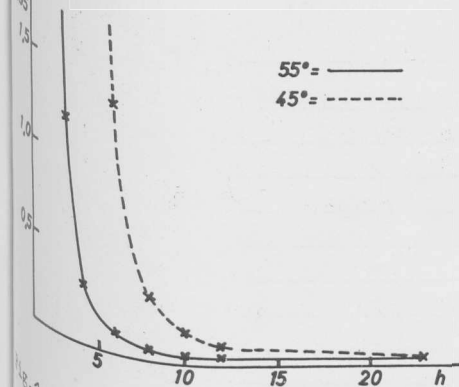


Fig. 1: Abhängigkeit der Proteolyse von der Zeit und der Temperatur.
Parameter: Farbintensität des Globinhydrolysates.
Dependence of proteolysis on time and temperature.
Parameter: Colourintensity of globinhydrolysate.

Die Geschwindigkeit der Proteolyse ist temperaturabhängig. Da die Reaktionszeit kurz gehalten werden sollte, wurden Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Als Parameter für die Reaktionsgeschwindigkeit diente die Entfärbung des nach dem Zentrifugieren überstehenden Globinhydrolysates (vgl. Fig. 1). Bei der höheren Temperatur (55°C) im Reaktionsansatz war die weitestgehende Entfärbung schon nach 5 Stunden, bei 45°C erst nach 12 Stunden erreicht. Da jedoch das Abzentrifugieren der braunen Häm-Protein-Anteile beim 55°C-Ansatz erschwert war, wurde als optimale Arbeitstemperatur 50°C gewählt.

Die verwendete Pilzproteinase S hatte bei Hämoglobin als Substrat in einer Lösung von 45°C mit einem pH von 4,8 eine Enzymaktivität von 2092 mTU je g. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Anson-Methode (1939).

Unterschiedliche Enzymaktivitäten beeinflussen bei gleicher Temperatur und gleicher Zeitdauer der Einwirkung die Rohproteinausbeute in dem Globinhydrolysat (vgl. Fig.2). Bis zu 6 mTU Pilzproteinase S je g Blutkörperchenkonzentrat wurde bei einer Steigerung der Aktivität um eine Einheit eine wesentliche Steigerung der Rohproteinausbeute im Globinhydrolysat erzielt. Darüberhinaus nahm die Ausbeutesteigerung wesentlich ab. Dementsprechend lag die optimale Aktivität der Pilzproteinase S für die hier beschriebene Reaktion bei 6 mTU (= 3 mg Enzympräparat) je g Blutkörperchenkonzentrat.

Nach der Reaktionszeit von 12 Stunden kann das klare, gelbliche Globinhydrolysat durch Zentrifugation von den ausgefallenen, braunen Häm-Protein-Anteilen abgetrennt werden. Das Globinhydrolysat enthält nach einer pH-Einstellung auf 7 mit 1 n Natronlauge ca. 0,9 % NaCl und 8 % Rohprotein. Das entspricht etwa 55 % des Rohproteins des eingesetzten Blutkörperchenkonzentrates. Das gewonnene Globinhydrolysat hat einen schwach aromatischen, bitterfreien Geschmack. Bei Trocknung dieses Hydrolysates entsteht ein weißliches Pulver mit einem Rohproteingehalt von ca. 85 %.

Zur Verwendung von Pilzproteinase S (gewonnen aus *aspergillus orycae*) für die partielle Hämoglobinspaltung beim beschriebenen Verfahren ist anzumerken, daß durch ihren Einsatz im Gegensatz zu vielen anderen geprüften Proteinase die Herstellung eines bitterfreien Globinhydrolysates erreicht werden konnte (vgl. Tab.1).

Bei unterschiedlichen Spaltungsorten gleicher Proteinmoleküle durch verschiedenartige Proteinase können mehr oder weniger große Mengen an sog. Bitterpeptiden entstehen. Nach Ney (1972) kann auf Grund der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen die Möglichkeit der Entstehung von Bitterpeptiden berechnet werden (Q-Werte: unter 1 300 keine Bitterpeptide, über 1 400 Bitterpeptide). Beim Blutkörperchenkonzentrat-Protein errechnet sich ein Q Wert von 1 380, also nahe dem Grenzwert 1 400. Durch Verwendung der Pilzproteinase S (und auch der sauren Pilzproteinase EL 25-79) wurden unter den angegebenen Reaktionsbedingungen offenbar nur solche Peptidbindungen gespalten, die nicht zur (möglichen) Bildung von Bitterpeptiden führen.

Tab.1: Geschmacksbeeinflussung von Globinhydrolysaten durch Verwendung unterschiedlicher Proteinase zur Partialsplattung
Influence on taste of globinhydrolysates by use of different peptidases for partial splitting

Proteinase	Hersteller-firma	Geschmack des Globinhydrolysates
Pepsin	Henkel	xxx
Sp 81	"	x
Sp 3	"	xx
Sp 1	"	x
AP 114	"	x
Denapsin 10 P	Nagase	x
Samprose 50	Siber Hegener	x
Saure Pilzproteinase EL 24-79	Röhm	x
" " EL 25-79	"	o
" " EL 120-79	"	x
Pilzproteinase S	"	o

xxx sehr bitter
xx bitter

x etwas bitter
o nicht bitter

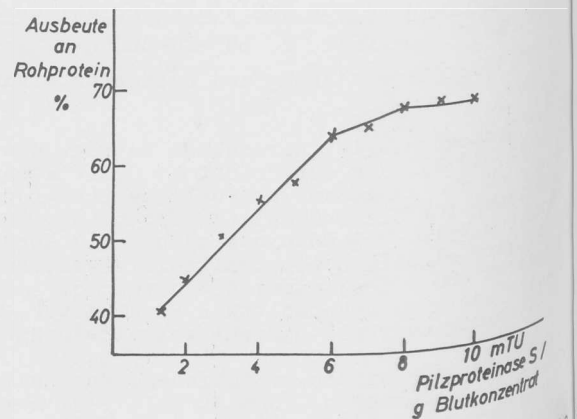


Fig.2: Abhängigkeit der Rohproteinausbeute im Globinhydrolysat von der eingesetzten Pilzproteinase S-Aktivität.

Dependence of crude protein yield in globinhydrolysate on added mycelial peptidase-activity.

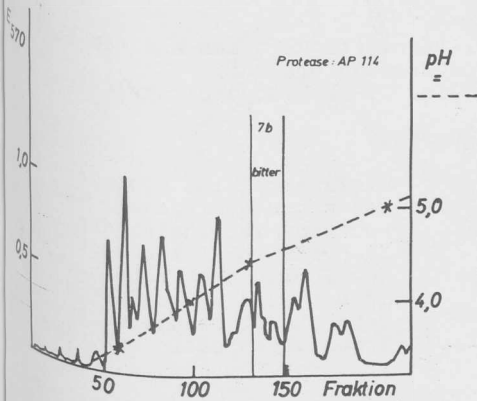


Fig. 3

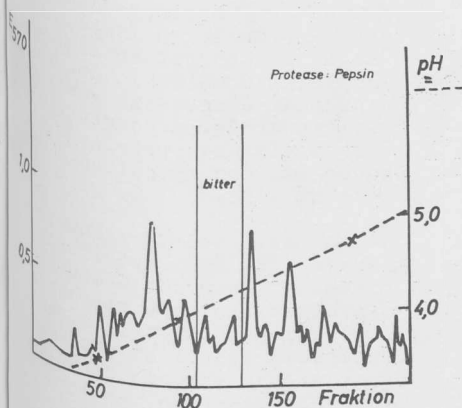


Fig. 4

Fig. 3 und 4: Gradientenelution der durch Gelfiltration aus dem Globinhydrolysat (AP 114, Pepsin) gewonnenen Bitterfraktion aus dem Ionenaustauscher Dowex 50 WX 2. Gradientenelution of bitterfraction, resulting from gelfiltration of globinhydrolysate (AP 114, pepsin), by ionexchange-resin Dowex 50 WX 2.

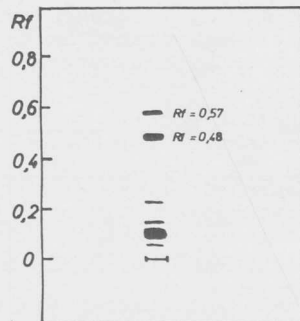
Die Unterschiede in der Hämoglobinspaltung bei Verwendung verschiedenartiger Proteinasen konnten nach Entsalzen (Biogel P₂) und Gelfiltration (Biogel P₄) durch photometrische Messungen der Eluatfraktionen bei 280 m μ ermittelt werden (Drepper und Drepper, 1981).

Die bitter schmeckenden Fraktionen der Eluate aus der Biogel P₄-Säule (nach der Globinpartialspaltung mit Pepsin und AP 114) wurden an Dowex 50 WX 2-Säulen mit einem linearen Gradienten (pH 3,1 $\rightarrow$ 5,6; Pyridiniumacetat) weiter fraktioniert. Die Aufteilung wurde durch Bestimmung der ninhydrinpositiven Substanzen (Moore, 1968) im Eluat verfolgt (vgl. Fig. 3 und 4).

Die aus dem Dowex 50 WX 2-Eluat abgetrennte 7b-Fraktion (AP 114) wurde einer zweiten Gradientenelution an Dowex 50 WX 2 beim pH 4,3 $\rightarrow$ 5,3 unterworfen und die aus dem Eluat gewonnene bitter schmeckende 7b₃-Fraktion dünn- schichtchromatographisch präparativ aufgeteilt (Kieselgel 60, n-Pentanol:Eisessig:Wasser = 60:15:25). Die R_f 0,5 zeigt nach Anfärbung des Streifens der Kieselgelplatte, daß mehrere ninhydrinpositive Substanzen voneinander getrennt wurden.

Fig. 5: Dünnschichtchromatographische Darstellung der 7b₃-Fraktion des Globinhydrolysates (AP 114)

TLC-picture of 7b₃-fraction of globinhydrolysate (AP 114).



Nach der Elution der von der Kieselgelplatte abgeschabten Streifen der R_f-Werte von 0,48 und 0,57 mit Wasser wurde das so isolierte Material auf seine Aminosäurezusammensetzung untersucht. (Wir danken Frau Dr. A.B. Holstein, München, für die Analysen). Bei der Substanz mit dem R_f-Wert von 0,57 wurden Phenylalanin und Leucin (1:1), bei der mit dem R_f-Wert von 0,48 Phenylalanin und Glutaminsäure (2:1) ermittelt. In der Sequenz des Schweinehämoglobins befindet sich in den Positionen 33/34 und 128/129 der α -Kette die Kombination Phe/Leu und in der Position 41/42/43 der β -Kette die Kombination Phe/Phe/Leu. Andere Positionen und Kombinationen von Phe:Leu (1:1) und Phe:Glu (2:1) kommen nicht vor. Bei den von der Dünnschichtplatte isolierten Substanzen kann es sich also nur um das Dipeptid Phe-Leu handeln. Daß diese Peptide, die während der Hydrolyse von Hämoglobin durch die Proteinase AP 114 gebildet wurden, einen bitteren Geschmack hervorrufen, läßt die Berechnung der Q-Werte nach Ney (1972) wahrscheinlich: Phe-Leu hat einen q-Wert von 535, Phe-Phe-Glu von 1 950. Beide liegen also weit über dem von Ney (1972) für Proteine angegebenen Grenzwert von 1 400, bei dem nach Hydrolyse ein Bittergeschmack auftreten sollte. Die Untersuchungen sollen vervollständigt werden durch Sequenzanalysen der isolierten Substanzen sowie durch dünn- schichtchromatographische und organoleptische Untersuchungen synthetischer Phe-Leu- und Phe-Phe-Glu-Peptide.

Parallel zu den Bitterpeptiduntersuchungen wurde die Proteinwertigkeit des aus dem Globinhydrolysat durch Gefriertrocknung gewonnenen Trockenproduktes untersucht. Die wahre Verdaulichkeit (Absorbierbarkeit) des Rohproteins im Globinhydrolysat betrug bei Ratten 97 %.

Die Aminosäurezusammensetzung ist in der Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung des Rohproteins im Trockenpulver des Globinhydrolysates und Aminosäurenbedarf wachsender Ratten (% des Rohproteins).
Content of amino acids in crude protein of globinhydrolysate-dry powder and amino acid requirements of growing rats (% of crude protein).

	Gehalt im Globinhydro- lysat-Rohpr.*	Bedarf wach- sender Ratten (Drepper und Weik, 1972)	Gehalt in % des Bedarfes
Arginin	3,3	5,0	66
Histidin	8,5	2,5	340
Isoleucin	0,17	5,0	3
Leucin	12,6	8,0	158
Lysin	10,2	6,0	170
Methionin + Cystein	1,5	4,5	33
Phenylalanin + Tyrosin	8,7	9,0	97
Threonin	3,1	4,0	78
Tryptophan	1,8	1,5	120
Valin	7,4	5,5	135

* Die Aminosäureanalysen wurden in den Laboratorien von Degussa-Wolfgang, Hanau, durchgeführt.

Tabelle 3: Protein Efficiency Ratio (PER) des Rohproteins im Trockenpulver des Globinhydrolysates 1)
Protein-Efficiency Ratio (PER) of crude protein in globinhydrolysate-dry powder

Rohproteinquelle	PER verd. ²⁾ u. korrigiert ³⁾
Standardrohprotein (Casein + Methionin)	2,50
Globinhydrolysat + Aminosäureenergänzung ⁴⁾	2,51
Globinhydrolysat ohne Aminosäureenergänzung	- (Futterverweigerung)

1) Halbsynthetische Diäten, 10 % Rohprotein, 10 wachsende Ratten je Gruppe, Versuchsd. 21 Tage

2) $PER \text{ verd.} = \frac{\text{Gewichtszunahme}}{\text{Aufnahme an verdaulichem Rohprotein}}$

3) Korrektur nach Campbell (1960)

4) L-Isoleucin, DL-Methionin, L-Arginin, L-Threonin

Literatur

- Anson, M.L.: J. gen. Physiol. 22, 79 - 89 (1938 - 1939)
 Brunner, M.: Übers. Tierernährung 6, 180 - 183 (1978)
 Campbell, J.A.: J. of Agric. Food Chem. 8, 323 - 327 (1960)
 Drepper, G.; K. Drepper: Fleischwirtschaft 59, 1252 - 1257 (1979)
 Drepper, G.; K. Drepper: Fleischwirtschaft 61, 30 - 33 (1981)
 Drepper, K. u. H. Weik: Versuchstierernährung, Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg, 1972
 Fretheim, K.; J. Nordal; E. Slinde: 25. Eur. Kongr. d. Fleischf. 829 - 834 (1979)
 Hald-Christensen, V.: 24. Eur. Kongr. d. Fleischf. (1978)
 Joep, E.M.; H.M. Joep; J.R.P. O'Brien: Nature, 164, 622 - 623 (1949)
 Moore, St.: J. Biol. Chem. 243, 6281 - 6283 (1968)
 Ney, K.H.: Z. Lebensmittel-Unters. u. Forschung 149, 321 - 323 (1972)
 v.d. Oord, A.H.A.; J.J. Wesdorp: 25. Eur. Kongr. d. Fleischf. 825 - 828 (1979)
 Tybor, P.T.; C.W. Dill; W.A. Landmann: J. of Food Science 38, 4 - 6 (1973)

Hinzuweisen ist besonders auf den hohen Lysingehalt des Rohproteins im Globinhydrolysat. Da Lysin in vielen menschlichen Kostformen den Proteinwert begrenzt, erscheint das Rohprotein des Globinhydrolysates als Ergänzungsprotein besonders geeignet.

Andererseits kann Globinhydrolysat, wie auch andere aus Blut gewonnene Proteinprodukte wegen des sehr geringen Isoleucingehaltes im Rohprotein kaum als Haupteisweißquelle in der Humanernährung eingesetzt werden, weil in größeren Mengen verfügbare Ergänzungspoteine mit hohen Isoleucingehalten nicht bekannt sind.

Ob im Laufe weiterer Entwicklungen z.B. über spezifische Einzeller oder durch chemische Synthesen Proteine mit hohem Isoleucingehalt oder reines L-Isoleucin reichlich zur Verfügung stehen werden, hängt wohl vom Weltbedarf ab.

In einem Fütterungsversuch an Ratten wurde geprüft, wie weit durch Aminosäureenergänzung die Wertigkeit des Rohproteins im Globinhydrolysat derjenigen eines vollwertigen Standardrohproteins angeglichen werden kann (vgl. Tab.3).

Durch Ergänzung des Globinhydrolysat-Rohproteins mit essentiellen Aminosäuren entsprechend dem Bedarf konnte also eine vollwertigkeit des Gesamtrohproteins für wachsende Ratten herbeigeführt werden.

Die z.Z. laufenden Untersuchungen mit Globinhydrolysat-Rohprotein als Ergänzungsprotein erstrecken sich auf Reis, Mais und Hirse.