

## Grundlagen zur Optimierung der Proteinzusammensetzung von Kartoffel- und Erbsenproteinhydrolysaten bezüglich der Bitterkeit und Regulation der Sättigung



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungseinrichtung(en):	Technische Universität München School of Life Sciences Forschungsdepartment Molecular Life Sciences Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik Prof. Dr. Corinna Dawid/Dr. Verena Mittermeier  Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie (LSB) an der Technischen Universität München Prof. Dr. Veronika Somoza/Michael Paul/Katrin Gradl
Industriegruppe(n):	Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP), Berlin
Projektkoordinator:	Dr. Jakob Ley Symrise AG, Holzminden
Laufzeit:	2021 – 2024
Zuwendungssumme:	€ 498.296,--

### Ausgangssituation

Pflanzenproteine sowie deren Hydrolysate werden bereits vielfältig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Aufgrund des geringeren ökologischen Fußabdrucks werden pflanzliche Proteine zunehmend tierischen Proteinen vorgezogen. Neben einem ca. 5-10-fach geringeren Energie- und Wasserverbrauch zeichnen sich pflanzliche Proteine auch durch einen ca. 80 % reduzierten Bedarf an Agrarflächen im Vergleich zu tierischen Proteinen aus. Auch in ernährungsphysiologischer Hinsicht bieten Proteine und deren Hydrolysate im Vergleich zu Kohlenhydraten und Fetten zahlreiche Vorteile: So konnte in Humanstudien gezeigt werden, dass nach isokalorischer Verabreichung einer proteinreichen Mahlzeit eine längere Sättigung induziert wird als nach Gabe anderer Makronährstoffe. Zudem führen Hydrolysate zu einer schnelleren Sättigung als intakte Proteine. Es wird vermutet, dass jene bioaktiven Peptide mit einem sättigenden Effekt im Hydrolysat bereits vorliegen und nicht erst im Verdauungstrakt freigesetzt werden müssen. In den letzten Jahren konnten mehr und mehr Peptidsequenzen aus Nahrungsproteinen identifiziert werden, die für einen sättigenden Effekt verantwortlich sind. Eine Verstärkung des Sättigungsgefühls, das zu einer verringerten Energieaufnahme führt, unterstützt damit die Erhaltung eines gesunden Körpergewichts. Angesichts der weltweit steigenden Zahlen an übergewichtigen und adipösen Menschen und den damit einhergehenden Folgeerkrankungen sind präventive Maßnahmen von großer Bedeutung für die Gesundheit der Weltbevölkerung. Ein Nachteil proteinreicher Produkte ist jedoch, dass diese oft von einem bitteren Fehlgeschmack begleitet werden, der ihren Einsatz in Abhängigkeit von der Lebensmittelapplikation einschränkt. Dieser Bittergeschmack kann zum einen von geschmacksaktiven Peptiden oder L-Aminosäuren und zum anderen von pflanzlichen Sekundärmetaboliten,

wie Saponinen und Polyphenolen, verursacht werden. Es gibt Hinweise, dass verkapselt verabreichte bitter-schmeckende Substanzen über eine Aktivierung von extra-oralen Bitterrezeptoren (TZRs) eine Sättigung in gesunden Erwachsenen induzieren. Um eine stärkere Verbraucherakzeptanz von Lebensmitteln auf Basis von Kartoffel- und Erbsenproteinhydrolysaten zu erzielen, ist es folglich erforderlich, den für pflanzliche Proteinhydrolysate typischen bitteren Geschmack soweit wie möglich zu reduzieren, ohne die positive Wirkung der Bitterstoffe auf das Sättigungsgefühl zu verlieren.

Ziel des Forschungsvorhabens ist es, die den bitteren Geschmack ursächlich prägenden Verbindungen auf molekularer Ebene zu identifizieren und zu quantifizieren.

### **Forschungsergebnis**

Im Rahmen des Projektes wurden mithilfe von vergleichenden Profilsensoren das jeweils bitterste Erbsen- oder Kartoffelproteinhydrolysat (EH5/KH4) und am wenigsten bittere Hydrolysat (EH1/KH1) innerhalb des Probensets (fünf EH und vier KH) identifiziert. Nach Quantifizierung der freien Aminosäuren sowie literaturbekannter Fettsäuren und deren Oxidationsprodukte konnte mithilfe von Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden, dass der Bittergeschmack der am wenigsten bitteren Hydrolysate (EH1/KH1) durch die bitteren Aminosäuren (Leucin, Histidin, Arginin, Tyrosin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan und Lysin) sowie Palmitinsäure und die Oxidationsprodukte 9,10,11-THOA und 9,10,13-THOA vollständig erklärt werden kann, wohingegen der Bittergeschmack für die bittersten Hydrolysate (EH5/KH4) durch weitere, noch nicht in der Literatur beschriebene Bitterstoffe hervorgerufen wird.

Um die unbekannt Bitterstoffe aufzuklären, wurde das Sensoproteomics-Konzept angewandt. Dazu wurden die bittersten und am wenigsten bitteren Hydrolysate (EH1, EH5, KH1 und KH4) mittels Ultrafiltration, anschließender Festphasenextraktion und präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie aufgetrennt. Mithilfe der Geschmacksverdünnungsanalyse (engl. *taste dilution analysis*) konnten die erhaltenen Fraktionen in deren Bitterkeit gewichtet und die nachfolgenden Analysen auf die bittersten Fraktionen fokussiert werden. Diese wurden anschließend mittels LC-TOF-MS analysiert und die enthaltenen Peptide mithilfe von Proteindatenbanken und der Software MaxQuant sequenziert. Durch Vergleich der Peptide in den bittersten und am wenigsten bitteren Hydrolysaten sowie Anwendung der beiden Bittervorhersagewerkzeuge Q-Value und iBitter-SCM konnten 17 bzw. 12 potenziell bittere Peptide in EH5 und KH4 gefunden werden. Mithilfe von *targeted* LC-MS/MS-Messungen und synthetischen Referenzpeptiden konnten diese Peptide nicht nur verifiziert, sondern auch die Bedeutung verschiedener Leucin-/Isoleucin-Varianten herausgearbeitet werden, so dass insgesamt 38 Zielpeptide ermittelt wurden.

Die humanen Schwellenwerte der 38 Zielpeptide lagen zwischen 48 und 707  $\mu\text{mol/l}$ , wobei 35 Peptide einen Bittergeschmack hervorrufen. Die Quantifizierung der Peptide mittels LC-MS/MS und die Berechnung der Dose-Over-Threshold (DoT)-Faktoren bestätigten, dass die Peptide EVY, LEPDNRIE, LLE, AIL, LTL und ITL DoT-Faktoren über eins aufwiesen und somit zum Bittergeschmack von EH5 beitragen. In KH4 tragen die Peptide EVY, PAF, AIL, LLE, LTL und ITL zum Bittergeschmack bei, wobei der größte Einfluss auf die Bitterkeit auf PAF zurückzuführen war.

Die bittersten (EH5/ KH4) und am wenigsten bitteren Erbsen- bzw. Kartoffelproteinhydrolysate (EH1/KH1) wurden einem *in-vitro* Verdau unterzogen, um anschließend die entstandenen Bitterpeptide zu identifizieren. Hierfür wurden die Peptide mittels LC-MS gemessen, mit MaxQuant identifiziert, mit Hilfe verschiedener Bittervorhersagewerkzeuge gescreent und die Bitterkeit durch humane Sensorikstudien verifiziert. Final konnten so für das bitterste Erbsenproteinhydrolysat EH5 die bitterschmeckenden Peptide YPYPR, YNDQDTPVI und ALEPDN identifiziert werden, für das weniger bittere Erbsenproteinhydrolysat EH1 wurden die Peptide EELEK, VPE und EWR nach dem *in vitro* Verdau nachgewiesen. Für die Kartoffelproteinhydrolysate konnten die Peptide GWPY-EPF, DKDFLPF aus dem weniger bitteren KH1 als bitter identifiziert werden, für das stärker bitter schmeckende KH4 wurden die Bitterpeptide EPWWPEM, VNDEKDFIPF nachgewiesen.

Anschließend wurden diese Peptide auf ihren Einfluss auf die gastrische Protonensekretion als Hauptmechanismus der für Verdauungsvorgänge essenziellen Magensäuresekretion, sowie deren Wirkung auf die zelluläre

Sekretion von Serotonin als zelluläres und systemisches Sättigungssignal in humanen Parietalzellen (HGT-1 Zellen) getestet. Alle sechs Peptide aus den Erbsenproteinhydrolysaten stimulierten in ähnlicher Weise die zelluläre Protonensekretion über funktionelle Beteiligung von den Bitterrezeptoren TAS2R4 und TAS2R43. Im Gegensatz dazu war die Freisetzung des Sättigungshormons Serotonin (ELISA) in HGT-1-Zellen bei gleichen Konzentrationen signifikant höher nach Inkubation mit den Peptiden aus dem weniger bitter schmeckenden Erbsenproteinhydrolysat EH1 EELEK, VPE und EWR gegenüber den Peptiden aus EH5 YPYPR, YNDQDTPVI und AL-EPDN. Auch hier konnte eine funktionelle Beteiligung der beiden Bitterrezeptoren TAS2R4 und TAS2R43 nachgewiesen werden.

Bei den Experimenten zur Untersuchung des Sättigungspotentials von Kartoffelproteinhydrolysaten (KHs) zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Auch hier induzierten die Bitterpeptide aus dem weniger bitter schmeckendem KH1 eine stärkere Freisetzung von Serotonin als die Peptide aus dem stärker bitter schmeckendem KH4.

Mit den Erbsenproteinhydrolysaten EH1 und EH5 wurde anschließend eine vergleichende, einfach verblindete, randomisierte humane Interventionsstudie mit männlichen, leicht übergewichtigen Männern durchgeführt. Neunzehn Teilnehmer aus insgesamt 23 gescreenten Probanden wurden in die Studie eingeschlossen und absolvierten alle drei, auf unterschiedliche Tage verteilte, Interventionen (Kontrolle, weniger bitter schmeckendes, stärker hydrolysiertes EH1 und stärker bitter schmeckendes, weniger hydrolysiertes EH5), bei denen Messungen zur Magenentleerung, Untersuchung des Hungergefühls und der Blutplasmakonzentrationen von Glucose, Insulin, GLP-1, DPP-4, Ghrelin, CCK, und Serotonin als Sättigungsindikatoren durchgeführt wurden. Ein erhöhtes Hungergefühl nach Kontrollintervention wurde durch die Gabe von EH1 und EH5 verhindert, während sich keine Unterschiede in der Energieaufnahme zeigten. Beim Vergleich der Wirkung des weniger bitter schmeckenden, stärker hydrolysierten EH1 mit dem stärker bitter schmeckenden, weniger hydrolysierten EH5 konnten keine Unterschiede für die Parameter Glucose, Insulin, GLP-1, Ghrelin und CCK detektiert werden. Jedoch konnten für DPP-IV verringerte Plasmakonzentration 120 min nach Gabe von EH1 im Vergleich zu EH5 gemessen werden. Ein verringerte DPP-IV Spiegel weist auf eine länger anhaltende Sättigung hin. Für das Sättigungshormon Serotonin konnten erhöhte Plasmakonzentration nach Verabreichung von EH1 ermittelt werden. Dies deutet ebenso auf ein verstärktes Sättigungsgefühl hin. Die Untersuchung der Magenentleerung zeigte eine verlangsamte Magenentleerung nach Intervention mit dem stärker bitter schmeckenden, weniger hydrolysierten EH5 im Vergleich zu EH1. Eine verlangsamte Magenentleerung führt zu einem länger anhaltenden Völlegefühl und somit zu einer länger anhaltenden Sättigung. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass beide Erbsenproteinhydrolysate einen positiven Einfluss auf das Sättigungsgefühl ausübten. Zum einen zeigte das weniger bitter schmeckende, stärker hydrolysierte EH1 einen stärkeren Einfluss auf die Sättigungshormone im Blut. Dies könnte daran liegen, dass EH1 stärker hydrolysiert ist und daher bioaktive Peptide schneller ins Blut übergehen können, da diese nicht erst im Zuge des gastrischen Verdaus im Magen gebildet werden. Wohingegen das stärker bitter schmeckende, weniger hydrolysierte EH5 einen stärkeren Einfluss auf die Magenentleerung ausübte, was an dem niedrigeren Hydrolysegrad liegen könnte. Dies Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit von Designerproteinen in der Lebensmittelindustrie auf. Für zukünftige Proteinhydrolysat-Produkte sollten vermehrt Hydrolyste ausgewählt werden, welche zusätzlich zur verlangsamten Magenentleerung auch bioaktive Peptide enthalten, die verstärkt Sättigungshormone ins Blut freisetzen.

### **Wirtschaftliche Bedeutung**

Vegetarische und vegane Lebensmittel gewinnen zunehmend an Bedeutung. Die pflanzenbasierte Lebensmittelindustrie ist von 2018 bis 2020 in Europa um 49% gewachsen (SMART PROTEIN Bericht). Der globale Markt für funktionelle Proteine soll von 2024 bis 2032 um durchschnittlich 14,8% jährlich steigen (Bericht-ID: FBI102458). Dieser stetig wachsende Markt bietet ein enormes Potential für den Einsatz hochwertiger pflanzlicher Proteine, die die Wünsche der Konsumenten nach natürlichen und GMO-freien Produkten erfüllen. Pflanzenbasierte Lebensmittel sind ernährungsphysiologisch vorteilhaft, da sie nur geringe Mengen an gesättigten Fettsäuren enthalten und einen hohen Gehalt an Ballaststoffen sowie sekundären

Pflanzeninhaltsstoffen aufweisen. Die Nutzung von Kartoffel- und Erbsenproteinhydrolysaten kann den Weg für neue Lebensmittelanwendungen ebnen.

Kartoffel- und Erbsenproteinhydrolysate sind von wirtschaftlicher Bedeutung, weil sie aus Nebenströmen gewonnen werden können, die bislang nur im Tierfutterbereich verwendet werden. Zusätzlich sind Kartoffeln und Erbsen regionale Pflanzen und können somit klimaneutraler angebaut werden als beispielsweise Soja. Während der handelsübliche Preis für Proteine, die zu Futterzwecken eingesetzt werden, derzeit bei 2,5 - 3,0 US-Dollar pro kg liegt, wird für Lebensmittelproteine ein Preis von ca. 30 - 50 US-Dollar pro kg Molken- oder Kartoffelprotein erzielt. Kartoffelprotein wird aus Kartoffelfruchtwasser isoliert, das als Nebenstromprodukt bei der Kartoffelstärkegewinnung anfällt (ca. 5 - 12 m<sup>3</sup> pro Tonne Kartoffelstärke). Mit einem Proteingehalt von 30 - 41 % Protein hat Kartoffelfruchtwasser einen höheren Proteingehalt als Molke (ca. 6 g/l). Auch Erbsen sind mit ca. 25 % Protein proteinreich und werden bisher ebenfalls vorwiegend im Tierfuttersektor eingesetzt.

Die erzielten Ergebnisse eröffnen insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen die Möglichkeit, sich mit neuen, pflanzenbasierten Produkten im Markt zu etablieren. Zudem können heimische Pflanzenproteine durch die molekular-sensorische Optimierung zukünftig ein deutlich höheres Wertschöpfungspotential erfahren.

### **Publikationen**

---

1. FEI-Schlussbericht 2024

### **Weiteres Informationsmaterial**

---

Technische Universität München  
School of Life Sciences  
Forschungsdepartment Molecular Life Sciences  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik  
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2901  
Fax: +49 8191 71-2949  
E-Mail: corinna.dawid@tum.de

Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie (LSB)  
an der Technischen Universität München  
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2700  
Fax: +49 8161 71-2970  
E-Mail: v.somoza.leibniz-lsb@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

### **Förderhinweis**

---

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

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © ExQuisine - Fotolia.com #157565738

Stand: 7. Oktober 2024