



AMINOMAX - Steigerung der Aminosäureausbeute im Konzept der grünen Bioraffinerie

von *Viktoria Leitner und Horst Steinmüller*

ENERGIE INFORMATION

Über den Prozess der Photosynthese wird etwa 1 % der eintreffenden Strahlung in Biomasse umgewandelt. Diese von der Natur vollbrachte Syntheseleistung kann vom Menschen vielfältig genutzt werden. Neben der Nahrungsmittelproduktion kann Biomasse sowohl energetisch als auch stofflich verwertet werden. Vor allem die stoffliche Verwertung spielt zukünftig in einer nachhaltigen Gesellschaft eine wichtige Rolle. In sogenannten Bioraffinerien werden aus nachwachsenden Rohstoffen Wertstoffe und Energie gewonnen. In der grünen Bioraffinerie, die in einer früheren Ausgabe des Energie Info (Ausgabe 02/2009) bereits ausführlich vorgestellt wurde, können aus dem Rohstoff Grassilage die Produkte Milchsäure, Aminosäuren, Zucker und Sulfate gewonnen werden. Dafür wird Silage abgepresst und aus dem Saft die genannten Wertstoffe abgetrennt. Wertvollstes Produkt sind die Aminosäuren, für die im bestehenden Prozess Optimierungspotential identifiziert wurden. Nur etwa 30 % des Proteins wird während der Silierung in Aminosäuren, die im Saft in Lösung gehen, abgebaut. Eine Verbesserung des Aminosäurewirkungsgrades in der grünen Bioraffinerie wurde im Sondierungsprojekt AMINOMX untersucht.

In sogenannten Bioraffinerien werden aus nachwachsenden Rohstoffen Wertstoffe und Energie gewonnen. In der grünen Bioraffinerie, die in einer früheren Ausgabe des Energie Info (Ausgabe 02/2009) bereits ausführlich vorgestellt wurde, können aus dem Rohstoff Grassilage die Produkte Milchsäure, Aminosäuren, Zucker und Sulfate gewonnen werden. Dafür wird Silage abgepresst und aus dem Saft die genannten Wertstoffe abgetrennt. Wertvollstes Produkt sind die Aminosäuren, für die im bestehenden Prozess Optimierungspotential identifiziert wurden. Nur etwa 30 % des Proteins wird während der Silierung in Aminosäuren, die im Saft in Lösung gehen, abgebaut. Eine Verbesserung des Aminosäurewirkungsgrades in der grünen Bioraffinerie wurde im Sondierungsprojekt AMINOMX untersucht.

AMINOMAX – Steigerung der Aminosäureausbeute im Konzept der grünen Bioraffinerie durch biotechnologische und verfahrenstechnische Maßnahmen

Förderprogramm

Produktion der Zukunft



Projektleitung

Energieinstitut an der JKU Linz

Projektpartner

Joanneum Research

Projekthalt

Das Projekt AMINOMAX verfolgt die Strategie der Steigerung der Attraktivität des Konzeptes der Grünen Bioraffinerie durch Erhöhung der Ausbeute von Aminosäuren aus Grassilage sowie die Optimierung des Aminosäurespektrums durch den Einsatz von sauren Proteasen verbunden mit neuen Prozessen zur Fest/Flüssigtrennung.

Im Rahmen eines Sondierungsprojektes wurde der Einsatz kommerziell erhältlicher Proteasen und alternativer Presskonzepte untersucht.

Warum eine grüne Bioraffinerie?

Die grüne Bioraffinerie bezeichnet eine kombinierte stoffliche und energetische Nutzung von Grünlandbiomasse. Dabei können verschiedene Verwertungskonzepte unterschieden werden, welche auf die Gewinnung unterschiedlicher Produkte abzielen.

Grünland wird heute vorwiegend für die Nutztierhaltung verwendet. In Österreich ist allerdings ein stetiger Rückgang des Rinderbestandes zu beobachten. Ob der Wegfall der Mutterkuhprämie seit dem Jahr 2015 und das Ende der Milchquote mit April 2015 einen signifikanten Einfluss auf diese Entwicklung nehmen werden, gilt es zu beobachten. Ein Rückgang im Rinderbestand ohne alternative Nutzungsformen des Grünlandes hat in vielen Fällen eine Verwaldung oder auch eine Versiegelung dieser Flächen zur Folge. Um Grünland als Kulturlandschaft erhalten zu können, bedarf es regelmäßiger Pflegeschritte, was wiederum mit Kosten verbunden ist. Diesem Aufwand müssen für einen wirtschaftlichen Betrieb Erträge gegenüber gestellt werden. Dies kann durch Förderungen oder die Schaffung neuer Märkte erfolgen. Die Entwicklungen im Bereich der grünen Bioraffinerie sollen diese alternative Verwertungsmöglichkeit schaffen.

Die vom Energieinstitut mitentwickelte Technologie der grünen Bioraffinerie zur Gewinnung von Milchsäure, Aminosäuren, Zucker und Sulfaten ist nur eine Möglichkeit der Verwertung von Grünland. Das wertvollste Produkt ist der Wertstoff Aminosäure.

Die Bedeutung von Aminosäuren

Aminosäuren sind die Grundbausteine von Proteinen und wesentlicher Bestandteil von Stoffwechselprozessen. Autotrophe Organismen wie Pflanzen sind in der Regel fähig, alle notwendigen Aminosäuren selbst aufzubauen. Heterotrophe Organismen, wie auch der Mensch, können nur einen Teil der notwendi-

gen Aminosäuren selbst synthetisieren und sind auf die Zufuhr essentieller Aminosäuren durch die Nahrung angewiesen. Proteine und somit auch Aminosäuren sind sowohl in pflanzlichen wie auch in tierischen Lebensmitteln zu finden. Neben der allgemeinen Notwendigkeit der Aufnahme von Aminosäuren lassen sich im Bereich Ernährung auch Spezialanwendungen von Einzelaminosäuren oder Aminosäuregemischen identifizieren. So sind am Markt zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel zu finden.

Auch abseits der Lebensmittelbranche finden Aminosäuren spezialisierte Anwendung. Vor allem in der Kosmetikindustrie und als biologischer Dünger werden diese eingesetzt. Als Düngemittel fördern sie die Aufnahme und den Transport von Nährstoffen und sind besonders hilfreich in Stresssituationen wie bei Trockenheit und Kälte.

Aminosäuren in der grünen Bioraffinerie

Aminosäuren sind in der grünen Bioraffinerie einer der gewinnbaren Wertstoffe. Sie entstehen während der Silierung durch den Abbau des in der Pflanze enthaltenen Proteins. Mikroorganismen führen während der Silierung zu einem partiellen Abbau der Biomasse. Die durch den Abbau der Kohlenhydrate entstehenden Säuren führen zu einer Absenkung des pH-Wertes auf unter pH 4 und dadurch zu einer Hemmung der meisten biologischen Prozesse. Es kommt dadurch zu einer natürlichen Konservierung des Rohstoffes. Auch der Proteinabbau wird durch den sinkenden pH-Wert gestoppt.

Für den Abbau der Proteine sind spezielle Enzyme sogenannte Proteasen zuständig. In der Natur gibt es Enzyme, welche auch bei sehr niedrigen pH-Werten noch eine Wirkung auf das Protein haben. Diese Enzyme werden als saure Proteasen bezeichnet. Im Projekt Aminomax wurde die mögliche Ausbeutesteigerung durch den Einsatz saurer Proteasen untersucht.

Proteasen – vom Protein zur Aminosäure

Um den Inhalt und die Ergebnisse des Projektes besser verstehen zu können, soll an dieser Stelle die Wirkungsweise von Proteasen etwas detaillierter beschrieben werden.

Bindungen zwischen Aminosäuren zur Bildung von Proteinen (Peptidbindung) sind sehr vielfältig und können nur von spezialisierten Enzymen wieder zerstört werden. Der Aufbau und die Wirkungsweise von Proteasen sind daher sehr komplex.

Am wichtigsten ist die Unterscheidung in sogenannte Endo- und Exoproteasen. Endoproteasen wirken relativ unspezifisch und schneiden die Peptidbindungen in der Mitte von Molekülen und bilden dadurch Bruchstücke von Proteinen.

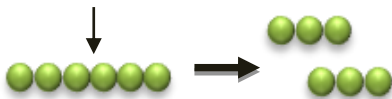


Abbildung 1 schematische Darstellung Endoprotease

Quelle: eigene Darstellung

Exoproteasen schneiden am Ende des Moleküls einzelne Aminosäuren oder Gruppen von 2-3 Aminosäuren ab. Diese Exoproteasen sind sehr spezifisch und komplexe Proteine benötigen für einen vollständigen Abbau daher eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme.



Abbildung 2 schematische Darstellung Exoprotease

Quelle: eigene Darstellung

Der Abbau von Enzymen findet sowohl innerhalb wie auch außerhalb von Zellen statt, wobei die Weiterverarbeitung der Aminosäuren in jeden Fall in der Zelle erfolgt [1]. Dabei gilt zu beachten, dass intakte Proteine zu groß sind, um die Zellwand passieren zu können. Sie müssen vor der Aufnahme in die Zelle vorverdaut werden.

Bei Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen wird diese Aufgabe von extrazellulären Enzymen übernommen und die Aminosäuren und Proteinbruchstücke werden über Membrantransporter in die Zelle eingeschleust.

Bei höheren Lebewesen wie auch dem Menschen erfolgt der Proteinabbau im Verdauungstrakt wobei Endoproteasen vor allem im Magen und Exoproteasen im Dünndarm wirken [2].

Der industrielle Einsatz von Proteasen

Proteasen sind die weltweit meist produzierten Enzyme [3]. Die Einsatzmöglichkeiten und dadurch auch die Anforderungen an das Enzym sind vielfältig [4]. Kommerziell erhältliche Proteasen unterscheiden sich im pH-Optimum. Man spricht daher von basischen, neutralen und sauren Proteasen.

Die im Projekt eingesetzten Proteasen waren kommerziell erhältliche Proteasen. Diese Proteasen werden als extrazelluläre Enzyme durch Fermentation aus Mikroorganismen gewonnen.

Klassische Einsatzgebiete von Proteasen sind in der Waschmittelindustrie, in der Lederverarbeitung und im Lebensmittelsektor [5]. Im Bereich Lebensmittel kann man den Einsatz in der Milchindustrie, in der Backwarenindustrie, in der Getränkeindustrie und in der Herstellung antiallergener Lebensmittel unterscheiden. Bei der Herstellung von Nahrungsmitteln ist darauf zu achten, dass bestimmte Aminosäuren zu einem unerwünschten bitteren Geschmack im Produkt führen, weshalb Proteinbruchstücke (Polipeptide) als Endprodukt freien Aminosäuren in vielen Fällen vorgezogen werden. So ist für die Herstellung von antiallergenen Milchprodukten zum Beispiel eine Peptidgröße kleiner 10 kDa ausreichend [6]. Ziel ist daher die Verkleinerung des Moleküls unter diesen Grenzwert ohne die Generierung freier Aminosäuren und eines bitteren Geschmacks.

Aminomax – Ausgewählte Ergebnisse

Als erster wichtiger Schritt im Projekt wurde eine Stickstoffbilanz des Prozesses erstellt. Dabei galt es zu identifizieren was mit dem Grasprotein durch die Silierung passiert und wo im Prozess das größte ungenutzte Proteinpotential liegt.

allen Versuchen nur eine geringe bis keine Steigerung der freien Aminosäuren ermittelt werden. Dabei wurden unterschiedliche Enzyme bei unterschiedlichen Prozessbedingungen untersucht.

Um die Wirkungsweise der Enzyme genauer zu untersuchen wurde neben Grassilage auch



Silage

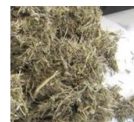
FM	1000 g
N _{ges}	9,7 g
Protein	61 g
AS	18 g

FM ... Frischmasse
AS ... Gemisch an freien Aminosäuren



Silagesaft

FM	560 g
N _{ges}	3,3 g
Protein	20 g
AS	10-12 g



Presskuchen

FM	440 g
N _{ges}	6,4 g
Protein	40 g
AS	5-7 g

Abbildung 3 Stickstoffbilanz von Grassilage und seinen Fraktionen

Quelle: eigene Laborversuche

Abbildung 3 zeigt die durch eigene Laborversuche ermittelte Bilanz. Für die Erstellung wurde im Labor aus Grünschnitt Grassilage hergestellt und mittels Laborpresse in eine Flüssig- und eine Festfraktion getrennt. Von den Fraktionen wurde der Stickstoffgehalt mittels der Methode nach Dumas bestimmt und der Proteingehalt mittels Proteinrechnungsfaktor von 6,25 ermittelt. Der Anteil freier Aminosäuren wurde mittels Chromatografie bestimmt. Erkennbar ist, dass im Saft nur etwa 50 % des Proteins als freie Aminosäuren vorliegen. Deutlich mehr Protein verbleibt im Presskuchen, sodass in diesem das größte Potential für eine Ausbeutesteigerung vorhanden ist.

In Laborversuchen wurde Enzym zu allen drei Fraktionen (Silage, Saft, Kuchen) beigemischt und die Ausbeutesteigerung an freien Aminosäuren bestimmt. Für Grassilage konnte in

die Wirkung auf andere Rohstoffe untersucht. So wurde zum Beispiel Molkeproteinpulver (WPC 80 Firma ProLactal) als Proteinquelle eingesetzt. Bei diesen Rohstoffen konnte zwar eine Wirkungsweise der Enzyme nachgewiesen werden, allerdings war der Anteil an hydrolysierten Protein begrenzt. Der Proteinabbaugrad des Molkeproteinpulvers entsprach nach enzymatischer Behandlung in etwa dem Abbaugrad wie er auch durch Silierung erreicht werden kann.

Eine Hydrolyse mit Chemikalien statt Enzymen, welche zum Vergleich durchgeführt wurde, zeigte eine 80 % Ausbeute des vorhandenen Proteinpotentials als freie Aminosäuren.

Da die eingesetzten Enzyme eine hohe Endopeptidase Aktivität aufweisen, wurde im Labor untersucht, ob der Einsatz von Enzymen zu einer Verkleinerung der Proteine führt.

Dies könnte vor allem beim Einsatz des Produktes als Dünger von Interesse sein, da kleinere Proteinbruchstücke schneller von der Pflanze aufgenommen werden und der Düngewert dadurch erhöht wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Enzyme auch keinen Einfluss auf die Größe der Proteine haben und Proteine im Saft bereits ein Molekulargewicht kleiner 3 kDa aufweisen.

Fazit

Für Grassilage konnte im Gegensatz zur sauren Hydrolyse kein positiver Einfluss kommerziell erhältlicher Proteasen nachgewiesen werden.

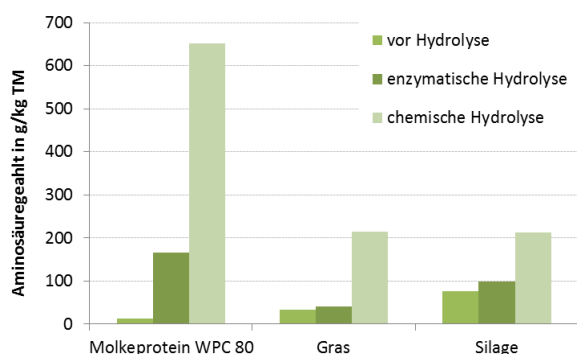


Abbildung 4 Vergleich enzymatische und chemische Hydrolyse

Quelle: eigene Laborversuche

Die Komplexität der enthaltenen Enzyme scheint für eine totale Proteolyse nicht ausreichend zu sein. Für eine Ausbeutesteigerung der freien Aminosäuren bedarf es der Entwicklung eines spezifischen Enzymmixes.

Literatur

- [1] Shah F, Rineau F, Canbäck B, Johansson T, Tunlid A; The molecular components of the extracellular protein-degradation pathways of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*, *New Phytologist* (2013) 200:875–887
- [2] Löffler, Petrides; *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage (2003) http://wwwalt.med-rz.uni-sb.de/med_fak/biochemie/Proteine.pdf
- [3] Woods R, Burger C, Bevan M, Beacham I; Extracellular enzyme production in *Pseudomonas fluorescens*, *J. Microbiology* 2001, 143: 345-354
- [4] Tremacoldi C.R, Watanabe N.K, Carmona E.C; Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*, *Wld. J. Microbiol. Biotechnology* 2004, 20: 639-642
- [5] Rao M. B, Tanksale A. M, Ghatge M. S, Deshpande V. V; Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62(3):597
- [6] Kreft D; Bauer R, Goerlich R; *Nahrungsmittelallergene: Charakteristika und Wirkungsweisen*, Berlin 1995

Die AutorInnen:

Viktoria Leitner ist wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung Energietechnik des Energieinstituts an der Johannes Kepler Universität Linz. Dr. Horst Steinmüller ist Geschäftsführer des Energieinstitutes an der Johannes Kepler Universität Linz und Leiter der Abteilung Energietechnik.

Gerne stehen die AutorInnen für Rückfragen und Anregungen zur Verfügung.

Tel: +43 (0)732 2468 5671

E-Mail: leitner@energieinstitut-linz.at

Neue Herausforderungen brauchen neue Herangehensweisen mit oft bekannten Instrumenten



Besuchen Sie uns auf unserer Homepage und informieren Sie sich über die neuesten Projekte:

www.energieinstitut-linz.at

Medieninhaber und Herausgeber:

ENERGIEINSTITUT AN DER JOHANNES KEPLER UNIVERSITÄT LINZ

Altenberger Straße 69, A-4040 Linz

Tel: +43-732-2468-5656 / Fax: DW 5651 / office@energieinstitut-linz.at / www.energieinstitut-linz.at

Offenlegung gem. § 25 MedienG abrufbar unter http://www.energieinstitut-linz.at/p_impresum.asp