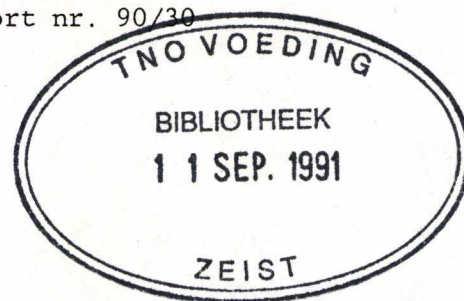


664.3 : 66.063.6

INDUSTRIËLE EIWITTEN

NRLO-rapport nr. 90/30



Verslag van het symposium "Industriële Eiwitten", gehouden op 19 september 1990 te Ede, georganiseerd door een werkgroep ad hoc bestaande uit: Prof.Dr.Ir. P. Walstra (voorzitter), Drs. J.W. van der Kamp (secretaris), Dr. W.IJ. Aalbersberg, Dr. J. Vereijken, Dr. G. Pol en Prof.Dr. B. Witholt, later uitgebreid met Dr. W. Nieuwenhuizen.

Nationale Raad voor
Landbouwkundig Onderzoek
Postbus 20401
2500 EK 's-Gravenhage
tel.: 070 - 3793653/3793654

INHOUD

Programma

<u>Verslag</u>	blz.
- Samenvatting van de openingstoespraak	1
- Samenvattingen van de voordrachten	2
- Samenvatting van de slotdiscussie en slotconclusies	7

Voordrachten

- <u>Drs.W.C. Bus</u> (stuurgroep IOP) Openingstoespraak.	bijlage 1
- <u>Dr.Ir.A.C.M. van Hooydonk</u> (Campina-Melkunie) Toepassingen van melkeiwitten voor emulgering en schuimvorming.	bijlage 2
- <u>Dr.A.C. Juriaanse</u> (Unilever Research) Textuurbepalende eiwitten in voedingsmiddelen.	bijlage 3
- <u>Drs.H. Hokse</u> (AVEBE) Aardappeleiwit: huidige en toekomstige afzet- mogelijkheden.	bijlage 4
- <u>Dr.G. Wijgaards</u> (CIVO-TNO) Binding van vlees met een enzymatisch gevormde eiwitgel.	bijlage 5
- <u>Dr.J. Vereijken</u> (ATO) Chemische modificatie van plantaardige eiwitten.	bijlage 6
- <u>Dr.R.J. Siezen</u> (NIZO) Enzymatische modificatie van melkeiwitten.	bijlage 7
- <u>Dr.R.J. Hamer</u> (IGMB-TNO) Eiwitdenaturatie: fundamentele en toepassings- gerichte aspecten.	bijlage 8
- <u>Prof.Dr.Ir.P. Walstra</u> (LUW) Funktionele eigenschappen van eiwitten bij industriële toepassingen.	bijlage 9
- <u>Dr.Ir.W. Norde</u> (LUW) Eiwitten aan grensvlakken.	bijlage 10
- <u>Prof.Dr.J. Drenth</u> (Chemie Consult Groningen) Moleculaire structuur van eiwitten.	bijlage 11

Deelnemerslijst



Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek

SYMPOSIUM INDUSTRIËLE EIWITTEN

Fundamenteel en toepassingsgericht onderzoek

19 september 1990, De Reehorst, Ede

PROGRAMMA

Ochtendsessie, voorzitter Prof.Dr.Ir. P. Walstra (LU Wageningen).

9.15 uur	Ontvangst, koffie.	
9.40 uur	Drs. W.C. Bus Stuurgroep IOP	Opening.
9.45 uur	Dr.Ir. A.C.M. van Hooydonk DMV Campina	Toepassingen van melkeiwitten voor emulgering en schuimvorming.
10.05 uur	Dr. A.C. Juriaanse Unilever Research	Textuurbepalende eiwitten in voedingsmiddelen.
10.25 uur	Drs. H. Hokse AVEBE	Aardappeleiwit, huidige en toekomstige afzetmogelijkheden.
10.45 uur	Dr. G. Wijngaards CIVO-TNO	Binding van vlees met een enzymatisch gevormde eiwit gel.
11.05 uur	Koffiepauze.	
11.30 uur	Dr. J. Vereijken ATO	Chemische modificatie van plantaardige eiwitten.
11.50 uur	Dr. R.J. Siezen NIZO	Enzymatische modificatie van melkeiwitten.
12.10 uur	Dr. R.J. Hamer IGMB-TNO	Eiwitdenaturatie, fundamentele en toepassingsgerichte aspecten.
12.30 uur	LUNCH	

Middagssessie, voorzitter: Prof.Dr. B. Witholt (RU Groningen).

13.45 uur	Prof.Dr.Ir. P. Walstra LU Wageningen	Funktionele eigenschappen van eiwitten bij industriële toepassingen.
14.25 uur	Prof.Dr. J. Lyklema Dr.Ir. W. Norde LU Wageningen	Eiwitten aan grensvlakken.
15.10 uur	Theepauze.	
15.30 uur	Prof.Dr. J. Drenth RU Groningen	Moleculaire structuur van eiwitten.
16.10 uur	Algemene discussie.	
16.40 uur	Prof.Dr. B. Witholt	Slotwoord.
16.50 uur	EINDE.	

VERSLAG VAN HET SYMPOSIUM "INDUSTRIËLE EWITTEN"

19 SEPTEMBER 1990

Samenvatting van de openingstoespraak

Het symposium industriële eiwitten werd geopend door de heer Bus van de stuurgroep IOP. Hij schetste de aanleiding van het symposium. Een aantal jaren geleden is er een door de NRLO ondersteunde studie uitgevoerd naar de wenselijkheid van een Innovatie-gericht Onderzoek Programma-eiwitten (IOP-e). Bij een IOP gaat het om de ontwikkeling van wetenschappelijke achtergrondkennis, gericht op industriële toepassingsmogelijkheden; onderzoek dat leidt naar duurzame samenwerking tussen onderzoeksinstituten en bedrijfsleven. Het moet een strategisch programma zijn, kansen bieden op innovatie, multidisciplinair van opzet zijn en een behoorlijke uitstraling hebben.

Deze wenselijkheidsstudie heeft geleid tot een rapport dat door het CIVI in opdracht van de stuurgroep IOP is samengesteld.

Ondanks de positieve toon van dit rapport heeft de stuurgroep besloten dat er vooralsnog onvoldoende argumenten aangevoerd waren om tot de opstelling van financiering van een IOP-eiwitten te komen. Hoewel er ruim voldoende industriële belangstelling is voor zo'n programma, schijnt de interesse van de universiteiten gering en er is dan ook nauwelijks fundamentele expertise op dit werkgebied. Op het gebied van het eiwitonderzoek gaapt er een kloof tussen industrie en wetenschap.

Hierop is een van de adviserende leden van de stuurgroep in overleg getreden met het ministerie van LNV om na te gaan of nadere informatie en verduidelijking tot nieuwe en aangepaste ideeën zou kunnen leiden, inzake programma en financiering.

In het kader van deze verdere verkenning is dit symposium georganiseerd. Het symposium moet aangeven of er een draagvlak voor een IOP-eiwitten is en een aanzet geven tot het opstellen van een dergelijk onderzoeksprogramma.

Samenvattingen van de gehouden voordrachten

- De heer Van Hooydonk van Campina-Melkunie besprak de toepassingen van melkeiwitten voor emulgering en schuimvorming. Hij stelde vast dat er geen voedingseiwit is waar zoveel van bekend is als melkeiwit. Ondanks deze kennis is de produktontwikkelaar veelal veroordeeld tot een "trial and error" aanpak bij het formuleren van levensmiddelen.

Als voorbeelden van applicaties van melkeiwitten gaf hij het gebruik van caseinaat bij de bereiding van knakworst en het gebruik van melkeiwit bij de bereiding en stabilisering van olie-in-water emulsies en toppings en het gebruik van een combinatie van gehydrolyseerd caseinaat en hitte-gelerend wei-eiwit bij de bereiding van meringues (schuimpjes).

Een nieuw aandachtsgebied vormen melkeiwitfracties met specifieke fysiologische functies. In Japan en de Verenigde Staten wordt hieraan al veel onderzoek verricht. Op dit terrein is er behoefte aan ondersteuning door fundamenteel onderzoek.

Van Hooydonk concludeerde onder andere dat het formuleren van nieuwe levensmiddelen meer kunst is dan wetenschap; maar ook, dat hoe beter de wetenschap is, des te beter de kunst wordt.

- De heer Juriaanse van Unilever Research lichtte zijn voordracht over textuurbepalende eiwitten in voedingsmiddelen toe met als voorbeeld de co-extrusie van collageen voor de

"velvorming" tijdens de bereiding van rookworst. Evenals zijn voorganger stelde hij dat dat de veelheid aan wetenschappelijke kennis van collageen moeilijk te vertalen is naar proces- en produkteigenschappen, met name omdat kinetische studies ontbreken.

Tijdens het proces komt de worst als een lang snoer uit de extruder en wordt ze op de gewenste lengte afgepast. Vervolgens gaat de worst door een loogbad om het collageen neer te slaan. De worsten worden vervolgens voorgedroogd, behandeld met 'vloeibare rook', waardoor het collageen gecrosslinkt wordt, en nagedroogd. Hierna kan het worstje elke gewenste verdere behandeling ondergaan.

Tijdens het proces spelen vele aspecten een rol, zoals: de homogeniteit van het collageen, de geleerkinetiek, het effect van ionen en temperatuur daarop, en het krimpgedrag. Vooral de kinetiek vergt nadere studie.

De voordracht werd besloten met een video-presentatie van het proces.

- De heer Hokse van AVEBE besprak de huidige en toekomstige afzetmogelijkheden van aardappeleiwit. Aardappeleiwit is een bijprodukt van de aardappelzetmeelindustrie. AVEBE produceert jaarlijk ongeveer 30.000 ton, dat grotendeels aan de veevoederindustrie verkocht wordt. Het eiwit wordt via een hitte-coagulatiestap afgescheiden uit de processtroom. Het gewonnen eiwit is onoplosbaar: dit is een nadeel, omdat bij toepassing als functioneel eiwit veelal een oplosbaar eiwit noodzakelijk is. De mogelijkheden om aardappeleiwit te gebruiken als coating-bindmiddel in papier, schuimmiddel in schuimbeton en steltmateriaal in doorschrijfpapier zijn reeds onderzocht, maar leidden nog niet tot toepassingen.

Het eiwit heeft vergeleken met soya, vismeel en melkeiwit een goede aminozuursamenstelling. Er zijn mogelijkheden om het eiwit toe te passen in menselijke voeding, maar vooralsnog zijn het hoge gehalte aan glycoalkaloiden (solanine), die tijdens het proces in de eiwitfractie terecht komen, het sulfietgehalte en de smaak bezwaren.

Aardappeleiwit is een hoogwaardig eiwit dat gemakkelijk en tegen lage kosten geproduceerd kan worden, maar heeft vooralsnog slechts geringe economische waarde (veevoer). Aan het eiwit kan nog veel onderzoek verricht worden, andere afscheidingsmethoden kunnen wellicht leiden tot verbetering van functionele eigenschappen. Karakterisering van de fracties waaruit het aardappeleiwit is opgebouwd zou kunnen leiden tot meer specifieke toepassingen.

- De heer Wijngaards van het CIVO-TNO, afdeling NCV, besprak een onderzoek naar binding van vlees met een enzymatisch gevormd gel. Bij het uitsnijden van karkassen blijven kleine stukken vlees, zgn. afsnijdsels over. Vaak zijn dit magere, kwalitatief goede spierstukjes. Deze afsnijdsels worden verwerkt in verkleinde vleeswaar als hamburgers. Een mogelijkheid om deze afsnijdsels op te waarderen is door ze met een enzymatisch gevormd fibrinegel aan elkaar te "plakken" tot een groot stuk "vers" vlees. Hiervoor wordt een met fibrinogeen verrijkte bloedplasmafractie gebruikt. Het produkt dat ontstaat is niet verkleurd, bevat geen extra zout of fosfaat, is te distribueren als vers vlees en kan alle fysische bewerkingen ondergaan. Het onderzoek is een voorbeeld van toepassing van fundamentele kennis van de bloedstolling bij de ontwikkeling van een voor de industrie aantrekkelijk procedé. Het onderzoek geeft tevens aan dat aan bloed extra waarde wordt toegevoegd door een kleine fractie uit de bulk meer specifiek toe te passen.

- De heer Vereijken van het ATO gaf een overzicht van de in de literatuur vermelde chemische modificaties van plantaardige eiwitten. Door middel van chemische modificatie is het mogelijk de funktionele eigenschappen van eiwitten ingrijpend te wijzigen. In het buitenland wordt op dit terrein al veel onderzoek verricht, kennelijk met succes. Nederland dreigt op dit gebied een achterstand op te lopen. Als voorbeeld van chemische modificatie werd de de-amidatie van gluten besproken. Door de-amidatie wordt glutamine omgezet in glutaminezuur. Bij een beperkte de-amidatie neemt de oplosbaarheid van gluten sterk toe.

Aan modificatie van plantaardige eiwitten, vooral uit de soyaboon, wordt in het buitenland veel onderzoek gedaan. Een goed voorbeeld van geslaagd Nederlands onderzoek is dat de R.U. Groningen en het ATO in samenwerking met Latenstein Zetmeel in korte tijd een gemodificeerd gluten-preparaat hebben ontwikkeld dat goed dispergeerbaar is en voldoet bij de bereiding van kalvermelk.

- De heer Siezen van het NIZO besprak de enzymatische afbraak van melk-eiwitten. Door enzymatische afbraak kunnen peptiden worden gemaakt met een verbeterde functionaliteit, verminderde allergene werking, een farmacologische werking of aroma's. Deze peptiden hebben een hogere toegevoegde waarde.

Wei-eiwitten zijn door hun globulaire conformatie minder gevoelig voor hydrolyse dan caseïnaat, dat in een "random-coil" conformatie voorkomt. Enkele interessante peptiden die uit melkeiwit gevormd worden zijn de peptiden gevormd uit β -caseïnaat, sommige hebben een zeer bittere smaak. Het N-terminale eind van α -sl-caseïne is de kaassmaak precursor. Verder is gebleken dat zelfs zeer geringe denaturatie door een milde hittebehandeling de hydrolyseerbaarheid van WPC (whey protein concentrate) sterk kan beïnvloeden. Dit vergt nader onderzoek.

- De heer Hamer van het IGMB-TNO ging in op de praktische en fundamentele aspecten van eiwitdenaturatie. Eiwitdenaturatie kan de funktionele eigenschappen van eiwitten in hoge mate veranderen. Dit werd toegelicht met als voorbeeld het verlies van functionaliteit van gluten tijdens drogen. Dit verlies van functionaliteit treedt op wanneer gluten verhit worden in aanwezigheid van meer dan 20% (w/w) water. Wanneer dit gluten wordt toegevoegd aan bloem geeft dit een vermindering van de rekbaarheid van het deeg en een geringer broodvolume.

Karakterisering van hitte behandelde monsters gluten met behulp van CD-

spectroscopie, "hydrophobe probes" en oplosbaarheidstechnieken gaf aan dat het verlies aan functionaliteit gepaard gaat met een daling van de oplosbaarheid van de glutenine-component van het gluten, een daling in het vrije-SH-gehalte, een verandering in hydrofobiciteit en een daling van het schijnbare gehalte aan α -helix. Uit deze gegevens ontstaat een model dat de veranderingen in het eiwit beschrijft en waarmee inzicht wordt verworven om het denaturatieproces te beheersen.

Denaturatie van eiwitten speelt bij zeer vele toepassingen een belangrijke rol. Gezien deze vele toepassings-aspecten enerzijds en de inzetbaarheid van geavanceerde karakteriseringstechnieken anderzijds biedt het thema denaturatie de nodige mogelijkheden voor onderzoek waarbij samenwerking tussen industrie, instituten en universiteiten zijn vruchten kan afwerpen.

- De heer Walstra van de vakgroep Levensmiddelentechnologie van de LUW besprak de functionele eigenschappen van eiwitten, van belang voor hun toepassing als ingrediënten bij de industriële bereiding van levensmiddelen. Het betreft hier meestal niet de eigenschappen van een enkel eiwitmolecuul, maar die van een groot aantal, elkaar beïnvloedende moleculen. Het gaat hierbij vooral om het bewerkstelligen van bepaalde reologische eigenschappen (o.m. via gelling), de invloed op de stabiliteit of aggregatie van dispersies, het maken en de stabiliteit van emulsies en schuim.

Hij illustreerde dat in de eerste plaats een goed inzicht in de onderliggende fysisch-chemische verschijnselen nodig is en dat daarop voortbouwende relaties met de moleculaire structuur en de reageerbaarheid van de eiwitten kunnen worden vastgesteld. Fundamentele eiwitchemici kunnen wezenlijke bijdragen leveren aan dit onderzoek, met name door bestudering van conformatie veranderingen bij adsorptie (ook dynamische aspecten); onderlinge chemische reactie; en denaturatie, vooral onder invloed van hoge temperatuur. Bij dit laatste zijn zowel de conformatieveranderingen als de erop volgende chemische reactie van belang en is de kinetiek wezenlijk.

Onttrafelen van relatie tussen structuur en functies kan dan leiden tot gerichte chemische, enzymatische en eventueel genetische modificatie, teneinde functionele eigenschappen te induceren of te verbeteren.

- De heer Norde van de vakgroep Fysische en Kolloïdchemie van de LUW besprak de adsorptie van eiwitten aan grensvlakken. In een aantal gevallen is deze adsorptie gewenst, zoals bij gevoelige medische analysetechnieken, soms is adsorptie ongewenst, zoals biofouling van membranen en tanden.

Eiwitadsorptie is van wezenlijk belang bij gebruik van kunststoffen voor medische toepassingen, zoals synthetische hartkleppen.

Bij adsorptiegedrag maakt men onderscheid tussen "harde" en "zachte" eiwitten. Harde eiwitten behouden hun conformatie, terwijl zachte eiwitten conformatieveranderingen ondergaan aan het grensvlak. Het adsorptiegedrag van "harde" eiwitten wordt vooral bepaald door elektrostatistische interactie en veranderingen in hydratatie van het grensvlak en het eiwit. Voor "zachte" eiwitten draagt de toename van de conformatie-entropie sterk bij tot de neiging om te adsorberen: deze eiwitten adsorberen soms aan grensvlakken die vrij hydrofiel zijn en het zelfde ladingsteken hebben.

Er worden vorderingen gemaakt om het adsorptiegedrag van eiwitten te voorspellen op basis van de primaire structuur. Op deze wijze is het mogelijk meer inzicht te krijgen in de gevolgen van verandering van de primaire structuur van eiwitten.

- De heer Drenth van Chemie Consult Groningen hield een voordracht over de moleculaire structuur van eiwitten. De conformatie van eiwitten ontstaat wanneer een peptideketen zich zo vouwt dat de toestand van laagste vrije energie bereikt wordt. Deze conformatie wordt mede bepaald door de omgeving van het molecuul, de conformatie van een eiwit kan dus nooit los gezien worden van zijn omgeving. Bij het vouwen van het molecuul spelen de volgende krachten een rol: de waterstofbrug, elektrostatistische krachten, de hydrofobe interactie, de covalente binding (S-S brug) en Van der Waals krachten. Vaak is de omgeving van het eiwit water, waardoor een molecuul zich zo vouwt dat relatief veel hydrofobe groepen in het hart van het molecuul liggen en de hydrofiele groepen aan het oppervlak. Deze fundamentele kennis is noodzakelijk om de funktionele eigenschappen van eiwitten te verklaren. Met name bij enkele enzymen heeft de opheldering van de structuur de werking van het enzym verduidelijkt.

Slotdiscussie

De slotdiscussie werd ingeleid door Prof.Dr.B. Witholt, die aangaf dat er in de dag bewust een gradiënt was aangebracht in de voordrachten, van industrie via instituten naar universiteiten en daarmee van toegepast onderzoek naar fundamenteel onderzoek. Eén van de doelstellingen van deze dag was na te gaan hoe de kloof die er is tussen deze wijzen van onderzoek overbrugd kan worden. Er werd benadrukt dat de bedoeling van de discussie was om na te gaan of er voldoende draagvlak is voor het opstarten van een IOP eiwitten.

De discussie werd geleid door Dr.W. Nieuwenhuizen, voorzitter van de werkgemeenschap eiwitten van het S.O.N., aan de hand van twee prikkelende stellingen.

Stelling 1. : Een IOP eiwitten heeft geen nut aangezien de industrie geen gerichte vragen stelt.

Naar aanleiding van Stelling 1:

Deze stelling wordt met name door de industriële deelnemers bestreden: de industrie heeft wel behoefte aan onderzoek en ziet wel degelijk mogelijkheden voor belangrijke resultaten. Van verschillende zijde wordt uitbreiding van het werkterrein van een eventueel IOP-eiwitten bepleit (fysiologische aspecten, enzymen, biosensoren). Sommigen stellen dat het heel lastig kan zijn om vragen van de industrie te vertalen in voor een eiwitchemicus hanteerbare problemen, anderen merken op dat juist dit symposium goede voorbeelden heeft gegeven van mogelijkheden daartoe. Vooral instituten (zoals CIVO-TNO, NIZO, ATO) en meer technologisch georiënteerde universitaire vakgroepen kunnen bij dit vertalen een rol spelen.

Stelling 2. : De universiteiten zijn fundamenteel ingesteld en willen zich niet "verlagen" tot toepassingsgericht onderzoek.

Naar aanleiding van Stelling 2:

Ook deze stelling wordt bestreden. Daarbij is wel van belang dat de hierboven genoemde voorwaarden vervuld worden (uitbreiding van het terrein, vertaalslag realiseren). Het lijkt gewenst vaak een tripartite samenwerking te realiseren: industrie - instituut/technologische vakgroep - fundamentele eiwitonderzoekers. Fundamenteel eiwitonderzoek is nodig als

kennis bron. Geconstateerd wordt dat de industrie te maken heeft met ingewikkelde en vaak "vuile" eiwitmengsels, terwijl de eiwitchemici werken met zeer zuivere preparaten van één eiwit en geen raad weten met zulke mengsels. Wel lijkt het mogelijk dat de eiwitchemici interessant onderzoek kunnen doen aan eenvoudige (binaire) mengsels, wat veel inzicht kan opleveren t.a.v. interacties tussen eiwitten.

Slotconclusie

Er bestaat een duidelijke en gerechtvaardigde behoefte bij de industrie naar betrekkelijk fundamenteel onderzoek aan eigenschappen van eiwitten en hun gedrag bij industriële verwerking en er gaapt vooralsnog een te grote kloof tussen het op deze dag beschouwde fundamentele en toegepaste eiwit-onderzoek om zonder gerichte stimulering belangrijke resultaten te kunnen behalen.

Het wetenschappelijke draagvlak als zodanig is groot genoeg om met succes het ontbrekende "middenveld" in het onderzoek te kunnen ontwikkelen. Een IOP-eiwitten is een uitstekend middel om deze ontwikkeling in gang te zetten.

Slotwoord

Prof.Dr.B. Witholt bedankte in zijn slotwoord de sprekers voor hun bijdrage en alle aanwezigen voor hun aandacht.

Wageningen 2 oktober 1990.

Ir. R.Orsel, IGMB-TNO.

Inleiding Symposium Industriële Eiwitten d.d. 19 september 1990

Dames en heren,

Dit is een bijzondere bijeenkomst. U had het al bemerkt uit het programma en zeker uit de samenstelling van de deelnemerslijst. Bijzonder, vooral ook omdat het onderwerp belangrijke macromolekulen zijn, opgebouwd uit interessante onderdelen. Eiwitten, weliswaar slechts een beperkt deel ervan, vooralsnog dus niet over enzymen, biokatalysatoren, eiwitten met medisch-farmaceutische eigenschappen - vandaag nog niet over proteïne engineering, neen, voorlopig over zo op 't eerste gezicht wat simpeler produkten, met volgens sommigen maar triviale toepassingen. Over industriële eiwitten. Op zich belangrijk. Maar er is meer. Deze bijeenkomst gaat ook over mogelijke en zeker wenselijke relaties tussen fundamenteel en toepassingsgericht onderzoek. Over bruggen en ravijnen in Wetenschapsland.

En dan is dit symposium ook bijzonder, omdat het een voorlopige resultante is van een aantal activiteiten inzake een mogelijk onderzoeksprogramma voor industriële eiwitten.

Begonnen een aantal jaren geleden met een door de NRLO ondersteunde studie over de wenselijkheid van zo'n programma. Het doet me genoegen de secretares van die commissie - gevormd van de Research Contact Groep van de VAI - de heer Schogl - hier te mogen begroeten.

Dit voorstel werd voor nadere beoordeling ook inzake financieringsmogelijkheden ingebracht bij de Stuurgroep voor Innovatie gerichte onderzoeksprogramma's. Stuurgroep I.O.P. Ik kom daar straks op terug.

Nu zullen er onder u zijn die denken of zelfs zeggen: er zijn toch al programma's genoeg en kijk eens naar alle reeds beschikbare geldstromen. Een eerste, een tweede en een derde, al worden ze dan bepaald niet dieper of breder ondanks grotere behoeftes. Er is toch al sturing door de N.W.O., al is daar de liefde voor de β -faculteiten wat tanende. Het is dan overigens verheugend dat ook de minister van Onderwijs en Wetenschappen dat schijnt te vinden, en deze minister zou best in staat zijn om er wat aan te doen ook. Maar goed, er zijn toch programmatisch bedrijfsgerichte Technologie Stimule-

ringen in velerlei kleuren - Instir - althans wat daar van ons is en die wordt vooralsnog verlengd. Ook op milieugebied lijken er nauwelijks ideeën genoeg. Zo op het oog geeft de overheid, als beheerder van de door u ingebrachte middelen, u toch wel in eniger mate waar voor uw geld.

Al heb je soms het idee dat van wat de linkerhand geeft met de rechter weer wat teruggenomen wordt, of omgekeerd. Is dat alles dan genoeg voor de wetenschappelijke en technologische toekomst van Nederland in het algemeen en van de industriële eiwitten in het bijzonder?

De Vervolg Commissie Technologiebeleid o.l.v. Prof. Wisse Dekker ingesteld door de Minister van Ec. Zaken meldt op pag. 5 van het in mei uitgebrachte advies dat de Technologie Stimulering in Nederland, internationaal vergeleken, wat gering is. Dat het weliswaar toegejuicht wordt dat in het regeerakkoord verruiming van middelen t.b.v. het technologiebeleid is toegezegd, maar dat het nu wel tijd wordt eens te zeggen hoeveel, hoe en wanneer. Een aantal honderden miljoenen guldens per jaar extra en dan niet door subtiële inschuivingen wordt als suggestie meegegeven. Een getal ook al vermeld in nota's van de gezamenlijke werkgevers verbonden, inzake het technologiebeleid. Weliswaar reageert de Minister van Economische Zaken op diverse suggesties in zijn onlangs aan de Tweede Kamer uitgebracht nota: "Economie met open grenzen" hier vooral op met woorden; met daden is dit overigens goed leesbare en van interessante situatieschetsen voorziene verhaal wat matig geïllustreerd.

Natuurlijk wordt ook in deze nota bijgedragen aan de gedachte dat onderzoekscholen - wat dat dan ook zullen zijn, gebouwen of netwerken of wat er dan nog meer over bedacht kan worden - de wetenschap en de techniek in Nederland omhoog moeten stuwen in de vaart der Europese, Japanse en Amerikaanse volkeren en dat ook Economische Zaken aan de toepassingsgerichte aspecten nu de eventuele programma's mede Stimulering zal geven, maar ik persoonlijk geloof nog niet dat al deze welwillendheid ons een interessant programma over industriële eiwitten zal brengen.

Toch is zo'n programma nodig. Een programma met industriële aspecten, uit te voeren door onderzoeksinstituten, passende in de redelijk succesvolle I.O.P. formule. Een regeling in de bovengenoemde nota van de minister ook expliciet genoemd en verlengd, helaas niet uitgebreid. Maar er is altijd al

vreugde als men niet gekort wordt en dus is er wat de I.O.P.'s betreft een zekere mate van tevredenheid. Bij de I.O.P.'s gaat het om de ontwikkeling van wetenschappelijke achtergrondkennis, gericht op industriële toepassingsmogelijkheden, onderzoek dat vooral ook leidt naar duurzame samenwerking tussen onderzoeksinstellingen en bedrijfsleven. Doelstellingen waaraan bijv. het I.O.P. Koolhydraten goed aan voldoet. Voor de overheid worden deze onderzoeksprogramma's beheerd door een ambtelijke Stuurgroep van Economische Zaken en Onderwijs en Wetenschappen. De voorzitter is de directeur van Algemeen Technologie Beleid van Economische Zaken. Deze afdeling verzorgt ook het sekretariaat. Ec. Zaken is verantwoordelijk voor de financiering van de programma's, zo'n 35 miljoen per jaar. In een enkel geval wordt zoals bij het I.O.P. Koolhydraten door het departement van Landbouw een substantiële bijdrage geleverd. De stuurgroep heeft 3 niet-ambtelijke adviserende leden. Het destijds bij de Stuurgroep ingediende voorstel: Oriëntatie voor onderzoek industriële eiwitten heeft de Stuurgroep doen besluiten een nader rapport voor dit onderwerp te doen samenstellen. Ondanks de positieve toon van een aantal conclusies in dit door het Centraal Instituut voor Industrialisatie opgestelde rapport, een rapport dat een goed beeld van het werkgebied gaf, heeft de Stuurgroep na nog de mening van een aantal wetenschappelijk deskundigen te hebben ingewonnen, gemeend dat er vooralsnog onvoldoende argumenten aangevoerd waren om tot opstelling en financiering van zo'n I.O.P. programma te komen.

Naast de wenselijkheid dat zo'n programma:

- * een strategisch programma moet zijn
- * kansen moet bieden op innovaties
- * meerdere invalshoeken moet hebben
- * multidisciplinair moet zijn
- * een behoorlijke uitstraling moet hebben.

Op zich lijkt dit al moeilijk genoeg, maar de ervaring leert dat bijna alle goede programma's deze aspecten in meerdere of mindere mate wel hebben, had de Stuurgroep vooral problemen met het volgende.

Hoewel ruim voldoende industriële belangstelling voor zo'n programma aanwezig lijkt, is er nauwelijks fundamentele expertise op dit werkgebied. Uit de verschafte informatie leek er eerder behoefte te bestaan aan toegepast on-

derzoek. En voor zo'n programma is een I.O.P. niet het geschikte instrument. Afgesproken werd in de Stuurgroep vergadering dat alhoewel geen I.O.P. eiwitten, zeker vooralsnog niet, kon worden ingesteld één van de adviserende leden van de Stuurgroep in overleg zou treden met het departement van Landbouw - dit departement had evenals destijds bij het tot stand komen van het I.O.P. Koolhydraten interesse getoond in het onderwerp om na te gaan of nadere informatie en verduidelijking tot nieuwe of aangepaste ideeën zou kunnen leiden, inzake programma en financiering.

In het kader van deze verdere verkenning heeft de NRLO dit symposium georganiseerd.

Dames en heren. Vandaag gaat het over een grondstof met een produktiewaarde van bijna 3 miljard gulden per jaar. Het gaat om polymeer molekulen, waaraan nog maar op beperkte schaal onderzoek is verricht. Het gaat om relaties tussen moleculaire structuren en materiaal eigenschappen. Het gaat om eventueel te veranderen eigenschappen van een der belangrijkste voedingsmiddelen van mens en dier, het gaat ook om toepassingen op het gebied van de zogenaamde non-foods. Het gaat dus ook om agrificatie, al maakt dit begrip door vele misvattingen wel eens de indruk van een afgesabbelde toverbal, vooral ook omdat nu eenmaal niet alle politieke en sociale problemen met behulp van wetenschap en techniek op te lossen zijn.

Het gaat echter bovenal om het vinden van aansluiting tussen wetenschappelijke expertise en belangstelling en industriële wensen en mogelijkheden op het gebied van de industriële eiwitten. Bij koolhydraten is dat te slotte gelukt, al lag het daar wel wat eenvoudiger. Ik zei al: dit is een bijzonder symposium. Een met een opdracht.

Dit symposium moet mede een aanzet geven tot het opstellen van een onderzoeksprogramma, zo mogelijk passend in de I.O.P.-structuur. Waarom ook niet. Ik heb er alle vertrouwen in.

En vertrouwen is het gevoel op de goede weg te zijn, ook al is er van de wegbewijzing niet te veel te zien.

Ik wens u een leerzame en plezierige dag toe.

W.C. Bus

De Melkindustrie Veghel bv

Division Industrial Products of DMV Campina bv

NCB-laan 80, P.O. Box 13, 5460 BA Veghel-The Netherlands
Telephone 04130 - 7 22 22, Telex 74650 dmv nl, Telefax 04130 - 43695
K. v. K. 's-Hertogenbosch 34232

Toepassing van melkeiwitten voor emulgering en schuimvorming.

A.C.M. van Hooydonk
DMV, Veghel

Samenvatting.

Melkeiwitten leveren ongeveer 25% van de totale eiwitbehoefte in het menselijk voedsel. Niet alleen hebben melkeiwitten een hoge nutritionele waarde, maar ook een breed scala van functionele eigenschappen die door geschikte fractionerings- en modificatietechnologieën optimaal afgestemd kunnen worden op de gewenste applicatie.

Onze kennis over melkeiwitten is in vergelijking met andere voedings-eiwitten enorm. De aminozuurvolgorde van de verschillende melkeiwitten is volledig bekend en het inzicht in de relatie tussen de eiwitstructuur en het functioneel gedrag is snel groeiend. Er is echter nog een lange weg af te leggen voordat we het gedrag van een eiwit in een gecompliceerd voedingsmiddel kunnen voorspellen op basis van fundamentele kennis.

Dit geldt met name ook ten aanzien van de voorspelbaarheid van het emulgeer- en schuimgedrag van melkeiwitten in de diverse voedingsmiddelen waarin juist deze functionaliteiten dominant vereist worden. Als voorbeeld zal de rol van melkeiwitten als emulgator bij de bereiding van fijn-verkleinde vleeswaren en sondevoedingen worden besproken. Voor zover onze kennis daartoe reikt wordt aangegeven waarom bepaalde melkeiwitfrakties voor deze specifieke toepassingen geschikt zijn. Een zelfde benadering wordt gekozen voor een tweetal schuimprodukten, namelijk toppings en meringues. Zowel bij de emulsie- als bij de schuimbereiding gaat het niet alleen om het creëren van de gewenste vet- of luchtverdeling, maar vooral om het behoud daarvan bij verdere bewerking en bewaring. Een combinatie van emulgatoren/stabilisatoren is vaak vereist om beide doelen optimaal te bereiken.

De trend naar kant en klaar maaltijden, gekoppeld aan segmentatie en individualisering van het dieet, zal de vraag naar nutritioneel en organoleptisch hoogwaardig geformuleerde levensmiddelen doen toenemen. Het op stabiele wijze "verpakken" van de discontinue fase door eiwitten zal bij het formuleren van deze levensmiddelen een steeds terugkerend probleem vormen bij de bereiding. Verbreding van onze kennis, over met name de relatie tussen eiwitstructuur en functioneel gedrag in het levensmiddel, zal niet alleen het werk van de produktontwikkelaar vergemakkelijken maar ook de basis leggen voor verdergaande "tailoring" van voedingseiwitten voor de diverse applicaties. De fractionerings- en modificatietechnologieën zijn voorhanden, de definitie van een op maat gesneden eiwit op basis van de structuur is echter nog zeer onvolledig aan te geven.



Produkten waarin melkeiwit
als ingrediënt wordt toegepast

- * zuivelprodukten
- * margarine/spreads
- * vlees/vis
- * babyvoeding
- * sportvoeding
- * dieet-/medische voeding
- * soepen
- * sauzen
- * bakwaren
- * zoetwaren
- * dessert
- * ijs
- * koffie creamers
- * roomlikeuren
- * beeldbuizen



Stelling

Er is geen voedingseiwit, waar
zoveel van bekend is dan van
melkeiwit.

Ondanks deze veelheid aan
kennis is de produktontwikkelaar
veelal veroordeeld tot een "trial
and error" aanpak bij het
formuleren van levensmiddelen.



Melkeiwitten

- * Hoge nutritionele waarde
- * Geen anti-nutritionele
factoren
- * In zuivere vorm te isoleren
- * Goed oplosbaar
- * Breed scala van functionele
eigenschappen



Klassificatie van melkeiwitten

	MW	Aminozuren	hydrof. kJ/res.	lading/res.
--	----	------------	-----------------	-------------

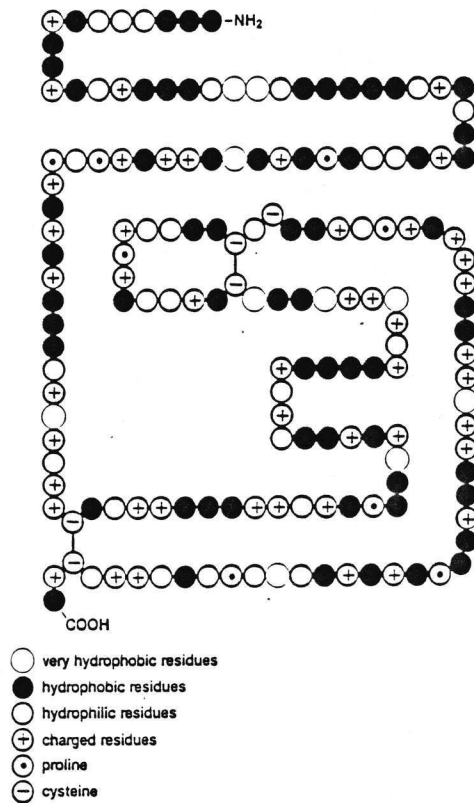
Caseine (80%)

- α s1	23600	199	4,9	-0,10
- α s2	25200	207	4,7	-0,07
- β	24000	209	5,6	-0,06
- κ	19000	169	5,1	-0,02

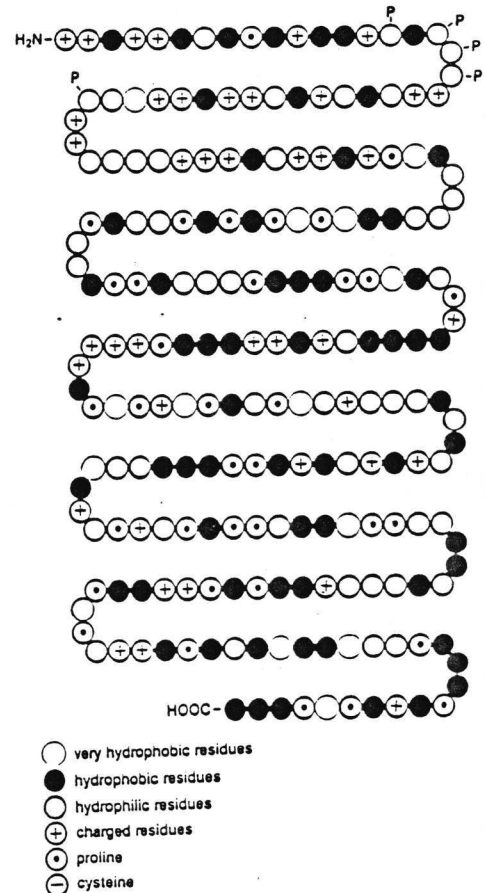
Wei-eiwit (20%)

- β Igl.	18400	162	5,1	-0,04
- α lactalb.	14200	123	4,7	-0,02
- BSA	66300	582	4,3	-0,02

Amino acid sequence of β -lactoglobulin A



Amino acid sequence of β -casein A



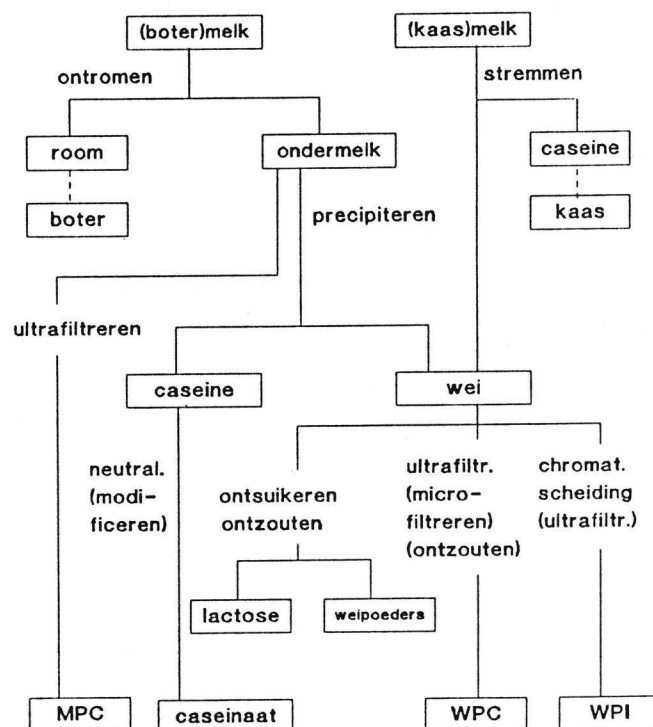


Functionele eigenschappen van melkeiwitten

	caseinaat	wei-eiwit
hitte denaturatie	-	++
hitte gelering	-	++
oplosbaarheid	++	++
pH-gevoeligheid	+	-
zwellen	+	-
viscositeit	+	-
emulgeereigenschappen	++	+
schuimeigenschappen	+	++



Winning van melkeiwitten



Knakworst

Recept:

%

Varkensschouder	45,0
Fosfaat	0,3
Caseinaat	2,0
Colorozozout	2,0
Water	22,6
Schoudervet	27,5
Kruiden	0,6

Gewenste eigenschappen van knakworst

- 1) Goede beet
(hittegeleding)
- 2) Geen vetafscheiding
(emulgering)
- 3) Geen gelei-afscheiding
(waterbinding)

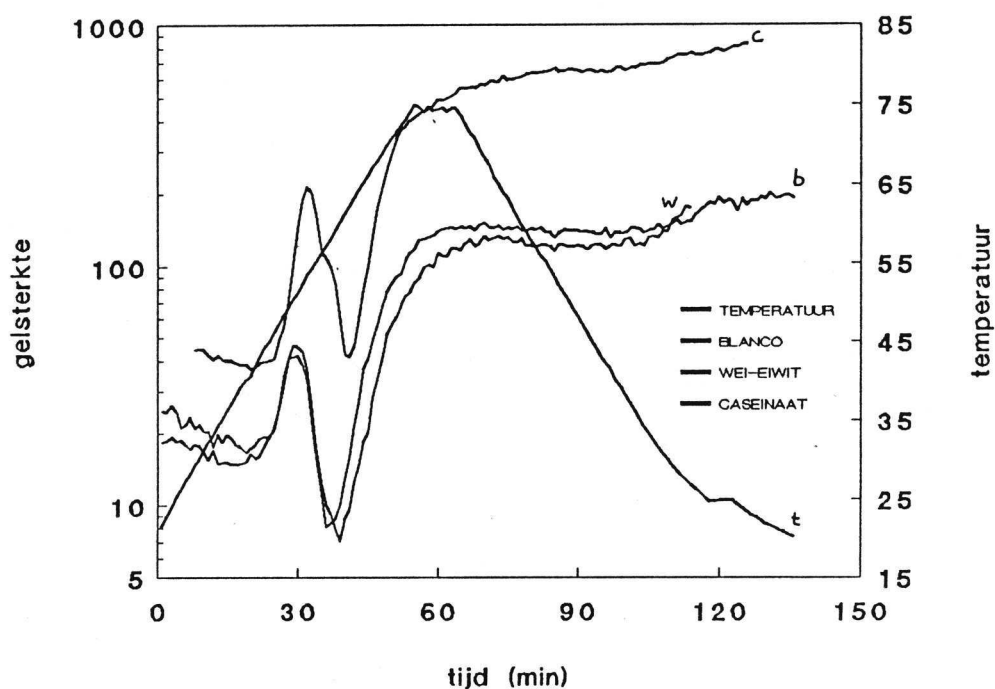


Vleeseiwitten

	%	oplosbaar- heid	geling	emul- gering
Sarcoplasmatisch	30	water	-	-
Bindweefsel	15	onop- losbaar	-	+/-
Myofibrillair	55	zout	+	++



Geling van vleeseiwit, met en zonder toevoeging van melkeiwit





o/w emulsies met 0,4 % melkeiwit en 4 % olie

	dvs (um)	belading (mg/m ²)	oproming (%)
Na-cas	0,38	2,3	19
Ca-cas	0,56	3,1	55
MPC	0,61	4,9	51
WPC	0,40	1,9	30



Conclusie

Berekeningen met de vergelijking van Stokes leren ons dat de dichtheid van het geadsorbeerde eiwitlaagje pas mee gaat tellen voor deeltjes $< 0,4 \text{ um}$



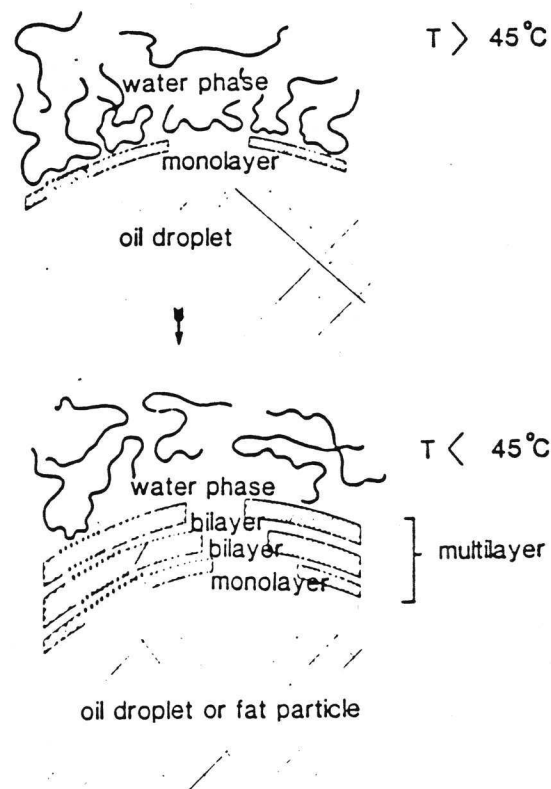
Topping

Een topping is een o/w emulsie, die na opkloppen een stabiel schuim geeft.

De rol van melkeiwitten is het stabiliseren van de emulsie en niet van het schuim.

De structuur van het schuim wordt gevormd door geaggregeerde en gedeeltelijk gekristalliseerde vetbollen.

TOPPINGS: background research



Meringue

Een meringue (schuimpje) is een eiwitschuim, waarvan de structuur door hittedenaturatie gefixeerd wordt.

Een combinatie van gehydrolyseerd caseïne (schuimvorming) en ontvet wei-eiwit (hittegelering) is een goede vervanger van ei-eiwit.

DMV



Conclusie 1

Het formuleren van levensmiddelen is meer een kunst dan een wetenschap.

Maar : hoe beter de wetenschap, des te beter de kunst.

Conclusie 2

De vertaling van de moleculaire eigenschappen van eiwitten naar functioneel gedrag in levensmiddelen is uiterst moeilijk.

DMV



Conclusie 3

Nederland heeft een voorsprong op het gebied van de fysische chemie van polymeren en colloïden.

Conclusie 4

Nederland heeft een achterstand op het gebied van de specifieke fysiologische effecten van melkeiwitten.

Abstract voor : Symposium Industriële eiwitten

Georganiseerd door : Ned. Raad Landbouwkundig Onderzoek

Datum : 19 september 1990, Reehorst, Ede

Lezing door : A.C. Jurlaanse

Titel : Textuurbepalende eiwitten in voedingsmiddelen

Abstract

Functionaliteit van eiwitten in voedingsmiddelen wordt vaak gerelateerd aan schuimvorming, emulgering en textuur. Dit laatste aspect wordt onderverdeeld in gelsterkte en viscositeit. In de meeste publikaties wordt aandacht besteed aan gelsterkte en viscositeit voor één bepaald eiwit van een bepaalde oplossing.

In een voedingsmiddel spelen vele andere functionele aspecten ook een zeer bepalende rol. Dit wordt nader uitgewerkt aan het voorbeeld van co-extrusie van collageen voor "velvorming" tijdens de bereiding van rookworst. Aspecten die een rol spelen zijn bijvoorbeeld:

- homogeniteit van de collageen matrix voor extrusie
- geleer kinetiek tijdens de velvorming/extrusie
- effecten van ionen, temperatuur, andere biopolymeren
- processing condities zoals temperatuur, druk, vochtgehalte en extruder design
- krimpgedrag tijdens drogen
- oplosbaarheid (bij koken vlak voor consumptie).

Aan de hand van enkele aspecten uit dit proces wordt duidelijk dat er een groot verschil bestaat tussen de wijze van eiwit onderzoek zoals dit in de open literatuur gepubliceerd is, en de fysisch/chemische inzichten die nodig zijn voor de succesvolle produktie van voedingsmiddelen: We weten "alles" van de moleculaire structuur van collageen, maar de vertaalslag naar proces- en produkteigenschappen laat veelal te wensen over.

Target
- to illustrate the "gap" between



ACJ/05601/01 d.d. 19-09-90

Example

Collagen Casings in Sausage Manufacture

Past

"Natural Casings" - intestines

Now

Cellulose casings / collagen casings

Now & Future

Co-extrusion of sausage + casing

ACJ/05601/03 d.d. 19-09-90

What is collagen

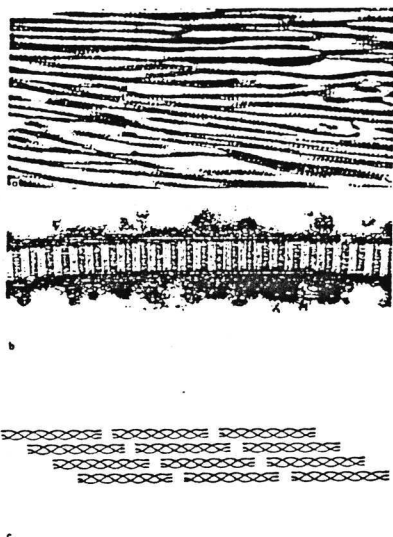


FIG. 1. (a) A collagen fibre formed from bundles of fibrils lying parallel to one another ($\times 32500$). (b) An electron micrograph of a negatively stained single collagen fibril revealing the regular repeat banding pattern typical of native collagen ($\times 120\,000$). (c) Banding pattern produced by the precise quarter staggered arrangement of the collagen helices within the native fibril.

ACJ/05601/04 d.d. 19-09-90

Structure of Molecule

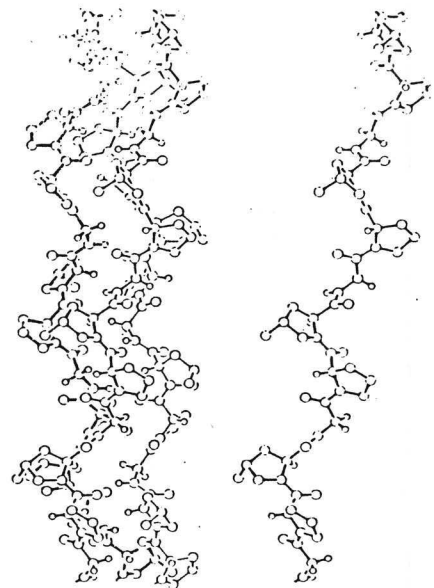


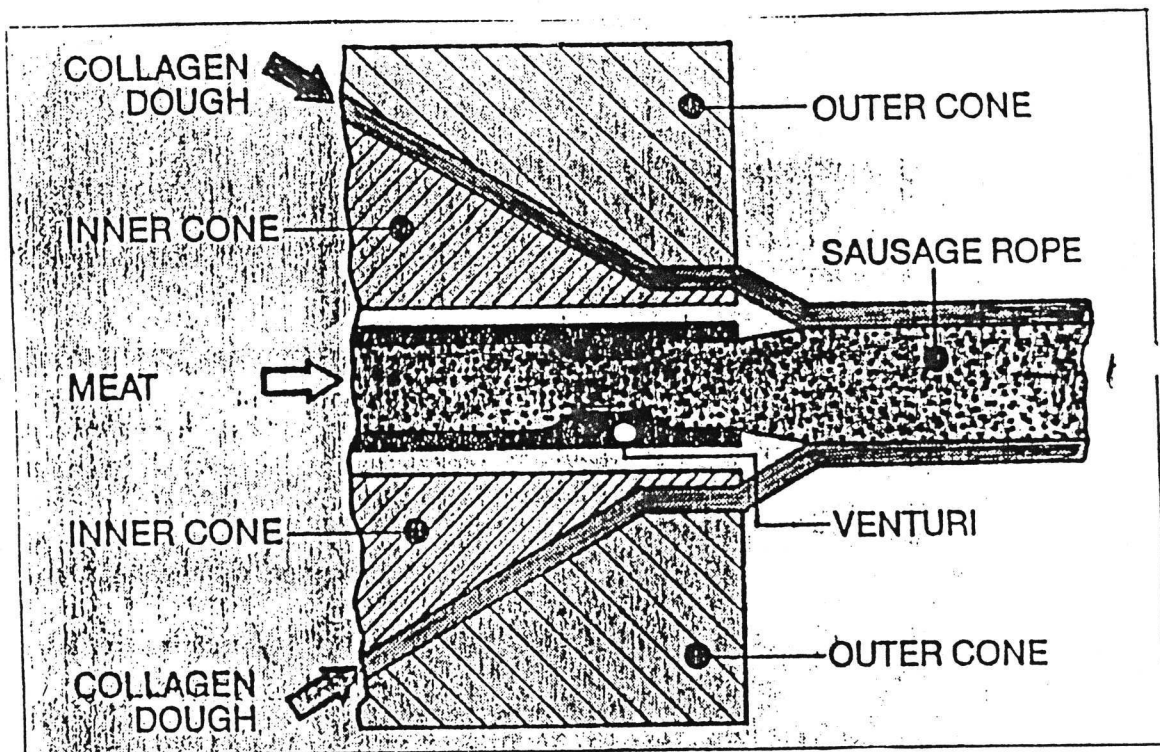
FIG. 3. Model for the structure of the collagen molecule obtained by refinement of the Rich-Crick structure II using the linked-atom least-squares refinement procedure. For clarity, hydrogen atoms not attached to the main-chain have been omitted. The complete model is shown on the left and a single strand on the right.

ACJ/05601/05 d.d. 19-09-90

Can we make co-extruded casing
with this type of knowledge?

ACJ/05601/06 d.d. 19-09-90

How to achieve



Extrusion aspects

- Homogeneous "dough"
pH time, temperature,
enzyme
- Strength + kinetics
Fibril alignment + thickness

Solubility - precipitation

Drying - cross linking
- Colour / clarity
- Taste
- In use properties
 - baking
 - eating

ACJ/05601/07 d.d. 19-09-90

Setting

- Fig. 9 consistency
- Kinetics

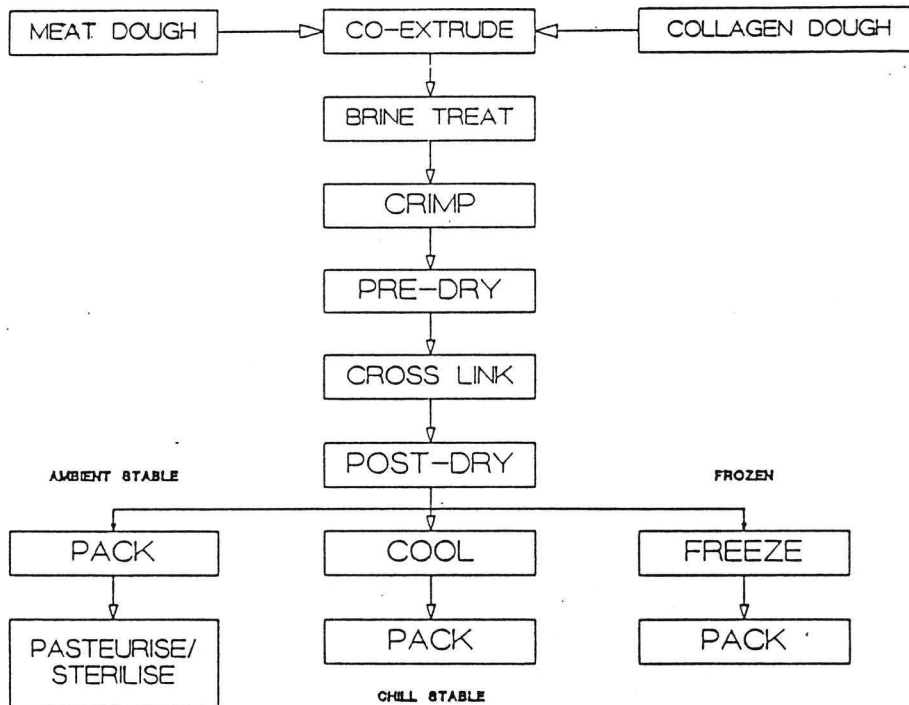
Mechanisms

- salt, pH 10 -> precipitation
- drying
- cross linking
- drying

ACJ/05601/08 d.d. 19-09-90

Total process

ALGIN SAUSAGES - PROCESS FLOWSHEET



ACJ/05601/13 d.d. 19-09-90

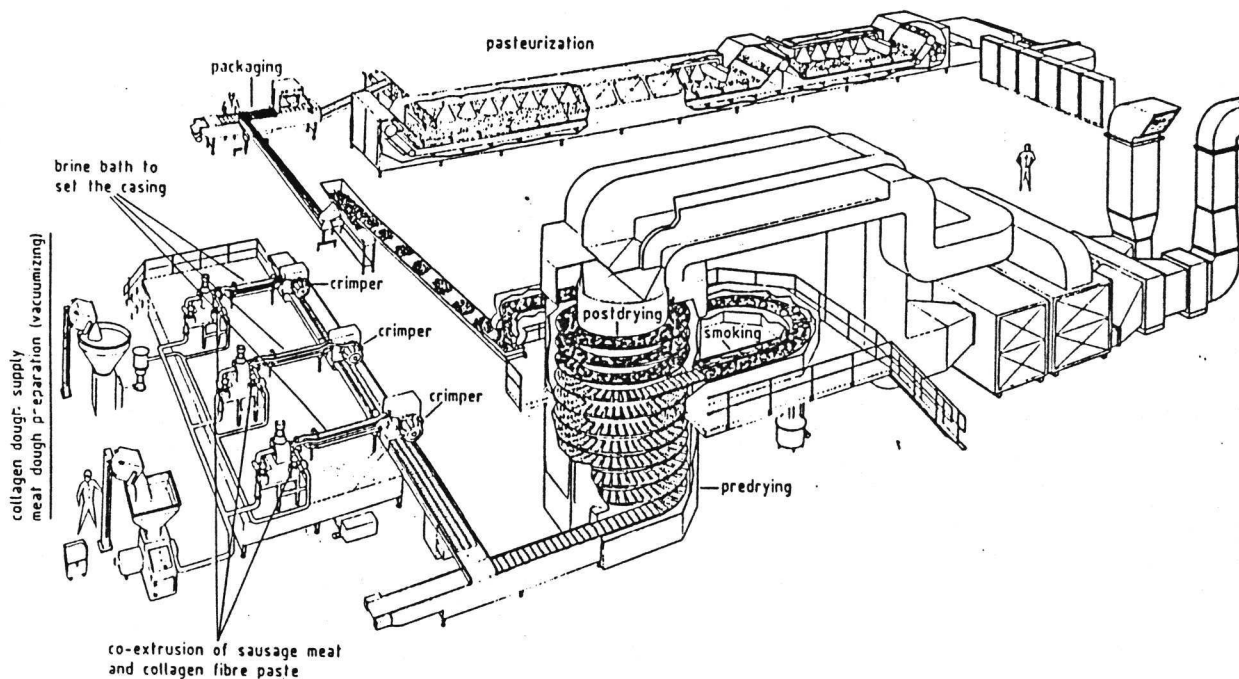
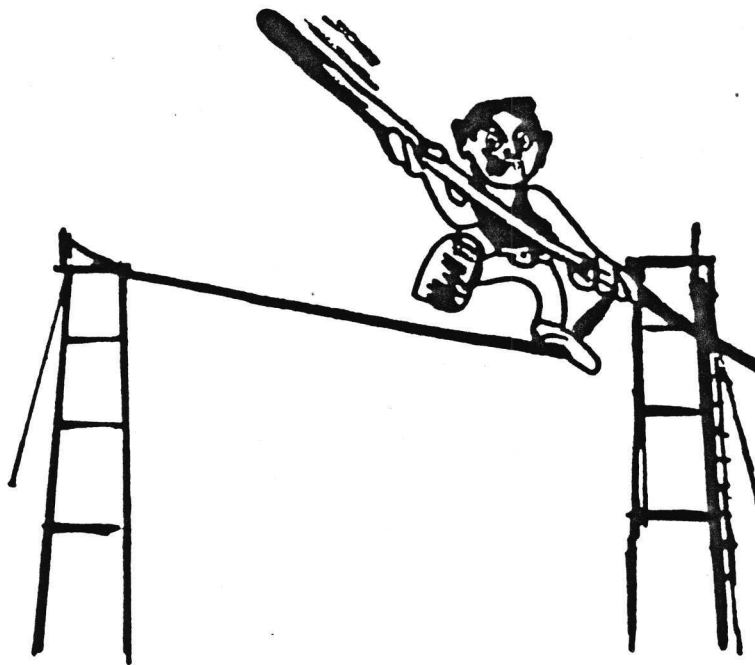


Fig. 1. Plant layout for the "Protecon" co-extrusion sausage process.

ACJ/05601/14 d.d. 19-09-90

Did we cross the gap?



ACJ/05601/16 d.d. 19-09-90



Aardappeleiwit, huidige en toekomstige afzetmogelijkheden.

Samenvatting.

De jaarlijkse verwerking van fabrieksaardappelen levert niet alleen zetmeel maar daarnaast ook een aantal andere produkten in aanzienlijke hoeveelheden.

Eén van deze produkten is aardappeleiwit, dat via een hittecoagulatieproces uit de processtroom wordt afgescheiden en na verdere verwerking in droge vorm beschikbaar komt.

Dit eiwit, dat qua aminozuursamenstelling en eiwitgehalte de vergelijking met andere eiwitbronnen zoals sojameel, vismeel en melkpoeder goed kan doorstaan, wordt op dit moment geheel afgezet in de diervoedersektor. Deze marktsektor wordt op termijn te beperkt geacht.

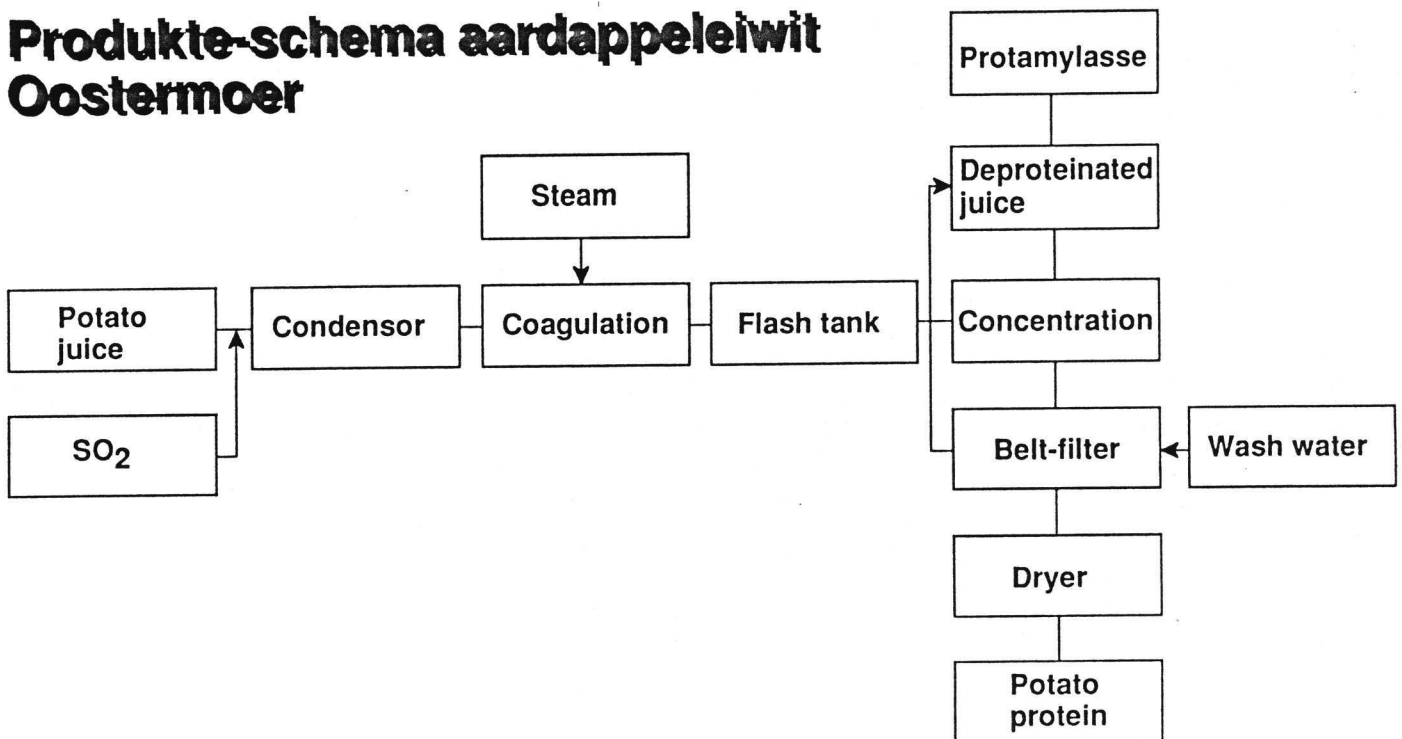
Het streven is de afzetmogelijkheden te verruimen onder meer door aandacht te besteden aan verbetering van die kwaliteitsaspecten die toepassing in menselijke voeding mogelijk maken.

Foxhol, 28 augustus 1990
Drs. H. Hokse
AVEBE Research & Development

Eiwitproductie per lokatie

Foxhol	300 ton/week (HF)
Ter Apelkanaal	400 ton/week
Gasselternijveen	400 ton/week
De Krim	250 ton/week (UF)

Produkte-schema aardappeleiwit Oostermoer



Protein content

Potato protein	Fish meal	Milkpowder	Soyaflour
75,5	66,0	36,0	45,0

(g/100g product a.i.)

	Potato protein	Fish meal	Milkpowder	Soyaflour
Lysine	7,8	7,2	8,2	6,4
Methionine	2,4	2,9	2,6	1,4
Cystine	1,6	0,9	0,9	1,5
Tryptophan	1,4	1,1	1,3	1,3
Threonine	6,1	4,3	4,6	4,2
Valine	7,1	5,5	6,9	5,0
Leucine	10,4	7,4	9,8	7,6
Isoleucine	6,1	4,4	5,6	4,9
Phenylalanine	6,4	4,2	4,8	4,9
Tyrosine	5,7	2,9	5,0	3,5
Histidine	2,2	2,3	2,8	2,5
Arginine	5,0	5,7	3,6	7,2
Glycine	4,8	5,9	2,0	4,2
Alanine	5,0	6,0	3,4	4,3
Aspartic acid	12,5	9,3	8,0	12,0
Glutamic acid	11,5	13,0	22,0	18,8
Proline	5,1	4,1	10,0	5,5
Serine	5,8	4,2	6,1	5,6

g/100g protein

Product description/properties

Appearance	yellow-grey powder, free flowing
Bulk density	0,4 - 0,6 kg/l
Moisture content	9 -11 g/100g
Protein	75,5 g/100g
Fat	2,5 - 3,5 g/100g
Fibre	0,3 - 0,5 g/100g
Ash	2,0 - 3,0 g/100g
Other	7,8 - 8,3 g/100g
Digestibility	approx. 90 %

Coating-bindmiddel in papier

Schuimmiddel in schuimbeton

Steltmateriaal in doorschrijfpapier

Ontwerp aardappeleiwit- produktenbeschikking 1986

Samenstelling:	aardappeleiwit- concentraat		aardappeleiwit- isolaat	
Proteïne	≥	70 %	≥	90 %
Vochtgehalte	≤	10 %	≤	10 %
Vezel	≤	2 %	≤	0,5 %
As	≤	4 %	≤	2 %
Glycoalkaloiden	≤	0,08 %	≤	0,04 %
Sulfiet	≤	0,01 %	≤	0,01 %

	Aardappeleiwit- concentraat Ontwerp produk- tenbeschikking		Produkt be- schrijving aardappel- eiwit
Proteïne	≥	70 %	75,5 g/100g
Vochtgehalte	≤	10 %	9 - 11 g/100g
Vezel	≤	2 %	0,3 - 0,5 g/100g
As	≤	4 %	2,0 - 3,0 g/100g
Glycoalkaloiden	≤	0,08 %	> 0,08 %
Sulfiet	≤	0,01 %	> 0,01 %

Ons Nummer

Datum

0038-NCV/GW-ng

22 augustus 1990

BINDING VAN VLEES MET EEN ENZYMATISCH GEVORMDE EIWIT GEL

G. Wijngaards en E.J.C. Paardekooper
Instituut CIVO-Technologie TNO, Afdeling NCV, Zeist.

Afhankelijk van de diersoort, de grootte van spieren, het vetgehalte en het bindweefselgehalte, hebben vleesgrondstoffen die verkregen worden bij het uitsnijden van karkassen verschillende bestemmingen. Kleine spieren en afsnijdsels worden vaak verwerkt in produkten met een relatief lage economische waarde. Teneinde kwalitatief hoogwaardige kleine spieren en afsnijdsels op te waarderen en andere vleesgrondstoffen meer bestemmingsmogelijkheden te geven, is een bindingsmethode ontwikkeld op basis van bloedplasma-eiwitten. Met deze methode kunnen stukjes vlees worden samengevoegd tot een groot stuk vers vlees en verschillende nieuwe vers vleesprodukten worden gemaakt.

De methode berust op de vorming van een fibrinegel door omzetting van fibrinogeen door thrombine en de onderlinge verknoping van fibrinemoleculen en van fibrine met collageen door transglutaminase. Onder geschikte omstandigheden wordt een stevige gel en gel/vleesbinding met deze methode verkregen. Dit is afhankelijk van de fibrinogeenconcentratie en pH van het hechtmedium, de aanwezigheid van zout (NaCl) en het collageen aan het gel/vleesgrensvlak en daarmee de vezelrichting van het vlees.

Het fibrinogeen voor deze methode wordt als fibrinogeen-verrijkt plasma bereid uit dierlijk bloedplasma. De verrijking met fibrinogeen wordt bereikt door cryoprecipitatie en omvat alleen fysische processtappen. Bij het hechten van vlees worden vleesgrondstof, fibrinogeen-verrijkt plasma en thrombine tesamen gemengd en het mengsel in een vorm gebracht. Na overnacht laten staan (onder koeling) wordt het vlees uit de vorm gehaald en verder verwerkt, bijvoorbeeld snijden, verpakken en distribueren.

Bij verhitten voor consumptie neemt de binding tussen de gehechte vleesdelen verder toe als gevolg van eiwitdenaturatie.



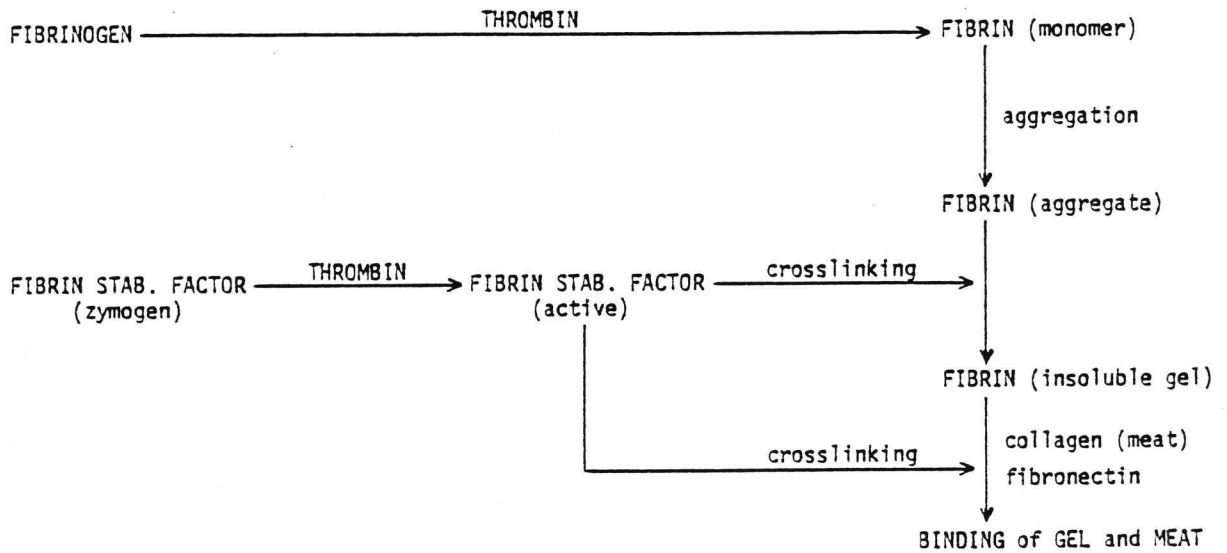


Figure 1 Principle of binding of raw meat by an enzymatically formed gel

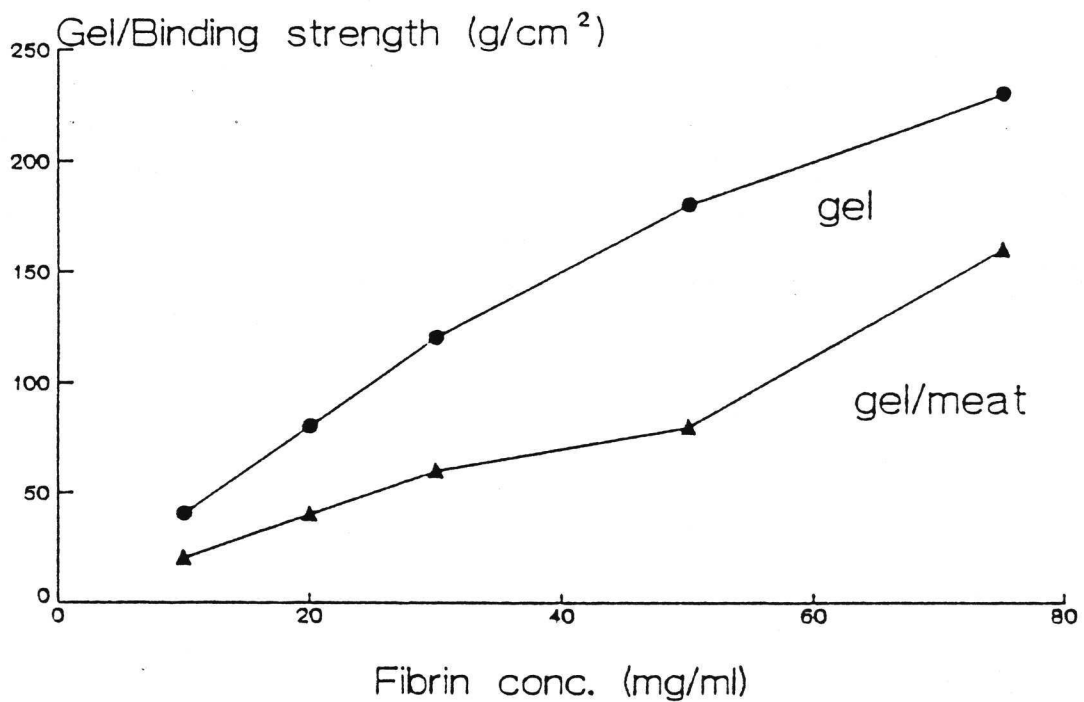
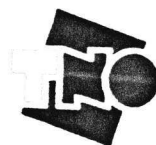


Figure 2 Influence of fibrin concentration on gel strength and gel to meat binding



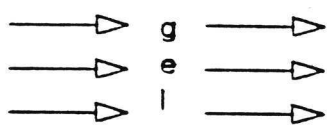
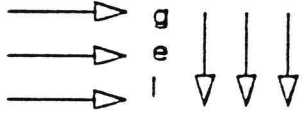
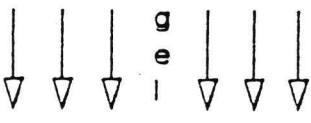
<u>Fiber direction</u>	<u>Binding strength (g/cm²)</u>
	80
	100
	160

Figure 3 Influence of direction of meat fibers on gel to meat binding

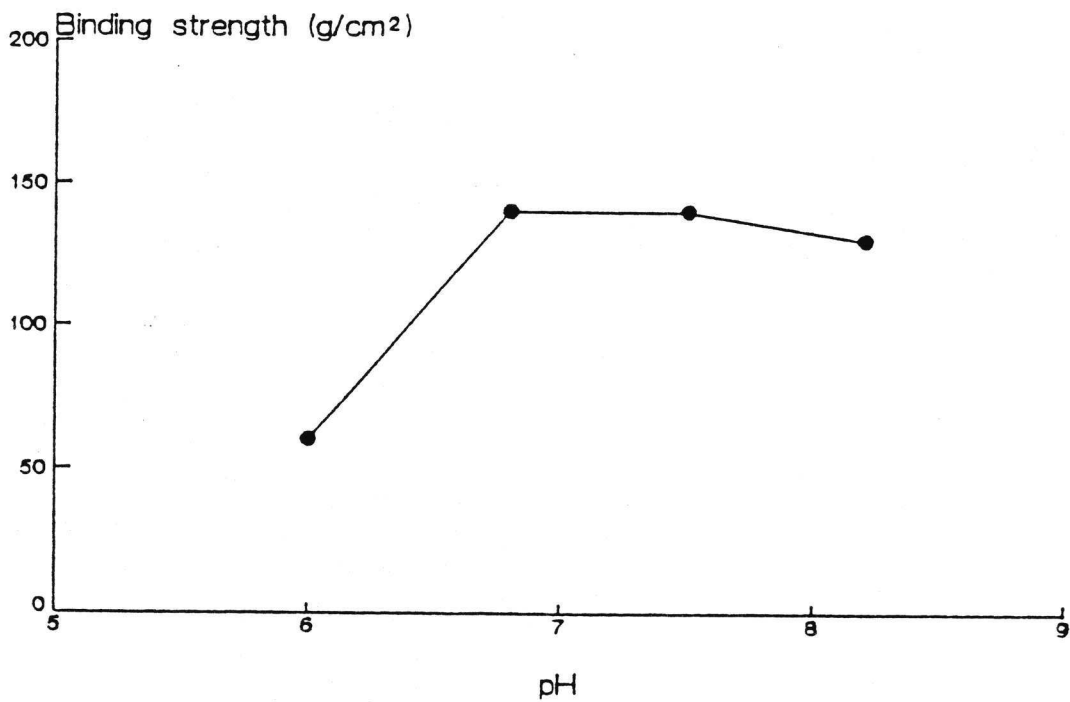
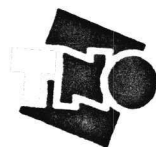


Figure 4 Influence of pH of gel on gel to meat binding



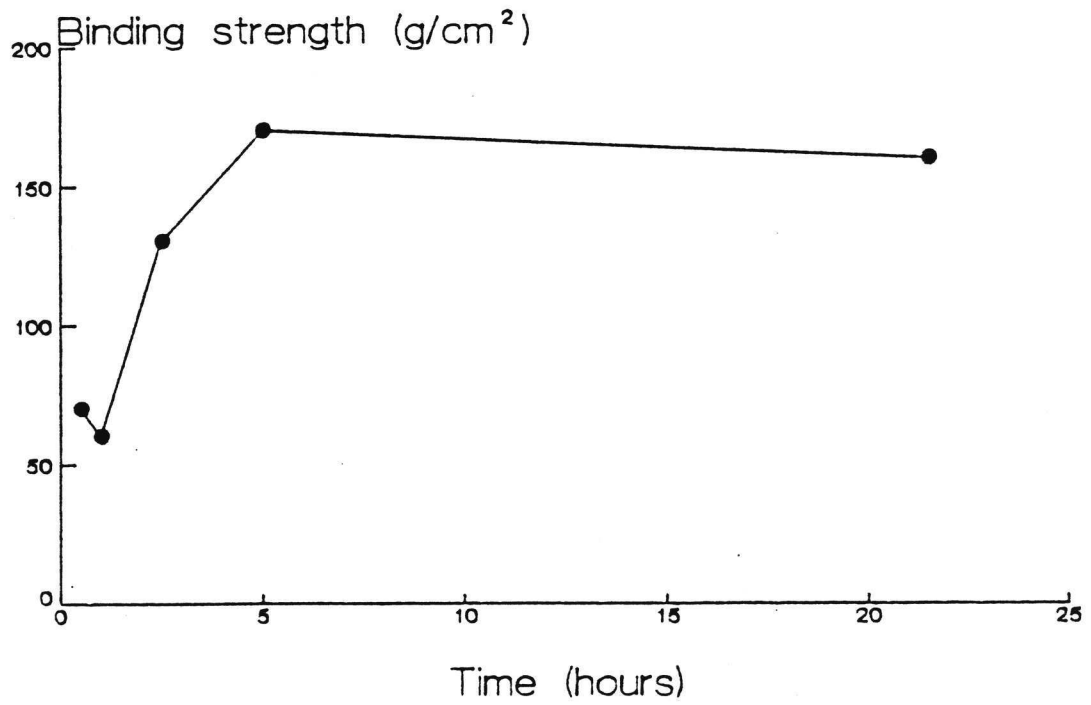


Figure 5 Influence of time on gel to meat binding

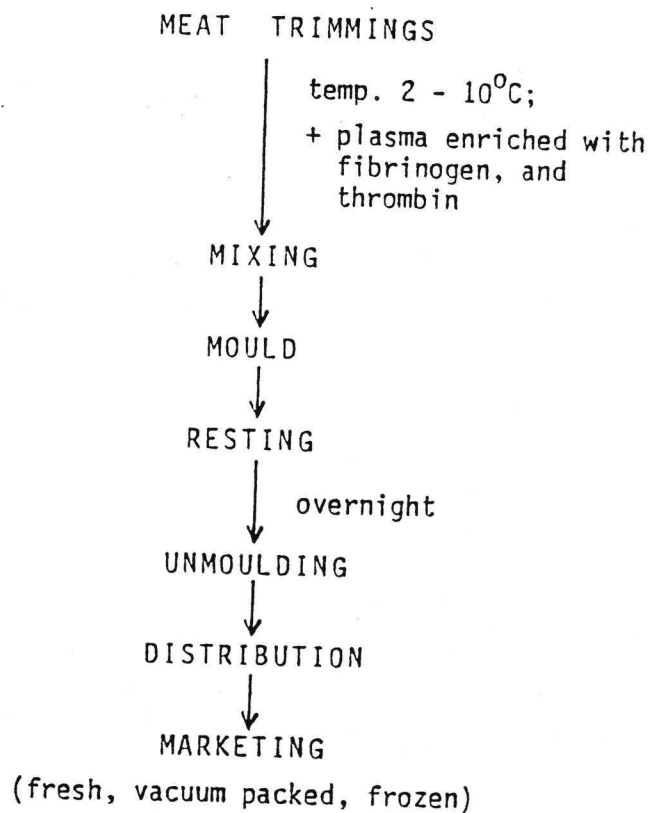
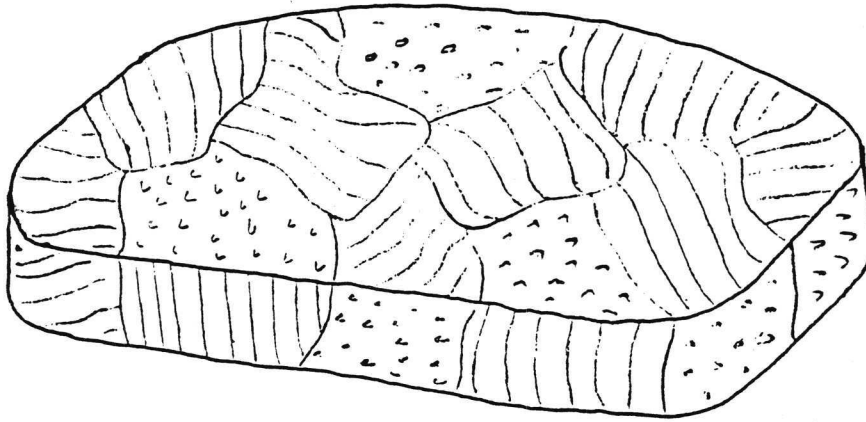


Figure 6 Preparation of a composite fresh meat product



COMPOSITE RAW MEAT PRODUCT



CHEMISCHE MODIFICATIE VAN PLANTAARDIGE EIWITTEN

J.M. Vereijken, ATO Agrotechnologie, Wageningen.

In Nederland wordt eiwit gewonnen uit een drietal gewassen, te weten tarwe, aardappelen en mais. Deze eiwitten hebben een beperkt toepassingsgebied: tarwegluten worden vrijwel alleen gebruikt in bakkerijproducten en aardappeleiwit en maisgluten vrijwel alleen in veevoeder. Dit kleine toepassingsgebied is voornamelijk te wijten aan hun beperkt scala aan functionele eigenschappen. Door de eiwitten te modificeren kan dit scala, en derhalve hun toepassingsbereik, worden vergroot. Eiwitten kunnen zowel chemisch, enzymatisch, fysisch als genetisch worden gemodificeerd. De nadruk bij deze lezing zal worden gelegd op chemische modificatie.

Om het inzicht in de relatie tussen de structuur en de functie van eiwitten te verdiepen wordt bij het fundamentele onderzoek zeer veel gebruik gemaakt van chemische modificatie. Hiervoor zijn dan ook een groot aantal methodes ontwikkeld, maar slechts enkele ervan zijn toegepast op plantaardige eiwitten, bijvoorbeeld deamidering en acylering van tarwegluten. Door deze modificaties worden de functionele eigenschappen van gluten zeer sterk veranderd: o.a. worden de gluten oplosbaar in water en verkrijgen zij goede schuimvormende en emulgerende eigenschappen. Verder is gebleken dat geacyleerde tarwegluten kunnen worden gebruikt als cobinder in papiercoating.

Onderzoek naar modificaties kan zeer snel tot succes leiden. In samenwerking met Latenstein Zetmeel BV is middels modificatie een glutenpreparaat ontwikkeld dat goed dispergeerbaar is in water en o.a. zeer goed voldoet in formuleringen voor kalvermelk. De tijdsduur tussen de start van het onderzoek en het op de markt brengen van dit preparaat bedroeg slechts 3 jaar.

Samenvattend kan worden gesteld dat modificering zeer goede perspectieven biedt voor valorisatie van plantaardige eiwitten. Verder onderzoek hiernaar is dan ook dringend gewenst.



CHEMISCHE MODIFICATIE VAN PLANTAARDIGE EIWITTEN

PRODUCTIE VAN PLANTAARDIGE EIWITTEN IN NEDERLAND

<u>EIWIT</u>	<u>TON/JAAR</u>
TARWEGLUTEN	35.000
AARDAPPELEIWIT	25.000
MAISGLUTEN	35.000

TOEPASSINGEN VAN PLANTAARDIGE EIWITTEN

<u>EIWIT</u>	<u>TOEPASSING</u>
TARWEGLUTEN	BAKKERIJPRODUCTEN
AARDAPPELEIWIT	VEEVOEDER
MAISGLUTEN	VEEVOEDER

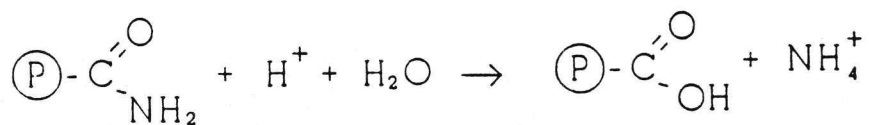
MOGELIJKHEDEN VOOR EIWTMODIFICATIE:

- CHEMISCH
- ENZYMATISCH
- FYSISCH
- GENETISCH

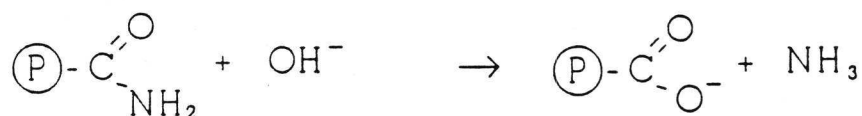
MODIFICATIE	REAGENS	ZIJKETEN
VERESTERING	ALKOHOL	GLU, ASP
DEAMIDATIE	ZUUR	GLN, ASN
ACYLERING	ANHYDRIDES	LYS
GLYCOSILERING	RED. SUIKERS	LYS
AMIDERING	AMINOZUREN	GLU, ASP
ALKYLERING	HALOACETATEN	CYS
FOSFORYLATIE	FOSFOOXYCHLORIDE	LYS
OXIDATIE	PEROXIDES	CYS, MET
REDUCTIE	THIOLS	CYS

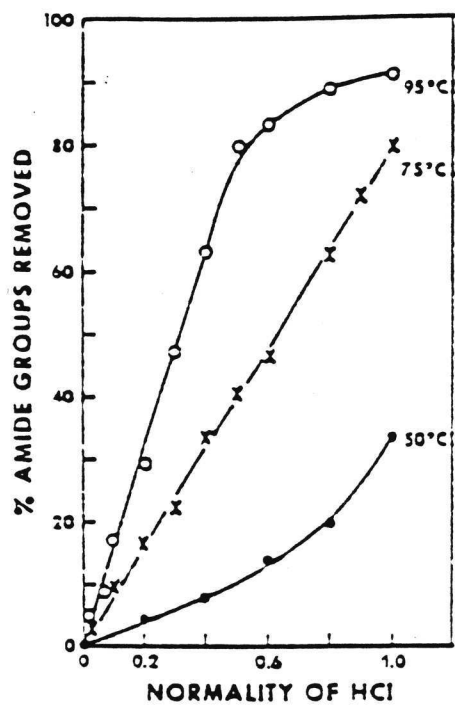
DEAMIDATIE

Zuur

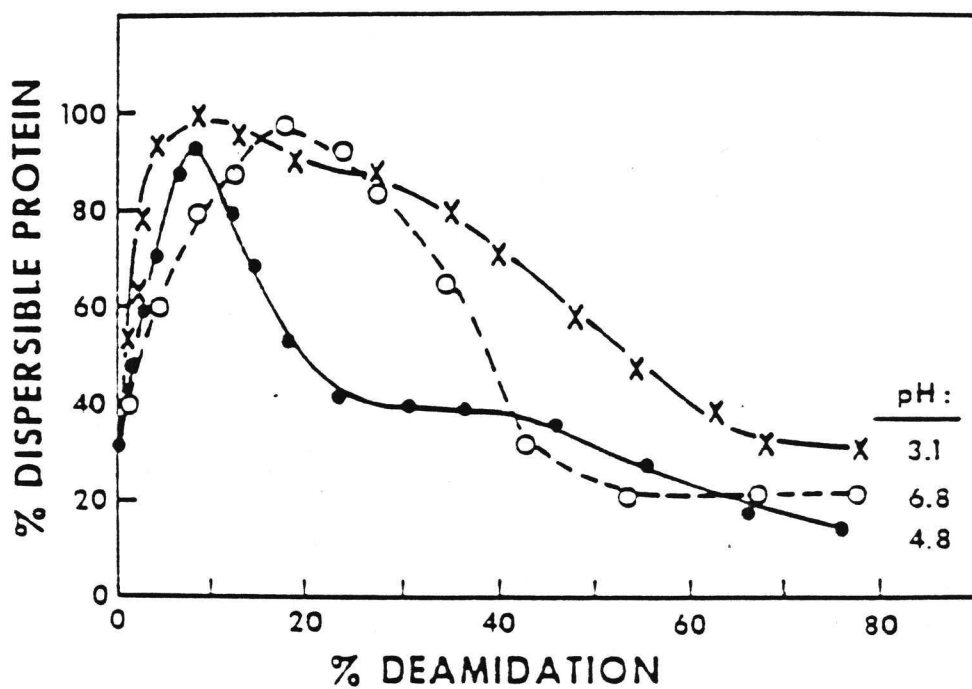


Base

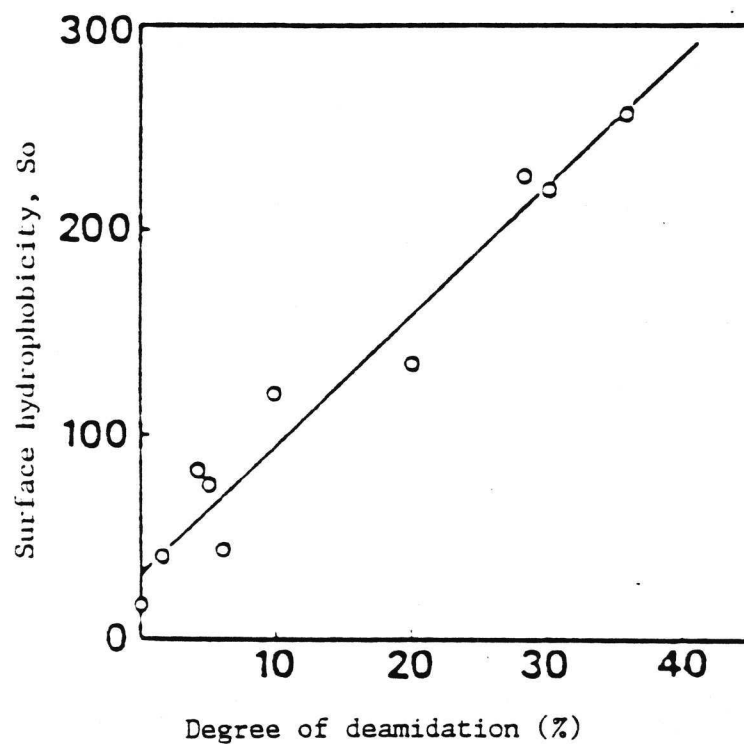




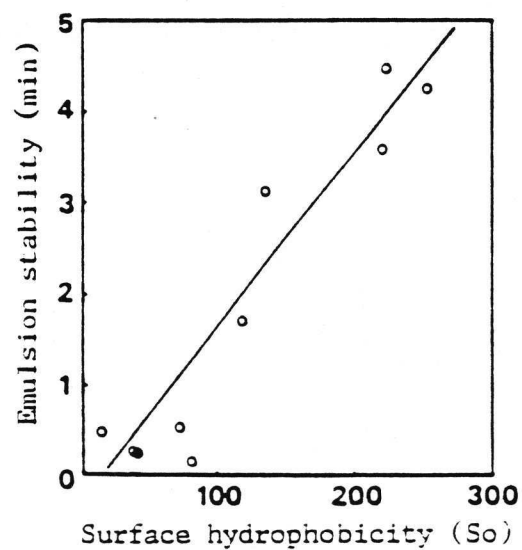
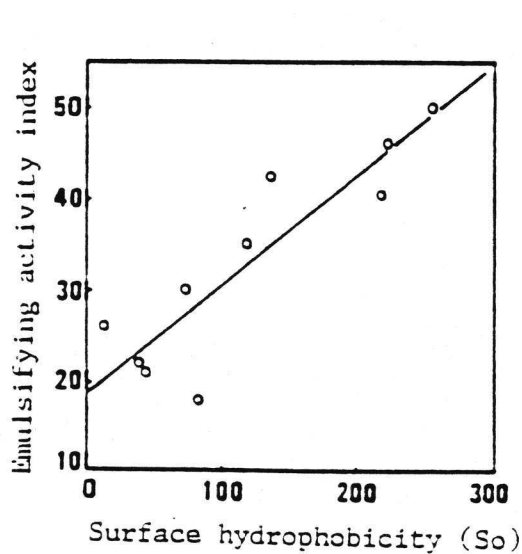
Bron: J.W. Finley
J. Food Sci. 40, 1975, 1283



Bron: J.W. Finley, J. Food Sci. 40, 1975, 1283



Bron: N. Matsudomi et al, Agric. Biol. Chem. 46, 1982, 1583



Bron: N. Matsudomi et al, Agric. Biol. Chem. 46, 1982, 1583

ENZYMATISCHE MODIFICATIE:

- MILDERE OMSTANDIGHEDEN
- SPECIFIEKER
- MILIEUVRIENDELIJKE
- TOXICOLOGISCH VEILIGER

ENZYMATISCHE MODIFICATIE:

- PROTEASES: HYDROLYSE
SYNTHESE
DEAMIDATIE
- PEPTIDOGLUTAMINASES: DEAMIDATIE
- PROTEIN KINASES: FOSFORYLERING
- TRANSGLUTAMINASES: AANHECHTING AMINOZUREN
CROSS-LINKING
DEAMIDATIE
- POLYPHENOLOXIDASES: CROSS-LINKING

CONCLUSIES:

- MODIFICATIE BIEDT ZEER GOEDE PERSPECTIEVEN
VOOR VALORISATIE VAN EIWITTEN
- VERDER ONDERZOEK IS DRINGEND NOODZAKELIJK

SYMPOSIUM INDUSTRIELE EIWITTEN
19 SEPT 1990
REEHORST, EDE

Voordracht:

ENZYMATISCHE AFBRAAK VAN MELKEIWITTEN

R.J.SIEZEN

Het eiwitonderzoek van NIZO is onderverdeeld in twee centrale thema's:

- de functionele rol die melkeiwitten spelen in voedingsmiddelen;

- de enzymatische afbraak van melkeiwitten.

Dit laatste aspect heeft deels betrekking op de enzymatische afbraak van caseïnes bij de kaasbereiding. Maar ook de afbraak van melkeiwitten, zowel caseïnes als wei-eiwitten, tot producten met bijzondere eigenschappen krijgt steeds meer aandacht.

Het NIZO-onderzoek is erop gericht om meer gebruik te maken van de specifieke eigenschappen van melkeiwitten. Er zijn aanwijzingen dat bepaalde frakties van melkeiwitten bijzondere fysiologische of functionele eigenschappen bezitten, die verder geoptimaliseerd kunnen worden door enzymatische behandeling van totaal melkeiwit, of van individuele melkeiwitcomponenten. Hierbij wordt gedacht aan afbraakproducten met bepaalde smaken, verhoogde calciumbinding, verhoogde oppervlakte-activiteit, farmacologische werking, verlaagde allergeniciteit, enz.

Toepassingen zullen vooral liggen in voedingsmiddelen en farmaceutica.

DOELSTELLING

Melkeiwitten (zowel caseïnes als wei-eiwitten) enzymatisch omzetten in peptiden met bijzondere eigenschappen, bv.:

- verbeterde functionaliteit
- natuurlijke aroma, smaakstof
- geschikt voor dieet/sonde-voeding
- verminderde allergene werking
- farmacologische werking

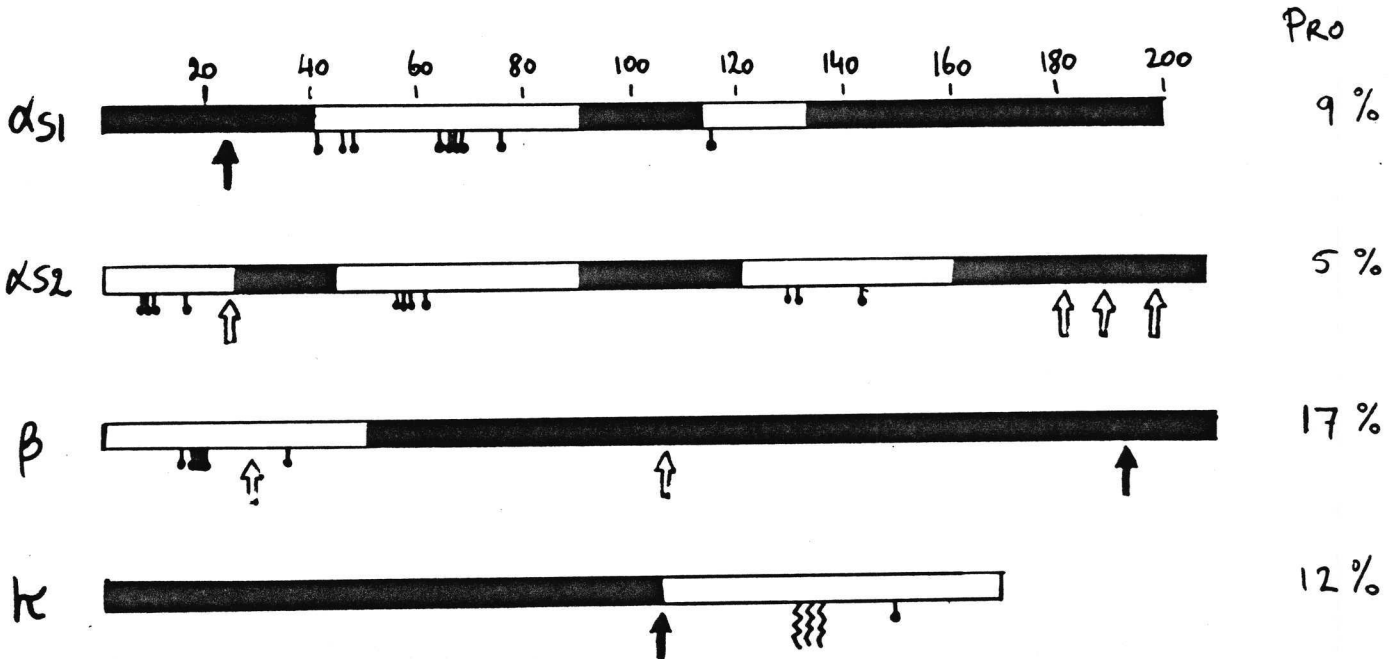
Tabel 2. Belangrijkste melkeiwitten

eiwit	aandeel in totaal eiwit (%)	fosfaatgroepen (aantal per molecuul)
CASEINES		
α_1 -caseïne	32	8
α_2 -caseïne	8	10-13
β -caseïne	32	5
κ -caseïne	8	1-2
	80	
WEI-EIWITTEN		
β -lactoglobuline	12	0
α -lactalbumine	4	0
immunoglobuline	3	0
serumalbumine	1	0
	20	

Eigenschappen van verschillende typen melkeiwit

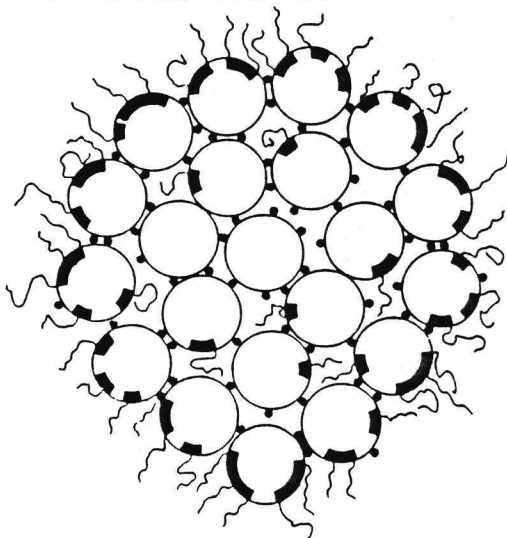
eigenschap	melkeiwit, type:	
	weieiwit	caseïnaat
• hitte denaturatie	• sterk	• geen
• hitte gelering	• sterk	• geen
emulgeer capaciteit	redelijk hoog	hoog
emulsie stabiliteit (koud)	groot	groot
emulsie stabiliteit (bij verhitting)	vrij groot	groot
schuim stabiliteit	goed	redelijk
viscositeit van de oplossing	laag	hoog
"flow" van de oplossing	kort	lang
• gevoeligheid voor pH	• gering	• groot
gevoeligheid voor natriumchloride	matig (neg.)	matig (pos.)
• gevoeligheid voor proteolyse	• gering	• groot

CASEIN STRUCTURE



δ serine-P ↑ chymosin cleavage □ hydrophilic
 § carbohydrate ↑ plasmin cleavage ■ hydrophobic

MODEL OF CASEIN MICELLE



• CALCIUM PHOSPHATE
 ~ κ-CASEIN

Bijzondere peptiden uit melk

bitter:

β-caseine

F-L-I 190-192
 Y-Q-Q-P-V-L-G-P-V-R-G-P-F-P-I-I-V 193-209

kaassmaak precursor:

αs1-caseine

R-P-K-H-P-I-K-H-Q-G-L-P-Q-
 E-V-L-N-E-N-L-L-R-F 1-23

fosfopeptide:

αs2-caseine

.....E-H-V-S-S-S-E-E-S-I-I-S-Q... 1-21
 P P P P

β-caseine

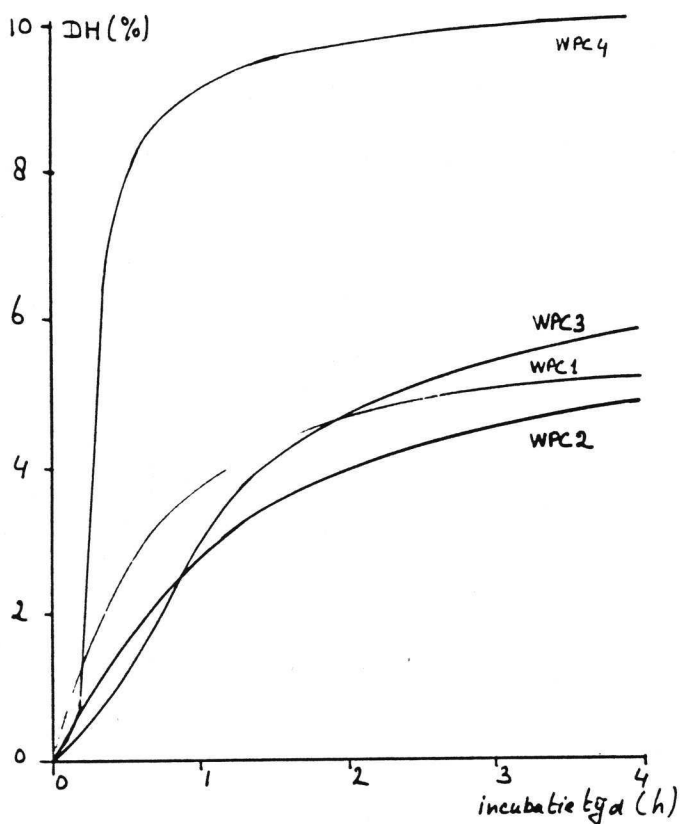
.....E-I-V-E-S-L-S-S-S-E-S-I.... 1-28
 P P P P

opioïde werking

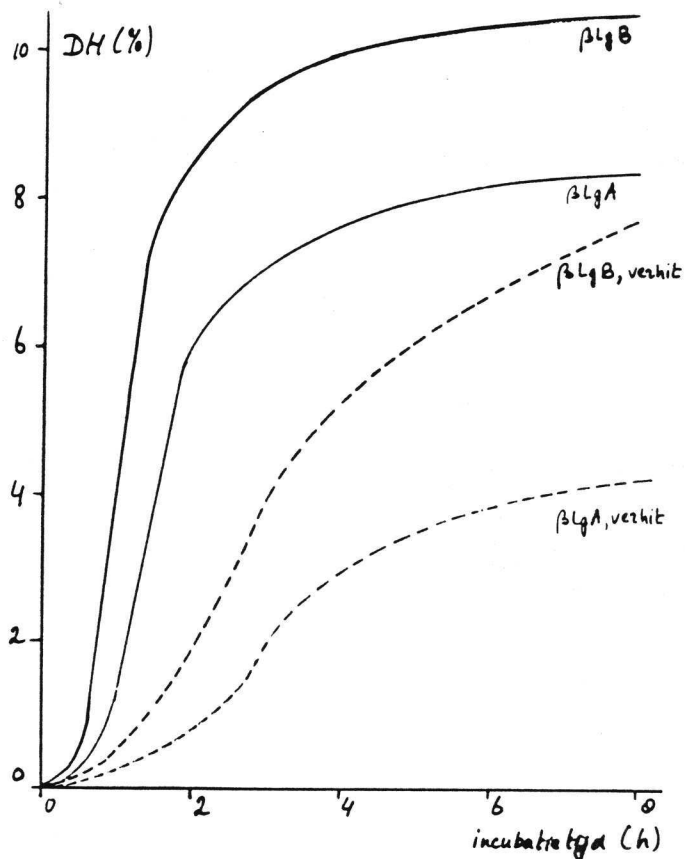
R-Y-L-G-Y-L-E	αs1-caseine	90-96
Y-P-F-x-x-x-x-x	β-caseine	60-66
x-x-Y-P-S-Y-x	κ-caseine	33-38
Y-G-L-F-x	α-lactalbumine	50-53
Y-L-L-F-x	β-lactoglobuline	102-105

enzyme	afbraak α -lactalbumine	afbraak β -lactoglobuline
MN16	+++	+++
HR70	+++	+++
GN86	+++	++
GE71	+	+
TN55	++	+
TN55 + Ca	-	++
BG78	+	+
• BG78 + Ca	-	+++
• BT41	+++	-
VN79	-	++
DE23	-	-

afbraak:
 +++ volledig
 ++ aanzienlijk
 + matig
 - geen



Incubatie van 4 verschillende WPC's met papaine
 eiwitconcentratie 0,6%, E/S = 1/200, pH 8,0, 40°C



Incubatie van beta-lgA en B, al dan niet 10' 72°C verhit
 met papaine. Eiwitconcentratie 0,6%, E/S = 1/500,
 pH 8,0, 40°C.

Praktische en fundamentele aspecten van eiwitdenaturatie

Dr. R.J. Hamer, IGMB-TNO, Wageningen

Samenvatting

In de industrie nemen verhittingsprocessen een belangrijke rol in. Zo worden verhittingsprocessen in de voedings- en voedermiddelen industrie toegepast om te drogen, te bakken en schadelijke bestanddelen te inaktiveren. Bij het verbeteren van de efficiëntie van deze processen spelen naast allerlei technologische ontwikkelingen ook (bio-)chemische overwegingen een belangrijke rol. In deze voordracht zal dit laatste punt aan de hand van een aantal voorbeelden worden toegelicht. Hierbij staat het effect van verhitten op de eigenschappen van eiwitten centraal.

Eiwitten kunnen onder invloed van hitte allerlei veranderingen ondergaan. Deze veranderingen kunnen in een groot aantal gevallen vervolgd worden met behulp van Differentiële Scanning Calorimetrie (DSC). Met deze methode kunnen gegevens worden verkregen over de kinetische en energetische parameters van deze veranderingen. Verder inzicht kan verkregen worden door met (bio-)chemische methoden de thermisch geïnduceerde veranderingen verder te bestuderen. Hierbij kan gedacht worden aan veranderingen in structurele organisatie en functionaliteit van eiwitten. Samen met DSC kan deze informatie gebruikt worden om thermische processen beter te begrijpen op moleculair niveau en daaruit voortvloeiend meer doelgericht en efficiënt toe te passen.

Praktische en fundamentele aspecten van eiwitdenaturatie.

R.J.Hamer
TNO-IGMB, Wageningen.

Verhittingsprocessen worden gebruikt om:

- te drogen;
- te ontsluiten;
- te inactiveren;
- te fixeren.

Tarwe eiwitten:

toepassingen:

- voedingsmiddelen;
- voeders;
- non food sector

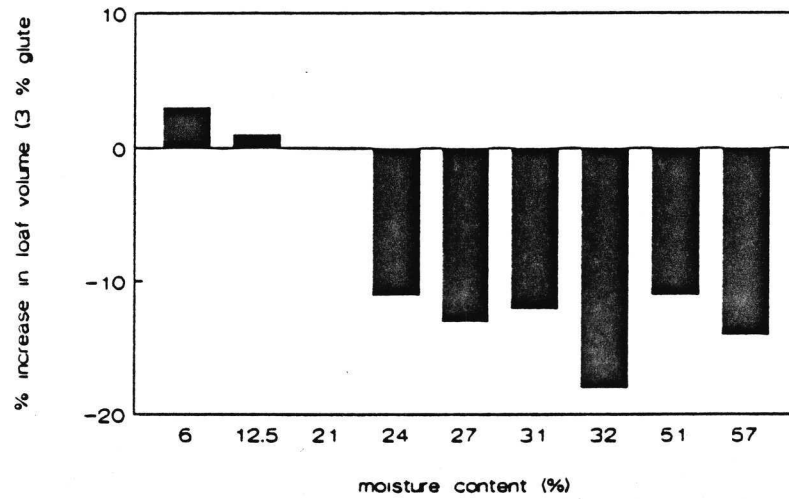
belangrijke eigenschappen:

- viscoelasticiteit;
- verteerbaarheid.

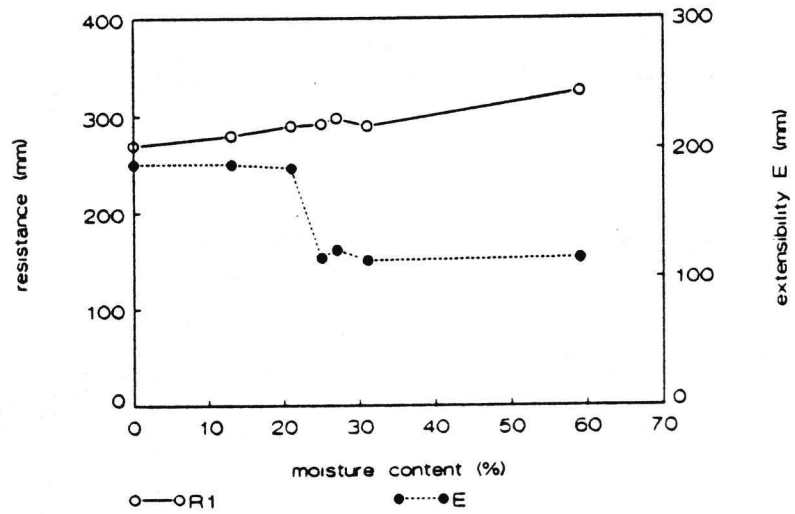
Onderzoek naar hitte geïnduceerde processen vereist:

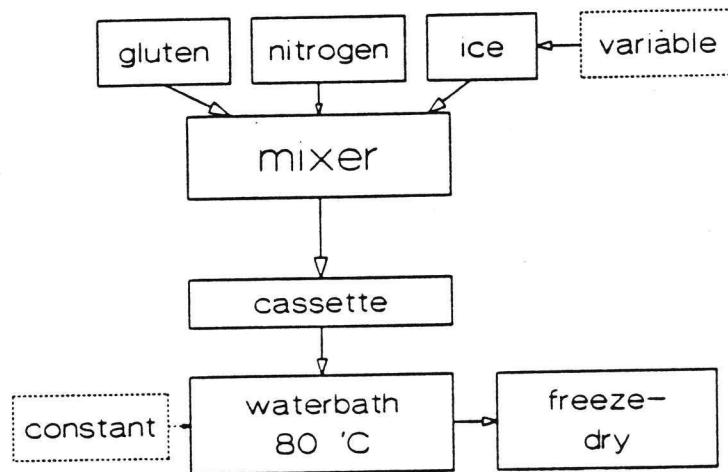
- goede modellen;
- in kaart brengen functionaliteit;
- bestuderen veranderingen op moleculair niveau;
- leggen van relaties hiertussen

Effect of heat on baking quality
heating at different moisture levels

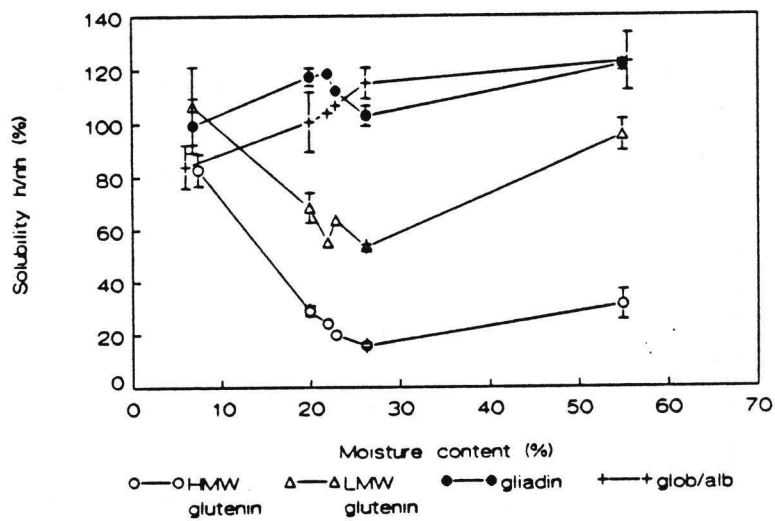


Effect of heat on gluten properties
Extensigraph measurements

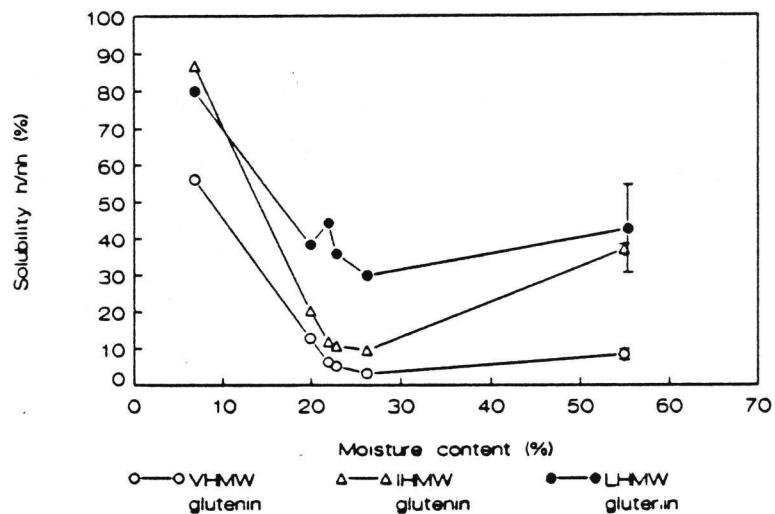




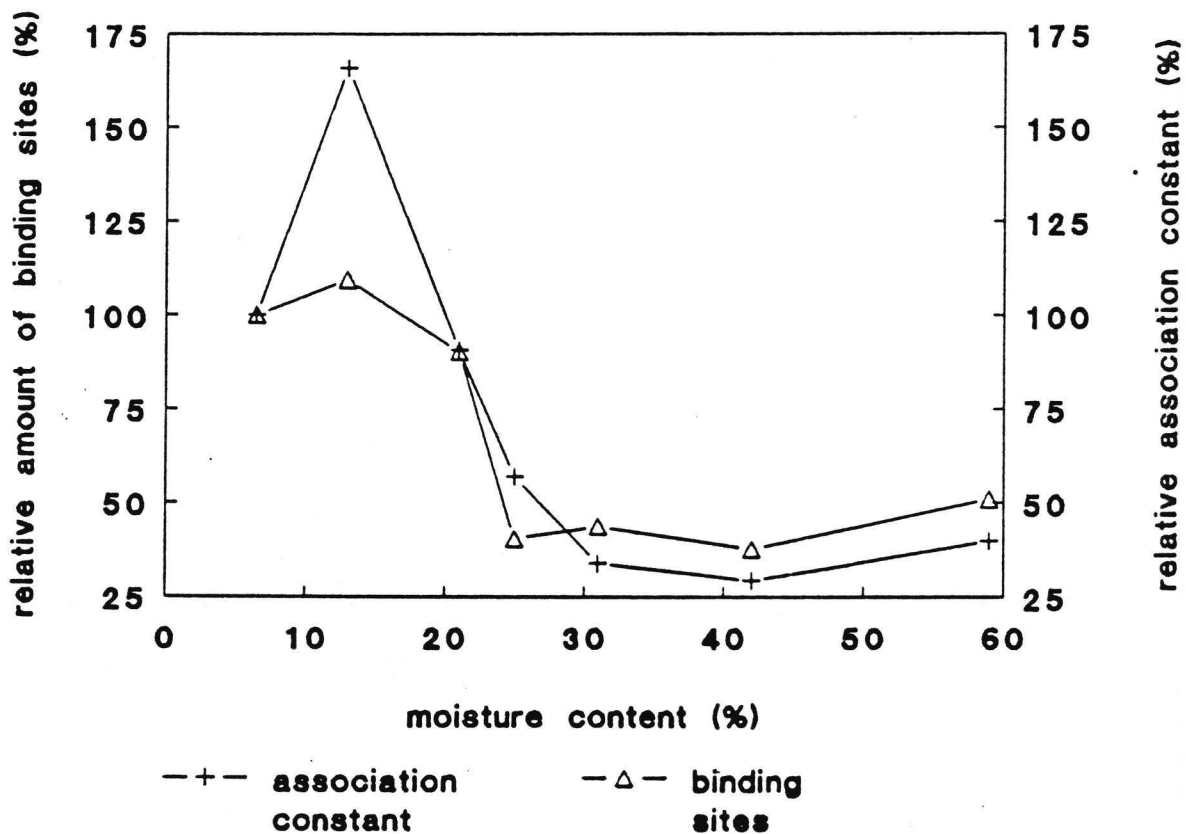
Solubility of gluten proteins



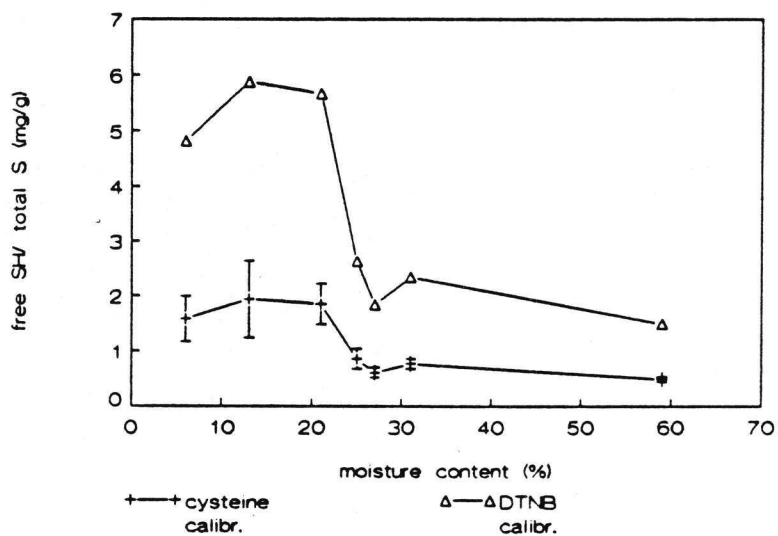
Solubility of glutenin polymers

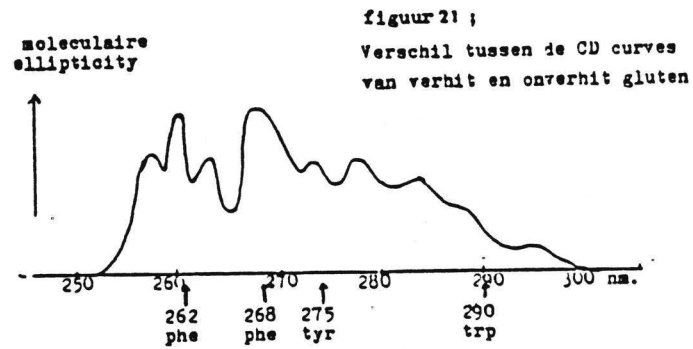
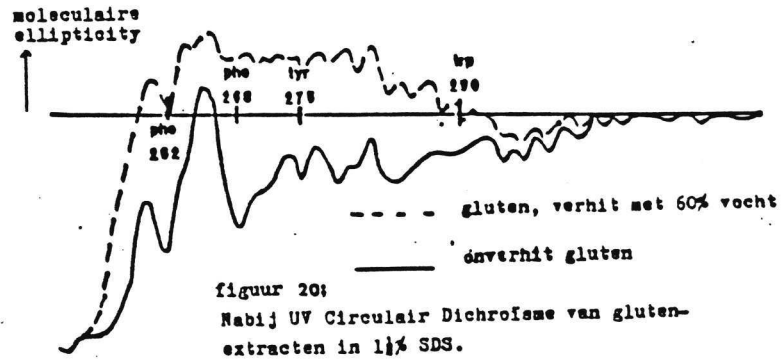


Relative hydrophobicity of heated gluten

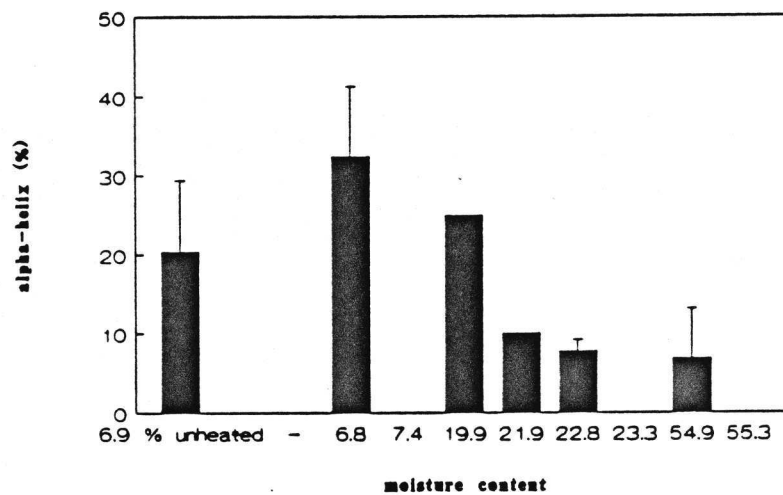


Effect of heat on gluten structure SH-measurements





Alpha-helix



FUNKTIONELE EIGENSCHAPPEN VAN EIWITTEN BIJ INDUSTRIELE TOEPASSING

P. Walstra, Vakgroep Levensmiddelentechnologie, LU

Bij industriële toepassing van eiwitten zijn vaak heel andere eigenschappen functioneel dan onder "natuurlijke" omstandigheden. Bij toepassing in levensmiddelen zijn voedingswaarde, afwezigheid van de gezondheid bedreigende factoren en smaak uiteraard van groot belang. Maar evenzeer wezenlijk zijn een aantal andere eigenschappen van meer fysisch-chemische aard waarin verschillende eiwitten vaak sterk verschillen. Dit zijn bijv.:

- De reologische eigenschappen van een waterige oplossing/dispersie.
- De mogelijkheden tot vorming van een gel, of meer algemeen tot een visco-elastisch materiaal met bepaalde eigenschappen; zowel macromoleculaire als deeltjesgelen komen voor.
- De stabilisering van dispersies via adsorptie aan de disperse fase; instabiliteit kan gewenst zijn als men een visco-elastisch materiaal wil maken, zoals hierboven vermeld.
- Het maken van emulsies: hoeveel eiwit is nodig en wat wordt de druppelgrootteverdeling?
- De stabiliteit van de gemaakte emulsies tegen vlokking en coalescentie.
- Het maken van schuim: dit is zeer verwant aan het maken van emulsies, maar niet identiek.
- De stabiliteit van het gemaakte schuim: hier spelen ook drainage en Ostwald-vergroving een grote rol.

Deze aspecten zullen in enig detail worden besproken. De conclusie is dat het voor een aanzienlijk deel om kolloidale of andere macroscopische problemen gaat. Voor een ander, eveneens aanzienlijk deel zijn moleculaire aspecten wezenlijk, vaak in relatie met de macroscopische. De belangrijkste zijn waarschijnlijk:

- Conformatieveranderingen bij adsorptie aan (starre en beweeglijke) grensvlakken, waarbij vooral dynamische aspecten wezenlijk zijn.
- Onderlinge (chemische) interacties van eiwitten, ook bij zeer hoge concentraties (zoals in een beweeglijk grensvlak); het gaat hierbij ook om mengsels van eiwitten.
- Denaturatie, zowel het ontvouwen van de peptideketen als de daarop volgende, tot irreversibele veranderingen leidende reacties. De eerste beide aspecten kunnen niet los gezien worden van denaturatie, maar ook voorafgaande denaturatie is van belang.

TYPEN EIWITTEN

Globulaire

enzymen
serumalbumine
actine

Fibrillaire

collageen
elastine
fibrine

Andere

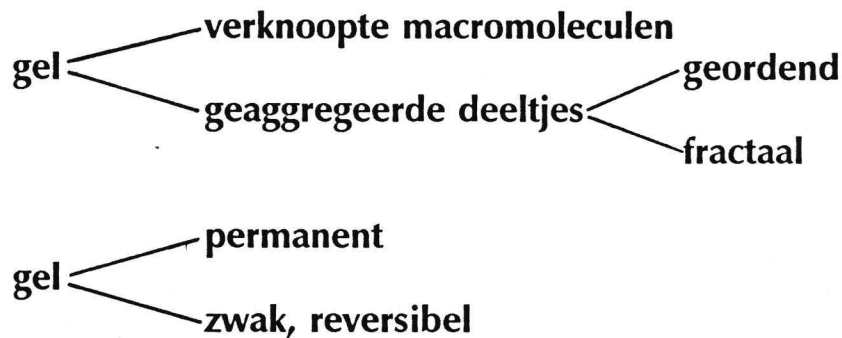
caseïne
glutenine
gedenatureerde globulaire

FUNCTIONELE EIGENSCHAPPEN VAN EIWITTEN BIJ INDUSTRIELE TOEPASSING

- Reologische eigenschappen in waterige oplossing/dispersie

- vorm/zwelling
- aggregatie

- Gelvorming



- Invloed, via adsorptie, op stabiliteit/aggregatie dispersie

- Emulsievorming

- hoeveel eiwit is nodig?
- welke druppelgrootte?

- Stabiliteit emulsie

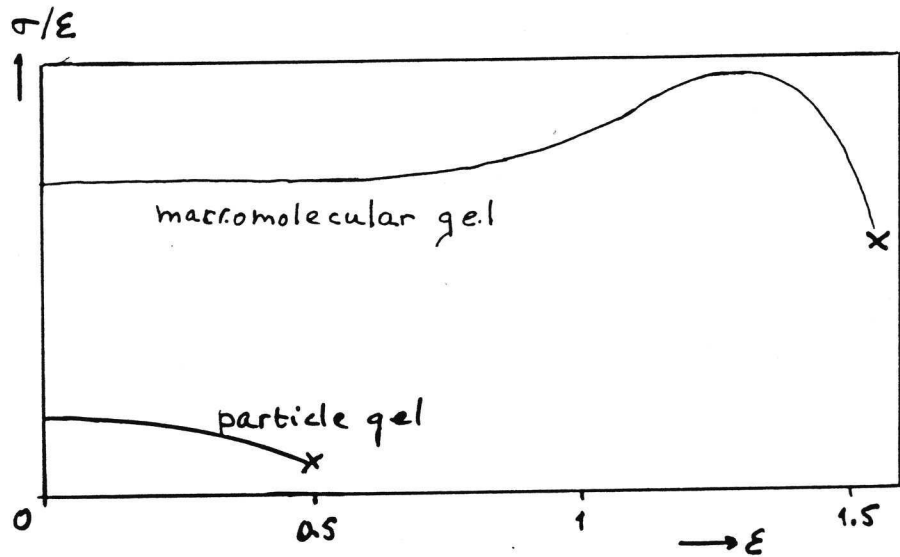
- sedimentatie
- aggregatie
- coalescentie
- partiële coalescentie

- Schuimvorming

- Stabiliteit schuim

- coalescentie/filmbreuk
- drainage
- Ostwald-vergroving

1. **Eerst probleem analyseren: welk verschijnsel?**
2. **Fysische chemie correct**
3. **Invloed mengsels/andere stoffen
dus analysemethoden**
4. **Eiwitchemie, o.m.**
 - a. **Conformatieverandering bij adsorptie
ook dynamische aspecten**
 - b. **Onderlinge chemische interacties
ook van mengsels
ook in (beweeglijke) grensvlakken**
 - c. **Denaturatie (hitte, pH, ...)
ontvouwen
volgreacties**
5. **Eiwit modificeren
chemisch
enzymatisch
genetisch**



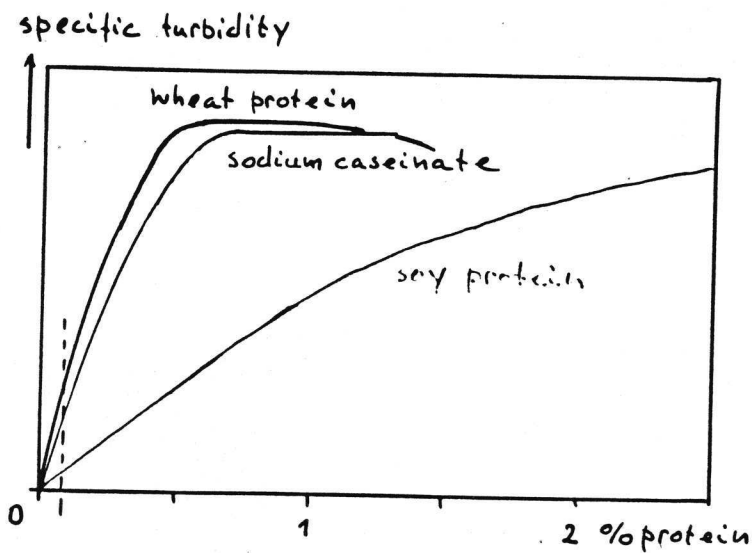
Linear region up to

- Rubber $\epsilon = 3$
- gelatin 1.5
- Alginate 0.2
- Skimmilk 0.03
- Margarine fat 0.0005

$$\epsilon = \ln(H_0/H)$$

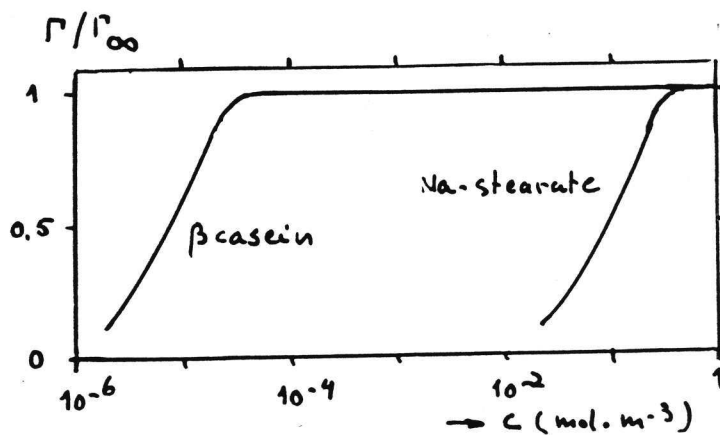
$$\sigma = F/A$$

EMULSIFICATION AT VARIOUS PROTEIN CONCENTRATIONS



$$Q = 0.27 \quad \text{Hom. press} = 20 \text{ bar}$$

After Mertens

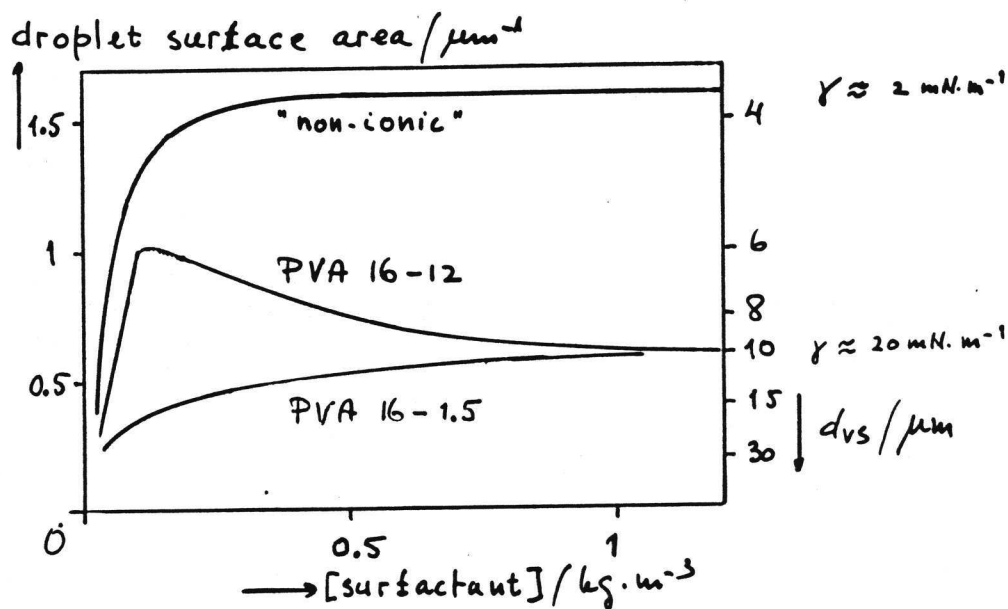


β casein: MW 24 000 ; Γ_∞ $2.7 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$)

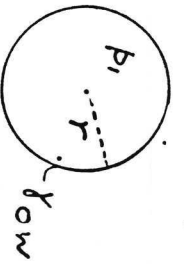
Na-stearate: MW 470 ; Γ_∞ $3.8 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$)

OIL-IN-WATER EMULSIONS

$\phi = 0.2$ constant conditions



p_2



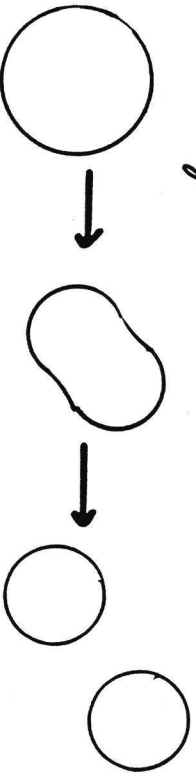
LAPLACE PRESSURE

$$\Delta p = p_1 - p_2 = \frac{2\gamma_{ow}}{r}$$

Disruption if external pressure $> \Delta p_{Laplace}$

In laminar flow:

$$We = \frac{\eta_c g r}{\gamma} \gtrsim 0.5$$



2.3!
 $\eta_c = 10^{-2} \text{ f}$
 $\gamma = 10^{-4} \text{ N/m}$
 $r = 10^{-3} \text{ m}$

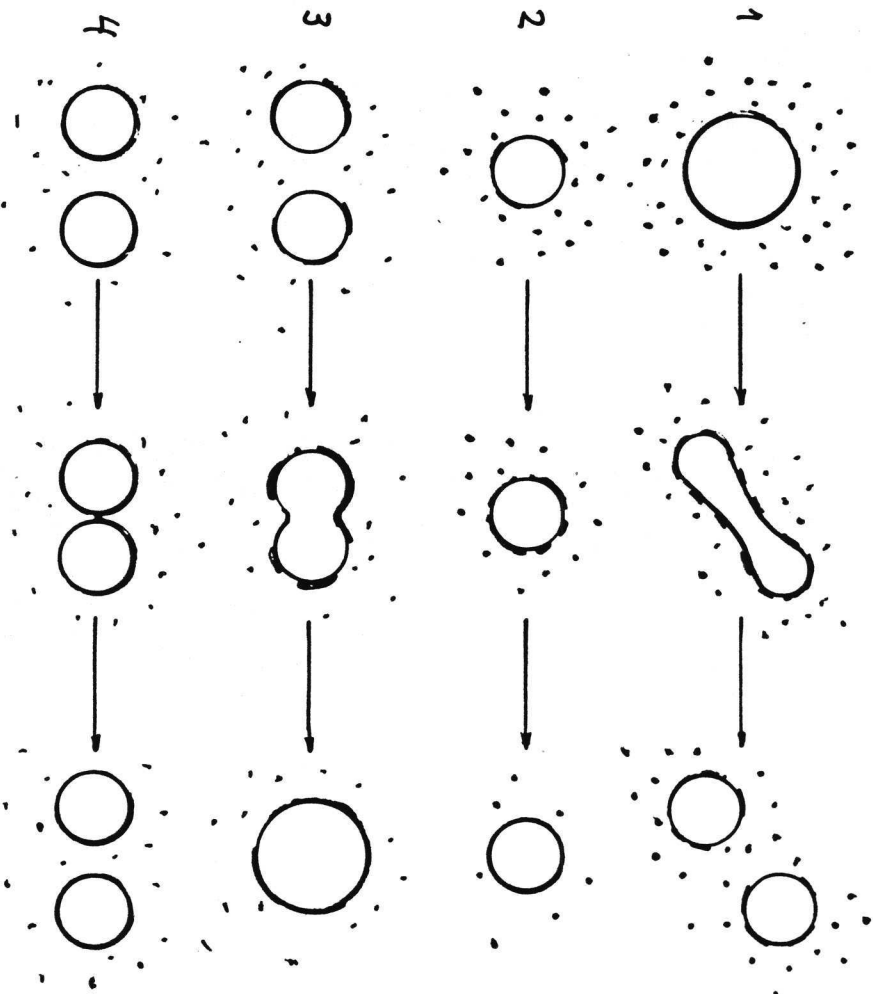
In turbulent flow

$$\langle v^2(x) \rangle \propto \epsilon^{2/3} \times \rho_c^{-2/3}$$

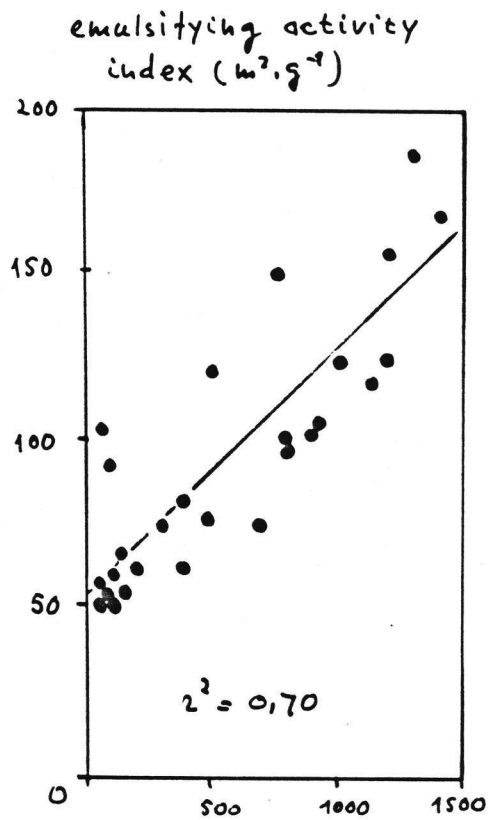
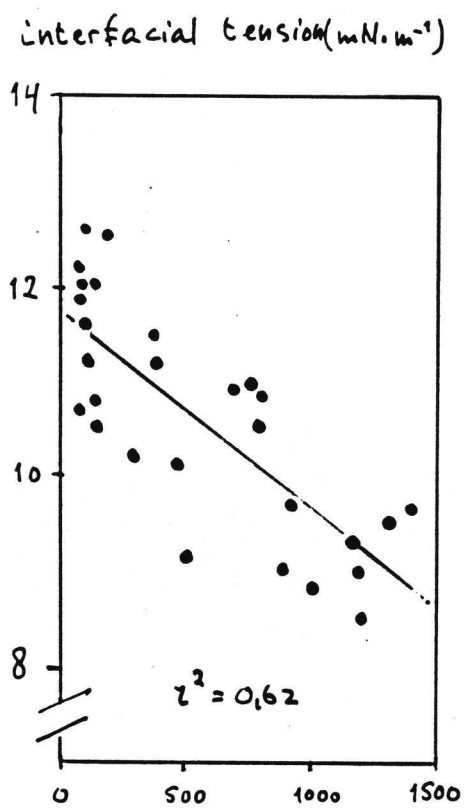
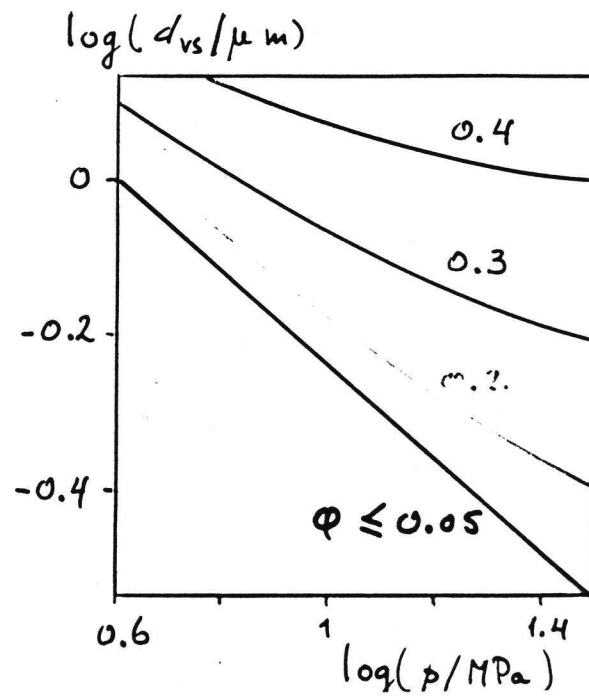
$$(\Delta p)_{turb} \approx \rho_c v^2(x)$$

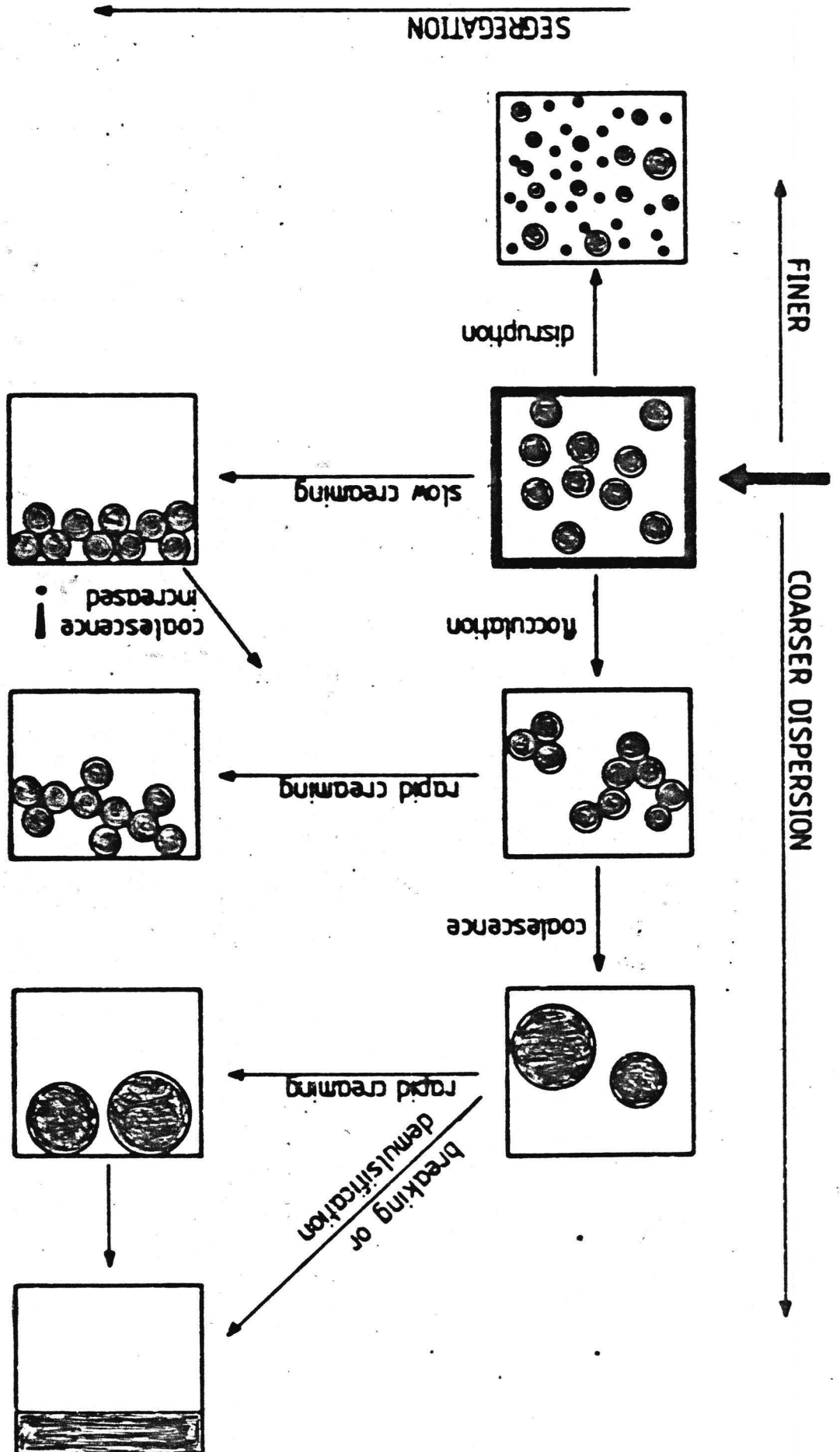
$$\therefore X_{max} \propto \epsilon^{-0.4} \gamma^{0.6} \rho_c^{-0.2}$$

PROCESSES DURING EMULSIFICATION

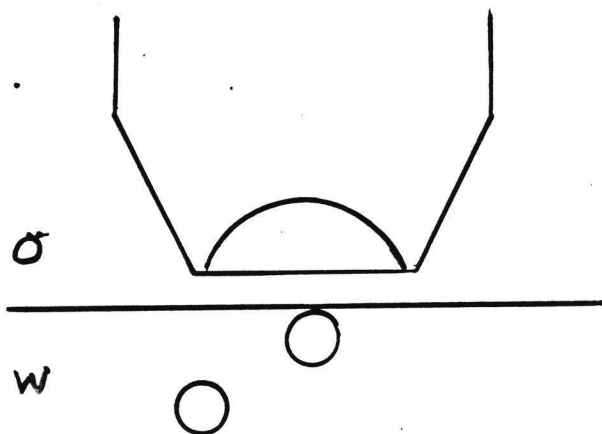


Not to scale!





COALESCENTIE VAN OLIEDRUPPELS MET O/W GRENSVLAK

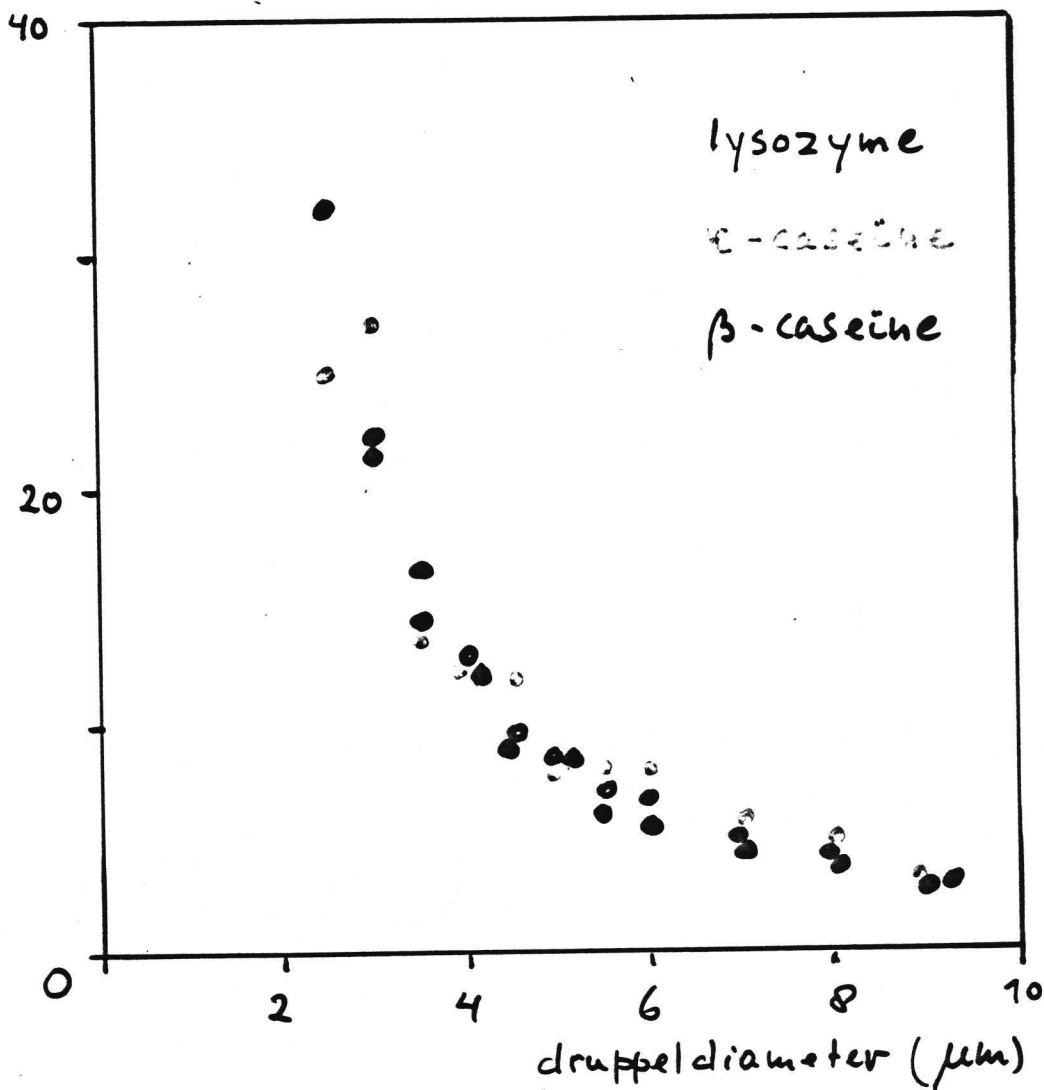


1 g eiwit per m^3

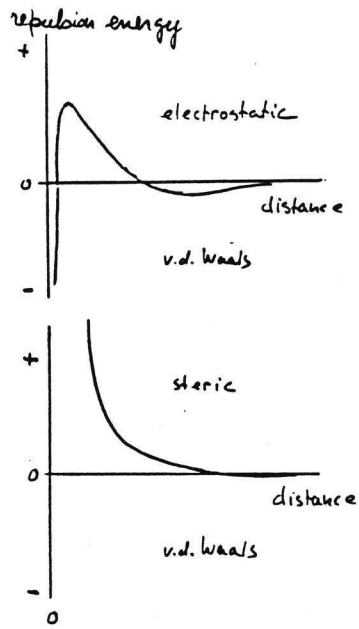
leeftijd ≈ 20 min

$\therefore \Gamma \approx 0,4 \text{ mg} \cdot m^{-2}$

"coalescentie tijd" (s)

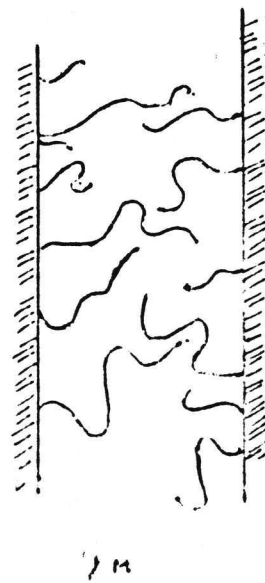
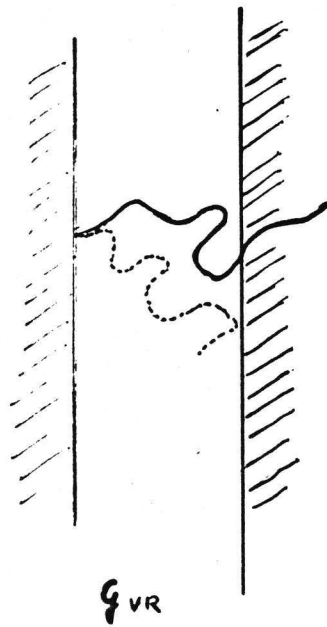
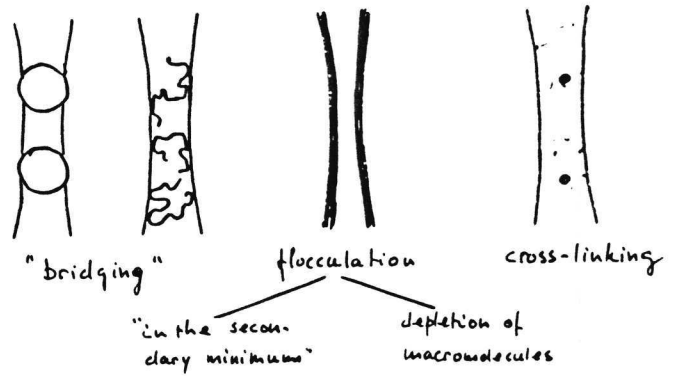


Dickinson, Murray & Stainsby



EXAMPLES !

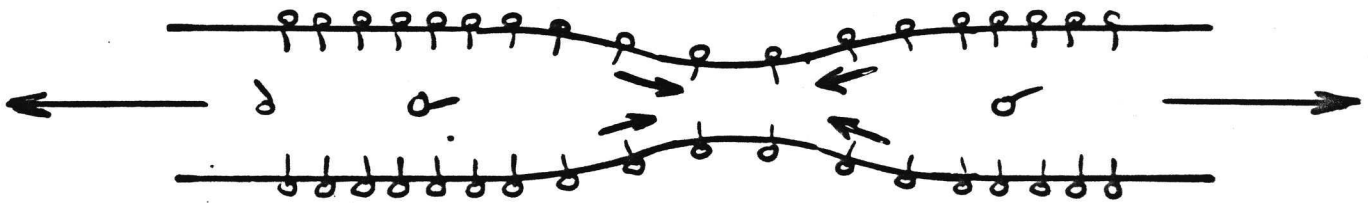
AGGREGATION



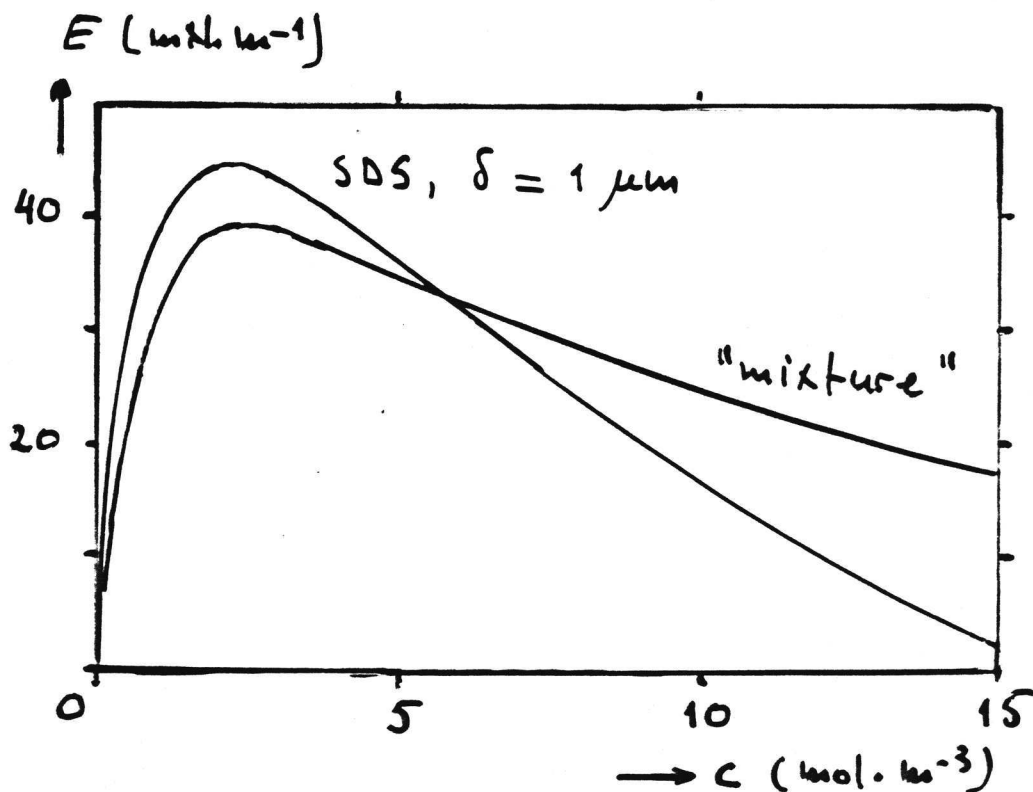
FILM RUPTURE

- Young films

GIBBS STABILITY OF FILM



Gibbs elasticity. $E \equiv 2\varepsilon \equiv 2d\gamma/d\ln A$



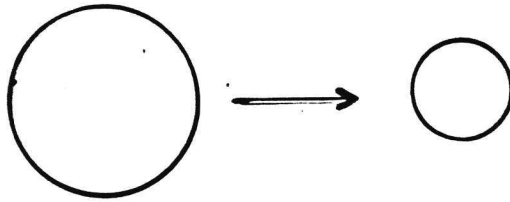
- Films with extraneous particles

- Thin films

colloidal interactions

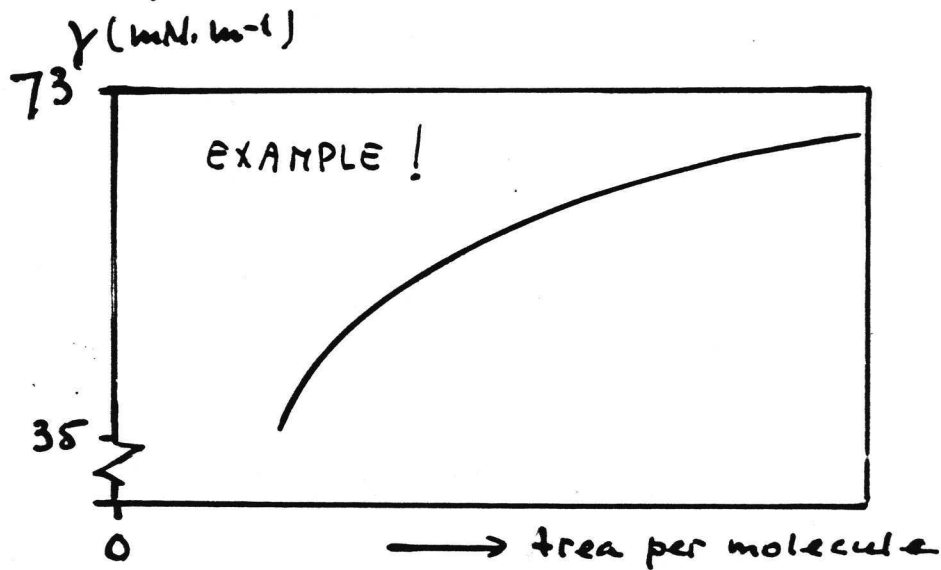
RETARDING DISPROPORTIONATION

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r}$$



hence, A decreases

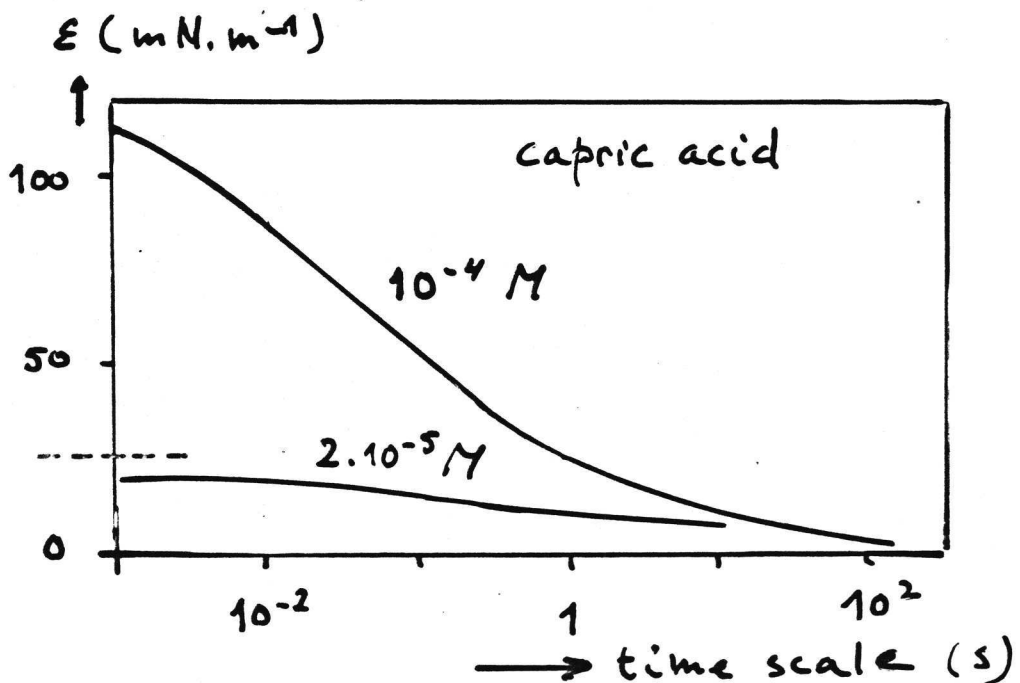
$$d \ln A = 2 d \ln r$$



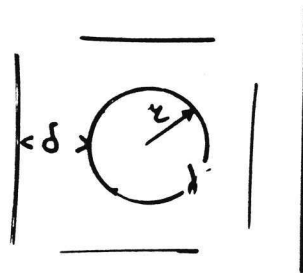
Surface dilational modulus $\epsilon \equiv d\gamma/d \ln A$

$$\text{if } \epsilon = \frac{1}{2} \gamma \rightarrow dr = 0$$

But, ϵ is time dependent, e.g.!



DISPROPORTIONATION

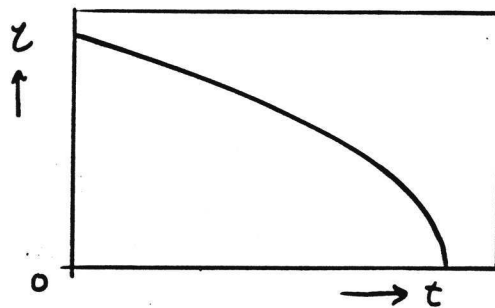


Kelvin 1

$$RT \ln \frac{S}{S_{\infty}} = 2 \gamma M / \rho_0 r$$

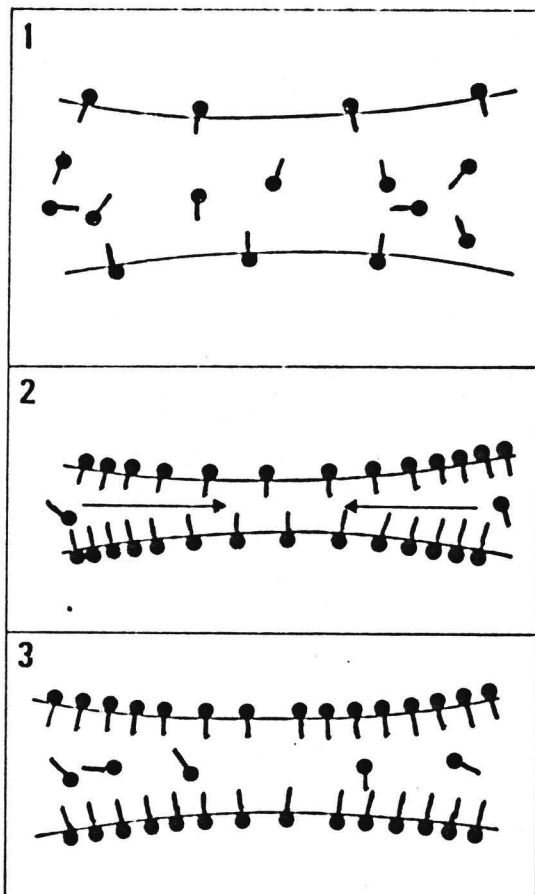
de Vries :

$$\gamma^2 = \gamma_0^2 - \frac{4 RT}{\rho_{atm}} \cdot \frac{D S_{\infty}}{\delta} \cdot \gamma \cdot t$$

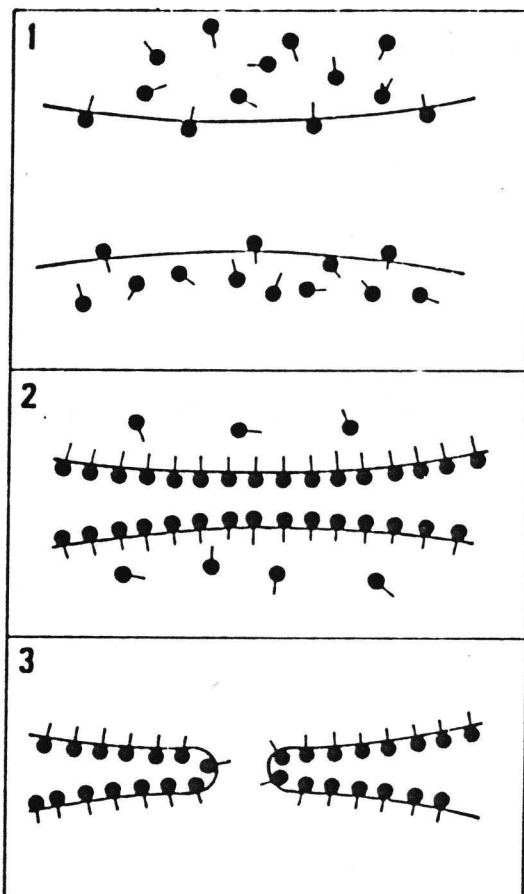


For N_2 in water : $t \approx 2 \cdot 10^{13} \gamma_0^2 s$ (s)

A



B



$$E \equiv 2 d \gamma / d \ln A$$

Eiwitten aan grensvlakken

De adsorptie van eiwitten aan grensvlakken wordt bepaald door een aantal verschillende soorten wisselwerkingen. Een van de belangrijkste vragen hierbij is in welke mate de conformatie van de eiwitmoleculen verandert ten gevolge van de adsorptie.

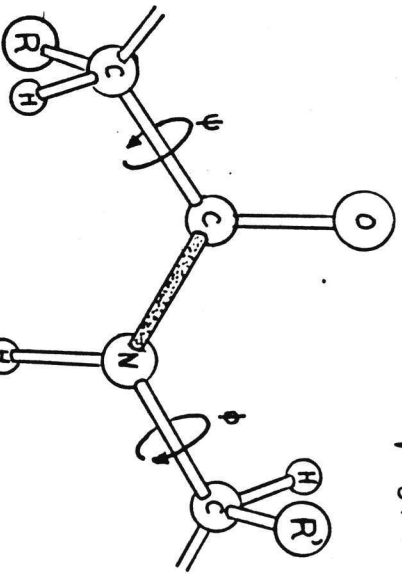
Het meeste eiwit-adsorptie werk in onze groep is uitgevoerd aan vaste oppervlakken met menselijk serum albumine (HSA) en runder ribonulcease (RNase) als eiwitten, maar ook een aantal kleine eiwitmoleculen, waarvan de 3D-structuur goed bekend is, is onderzocht. De onderzoeksmethoden en de interpretatie van de gegevens zijn gericht op de eiwitmoleculen in hun geheel (kolloïd-chemische benadering) en niet op bepaalde sub-moleculaire domeinen van de eiwitten. Bij de interpretatie wordt, dientengevolge, veelal van de thermodynamica gebruik gemaakt, waarbij de vraag of de adsorptie energetisch dan wel entropisch gedreven wordt centraal staat.

Met betrekking tot hun adsorptiegedrag maken we onderscheid tussen "harde" en "zachte" eiwitten. Harde eiwitmoleculen behouden hun oorspronkelijke conformatie terwijl de zachte conformatieveranderingen ondergaan aan het adsorbens-oppervlak. De adsorptie van de harde eiwitten kan worden beschreven in termen van electrostatische interactie en hydrofobe dehydratatie, terwijl voor de zachte eiwitten toename van de conformatie-entropie sterk bijdraagt tot de neiging om te adsorberen, zodat deze eiwitten spontaan adsorberen zelfs als het adsorbens-oppervlak hydrofiel is en hetzelfde ladingsteken heeft als het eiwit.

structure of protein molecules in an aqueous environment

protein : co-polymer ~ 22 amino acids

linear polypeptide chain (primary structure)



R, R' trans configuration

$R \dots R' \dots R''$ amphoterie

amphiphilic

secondary structure : α -helix

β -pleated sheet

(random) coil

H-bonds between peptide units

per peptide unit : α -helix

β -sheet

$W_{\text{conf}} = 1$

coil

$W_{\text{conf}} \approx 4$



coil $\rightarrow \alpha$ -helix, β -sheet $\Delta S_{\text{conf}} = R \ln \frac{1}{4}$

tertiary structure (globular proteins)

* more or less spherical and compact

$r \sim$ few (tens of) nm

packing density of ~ 0.8 volume fraction

* tendency : apolar groups in the interior of the molecule
polar groups at the aqueous periphery
(charged groups at the protein surface)

Three dimensional structure

type of interaction	$\Delta \text{comp-fg}$	remarks
Coulomb	≥ 0	depends on pH
dipole	≈ 0	bonds in protein and between water molecules VS.
H-bonding	≈ 0	protein-water bond
dispersion	≤ 0	Hamaker constant of protein in water
hydrophobic dehydration	$\ll 0$	entropy of water
distortion of bond lengths and - angles	> 0	
rotational freedom polypeptide chain	$\gg 0$	conformation entropy of the protein

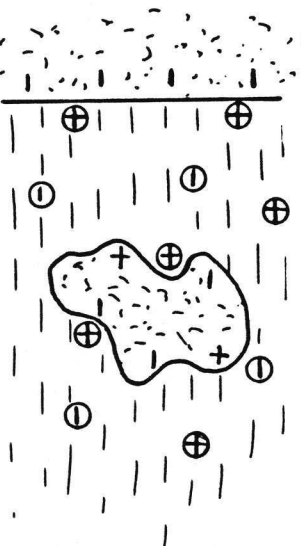
protein structures thermodynamically marginally stable relative to each other
structure to a large extent intrinsically determined

ϕ_a s-s-potential
s-s- σ_{ek}

hydrophobic hydration
hydration of low m.w. ions

- protein adsorption on soil particles \longleftrightarrow biological activity in the soil
- protein adsorption on particles in waste water \longleftrightarrow waste water purification

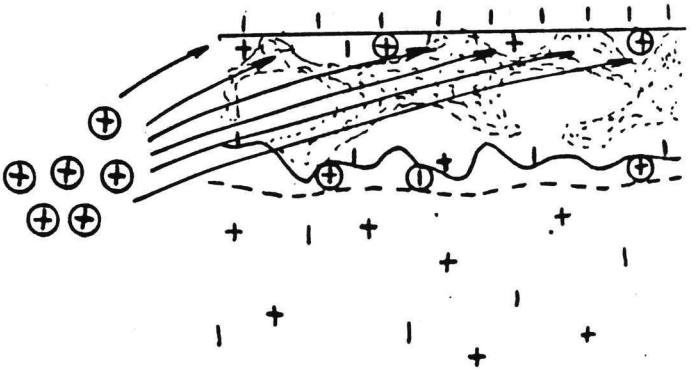
fundamental studies using 'simple', well-defined systems



feasibility of protein adsorption: $\Delta_{\text{ads}} G$
(constant temperature and pressure) $\Delta_{\text{ads}} G = \Delta_{\text{ads}} H - T \Delta_{\text{ads}} S$

comparison between the systems before and after adsorp

After adsorption
 ellipsometry
 light scattering
 viscometry



- major factors determining protein adsorption affinity
- (i) changes in the hydration of the sorbent and the protein
 - (ii) overlap of electrical double layers \longrightarrow redistribution of charged groups
 - (iii) structural rearrangements in the protein molecule

(i) changes in the hydration of the sorbent and the protein.

dehydration hydrophobic areas favors adsorption

protein : size of hydrophobic patches at the exterior of the molecule

Water soluble proteins : small contribution

Sorbent : example : polystyrene

298 K $\Delta_{\text{dehyd}} S \approx +15.4 \text{ mJ m}^{-2}$

$\Delta_{\text{dehyd}} H = -1.4 \text{ mJ m}^{-2}$

$$\Delta_{\text{dehydr}} G = -16.8 \text{ mJ m}^{-2}$$

$$\left[\begin{array}{l} \text{protein } 50,000 \text{ Da} \\ 2 \text{ mg m}^{-2} \end{array} \right] \quad -170 \text{ RT / mole protein}$$

(ii) redistribution of charged groups.

ions : charge electrical part
matter chemical part

electrical part

electrical part of the Gibbs energy of an electric double layer

$$G = \int_0^{\sigma_0} \phi_0' d\sigma_0'$$

protein covered sorbent dissolved protein
bare sorbent model

$$\text{ionic strength} \sim 10^{-3} - 10^{-1} \text{ M}$$

$$\Delta_{\text{el}} G = \pm \text{few mJ m}^{-2}$$

$$\text{protein } 50,000 \text{ Da} \\ 2 \text{ mg m}^{-2}$$

\pm few tens of RT per mole of protein

chemical part

ion (i) : solution (s) \longrightarrow protein layer (p)

$$\Delta_{\text{tr}} g_i = \Delta_{\text{chem}} g_i + \Delta_{\text{el}} g_i$$

$$= (\mu_i^p - \mu_i^s) + z_i F (\phi^p - \phi^s)$$

estimated from model studies :
partitioning of ions between water
and non-polar solvents

change in hydration water (size, valency of ion)

low m.w. electrolyte

$$\Delta_{\text{chem}} h_i < 0$$

$$\Delta_{\text{chem}} s_i < 0$$

$$\Delta_{\text{chem}} g_i > 0$$

(\sim few RT / mole ion)

ion co-adsorption. estimated from electrokinetic data

$$\Delta_{\text{ads}} \sigma_{\text{ek}} = \sigma_{\text{ek}}^{\text{sorb/prot}} - (\sigma_{\text{ek}}^{\text{sorb}} + \sigma_{\text{ek}}^{\text{prot}} \Gamma A)$$

• directly determined using radionuclides

$$\sim 0 - 5 \mu\text{C cm}^{-2}$$

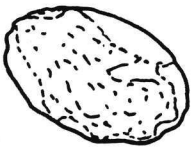
$$M_{\text{protein}} = 50,000 \text{ Da}$$

$$\Gamma = 2 \text{ mg m}^{-2}$$

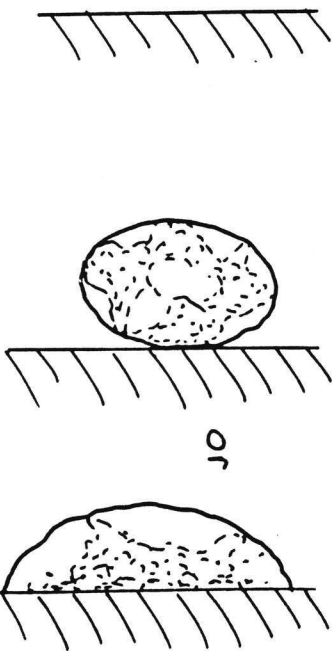
$$\left. \begin{array}{l} 0 - 12 \text{ ions / protein molecule} \\ \text{few } RT / \text{mole ion} \end{array} \right\} \Delta_{\text{chem}} G = + \text{few kts of } RT \text{ per mole protein}$$

(iii) structure rearrangement in the protein molecule

before adsorption



after adsorption



As an alternative for intramolecular hydrophobic interaction, apolar parts of the protein molecule may be exposed to the solvent surface

Structure rearrangements more likely if the native structure is less stable

Intramolecular hydrophobic interaction between R, R', R'' promotes formation of secondary structure. Therefore, loss of intramolecular hydrophobic interaction \rightarrow less secondary structure \rightarrow increased rotational freedom \rightarrow gain in conformational entropy.

$$M = 50,000 \text{ Da} \quad (500 \text{ a.a.})$$

50 a.a. released from α -helix (or β -sheet) into coil

$$\Delta_{\text{str. ch}} S_{\text{confs}} = R \ln 4^{50} \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$T \Delta S = 69 RT / \text{mole protein}$$

$$\Delta_{\text{str. ch}} G = -69 RT / \text{mole protein}$$

Case studies

1. Comparative protein adsorption in model systems.

proteins : lysozyme (LSZ)
 ribonuclease (RNase)
 myoglobin (MgB)
 α -lactalbumin (α LA)

	LSZ	RNase	MgB	α LA
molar mass (Da)	14,600	13,680	17,800	14,200
dimensions (nm ³)	4.5x2.0x2.0	3.8x2.8x2.2	4.5x3.5x2.5	1.7x2.2x2.2
isoelectric point (pH units)	11.1	9.4	7.0	4.2
apolar fraction of the water-accessible surface	41	46	48	?

overall hydrophobicity (Jg⁻¹)
 (Eisenberg's scale) -7.6 -8.7 -4.1 -5.8

Gibbs energy of denaturation (Jg ⁻¹)	heat	denaturant	denaturant
-4.1	-3.2	-2.8	-1.5
-4.0	-3.9	-3.1	-1.9
-2.6	-2.2	-1.9	-1.3

secondary structure	% α -helix	% β -pleated sheet
	42	14.5
	33	75
	-	26
	-	14

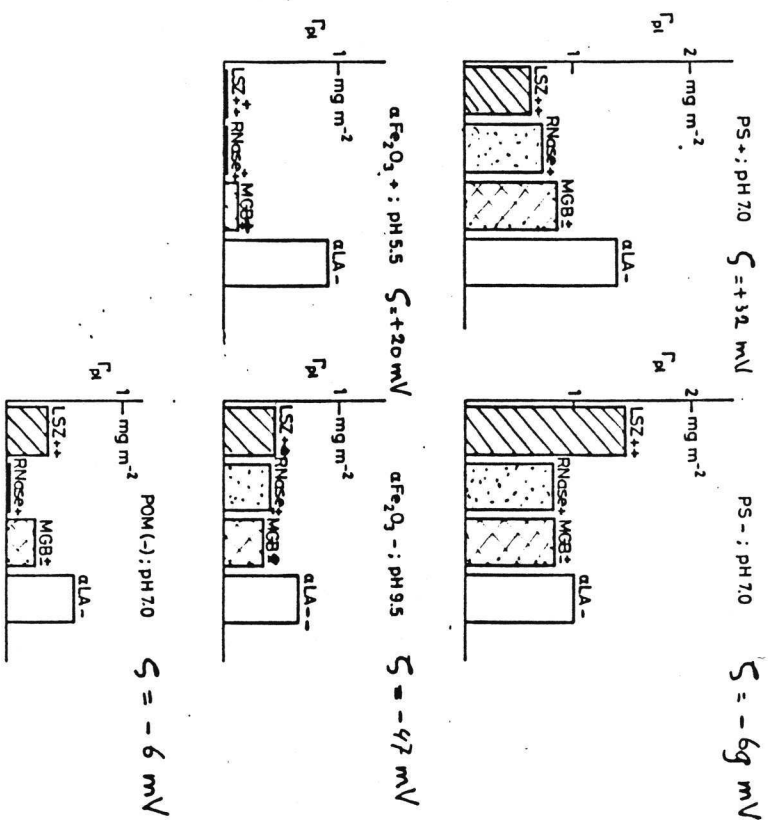
sorbents : polystyrene (PS)

polyoxymethylene (POM)

hematite (α -Fe₂O₃)

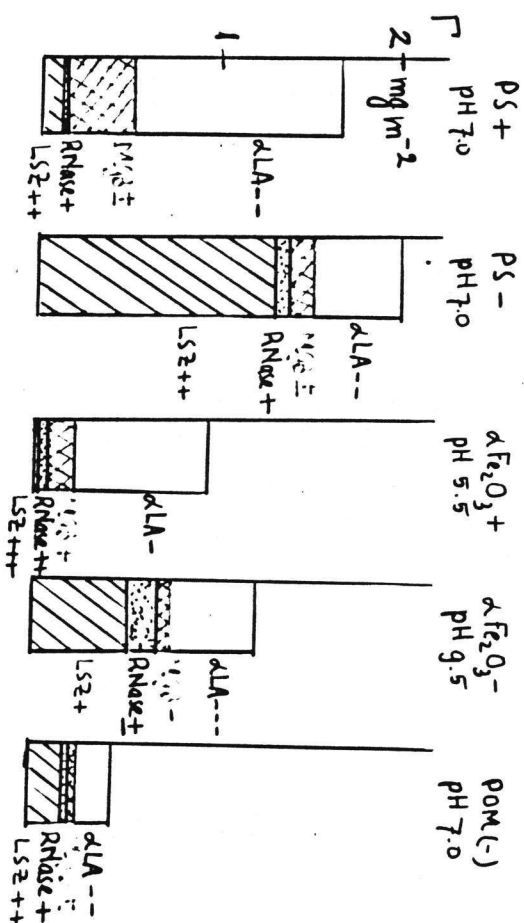
	0.05 M phosphate pH 7.0	acetate buffer pH 5.5	borate pH 9.5
PS-	PS+ $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N}^+ - \text{C} \\ \quad \\ \text{N}(\text{CH}_3)_2 \quad \text{N} - \text{CH}_2 \end{array}$	POM $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3^+$ $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3^-$	
nature of charged groups	$-\text{OSO}_3^-$	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2^+$	$-\text{OH}_2^+$ $-\text{O}^-$
surface charge density ($\mu\text{C cm}^{-2}$)	-2.3	+2.7	uncharged +1.3 -2.9
ζ -potential (mV)	-69	+32	-6 +20 -47
hydrophobicity (contact angle)	82.1°	81.6°	63.7° hydrophilic
surface drop of 0.05 M P-buffer			

Plateau values of the adsorption isotherms.



proteins that have a high structure stability (LSZ, RNase and, to a lesser extent, MGB) behave like "hard" particles. Their adsorption is governed by electrostatic interaction and hydration of the sorbent surface. Proteins that have a low structure stability ("soft" proteins) possess an additional factor that promotes adsorption. This factor is related to structure rearrangements in the protein molecule involving an increase in conformational entropy.

Competitive adsorption



LSZ, RNase, MGB : adsorption preference follows electrostatics

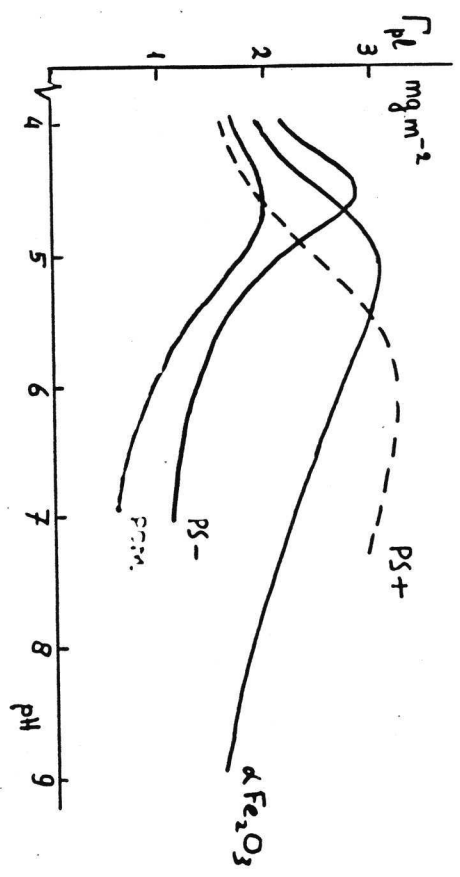
ALA : extraordinarily strong competitor

Contribution from structure rearrangements to Δadsy is a major factor in competitive protein adsorption, resulting in preferential adsorption of the "soft" proteins over the "hard" ones.

2. Serum albumin on various surfaces.

SA conformational adaptability changing conditions ("soft" protein)

Γ_{pl} (pH)



Γ_{pl} (pH) maximum at i.e.p. protein/sorbent complex

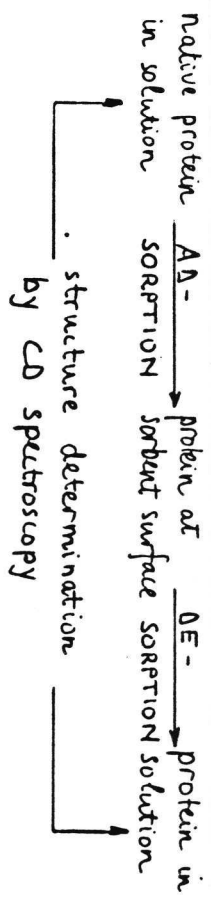
reduction of Γ_{pl} at either side of i.e.p. (partly) due to structure rearrangements SA

(proton titrations $\Gamma(T)$ calorimetry)

FTIR spectroscopy.

Jakobsen et al, Biol. Industr. Appl. IR spectroscopy, J.R. Durig, ed, Wiley 2 Sons, London, 1985, 199-213

TIRF spectroscopy: Hladky et al, JCI 15 111 (1986) 555



? structure change in ad- and/or desorption step
? re-organization towards native structure after desorption

Soderquist, Walton
JCI 15 75 (1980) 306

albumin disturbed from different polypeptides reduction α -helix content 80-90 %

Sato et al
ACS Symp. Ser 343 (1987) 76

albumin different sorbents 15-30 %

Norde et al
JCI 15 112 (1986) 1027

albumin / oxides POM various desorption methods 20-25 %

17.

native BSA
65% helix

denatured BSA
50% helix

$$\Delta S_{\text{conf}} = R \ln 4^{(0.15 \times 585)} = 1014 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$298 \text{ K} \quad -T \Delta S_{\text{conf}} = -302 \text{ kJ mol}^{-1}$$

calorimetry:

$$\text{BSA} / \text{SiO}_2 \quad \Delta_{\text{ads}} H = +136 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\text{BSA} / \alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3 \quad +200 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Increase S_{conf} causes the protein to adsorb on a hydrophilic, like-charged surface.

RU Groningen

J. Drenth: Moleculaire structuur van eiwitten

De twintig types aminozuren die ter beschikking staan voor de opbouw van de polypeptide keten in een eiwitmolecule, maken het mogelijk een enorme variatie aan eiwitten te ontwerpen. De evolutionaire ontwikkeling heeft echter geleid tot de produktie van geselecteerde moleculen die de - voor het levend organisme - gewenste eigenschappen hebben. Die eigenschappen kunnen geheel verschillend zijn. Sommige eiwitten hebben een vezelachtige structuur, meestal met een mechanische functie. Andere eiwitten hebben globulaire moleculen met katalytische of transporterende of regulerende eigenschappen.

We weten dat van een bepaald eiwit de volgorde van de aminozuren in de keten vastligt door de genetische code. Maar bovendien vouwen alle moleculen zich op identieke wijze op en de vraag is hoe elk afzonderlijk molecule zo precies weet op welke manier hij zich moet opvouwen. We moeten ons dat zo voorstellen: de lange polypeptide keten streeft al tastend en steeds weer proberend naar een konformatie, dus een opvouwing met een minimale waarde van de vrije energie. Die energie wordt niet alleen bepaald door interacties in het molecule zelf, maar ook door interacties tussen het eiwitmolecule en zijn omgeving, en dat is vaak water.

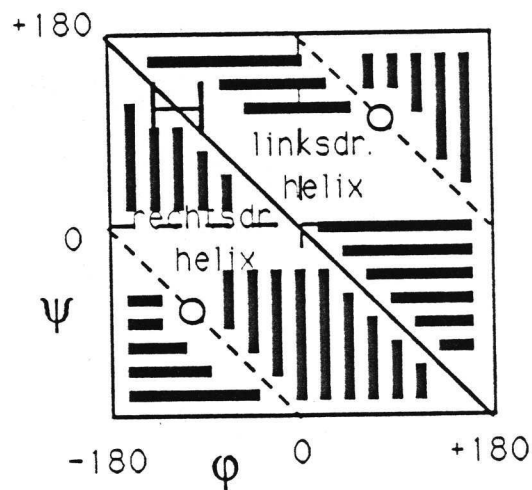
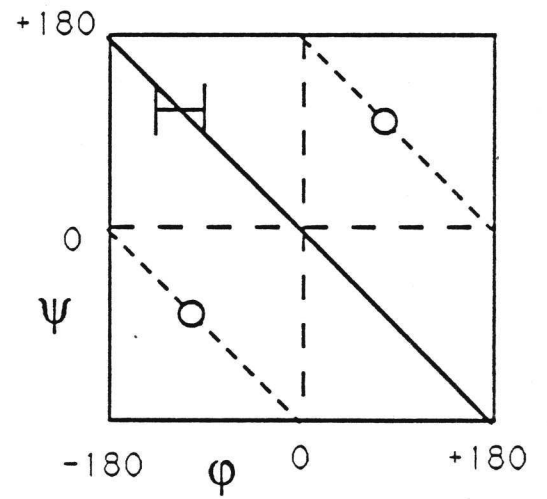
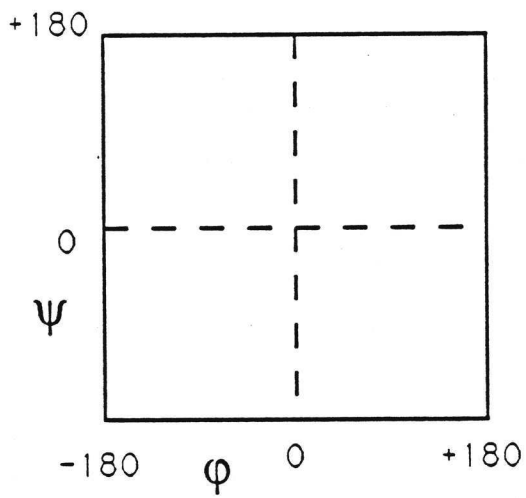
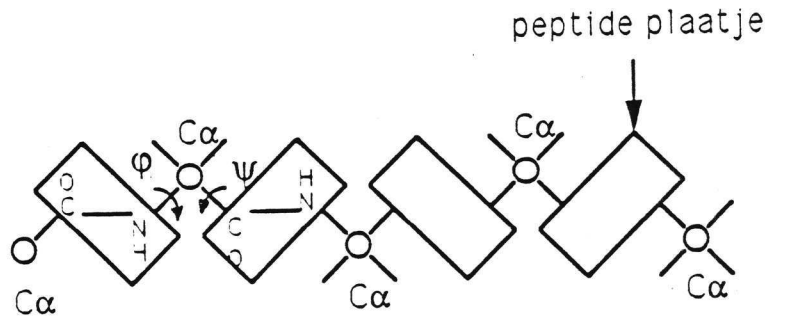
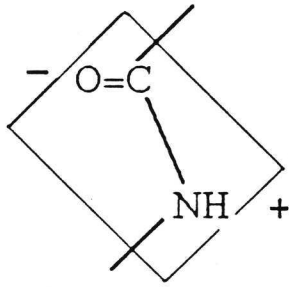
Bij die interacties spelen de volgende krachten een rol:

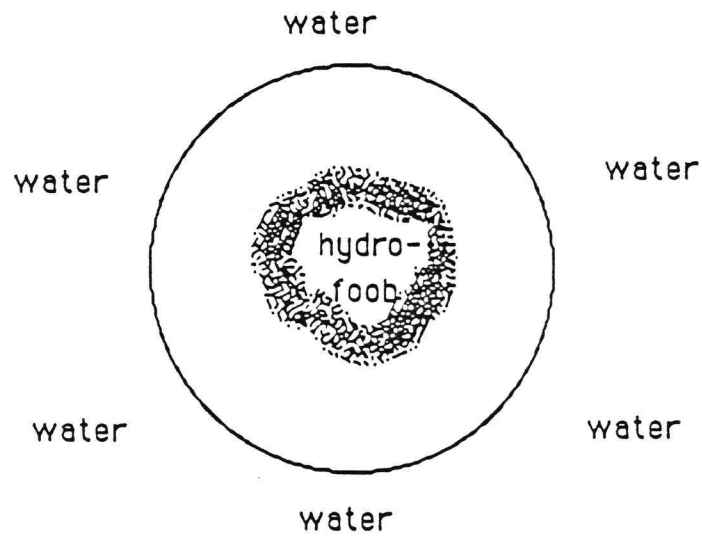
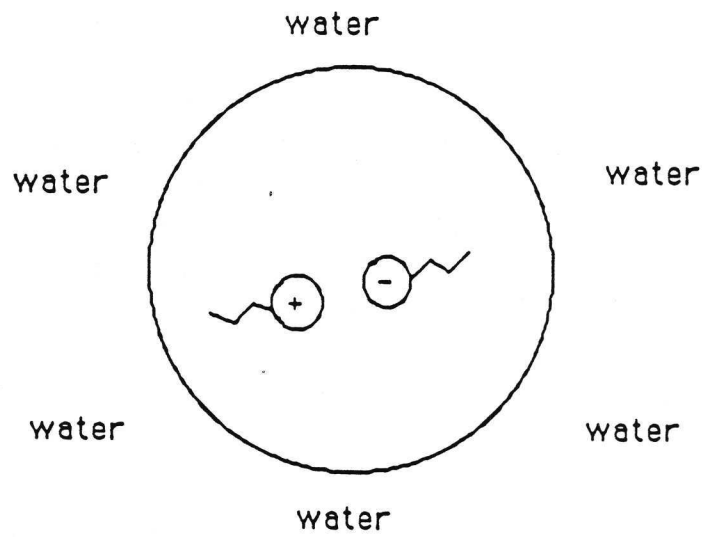
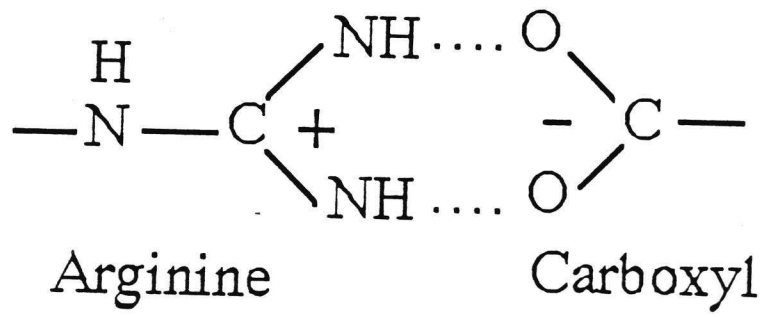
- de waterstofbrug
- electrostatische krachten
- de hydrofobe binding
- de covalente binding
- Van der Waals krachten.

Deze verschillende krachten zullen worden besproken.

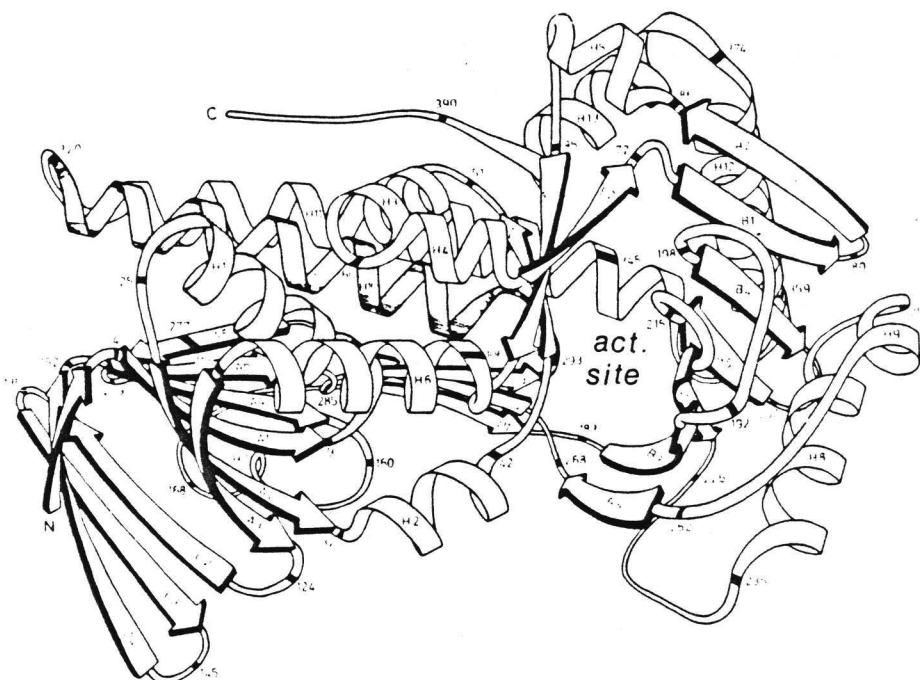
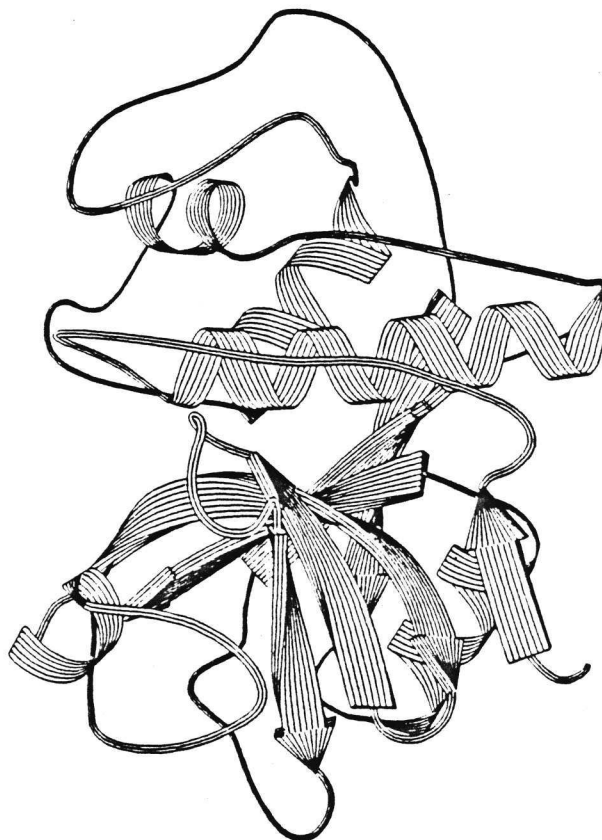
Bepaalde opvouwingswijzen van de polypeptide keten zijn gunstig en worden dikwijls aangetroffen. Tot zulke karakteristieke opvouwpatronen behoren de α -helix en de vouwbladstructuren (β -sheets).

In het evolutieproces worden nieuwe eiwitten met een aan de behoefte aangepaste functie, vaak gemaakt door veranderingen aan te brengen in reeds bestaande moleculen. Voor de haastige mens van de twintigste eeuw gaat dat te langzaam en wordt "site directed mutagenesis" toegepast of worden hele stukken keten ingevoegd of weggeknipt. Voorwaarde daarbij is wel dat de nieuwe keten zich kan opvouwen tot een molecule met voldoende stabiliteit.





PAPAIN



Schematic drawing of the overall folding of the polypeptide chain of p-hydroxybenzoate hydroxylase.



Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek

**Deelnemers aan het *Symposium Industriële Eiwitten* op 19 september 1990
"de Reehorst", Ede**

1. ATO - Dr. J.M. Vereijken
2. ATO - Dr. W.M.J. van Gelder
3. ATO - Dr.Ir. C. van Dijk
4. ATO - Ir. J.C.F. Rynja
5. AVEBE - Dr. J.P. Bleeker
6. AVEBE - Drs. H. Hokse
7. AVEBE - Ir. J.C.J. Verhaart
8. Drs. W.C. Bus
9. CABO-DLO - Dr. L.W. van Broekhoven
10. Campina Melkunie - Dr.Ir. J.M.P. Papenhuijzen
11. Campina Melkunie - Drs. F. Brouwer
12. Cargill B.V. - Mw. Ing. R.M. Delrue
13. ccFriesland - Drs. A.D. Siemensma
14. ccFriesland - Ir. J.A. Nieuwenhuijse
15. CEBECO - Dr. A. Capelle
16. CEHAVE Veghel - Dr. G. van den Bosch
17. Cerestar - Dr. J.W.G.C. de Sadeleer
18. Cerestar Benelux B.V. - Drs. J.J. Scheele
19. Chemie Consult Groningen - Prof.Dr. J. Drenth
20. CIVI Consultancy - Drs. A. van der Schuyt
21. CIVO Analyse TNO - Drs. J.W. van der Kamp
22. CIVO-TNO - Dr. G. Wijngaards
23. Coberco Research - Dr. J.E. Mellema
24. COVP "Het Spelderholt" - Dr. R.W.A.W. Mulder
25. COVP "Het Spelderholt" - Ing. F. Schreurs
26. COVP "Het Spelderholt" - Ir. T.G. Uijttenboogaart
27. DMV Campina - Dr.Ir. A.C.M. van Hooydonk
28. DMV Campina - Ir. J.H. Roskam
29. Gelatine Delft N.V. - J.A. Hage
30. Gist-Brocades - Dr. J.J. Plijter
31. Gist-Brocades - Mw. Dr. J. Plijter-Schuddeman
32. Heineken - Mw. Dr. M. Hollemans
33. Henningsen van den Burg - W.J.M. Hogenboom
34. Hoechst Holland N.V. - Drs. A.H.J. Welkers
35. Hoofd Produktschap Akkerbouwprodukten - de heer Ir. O.C. Knottnerus
36. IGMB-TNO - Dr. M.G. van Oort
37. IGMB-TNO - Dr. R.J. Hamer
38. IGMB-TNO - Ir. R. Orsel (verslag)
39. IGMB-TNO - Ir. P.L. Weegels
40. Latenstein Zetmeel B.V. - H. Tigelaar
41. LUW - Dr. A. de Kok
42. LUW - Dr. Ir. T. van Vliet
43. LUW - Dr. J.J.M. Vervoort
44. LUW - Dr.Ir. W. Norde
45. LUW - Ir. H. Gruppen

46. LUW - Prof. P. Walstra
47. LUW - Prof.Dr. A. Prins
48. LUW - Prof.Dr. C. Veeger
49. LUW - Prof.Dr. J. Lyklema
50. LUW - Dr. R.M.D. Verhaert
51. MBL-TNO - Dr. A.C.M. v.d. Drift
52. MENEBA N.V. - Ir. G.L. Peels
53. Min. van Economisch Zaken - Drs. M.F. Dumont
54. Min. van Economische Zaken - Drs. J.W.A. van Enst
55. Min. van Economische Zaken, Stipt - Ph. van Lelyveld
56. Min. van LNV - Ir. J.A. Cornelese
57. MOGEN International NV - Dr. A. Hoekema
58. MOGEN International NV - Dr. J. Pen
59. NIVE - Ir. A.J. Ros
60. NIZO - Dr. C.G. de Kruif
61. NIZO - Dr. D.G. Schmidt
62. NIZO - Dr. R.J. Siezen
63. NIZO - Dr. S. Visser
64. NIZO - Dr. W.IJ. Aalbersberg
65. NIZO - Dr.Ir. P. Zoon
66. NIZO - Dr.Ir. S.P.F.M. Roefs
67. NIZO - Ir. Th.J.M. Jeurnink
68. Noord-Nederland B.A. - Dr.Ir. T.H.M. Snoeren
69. NRLO - Dr.Ir. A.P. Verkaik
70. NRLO - Ir. P.L. Slis
71. N.V. Ver. Bedr. Nutricia - Dr.Ir. A.K. Muntjewerf
72. Progr. Bureau Koolhydraten, Drs. J.F. Zijlstra
73. Quest International - Ir. W.R. Blom
74. RUG - Dr. R.M. Scheek
75. RUG - Dr. W. Keck
76. RUG - Prof.Dr. B. Witholt
77. RUG - Prof.Dr. E.F.J. van Bruggen
78. RUG - Prof.Dr. G.T. Robillard
79. RUL - Prof.Dr. W. Möller
80. Drs. J.C.M. Schogt
81. TNO Leiden - Dr. W. Nieuwenhuizen
82. TU Delft - Prof.Dr.Ir. J.A. Duine
83. Unilever - Dr. A. Graveland
84. Unilever - Dr. A.C. Juriaanse
85. Unilever - Dr.Ir. J. Visser
86. Universiteit Amsterdam - Dr. R. Wever
87. Universiteit Amsterdam - Prof.Dr. B.F. van Gelder
88. Wessanen Meel B.V. - G. Pol
89. Wessanen Nederland BV - Ir. P.W.M. Verhagen
90. Zetmeelbedrijven "de Bijenkorf" B.V. - A.M. Derde