

Rubisco geschikt gemaakt voor voedingsmiddelen

Door de voortdurend toenemende wereldbevolking zijn eiwitten die gewonnen kunnen worden uit bestaande bij- en afvalstromen van de landbouw hoogst interessant voor de voedingsmiddelenindustrie. Het eiwit RuBisCO is een goede kandidaat. Tot nu toe maakte de groene kleur van Rubisco-preparaten acceptatie door de consument echter uiterst moeilijk. NIZO ontwikkelde onlangs een oplossing.

Onderzoekers van het NIZO Protein Centre hebben een doeltreffend en opschaalbaar extractieproces voor Rubisco ontwikkeld, dat een kleurloos eiwingrediënt oplevert met een hoog percentage aan niet-gedenatureerd eiwit. Bovendien heeft het eiwingrediënt veelbelovende technisch-functionele eigenschappen, zoals een hoog schuimvolume en -stabiliteit en hitte-geïnduceerde gelying bij een laag eiwitgehalte (2% w/w).

Reduceren verspilling

Plantaardige eiwitten staan bekend als duurzamer en rendabeler (1,2) dan dierlijke eiwitten. (Gedeeltelijke) vervanging van dierlijke eiwitten in producten door ingrediënten bestaande uit plantaardige eiwitten of ontwikkeling van nieuwe producten op basis van plantaardige eiwitten kan bijdragen aan efficiënt gebruik van beschikbare eiwitten. Een stap verder in het terugdringen van het milieu-effect van de voedingsmiddelenproductie kan bestaan uit het opwerken van eiwitten uit bij- en afvalstromen van voedingsmiddelen, waarbij verspilling in de voedselketen wordt gereduceerd.

Als antwoord op het bovenstaande hebben onderzoekers van het NIZO Protein Centre een proces ontwikkeld voor de extractie van Rubisco, het meest aanwezige plantaardige eiwit. Zij zijn erin geslaagd om dit zodanig te doen, dat



Rubisco is aanwezig in vele eetbare planten, zoals spinazie.

aan de eisen voor voedingsmiddelen wordt voldaan en tegelijkertijd de functionele eigenschappen van dit nieuwe voedingsmiddelen ingrediënt behouden blijven.

Rubisco

Ribulose-1,5-bisfosfaat carboxylase oxygenase (RuBisCO) is een enzym dat als katalysator optreedt in de eerste stap van koolstoffixatie. In dit proces zetten planten met behulp van zonlicht koolstofdioxide en water om in energierijke moleculen (3). In groene delen van planten kan wel 50% van de totale eiwitfractie uit het eiwit Rubisco bestaan. Daarmee is Rubisco het belangrijke fotosynthetische enzym in de groene bladeren van planten en geldt het als het meest overvloedig aanwezige eiwit op aarde. Het bevindt zich compact verpakt in de mobiele fase van het chloroplast stroma in concentraties van ongeveer 300 mg/ml (4). De concentratie van uit groene bladeren verkregen Rubisco is afhankelijk van veel factoren, zoals de leeftijd van de plant op het moment van oogsten, de soort, de

groeiomstandigheden (onder meer lichtintensiteit en aanwezigheid van stikstof) en de efficiëntie van de extractiemethode (5). Naast de overvloedige aanwezigheid maakt ook de hoge voedingswaarde Rubisco potentieel interessant voor menselijke consumptie. Rubisco bevat grote hoeveelheden essentiële aminozuren, wat het vrijwel uniek maakt onder de plantaardige eiwitten. Vergeleken met de FAO/WHO-referentiewaarden voor menselijke voeding, scoort de aminozuursamenstelling van Rubisco een waarde van 98 voor de essentiële aminozuren (5).

Plantaardig afvalmateriaal

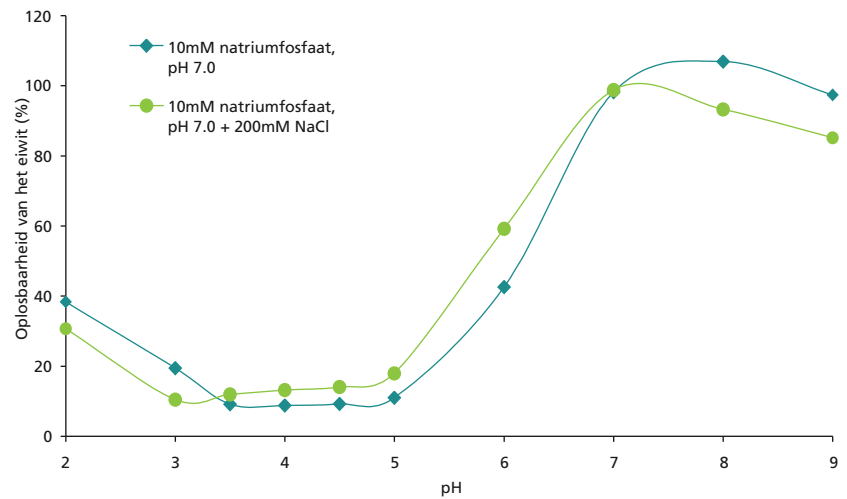
Afhankelijk van de eigenschappen en de groeiomstandigheden van de plant varieert de hoeveelheid eiwitten in groene bladeren van 1,2 tot 8,2% op basis van nat gewicht (6). Dit betekent dat de maximumconcentratie van Rubisco in sappen van bladeren/planten varieert van 0,6 tot 4,1%, waarbij de laatste waarde vergelijkbaar is met het eiwitgehalte van koemelk (3,5%). Rubisco is aanwezig in vele eetbare planten, zoals spinazie en

alfalfa, alsook in eetbare agrarische bij- en afvalstromen, zoals de bladeren van suikerbiet, mais en wortel en erwten-dopen.

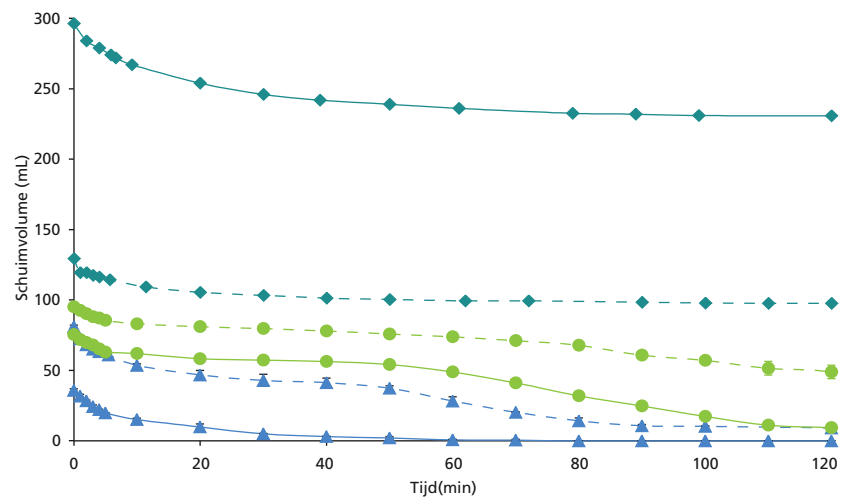
Gunstige functionele eigenschappen

De voedingsmiddelenindustrie zal alleen nieuwe eiwingrediënten in haar producten toepassen als dit geen negatieve invloed heeft op de voorkeur van de consumenten voor producten (smaak, textuur) en voordelen oplevert met betrekking tot bijvoorbeeld kosten, imago, gezondheid, smaak en textuur. In de praktijk veroveren nieuwe plantaardige eiwitten moeilijk een marktpositie, omdat zij op één of meerdere van deze relevante eigenschappen vaak lager scoren dan dierlijke eiwitten. Eerder uitgevoerd onderzoek (5) heeft aangetoond dat Rubisco goede voedings-eigenschappen combineert met goede technisch-functionele prestaties. Desserts, samengestelde vleesproducten, ijs, dranken zijn voedingsmiddelen waarin het eiwit toepasbaar is. Tot nu toe was de grootste uitdaging het ontwikkelen van een extractieproces dat aan de eisen voor voedingsmiddelen voldoet, de functionele eigenschappen van Rubisco in stand houdt en een kleurloos poeder oplevert. Het enzym kan in het laboratorium eenvoudig uit bladeren worden gezuiverd, maar tot op heden is er geen eenvoudige, economisch haalbare methode voor het isoleren van grote (kilogram) hoeveelheden van het plantaardige eiwit voorhanden. Zuiver Rubisco is een smaakloos, geurloos wit poeder met een voedingswaarde die volgens de rapporten gelijk is aan of hoger is dan die van andere eiwitten in voedingsmiddelen.

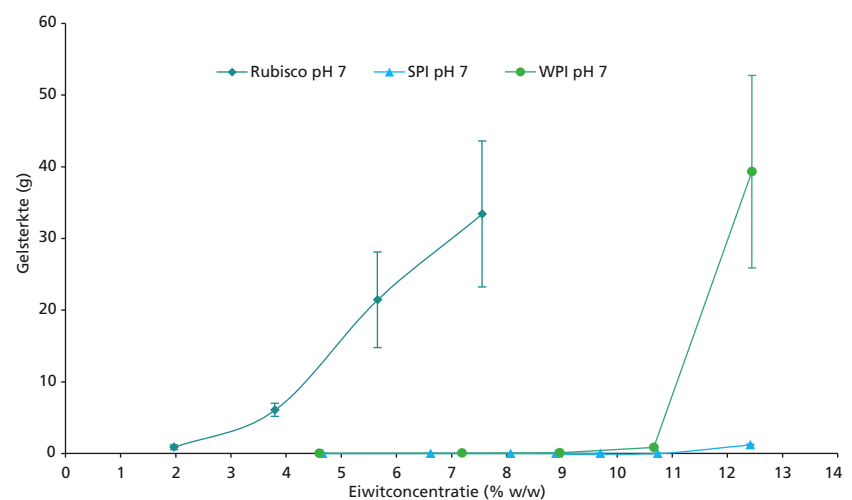
De huidige methoden voor het isoleren van Rubisco uit plantaardig materiaal hebben een aantal nadelen. Sommige van deze methoden leveren Rubisco-preparaten op met een groene kleur door een hoog chlorofylgehalte (7-10). Preparaten met een dergelijke groene kleur zijn doorgaans ongeschikt voor toepassing in voedingsmiddelen en dranken en worden niet geaccepteerd door de consument. Een ander nadeel van de huidige methoden is dat ze zijn gebaseerd op precipitatie van Rubisco door organisch oplosmiddel (polyethyleen glycol) en/of zuren. Een nadeel van precipitatie is dat het neergeslagen eiwit meestal opnieuw moet worden opgelost voor verdere verwerking en dat dit kan leiden tot denatu-



Figuur 1. Oplosbaarheid van op pilotschaal geproduceerd Rubisco uit spinazie als een functie van de pH en ionsterkte.



Figuur 2. Schuimvolume van op pilotschaal geproduceerd Rubisco (◆), soja-eiwit (▲) en wei-eiwit (●) bij verschillende pH's (4,5: stippellijn en 7,0: doorgetrokken lijn).



Figuur 3. Gelsterkte als een functie van de eiwitconcentratie bij pH 7,0 voor op pilotschaal geproduceerd Rubisco (◆), soja-eiwit (▲) en wei-eiwit (●).

ratie/aggregatie van het eiwit, waardoor de functionaliteit afneemt.

Extractieproces

In het NIZO Protein Centre is een methode ontwikkeld voor de extractie van Rubisco uit groene planten. Dit proces resulteert in een eiwitingrediënt waarvan de technisch-functionele eigenschappen, zoals oplosbaarheid en geleringseigenschappen, behouden zijn gebleven. NIZO food research heeft een octrooiaanvraag voor het extractieproces en het verkregen ingrediënt ingediend. Laboratoriumexperimenten hebben aangetoond dat de problemen met betrekking tot de groene kleur en de oplosbaarheid kunnen worden opgelost. Verder is het proces in het NIZO Processing Centre opgeschaald naar een semi-industriële schaal, die aan de eisen voor voedingsmiddelen voldoet. Op deze schaal werd voldoende materiaal geïsoleerd/geproduceerd voor het testen van de functionele eigenschappen van het eiwitingrediënt.

Het NIZO-proces, met spinazie als grondstof, levert geïsoleerde Rubisco waaruit het chlorofyl is verwijderd en dat meer dan 90 wt% niet-gedenatureerd Rubisco

Schuimvormende eigenschappen

Met geïsoleerd Rubisco gemaakt schuim had een groter schuimvolume dan het schuim dat met commercieel verkrijgbare soja- en wei-eiwitten werd gemaakt (figuur 2). Bij gebruik van Rubisco waren de luchtbellen aanzienlijk kleiner dan bij soja- of wei-eiwitten. In tegenstelling tot soja- en wei-eiwitten was het schuimvolume bij gebruik van Rubisco aanzienlijk groter bij pH 7,0 dan bij zure condities (pH 4,5). Bovendien bleek met Rubisco gemaakt schuim het meest stabiel bij beide pH-waarden zonder duidelijke coalescentie in de eerste 2 uren. Het Rubisco-schuim kan worden gebruikt als een alternatief voor toepassingen van schuim in de zuivelindustrie, zoals koffie, ijs en desserts.

Geleringseigenschappen

De op pilotschaal geproduceerde Rubisco-eiwitten geleren bij een lagere concentratie dan soja- en wei-eiwitten (figuur 3). Deze resultaten komen overeen met literatuurgegevens over het geleergedrag van op laboratoriumschaal geïsoleerd Rubisco (12,13). De resultaten tonen aan dat bij een pH van 7,0 de hittegeïnduceerde gelering van Rubisco begint bij ongeveer 2% w/w eiwit, terwijl dit bij wei-eiwitten pas bij ongeveer 10% w/w en bij soja-eiwitten pas bij een eiwitconcentratie van hoger dan 12% w/w begint. Het hoge geleringsvermogen van Rubisco maakt toepassing in desserts voor vegetarische consumenten en met het label hypoallergeen mogelijk.

Vervolgstappen

De vervolgstappen voor toepassing van Rubisco in voedingsmiddelen zijn: 1. Het opschalen van het extractieproces naar meerdere kilogrammen en voor specifieke landbouwafvalstromen en 2. Testen van textuur- en smaak-eigenschappen voor verschillende voedingsproducten, zoals dessert, yoghurt, ijs, bij gebruik van Rubisco-eiwit als enige eiwitbron of als gedeeltelijke vervanging van zuiveleiwitten. Voor het verder ontwikkelen van de productie van Rubisco tot een voedingsingrediënt gaat het NIZO Protein Centre onderzoek verrichten binnen het kader van een SBIR-opdracht 'Verminderen Voedselverspilling' van het ministerie van Economische Zaken, Landbouw & Innovatie.

Referenties

1. Aiking, H., J. de Boer en J. Vereijken (2006) *Sustainable protein production and consumption: Pigs or peas?* Springer, Dordrecht, Nederland.
2. Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales en C. de Haan (2006) *Livestock's long shadow Environmental issues and options*. FAO-rapport, Rome, ISBN 92-5-105571-7.
3. Weissbach, A.; Horecker, B. L.; Hurwitz, J. (1956) The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. *Journal of Biological chemistry*, 218, 795.
4. Ellis, J.R. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in biochemical Science*, 4, 241-244.
5. Barbeau, W. E. en Kinsella, J.E. (1988) Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) from green leaves – Potential as a food protein. *Food Reviews International*, 4, 93-127.
6. Martin, F.W. en Ruberte, R.M. (1975) *Edible leaves of the tropics*. Agency for international development, Washington, DC.
7. Bickoff, E.M., D. de Fremery, R.H. Edwards, B.E. Knuckles, G.O. Kholer en R.E. Miller (1976) Preparation of soluble edible protein from leafy green crops. VS octrooiaanvraag 3,959,246 (gepubliceerd 1976-05-25).
8. Bickoff, E.M., D. de Fremery, R.H. Edwards, B.E. Knuckles, G.O. Kholer en R.E. Miller (1977) Preparation of soluble edible protein from leafy green crops. VS octrooiaanvraag 4,006,078 (gepubliceerd 1977-02-01).
9. Johal, S. (1982) Preparation and crystallization of fraction I protein from plant sources. VS octrooiaanvraag 4,334,024 (gepubliceerd 1982-06-08).
10. Wildman, S.G. en P. Kwanyuen (1981) Process for isolation of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase from plant leaves. VS octrooiaanvraag 4,268,632 (gepubliceerd 1981-05-19).
11. Betschart, A. A. (1974) Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. *Journal of Food Science*, 39, 1110-1115.
12. Knuckles, B. E. en Kohler, G.O. (1982) Functional properties of edible protein concentrates from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 748-752.
13. Sheen, S. J. en Sheen, V. L. (1985). Functional Properties of Fraction I from Tobacco Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 79-83.

Fred van de Velde, Arno Alting, Laurice Pouvreau

F. van de Velde, A. Alting, L. Pouvreau
NIZO Protein Centre, NIZO food research, Fred.vandevelde@nizo.nl

'Rubisco heeft een hoge voedingswaarde'

en minder dan 0,1% chlorofyl van het gewicht van het Rubisco bevat. Het proces is ook succesvol toegepast voor de extractie uit bladeren van suikerbieten en wortels.

Technisch-functionele eigenschappen Oplosbaarheid

De oplosbaarheid van Rubisco als functie van de pH bij hoge en lage ionsterkte is weergegeven in figuur 1. De oplosbaarheid is minimaal in het gebied van pH 3,5 tot 5,0 bij beide ionsterkten. Onafhankelijk van de ionsterkte neemt de oplosbaarheid toe bij neutrale en basische pH (tussen pH 6,0 en 9,0) en bij zure pH (pH lager dan 3). De ionsterkte had geen invloed op de oplosbaarheid. Het oplosbaarheidsprofiel van het op pilotschaal uit spinazie gewonnen Rubisco is gelijk aan dat wat in de literatuur voor uit alfalfa geïsoleerd Rubisco wordt beschreven (11).