

IEL Lebensmitteltechnologie / -biotechnologie

**Prozessoptimierung zur Isolierung von Proteinen aus
Lupinus angustifolius L. cv. Vitabor und deren Potential
als natürliches Fettsubstitut**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor-Ingenieur
(Dr.-Ing.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am: 19. Juli 2011

von

Dipl.-Ing. Daniela Sußmann

aus

Essen

Referent:	Prof. Dr.-Ing. habil. Benno Kunz
Korreferent:	Prof. Dr. Matthias Wüst
Tag der mündlichen Prüfung:	09.12.2011
Erscheinungsjahr:	2011

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Benno Kunz für die Übernahme des Hauptreferats, seinen steten wissenschaftlichen Rat, die freundliche Betreuung und das mir entgegenbrachte Vertrauen.

Herrn Professor Matthias Wüst danke ich für die Übernahme des Korreferats und das Interesse an meiner Arbeit.

Die Arbeit entstand in der Zeit von August 2008 bis Juli 2011 während meiner Tätigkeit am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV) - unter der Leitung von Herrn Professor Horst-Christian Langowski - in Freising.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Peter Eisner für die Aufnahme in seine Abteilung der Verfahrenstechnik, der Bereitstellung des Themas, den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für seinen steten Rückhalt, insbesondere in den schweren Phasen meiner Promotionszeit. Ferner gebührt Frau Dr. Ute Weisz mein besonderer Dank für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, den vielen fachlichen Hinweise und Diskussionen sowie für die unermüdliche kritische Durchsicht dieser Arbeit. Beide - Herr Dr. Eisner und Frau Dr. Weisz - waren mir wertvolle Wegbegleiter und haben mich im Hinblick meiner fachlichen, beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung stets gefördert.

Allen Mitarbeitern der VT-Abteilung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Claudia Pickardt für die stete Unterstützung, den anregenden Diskussionen und der freundschaftlichen Zusammenarbeit. Frau Sigrid Bergmann, Frau Sigrid Gruppe, Frau Evi Müller und Frau Elfriede Bischof danke ich für ihre Unterstützung bei der chemischen Analyse zahlreicher Proben.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Benno Kunz, die den zügigen Fortgang meiner Dissertation maßgeblich durch kritische wie konstruktive Fachdiskussionen bereichert hat.

Freising, im Juli 2011

Daniela Sußmann

Nomenklatur

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Formelzeichen, Indizes und Einheiten.

ABKÜRZUNGEN

2FWW	Faktorwechselwirkung zwischen zwei Faktoren
A	x_{pH_E}
AG	Aktiengesellschaft
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of Variance</i>)
B	x_{RSV}
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	$x_{c_{NaCl}}$
CCD	Zentral zusammengesetzter Versuchsplan (engl. <i>Central composite design</i>)
Co.	Compagnie
cv.	Cultivar
D	x_{T_E}
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
E	x_{t_E}
F	x_{EWV}
FC	Flächenzentriert (engl.: <i>face-centered</i>)
FWW	Faktorwechselwirkung
G	$x_{\Delta T}$
Gl.	Gleichung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	x_{pH_F}
HCl	Salzsäure
IP	Isoelektrischer Punkt
IVV	Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung
J	x_{t_Z}
K	x_{t_S}
k. A.	Keine Angabe
KG	Kommanditgesellschaft
L.	Linné

<i>L</i>	<i>Lupinus</i>
LOF	<i>Lack of fit</i>
M_r	Molekülmasse
P	p-Wert (engl. <i>probability</i>)
n. b.	Nicht bestimmbar
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
OHG	Offene Handelsgesellschaft
TS	Trockensubstanz
U	Umdrehung

FORMELZEICHEN

<i>A</i>	Schnittpunkt der Ordinate
β_0	Konstante
β_{ij}	Koeffizienten
<i>B</i>	Anstieg des Graphen
<i>C</i>	Konzentration
c_P	Proteinkonzentration in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
c_{NaCl}	Salzkonzentration in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
ΔT	Delta-T, Temperaturdifferenz
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient
<i>E</i>	Adsorption in nm
<i>EA</i>	Extraktionsausbeute in %
<i>EWV</i>	Extrakt-Wasser-Verhältnis
<i>g</i>	Erdbeschleunigung / $9,81\text{m s}^{-2}$
<i>K</i>	Einsalzkonstante bzw. Boltzmann-Konstante $1,3806504 \cdot 10^{-23} \text{J}\cdot\text{K}^{-1}$
<i>Ln</i>	Logarithmus naturalis, der natürliche Logarithmus
\log_{10}	Logarithmus zur Basis 10
L_i	Untere Grenze in Gl. (4.9) - (4.11)
<i>m</i>	Masse in g
n_A	Stoffmenge der Komponente A
<i>PGA</i>	Proteingesamtausbeute in %
pH_E	pH-Wert während der Extraktion

pH_F	pH-Wert des Extrakts während der Fällung
q	Anzahl der eingehenden Teil-Zielfunktionen in Gl. (4.12)
R^2	Bestimmtheitsmaß
R_{adj}^2	Korrigiertes Bestimmtheitsmaß
R_{pred}^2	Prognose-Bestimmtheitsmaß
RSV	Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis
t	Zeit in min
T	Temperatur in °C
T_i	Zielwert in Gl. (4.9) - (4.11)
r_i	Priorität (Gl. (4.12))
U_i	Obere Grenze in Gl. (4.9) - (4.11)
$visTex$	Visuelle Texturbewertung (Kapitel 4.4.3)
D	Zielfunktion (engl. <i>Desirability</i> -Funktion in Gl. (4.12))
d_i	Teil-Zielfunktionen (Gl. (4.9) - (4.11))
x_i	Faktor i
y_i	Zielgröße i

INDIZES

A	Komponente A
E	Extraktion
F	Fällung
$NaCl$	Natriumchlorid
P	Protein
S	Sedimentation
Z	Zentrifugation

EINHEITEN

°C	Grad Celsius
bar	Druck
D	Dalton
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m·s ⁻²)
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
k	Kilo

L	Liter
M	Molar
mol	Mol
μm	Mikrometer
min	Minute
mm	Millimeter
N	Newton
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunde
U	Umdrehung

Kurzreferat

Natürliche Fettsubstitute auf pflanzlicher Proteinbasis gewinnen aufgrund der hohen Verbrauchernachfrage, Versorgungssicherheit und dem großen Interesse der Lebensmittelindustrie für die Herstellung fettreduzierter Lebensmittel zunehmend an Bedeutung. Durch deren Einsatz soll neben dem Fett- vor allem der Energiegehalt der Produkte - bei gleichbleibenden sensorischen Eigenschaften - vermindert werden. Kommerziell erhältliche Fettaustausch-Präparate konnten sich bislang, u. a. durch die hohen Herstellungskosten sowie den reduzierten Genusswert der damit hergestellten Produkte, nicht durchsetzen.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren zur Herstellung eines Fettsubstituts auf Basis von Lupinenprotein intensiv untersucht. Ziel war es, den Herstellungsprozess systematisch unter Anwendung geeigneter statischer Versuchsdesigns zu optimieren. Der Einfluss auf die Proteinausbeuten (*EA* und *PGA*) und sensorische Isolatqualität (*visTex*) wurde dabei als Bewertungsgrundlage herangezogen.

Im ersten Schritt wurden umfangreiche *Screening*-Versuche durchgeführt, um die signifikanten Einflussgrößen des Prozesses zu ermitteln. Dabei wurden c_{NaCl} , pH_E , t_E , *RSV*, T_E , pH_F , ΔT , *EWV* und t_Z als signifikante Faktoren in Bezug auf *EA*, *PGA* und *visTex* bestimmt. Im zweiten Schritt wurden unterschiedliche Körnerleguminosen (Soja, Ackerbohne, Erbse, Linse, Lupine und weiße Bohne) zur Herstellung des proteinbasierten Fettsubstituts miteinander verglichen und der Prozess für jeden einzelnen Rohstoff angepasst. So zeigte sich, dass lediglich mit der Ackerbohne, Erbse, Sojabohne und Lupine ausreichend hohe Proteinausbeuten erzielt werden, wobei ausschließlich mit der Lupinensaat eine angenehm glatte und vor allem cremige Textur des Proteinisolats erzielt werden konnte.

Im letzten Schritt wurde die Prozessoptimierung am Beispiel von *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor mit folgenden Faktoren - pH_E , c_{NaCl} , *RSV*, pH_F , *EWV*, t_Z und t_S - durchgeführt und die Signifikanz der jeweiligen Parameter erneut bestätigt. Nach erfolgreicher Validierung der Modelle folgte schließlich die Polyoptimierung unter Anwendung der *Desirability*-Funktion. Die dabei ermittelte Parameterkonstellation wurde im Labor überprüft und eine *PGA* von 42 % sowie eine fettähnliche Isolatqualität erzielt. Im Vergleich zum Standard-Prozess konnte somit die Ausbeute verdoppelt werden. Zudem wurde die Salzkonzentration um 76 %, der Wasserverbrauch während der Extraktion um 13 % und während der Verdünnungsfällung um 33 % verringert sowie die Sedimentationszeit um 98 % verkürzt werden.

Abstract

Natural fat substitutes based on plant proteins are gaining more and more importance in the production of fat reduced foods due to a high consumer demand, the supply security and an increasing interest in food industry. Fat substitutes are used to reduce the fat or in particular the energy content of a food product, while retaining its sensory properties. Commercially available fat replacers still lack in consumer acceptance due to the high market price caused by high production costs and an unsatisfactory sensory profile of the final product.

In this study an alternative method for the production of fat substitutes based on lupin proteins was extensively investigated. The aim was a systematic optimisation of the production process by means of appropriate experimental design and statistics, taking the protein yields (*EA* and *PGA*) and the texture quality (*visTex*) of the protein isolate into consideration.

At first, extensive screening experiments were conducted to determine the significant factors influencing the production process. Thereby, c_{NaCl} , pH_E , t_E , *RSV*, T_E , pH_F , ΔT , *EWV* and t_Z were identified to significantly impact *EA*, *PGA* and *visTex*. Secondly, the suitability of different grain legumes (soybean, faba bean, pea, lentil, lupin and white bean) for the production of protein isolates in proper amounts and specific creamy textural properties was evaluated. The process parameters were adopted for each raw material. It could be shown that sufficient high protein yields were achieved by using lupin, faba bean, pea and soybean as raw materials. However, the textural properties of the protein isolates were outmost different, while a pleasantly smooth and creamy texture could only be achieved with lupins.

Finally, a process optimisation using *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor as an example was performed. Thus, the impact of pH_E , c_{NaCl} , *RSV*, pH_F , *EWV*, t_Z and t_S ; were investigated and the significance of each parameter was reconfirmed. After the successful validation of the calculated models, the desirability function was applied. The resulting parameter setting has been examined achieving a *PGA* of 42 % and fat-like texture of the protein isolate. Thus, compared to the initial process, the *PGA* was doubled, while the salt content, sedimentation time as well as the amount of water during extraction and precipitation were respectively reduced by 76 %, 98 %, 13 % and 33 %.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Kurzreferat	VII
Abstract.....	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Fett und Fettsubstitution	4
2.1.1 Funktion von Fett im Lebensmittel	4
2.1.2 Fettersatzstoffe und Fettaustauschstoffe	5
2.1.3 Proteine als Fettsubstitute	5
2.2 Lupine	7
2.2.1 Entwicklung der Kulturpflanze Lupine und ihre Anbauggebiete	7
2.2.2 Aufbau und Zusammensetzung der Samen von <i>Lupinus angustifolius</i> L. und deren Proteine.....	8
2.2.3 Nutzung der Lupinensamen in der menschlichen Ernährung	10
2.3 Charakterisierung des Prozesses zur Proteinisolierung aus Lupinen	11
2.3.1 Transportvorgänge der Fest-Flüssig-Extraktion	12
2.3.2 Proteinfällung aus konzentrierter Salzlösung.....	14
2.4 Prozessoptimierung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung	15
2.4.1 Begriffsdefinitionen	15
2.4.2 Allgemeine Vorgehensweise bei der Prozessoptimierung.....	16
2.4.3 Auswertung der Versuchsergebnisse	18
2.4.4 Grafische Darstellung.....	19

2.4.5	Polyoptimierung bei mehreren Zielgrößen und Faktoren.....	19
3	Ziel der Arbeit.....	20
4	Material und Methoden	21
4.1	Vorbehandlung der verwendeten Leguminosensaaten	23
4.2	Prozess zur Herstellung des mizellaren Proteinisolats	24
4.3	Optimierung des Prozesses zur Proteinisolierung	26
4.3.1	Identifikation signifikanter Prozessparameter (<i>Screening</i>)	26
4.3.2	Rohstoffvergleich	27
4.3.3	Finale Prozessoptimierung.....	29
4.4	Analysemethoden	31
4.4.1	Bestimmung der Trockensubstanz und des Aschegehalts	31
4.4.2	Bestimmung des Proteingehalts (Dumas und Biuret).....	31
4.4.3	Visuelle Texturbewertung (<i>visTex</i>).....	32
5	Ergebnisse.....	34
5.1	Signifikante Prozessfaktoren	35
5.1.1	Signifikanz der Effekte und Modellbildung	37
5.1.2	Grafische Darstellung der 2FWW	38
5.2	Rohstoff-Auswahl	43
5.2.1	<i>EA</i> bei unterschiedlichen Rohstoffe.....	46
5.2.2	<i>PGA</i> bei unterschiedlichen Rohstoffe.....	49
5.2.3	Validierung der gewählten Modelle	51
5.2.4	Isolatqualität unterschiedlicher Körnerleguminosen	52
5.3	Finale Prozessoptimierung	54
5.3.1	<i>EA</i> bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen	55
5.3.2	<i>PGA</i> bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen	57
5.3.3	<i>visTex</i> bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen.....	59

5.3.4	Validierung der Modelle	60
5.3.5	Polyoptimierung	61
6	Diskussion	64
6.1	Signifikante Prozessfaktoren bei der Proteinisolierung	64
6.1.1	Faktoren der Extraktionsausbeute (<i>EA</i>)	65
6.1.2	Faktoren der Proteingesamtausbeute (<i>PGA</i>)	68
6.1.3	Faktoren der Isolatqualität (<i>visTex</i>).....	71
6.1.4	Zusammenfassung und Schlussfolgerung des <i>Screenings</i>	72
6.2	Die Rohstoff-Auswahl	73
6.2.1	Extraktionsausbeute (<i>EA</i>) beim Rohstoffvergleich	73
6.2.2	Proteingesamtausbeute (<i>PGA</i>) beim Rohstoffvergleich.....	75
6.2.3	Isolatqualität unterschiedlicher Körnerleguminosen.....	76
6.2.4	Zusammenfassung und Schlussfolgerung des Rohstoffvergleichs	77
6.3	Finale Prozessoptimierung	78
6.3.1	<i>EA</i> in Abhängigkeit signifikanter Faktoren.....	78
6.3.2	<i>PGA</i> in Abhängigkeit signifikanter Faktoren.....	80
6.3.3	Validierung der Modelle	82
6.3.4	Polyoptimierung	83
6.3.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung der Prozessoptimierung	83
7	Zusammenfassung.....	85
8	Literaturverzeichnis.....	88
9	Anhang	100

1 Einleitung

Übergewicht und insbesondere dessen Folgeerkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose und Diabetes, gehören weltweit zu den zentralen ernährungsbedingten Gesundheitsproblemen [41, 198]. In Deutschland sind 66 % der Männer und 51 % der Frauen übergewichtig oder adipös [123]. Dies hat nicht nur individuelle, sondern auch soziale und volkswirtschaftliche Auswirkungen [133]. Abschätzungen ergaben, dass die gesamtwirtschaftlichen Kosten von Adipositas und dessen Folgeerkrankungen das deutsche Gesundheitssystem mit rund 11 Milliarden Euro pro Jahr belasten [162].

Die Ursachen für diese Entwicklung sind zahlreich und komplex, wobei unstrittig ist, dass eine täglich überhöhte Energieaufnahme bei gleichzeitig mangelnder Bewegung, vor allem ein Zuviel an Nahrungsfetten, ein Hauptrisikofaktor darstellt [24, 26]. Trotz zunehmender Interesse der Verbraucher für Gesundheit und Ernährung scheint es nicht realisierbar eine ernährungsphysiologisch positive Lebensweise umzusetzen [198]. Geleitet vom Arbeitsalltag sind Essenszeiten zunehmend unregelmäßig und von Eile geprägt. Erschwerend kommt hinzu, dass über die Jahre entwickelte Ernährungs- und Lebensgewohnheiten nur mühsam zu ändern sind [180]. Deshalb steigt bereits seit Jahren die Nachfrage nach fettreduzierten Produkten kontinuierlich. Damit lässt sich die Energieaufnahme vermindern, ohne dass die individuellen Verzehrsgewohnheiten wesentlich geändert werden müssen - ein dem fetthaltigen Referenzprodukt entsprechender Genusswert vorausgesetzt [206].

Fette haben im Lebensmittel zahlreiche ernährungsphysiologische, technofunktionelle und vor allem sensorische Funktionen; Struktur, Viskosität, Geschmack und Aussehen des Lebensmittels werden maßgeblich durch den Fettgehalt beeinflusst [109, 112, 206]. Die Herabsetzung des Fettgehalts führt unweigerlich zu Veränderungen der qualitativen Eigenschaften. Ein raues und trockenes Mundgefühl sowie ein leerer Aromaeindruck lassen fettreduzierte Lebensmittel vielfach auf Ablehnung stoßen. Dies soll durch den Einsatz von Fettaustausch- und Fettersatzstoffen kompensiert werden, d. h. durch Substanzen die im Vergleich zu Fett einen reduzierten oder keinen (z. B. Olestra) physiologischen Brennwert besitzen [112, 118, 192]. Der Begriff Fettsubstitut wird als Überbegriff für Fettaustauschstoffe und Fettersatzstoffe verwendet. Eine Unterteilung der Fettsubstitute kann auch nach der Hauptnährstoffklasse (Kohlenhydrate, Lipide und Proteine) erfolgen, die als Basis dient [112, 156, 168].

Das Konzept Proteine als Fettsubstitute zu verwenden ist demnach nicht neu [79, 117]. Bereits kommerziell erhältliche Fettaustauschstoffe auf Proteinbasis sind beispielsweise Simplese[®], Dairy Lo[™], Trailblazer[®] und Lita[®], die u. a. Proteine aus Eiklar, Molke, Mais oder Weizen enthalten [29, 79, 117, 137, 148, 161]. Diese Produkte haben sich jedoch bislang nicht durchsetzen können, was insbesondere durch die hohen Herstellungskosten bzw. Marktpreise sowie den reduzierten Genusswert der damit hergestellten Produkte begründet ist.

Der Austausch von Fett durch Protein ist ernährungsphysiologisch als vorteilhaft anzusehen, da Proteine das Sättigungsgefühl unterstützen und somit eine kalorienreduzierte Ernährungsweise erleichtern können [136]. Dabei weisen Pflanzenproteine gegenüber tierischem Eiweiß eine Reihe von Vorteilen auf, wie z. B: günstiger Preis, höhere Versorgungssicherheit und Verbraucherakzeptanz [36, 144].

Bei der Verwendung von Lupinensaat zur Herstellung eines proteinbasierten Fettsubstituts kommt ferner, als weiterer Vorteil gegenüber bisherigen Lösungen, die Einfachheit des Produktionsverfahrens hinzu. Der Prozess der Proteinisolierung besteht aus einer salzinduzierten Extraktion mit anschließender Verdünnungsfällung [13, 19, 20, 42, 50, 68, 97, 98, 126-128, 139]. Eine nieder-konzentrierte Salzlösung löst die Proteine indem elektrostatische Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückgedrängt werden. Durch die anschließende Senkung der Ionenstärke mittels Zugabe von Wasser werden elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt, was zur Aggregation und letztlich zur Ausfällung der Proteine führt [50, 126, 128, 134]. Diese Prozessvariante liefert ein hochviskoses, adhäsives und cremiges Isolat, welches bereits erfolgreich als Fettaustauscher in einzelnen Lebensmitteln angewendet wurde. Jedoch fehlt es bislang an einer effizienten Herstellung markttauglicher Isolate auf Basis von Lupinenproteinen.

Eine systematische, statistisch unterlegte Prozessoptimierung zur Gewinnung eines Proteinisolats aus *L. angustifolius* L. cv. Vitabor mit fettähnlichen Eigenschaften wurde bislang in dieser Form nie untersucht und bietet Grundlage für die vorliegende Arbeit und ein hohes Potential für die Lebensmittelindustrie. Es wird eine Optimierung des Prozesses, unter Verwendung geeigneter statistischer Versuchsdesigns durchgeführt.

Nach umfangreichen *Screening*-Versuchen werden signifikante Prozessfaktoren deren Wechselwirkungen und ein geeigneter Rohstoff ermittelt. Der Einfluss auf verfahrenstechnische Kenngrößen wie die Massenausbeute wird als Bewertungsgrundlage ermittelt. Anschließend erfolgt die Optimierung der Extraktion und Fällung im Hinblick auf die

Maximierung der Proteinausbeute unter Beibehaltung einer fettähnlichen Isolatstruktur. Für die industrielle Umsetzung der Proteinisolierung ist dies eine zwingend erforderlich Grundlage.

Diese Arbeit leistet somit einen entscheidenden Beitrag auf dem Gebiet der Herstellung pflanzlicher Fettsubstitute auf Basis von Proteinen. Die Optimierung der Produktausbeute und –qualität kommt der Forderung der Lebensmittelindustrie und Verbraucher im Bezug auf wohlschmeckende fettreduzierte Lebensmittelprodukte nach.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Fett und Fettsubstitution

2.1.1 Funktion von Fett im Lebensmittel

Fette, sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerol (Propan-1,2,3-triol) mit drei meist unterschiedlichen überwiegend geradzahligen, langkettigen Fettsäuren. Derartige Verbindungen zählen zu den Triacylglycerolen [17, 132]. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Triacylglycerine hängen von der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad sowie von der Anwesenheit und Position funktioneller Gruppen und Doppelbindungen ab [17, 132].

In Lebensmittelzubereitungen haben Fette zahlreiche ernährungsphysiologische, technofunktionelle und sensorische Funktionen [109, 112]. Fett ist unter anderem der Nährstoff mit der höchsten Energiedichte und liefert einen Brennwert von $38 - 39 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, wohingegen Kohlenhydrate und Proteine nur einen Brennwert von ca. $17 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ aufweisen. Bei der Lebensmittelzubereitung dienen Fette insbesondere der Wärmeübertragung, z. B. bei Brat- und Frittierprozessen, und ermöglichen hohe Temperaturen, die sowohl für Maillard Reaktionen und den dabei entstehenden Aromakomponenten als auch für die Bildung einer knusprigen Textur einiger Produkte benötigt werden. Einige wasserunlösliche Aromastoffe als auch Vitamine und Provitamine werden durch Fett transportiert.

Doch insbesondere der Einfluss von Fetten auf den sensorischen Eindruck eines Lebensmittels, ist von entscheidender Bedeutung und muss beim Austausch von Fett mit anderen Substanzen zwingend berücksichtigt und angepasst werden. Die Erzeugung des fettigen und/oder cremigen Mundgefühls durch Fett wird in der wissenschaftlichen Literatur stark diskutiert [60, 63, 89]. Der fettige Eindruck wird auf das Vorhandensein sphärischer Fettpartikel, die aneinander abrollen können, zurückgeführt [152, 187]. Vermittelt über die Tastzellen im Mund wird dadurch ein fettiger bzw. cremiger Sinneseindruck hervorgerufen [60, 152, 187]. Dies wird als sog. Kugellagereffekt (engl. *ball-bearing effect*) bezeichnet, der in Bild 2.1 schematisch dargestellt ist [117, 168, 187, 188]. Ausschlaggebend sind dabei vor allem die sphärische Form und gleichmäßige Größe der Fettpartikel von maximal $3 \mu\text{m}$. Größere Partikel können bei hinreichender Kompressibilität ebenfalls ein cremiges Mundgefühl erzeugen [79].

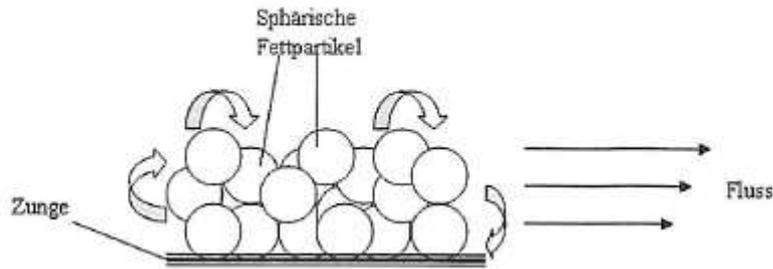


Bild 2.1: Schematische Darstellung des Kugellagereffektes von sphärischen Fettpartikeln im Lebensmittel auf den Tastzellen der Zunge (modifiziert nach [187])

2.1.2 Fettersatzstoffe und Fettaustauschstoffe

Fettersatzstoffe und Fettaustauschstoffe besitzen im Vergleich zu Fett einen reduzierten oder keinen (z. B. Olestra) physiologischen Brennwert [112, 118, 192]. Obwohl die Begrifflichkeiten in der Literatur zum Teil nicht ganz einheitlich verwendet werden, kann im Allgemeinen folgende Differenzierung erfolgen: Fettersatzstoffe sind in ihren physikalischen Eigenschaften (Lipophilie, Schmelzverhalten, Temperaturbeständigkeit) den Nahrungsfetten ähnlich, wohingegen Fettaustauschstoffe vorrangig die sensorischen Eigenschaften simulieren [93, 206]. Die Gruppe der Fettersatzstoffe umfasst Triacylglycerole (z. B. Salatrim), Kohlenhydratpolyester wie Olestra, Retrofette, Jojobaöl und Trialkylglycerolether [2, 147, 179, 206]. Beispiele für Fettaustauschstoffe sind mikropartikulierte Proteine (Simplese[®], Trailblazer[®]) und Produkte auf Kohlenhydrat-Basis wie Inulin, modifizierte Stärken, Dextrine (Maltrin[®], N-Oil[®], Paselli SA 2[®]) sowie stark wasserbindende Quellstoffe [100, 168, 175].

Der Begriff Fettsubstitut wird als Überbegriff für Fettaustauschstoffe und Fettersatzstoffe verwendet. Eine Unterteilung der Fettsubstitute kann auch nach der Hauptnährstoffklasse erfolgen, die als Basisstoff dient [112, 156, 168]. So gibt es Fettsubstitute auf Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinbasis sowie auf Grundlage einer Mischung der genannten Stoffe.

2.1.3 Proteine als Fettsubstitute

Die Idee Proteine als Fettsubstitute zu verwenden ist nicht neu [79, 117, 174]. Bereits 1970 wurden erste Versuche zum Austausch von Milchfett durch Milchprotein in Form von homogenisiertem Käsebruch unternommen [58, 76]. Dabei war die Aggregatgröße und

eine ausreichende Hydratisierung der Proteine von entscheidender Bedeutung [79]. Ausgelöst durch den Fortschritt in der Lebensmitteltechnologie, insbesondere durch die Entwicklung der sog. Mikropartikulation von Proteinen, begann Anfang der 90er Jahre die Einführung zahlreicher „light-Produkte“ auf den europäischen Markt [79]. SINGER et. al (1988) entwickelte in der USA bei der NutraSweet Company „Simplese[®]“-Produkte, die mikropartikulierte Proteine auf Eiklar- oder Molkebasis enthielten [172-174]. Die Produktion von Simplese[®] erfolgt mittels eines speziellen thermomechanischen Verfahrens, bei dem das gekühlte Konzentrat zunächst auf etwa 70 °C vorerhitzt und nach Abkühlung auf 55 °C dem sog. Mikrokocher zugeführt wird. Dort werden die Proteine unter Einwirkung hoher Scherkräfte und durch erneutes Erwärmen auf mindestens 90 °C zu Partikeln mit definierter Korngröße verarbeitet [173]. Simplese[®] 100 (Molkeprotein) wurde erstmalig 1991 in „fettfreiem“ Speiseeis eines finnischen Herstellers eingesetzt [79]. Nach kurzem Produktionsanstieg (12 europäische Produkte und 25 in den USA) waren Anfang 1998 nur noch wenige Anwendungen in den USA, z. B. Schmelzkäseerzeugnisse bekannt [79]. Ähnlich konnte auch Dairy Lo[™] die Verkaufserwartungen nicht erfüllen. Hierbei handelt es sich um ultrafiltrierte Molken- oder Weizenproteine, welche mit einem pH-Wert von 6,3 für 17 sec einem Plattenwärem austauscher bei 80 °C zugeführt werden [16, 79]. Es folgt eine Aufkonzentrierung mittels Evaporation unter Vakuum mit anschließender Kühlung auf 6 °C und Sprühtrocknung. Daraus resultiert eine andere Mikrostruktur der Proteine als bei der Herstellung von Simplese[®] [79]. Neben den beiden industriell am häufigsten eingesetzten Produkten Simplese[®] und Dairy Lo[™], gab es noch andere Fettsubstitute primär auf Molken- und Weizenproteinbasis [29, 120, 137, 148, 161]. BROWN et. al (1990) patentierten Proteinisolate und/oder -konzentrate aus Sojabohnen und Sonnenblumensaat, welche ein fettähnliches Mundgefühl hervorrufen, wobei zu deren Herstellung ebenfalls hohe Temperaturen und Scherkräfte angewandt wurden [27]. Ein weiterer auf Basis eines Pflanzenproteins hergestellter Fettaustauschstoff ist Lita[®] [117, 161]. Es handelt sich um ein stabiles kolloidales Präzipitat bei der eine alkoholische Zeinlösung (Maisprotein) in eine wässrige Polysaccharidlösung eingebracht wird [29, 79]. Somit beruht diese Substanz auf der Interaktion von Proteinen mit Polysacchariden, wie auch Trailblazer, eine Kombination aus Xanthan und globulären Proteinen aus Milch oder Eiern [29, 30]. Fettsubstitute auf Proteinbasis – insbesondere auf Pflanzenproteinbasis wurden bislang nur nach einer Modifikation und/oder Vermengung mit Polysacchariden als Fettsubstitute verwendet [79, 109, 206].

2.2 Lupine

2.2.1 Entwicklung der Kulturpflanze Lupine und ihre Anbauggebiete

Die Gattung *Lupinus* (Lupine) gehört botanisch zu der Ordnung Schmetterlingsblütenartigen (Fabales) und innerhalb der Familie Leguminosae oder Fabaceae (Hülsenfrüchtler) zum Tribus Genisteae und umfasst je nach Klassifikationskriterien bis zu 400 Spezies [80, 142].

Die Entwicklung der Lupine von Wildpflanze zur Kulturpflanze ist ein länger andauernder Prozess [80]. Fossile Funde belegen, dass die Familie der Leguminosen südamerikanischen Ursprungs ist und die frühesten Funde der Gattung *Lupinus* in der Bronzezeit (13. Jahrhundert v. Chr.) aus Griechenland stammen [80]. Insgesamt sind die Nachweise der Lupine mittels Ausgrabungen spärlich, wobei die zeitgenössische Literatur frühe und reichliche Anbaunachweise liefert [74]. Die erste Nennung der Lupine können den Werken des griechischen Arztes HIPPOKRATES VON KOS (400-356 v. Chr.) entnommen werden. Ausführlicheres ist im groß angelegten Werk „Die Naturgeschichte der Pflanzen“ von THEOPHRAST (372-288 v. Chr.) zu finden, dessen Buch galt bis ins Mittelalter als Standardwerk der Botanik und des Pflanzenbaus [74]. In der deutschen Literatur wird die Lupine zum ersten Mal bei HILDEGARDIS VON BINGEN (1098-1178) als Heilpflanze erwähnt [74, 80]. Vorangebracht wurde der landwirtschaftliche Anbau der Lupine in Deutschland im späten 18. Jahrhundert durch das Engagement von FRIEDRICH II. [80]. 1926 wurden in Deutschland 174.000 ha Ackerfläche mit Lupine aus den westlichen Mittelmeergebiet (Spanien, Italien) als Grün- oder Futterpflanze bewirtschaft [74].

Diese Wildarten der Lupine beinhalteten jedoch einen hohen Anteil an bitteren und toxischen Alkaloiden, was wiederum die Verwendungsmöglichkeiten in der menschlichen Ernährung einschränkte. In den Jahren 1927 bis 1929 gelang es VON SENGBUSCH alkaloidarmen Lupinenarten (< 0,02 % Alkaloide), sog. Süßlupinen, zu züchten [74, 193]. Diese Sorten können nun ohne Bedenken als Nahrungsmittel genutzt werden [80, 150]. Insbesondere *L. angustifolius* L. cv. Vitabor hat einen vergleichbar geringen Alkaloidgehalt als andere Sorten [157].

Heute befindet sich laut FAO die derzeit größte Anbaufläche



Bild 2.2: *Lupinus angustifolius* L.

für Lupine in Australien [54]. Das zweitgrößte Lupinenanbauland der Welt ist Deutschland, wobei 2008 weltweit mehr als 1 Millionen Tonnen Lupinen verarbeitet wurden [54]. Für den Anbau in Deutschland gibt es drei Lupinenarten, die nach ihrer Blütenfarbe benannt werden: die gelbe (*Lupinus luteus* L.), die blaue (*Lupinus angustifolius* L. siehe Bild 2.2) und die weiße Lupine (*Lupinus albus* L.). Hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe, Verwertungsmöglichkeiten sowie Ansprüche an Boden und Klima unterschieden sich die drei Lupinenarten. Durch das Auftreten der Krankheit Anthraknose im Jahr 1995 in Deutschland wurde die Anthraknose-tolerante *Lupinus angustifolius* L. in 1997 zugelassen und hat sich in wenigen Jahren zur wichtigsten Lupinenart entwickelt [47, 73].

2.2.2 Aufbau und Zusammensetzung der Samen von *Lupinus angustifolius* L. und deren Proteine

Die Lupinensamen bilden sich in Hülsen, die am Hauptstängel der Lupine wachsen. Der Aufbau der Lupinensaat besteht im Wesentlichen aus zwei strukturellen Bestandteilen: der im Samenkern enthaltenen Kotyledonarzelle und der umgebenden Samenschale (Testa). Hauptbestandteile der Testa sind Cellulose, Hemicellulose sowie kleine Anteile von Lignin und Mineralien [52, 142]. Cellulose und Hemicellulose bilden die größte Kohlenhydratfraktion der Lupine ($\sim 400 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in Bezug auf die Trockensubstanz (TS)), wobei der Ligningehalt mit $12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in der TS im Gegensatz zum Gehalt anderer Leguminosen vergleichsweise niedrig ist [62]. Einfachzucker der *L. angustifolius* L. wie Glucose, Galactose (je $30 - 40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS) und Mannose ($8 - 10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS) befinden sich in der Kotyledonarzelle [62]. Die Mineralien der Testa setzen sich unter anderem aus Calcium ($82,4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Magnesium, Phosphor ($3,3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Kalium ($8,9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Natrium und Schwefel ($2,5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS) zusammen [62].

Die Lupine zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Leguminosen durch ihren besonders geringen Stärke- sowie sehr hohen Lipid- und Proteingehalt (bis zu 40,0 %) aus [90, 177]. Der Stärkegehalt im Samen der *L. angustifolius* L. ist mit weniger als $15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in der TS kaum vorhanden [62]. Der Lipidgehalt variiert je nach Lupinenspezies zwischen 4 und 15 % und setzt sich bei *L. angustifolius* L. zusammen aus Triglyceriden (71,1 %), Phospholipiden (14,9 %), freien Sterolen (5,2 %), Glykolipiden (3,5 %), freien Fettsäuren und Wachsesteren (0,9 %) [62]. Typischerweise ist in Lupinen ein hoher Anteil an ungesättigten Fetten ~ 75 % vorzufinden mit einem hohen Anteil an Ölsäure und Linolsäure

[142]. Des Weiteren enthält die Zelle Wasser (12 %), Phytinsäure (1 %) und Vitamine. *L. angustifolius* L. enthält zudem Niacin ($40,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Carotine ($3,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Thiamin ($5,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Riboflavin ($3,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), Cholin ($3,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS), α -Tocopherol ($2,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TS) sowie kleinere Mengen an Biotin, Pantothen- und Folsäure [62, 141].

Die Proteine befinden sich ebenfalls in den Kotyledonen, in globulärer Form, den sog. Proteinkörperchen und bestehen im Wesentlichen aus den beiden glycolysierten Speicherproteinen Globuline (~85 %) und Albumine (5 - 12 %) in einem Verhältnis von Albuminen zu Globulinen von 1:9 [45].

Globuline sind die Hauptspeicherproteine der Lupinensamen, welche im wässrigen Medium erst durch die Anwesenheit von Ionen löslich sind. Durch schrittweise Erhöhung der Salzkonzentration des Lösungsmittels lassen sich die Globuline in 12 verschiedene Komponenten auftrennen [46]. Zwischen den einzelnen Globulinkomponenten treten Wechselwirkungen auf, die zur Assoziation oder Dissoziation führen, wobei sich hierbei drei Hauptglobuline definieren lassen, die als Conglutin α , β und γ bezeichnet werden. Die zwei sauren Hauptglobuline ($\text{pI} < 7$) sind das leguminartige α -Conglutin (35 - 37 % des Globulinanteils) und das vicilinartige β -Conglutin (44 - 45 %) mit den Sedimentationskoeffizienten von 11 S und 7 S. α -Conglutin ist mit 330 - 430 kDa der größte und schwerste Proteinkomplex bestehend aus zwei Globulinuntereinheiten, wohingegen das aus vier Untereinheiten bestehende β -Conglutin ein Molekulargewicht von 143 - 260 kD hat [45, 106, 108, 140, 151]. Conglutin γ ist das schwefelreichste Glykoprotein mit einer Verteilung von 4 - 5 %, einem Sedimentationskoeffizienten von 7 S und einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa. Conglutin γ und Conglutin δ sind lupinenspezifische Proteinfractionen (10 S und 2 S) [45].

Albumine sind in Wasser gut löslich, haben einen Sedimentationskoeffizienten von 2 S, ein Molekulargewicht von 6 kD und 117 kD und fungieren als Speicherproteine sowie Enzyme in der Pflanzenzelle [45]. Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die Albumine auch als δ -Conglutin bezeichnet.

Weitere Proteinfractionen, wie Prolamine und Gluteline, kommen in vernachlässigbaren Mengen vor [31, 134].

2.2.3 Nutzung der Lupinensamen in der menschlichen Ernährung

Das Interesse für Lupinenprodukte, welche immer mehr Möglichkeiten für die Lebensmittelindustrie erschließen, steigt aufgrund der wertvollen Zusammensetzung und den günstigen Rohstoffkosten stetig. Zudem wächst die Nachfrage nach pflanzlichen Proteinpräparaten aufgrund der Nachhaltigkeitsdebatte und eines gesteigerten Gesundheitsbewusstseins der Konsumenten [36, 144, 158]. Die Lupinensaat verfügt über eine Reihe gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe und weist zudem für die Lebensmittelverarbeitung positive technofunktionelle Eigenschaften auf, wie Emulgier- und Schaumverhalten, sowie Wasserbindungs- und Geliervermögen [22, 142, 163, 176, 178]. Bereits auf dem Markt erhältliche Produkte aus Lupine sind Snacks, Nudeln, Brot, Kuchen, Kaffee, Eiscreme, Brotaufstriche, Babynahrung, Fleisch- oder Tofuersatz und Instantmehle [49, 55, 91, 98, 176]. Lupinensamen konnten außerdem mittels Fermentation in bekannte Produkte auf Sojabasis überführt werden, z. B. Tempeh, Miso, Natto und Shoyu [61, 142]. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Veränderung der Lebensmitteleigenschaften durch den Zusatz von Lupinenmehl, -protein oder -faserstoff in Brot, Feingebäck, Pasta, Eiscreme, Milchprodukte sowie Fleisch- und Wurstwaren [6, 12, 14, 22, 34, 39, 43, 44, 49, 71, 86, 98, 114, 124, 145, 190, 199]. Insgesamt wurden in Europa ca. 500.000 Tonnen Lebensmittel mit oder aus Lupinensamen bzw. einzelnen Sameninhaltsstoffe konsumiert [57].

In den letzten Jahren wird über das allergene Potential der Lupinenproteinen diskutiert, die auch Kreuzreaktionen mit Allergenen aus Sojabohnen, Erdnüssen, grünen Bohnen und Erbsen aufweisen können [104, 169]. Andere Studien hingegen berichten, dass Allergien insbesondere dann auftraten, wenn die Patienten keine anderen Allergien vorwiesen und typischerweise wenig Lupinensamen zu sich nehmen [78]. Eine generelle Restriktion für Menschen mit einer Erdnussallergie wurde deswegen als nicht sinnvoll eingestuft [104]. Insgesamt sind in der Literatur vergleichsweise wenig Fälle allergischer Reaktionen auf Lupinmehl oder Lupinensamen dokumentiert [72, 75, 140, 196, 201, 202]. Es gibt somit Hinweise auf das Allergiepotezial der Lupine, was derzeit in klinischen Studien näher untersucht wird [45]. Fest steht, dass der Einsatz von Lupinen im Lebensmittel auf der Verpackung entsprechend gekennzeichnet werden muss [96].

2.3 Charakterisierung des Prozesses zur Proteinisolierung aus Lupinen

Meist werden Ölsaaten, Leguminosen und verschiedenen Getreidesorten zur Gewinnung von pflanzlichen Proteinpräparaten eingesetzt. Sojaproteinpräparate sind weltweit am weitesten verbreitet (69 %), wobei diese Entwicklung aufgrund der Tatsache, dass mehr als 50 % der Sojabohnen gentechnologisch modifiziert sind, kontrovers diskutiert wird [15, 85, 99, 121, 166]. Hier bieten Lupinensamen aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung zur Soja eine Alternative [3, 81]. Sie eignen sich aufgrund ihres hohen Proteingehalts sowohl zur Herstellung von Proteinkonzentraten (mindestens 70 % Protein bezogen auf die TS) als auch -isolaten (mindestens 90 % Protein bezogen auf die TS) [42, 117, 203].

Die Gewinnung von Proteinisolaten aus der Lupinensaat wurde in vielen Studien bereits dokumentiert [7, 31, 35, 42, 50, 69, 70, 97, 106, 159, 178, 182]. Allen Prozessen gemeinsam ist eine wässrige Extraktion zur Lösung der Proteine und eine anschließende Fällung oder Ultrafiltration. Dabei wurden unterschiedliche Parametereinstellungen angewandt, wobei in den meisten Fällen eine alkalische Extraktion ($\text{pH} \approx 8,5$) mit anschließender Fällung am isoelektrischen Punkt ($\text{pH} \approx 4,5$) durchgeführt worden ist [7, 42, 50, 69, 70, 97, 159]. Diese Proteinisolierung ist aufgrund der vergleichsweise großen Proteinausbeute lukrativ, wobei Studien auf unerwünschte Denaturierungen der Proteine während dieses Prozesses hinweisen, was zur Veränderung einiger funktioneller wie auch ernährungsphysiologischer Eigenschaften der Proteine führen kann [31, 48, 97, 102, 122, 138, 149]. Vor allem die alkalische Prozessführung kann unter anderem zu einer Racemisierung der Aminosäuren, Bildung von Lysinoalanin, Reduktion der Verdaulichkeit und/oder Reduktion des Anteils an essentiellen Aminosäuren führen [56, 59, 102, 111, 122].

Eine weitere und mildere Prozessvariante zur Isolierung von Leguminosenproteinen ist eine salzinduzierte Extraktion mit anschließender Verdünnungsfällung [19, 20, 42, 50, 68, 97, 98, 126, 128, 139, 204]. Eine nieder-konzentrierte Salzlösung ($0,1 - 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) löst die Proteine indem elektrostatische Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückgedrängt werden. Durch die anschließende Senkung der Ionenstärke mittels Zugabe von Wasser werden elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt, was zur Aggregation und letztlich zur Ausfällung der Proteine führt [50, 126, 128, 134].

Derartig isolierte Lupinenproteine unterscheiden sich in den jeweiligen Proteinfractionen sowie dem Denaturierungsgrad und der Proteinausbeute, im Aussehen (Bild 2.3) und den

technofunktionellen Eigenschaften stark von den Isolaten, die mit Hilfe der alkalischen Extraktion mit anschließender isoelektrischer Fällung gewonnen werden [50, 122, 155]. Während eine raue, feste, Quark-artige Konsistenz (Bild 2.3) und gute Emulsions- und Schaumaktivitäten aufweisen, ist das Isolat der milderer Prozessvariante glatt, hochviskos, adhäsiv mit einer fettähnlichen oder cremigen Textur (Bild 2.3), was den Einsatz als Fettsubstitut ermöglichen könnte.



Bild 2.3: Links isoelektrisch gefällte Lupinenproteinisolate und rechts mizellare Lupinenproteinisolate [Quelle: Fraunhofer IVV]

2.3.1 Transportvorgänge der Fest-Flüssig-Extraktion

Die Proteinextraktion ist eine Fest-Flüssig-Extraktion, bei der die Proteine, durch ein flüssiges Extraktionsmittel aus der vorbehandelten Saat herausgelöst werden [77, 87, 94]. Damit lösliche Proteinmoleküle vom Feststoffpartikel in die kontinuierliche Flüssigphase übergehen, sind insgesamt folgende Schritte nötig [95]:

1. Eindringen des Lösungsmittels in das Rohstoff-Partikel

2. Verteilung des Lösungsmittels im Zellinneren und Ausdehnung des Partikels
3. Transport und Lösung der Proteinmoleküle aus dem Zellinneren an die fest-flüssig Phasengrenzfläche (NERNST-Diffusionsschicht)
4. Diffusion durch die Phasengrenzfläche
5. Migration in die kontinuierliche Flüssigkeitsphase (Konvektion in der Flüssigkeitsphase)

Die an der Partikeloberfläche befindlichen Proteine werden unmittelbar abgelöst, die innerhalb des Partikels befindlichen Proteine werden zeitabhängig gelöst und an die Partikeloberfläche transportiert [5]. Die Güte der Proteinlöslichkeit wird durch zahlreiche Umgebungsparameter sowie durch die Konstellation des Feststoffs und Lösungsmittels bestimmt [4]. Unter anderem zählen zu den wesentlichen Einflussfaktoren:

- der pH-Wert des Lösungsmittels (pH_E)

Die Löslichkeit der Lupinenproteine hat ein Minimum am isoelektrischen Punkt, der zwischen den pH-Werten 4,0 und 5,0 liegt, wobei LQARI et al. (2002) und EL-ADAWY et al. (2006) diesen Bereich auf 4,3 - 4,9 weiter eingrenzen konnten [25, 50, 108, 159]. Außerhalb dieses pH-Bereiches steigt die Proteinlöslichkeit sowohl im alkalischen als auch im sauren Bereich an [25, 50, 108, 159]. Während im alkalischen Bereich maximale Proteinausbeuten erzielt werden konnten, zeigte sich die Proteinlöslichkeit im sauren pH-Bereich vergleichsweise gering [25, 50, 108, 159].

- die Salzkonzentration des Extraktionsmediums (c_{NaCl})

Die Proteinlöslichkeit wird von der Ionenstärke bzw. der c_{NaCl} auf zwei Weisen beeinflusst. Eine geringe c_{NaCl} fördert die Löslichkeit von Proteinen, was als Einsalzeffekt (engl.: *salting-in*) bezeichnet wird [33, 66, 67, 170, 197]. Wird c_{NaCl} darüber hinaus erhöht, kommt es zum sog. Aussalzeffekt (engl.: *salting-out*) und die Löslichkeit sinkt [33, 65, 116, 170, 197].

In mehreren Studien wurden unterschiedliche c_{NaCl} für die Bestimmung der maximalen Löslichkeit der Proteine aus Lupinen erprobt. EL-ADAWY et al. (2001) nennen als „optimale“ c_{NaCl} $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für *Lupinus albus* L. und *L. termis* L., wohingegen LAMPART-SZCZAPA (1996) $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für vollfettes Lupinenmehl und OOMAH et al. (1983) $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ für acht verschiedene Kulturvarietäten zweier Lupinen Spezies (*L. albus* L. und *L. angustifolius* L.) festlegten [51, 97, 134]. Die Unterschiede entstehen zum einem aufgrund der üblichen Schwankungen in den Inhaltsstoffen, denen jeder Rohstoff

unterlegen ist. Auf der anderen Seite wurden verschiedenen Parametereinstellungen angewandt und bisher wurde keine Optimierung des Prozesses vorgenommen.

▪ weitere wichtige Extraktionsparameter

Nach dem FICK'schen Gesetz läuft die Diffusion der Proteinmoleküle aus dem Rohstoffpartikel ins Extraktionsmedium bis zum Konzentrationsausgleich ab. Um die maximale Proteinmenge in Lösung zu bringen, sollte demnach u. a. eine ausreichende Lösungsmittelmenge und Extraktionszeit (t_E) gewählt werden. In den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen schwankte das Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis (*RSV*) bei einer salzinduzierte Extraktion von Lupinenproteinen zwischen 1:4 und 1:10 [50, 97, 204]. Es gibt wissenschaftliche Untersuchungen, die für das *RSV* bei der Extraktion von Leguminosenproteinen sogar eine Spannbreite von 1:5 bis 1:50 angegeben [88, 105, 128, 159].

2.3.2 Proteinfällung aus konzentrierter Salzlösung

Bei der Proteinfällung aus konzentrierten Salzlösungen wird durch eine Verdünnung des Proteinextrakts mit Wasser die Ionenstärke herabgesetzt. Dadurch wird die Löslichkeit der Proteine bis zu deren Ausfällung verringert [50, 82, 83, 128]. Zu den wesentlichen Fällungsparameter zählen der pH-Wert des Proteinextraktes der pH-Wert des Proteinextraktes unmittelbar vor der Fällung (pH_F), die Menge des verwendeten Wassers zur Verdünnungsfällung (Extrakt-Wasser-Verhältnis (*EWV*)), die Ionenstärke sowie die Zeit und Temperatur der Sedimentation und/oder Zentrifugation zur Abtrennung der Proteinmasse [83, 84, 170].

Nach MURRAY et. al (1981) entstehen bei der Verdünnungsfällung nach einer salzinduzierten Extraktion feinstpartikuläre, kugelförmige Protein-Partikel [125-128]. Die so gebildeten Partikel werden in der einschlägigen Literatur Assoziationskolloide oder Mizellen und die so gewonnen Proteinisolate als mizellares Proteinisolat, Mizellar-Protein oder Mizellen-Protein (engl.: *protein micellar mass*) bezeichnet [19, 20, 50, 68, 82-84, 125-129, 184, 185, 204].

Vermutlich gleiten diese Proteinkügelchen bzw. -mizellen genau wie Fettpartikel in Mayonnaise oder Sahne leicht aneinander ab (Bild 2.1). Bei ihrem Verzehr entsteht daher an den Papillen der Zunge der Eindruck von Fett bzw. ein cremiges Mundgefühl. Mittels rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wird die Ähnlichkeit der Proteinmizellen zu den Fettkügelchen in beispielsweise einem Brühwurstbrät deutlich (Bild 2.4).



Bild 2.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Lupinenmizellenisolats (links; 16000fache Vergrößerung) [Quelle: Fraunhofer IVV] und Fettpartikel in einem Brühwurstbrät (rechts; 500fache Vergrößerung) [Quelle: Fleischtechnologie, Behr's Verlag]

2.4 Prozessoptimierung mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung

Wie bereits oben erwähnt, erfolgte bislang keine Optimierung des Herstellungsprozesses des Mizellenproteins. Eine Optimierung kann unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen wie beispielsweise die Maximierung der Proteinausbeute bei gleichbleibender Qualität. Prozessoptimierungen sind in der Regel experimentell äußerst aufwändig. Deshalb sind für eine effiziente Arbeitsweise und rationale Entscheidungen statistische Verfahren zur Planung und Auswertung von Experimenten zur Optimierung von Prozessen unabdingbar. Um den Einfluss unterschiedlicher Prozessparameter auf eine oder mehrere Zielgrößen zu untersuchen, sind Versuche durchzuführen, die sowohl zeit-, als auch kostenintensiv sind, weswegen die Anzahl der Versuche auf ein nötiges Minimum reduziert werden muss. Im Gegensatz zur klassischen *one-factor-at-a-time*-Methode, wo stets ein Faktor variiert wird, werden bei der statistischen Versuchsplanung mehrere Faktoren gleichzeitig verändert. Dies reduziert die Anzahl durchzuführender Versuche deutlich und bringt zusätzliche Informationen, da hierbei Kombinationen von Faktoren berücksichtigt werden, was einen Rückschluss auf mögliche Wechselwirkungen erlaubt.

2.4.1 Begriffsdefinitionen

Bevor die allgemeine Vorgehensweise zur Optimierung eines Prozesses beschrieben wird, werden einige wichtige Begriffe und ihre Anwendung in der Versuchsplanung in Tabelle 2.1 kurz erläutert.

Tabelle 2.1: Definitionen einiger wichtiger Begriffe und ihre Anwendung in der statistischen Versuchsplanung [171]

Begriff	Erläuterung
Auflösung	Bewertet die Vermengungsstruktur und gibt somit einen Hinweis, ob der Versuchsplan als kritisch oder unkritisch zu betrachten ist
Einflussgrößen	Prozessparameter, die die Zielgrößen möglicherweise beeinflussen, die auf einen bestimmten Wert eingestellt und dort gehalten werden können
Faktoren	Prozessparameter, die aus der Vielzahl der Einflussgrößen ausgewählt und in den Versuchsplan aufgenommen werden
Faktorstufen	Ausgewählte Werte, die der einzelne Faktor annehmen soll
<i>Fold-over</i>	Kopie des ursprünglichen Versuchsplans mit gleichzeitiger Invertierung, d. h., Vorzeichenwechsel bei der Kodierung, um so Vermengungen aufzubrechen
Haupteffekt	(Signifikante) lineare Terme der Regressionsgleichung
Vermengung	Systematische Überlagerung von Effekten; d. h. die Effekte können nicht eindeutig zugeordnet werden, da vermengte Effekte immer nur die Summe dieser darstellt
Wechselwirkung (WW)	Kombinierter Effekt zweier oder mehrerer Faktoren, d. h. der Effekt eines Faktors hängt von den Einstellungen anderer Faktoren ab
Zentralpunkte	Versuche, in denen alle Faktoren auf den Stufenmittelwert eingestellt werden
Zielgrößen	Beschreiben das Ergebnis eines Versuchs in Form von Messwerten oder aber auch Größen, die aus einem oder mehreren Messwerten errechnet werden

2.4.2 Allgemeine Vorgehensweise bei der Prozessoptimierung

Ein wesentlicher Aspekt der statistischen Versuchsplanung ist eine systematische Planungsphase in der die Ausgangssituation sondiert, der Prozess standardisiert, alle wesentlichen Ziel- und Einflussgrößen sowie Informationen gesammelt werden.

Der dann zu generierende Versuchsplan hängt vom Untersuchungsziel ab. Das erste Ziel bei einer Prozessoptimierung ist die Identifikation signifikanter Prozessparameter (sog. *Screening*). Als geeignetes statistisches Versuchsmodell zur Durchführung eines

Screenings werden meist faktorielle oder fraktioniert faktorielle Versuchspläne ausgewählt [92, 110, 131]. Diese sind besonders geeignet, wenn viele Faktoren untersucht werden sollen, weil diese nur auf zwei Stufen (mit der allgemeinen Bezeichnung + und -) variieren und dennoch die Signifikanz eines Effektes bestimmt werden kann. Prinzipiell werden nach der Festlegung des Untersuchungsziels geeignete Zielgrößen, Faktoren und Faktorstufen festgelegt. Die Faktorstufenkombinationen bilden immer die Eckpunkte eines k -dimensionalen Würfels (Bild 2.5). Um die Abweichung und die Reproduzierbarkeit der Versuche zu bestätigen sowie eventuell Nicht-Linearitäten zu identifizieren, werden dem Versuchsplan Zentralpunkte hinzugefügt.

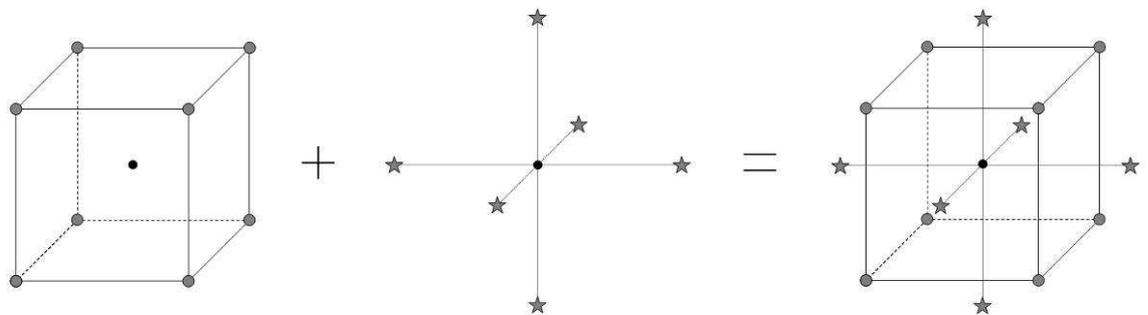


Bild 2.5: Schematische Darstellung eines faktoriellen Versuchsplans mit drei Faktoren und Zentralpunkt sowie die Bildung eines zentral zusammengesetzten Versuchsplans (CCD) aus demselben durch Hinzunehmen weiterer Untersuchungspunkte („Stern“-Punkte)

Bei vollständigen faktoriellen Versuchen nimmt die Anzahl der Faktorstufenkombinationen mit der Anzahl der Faktoren x_i sehr schnell zu ($m = 2^{x_i}$). Der Versuchsaufwand wird oft zu groß und es wird zunächst ein sog. fraktionell faktorieller Versuchsplan durchgeführt, bei dem nur ein Teil der Versuche des vollständigen Plans realisiert werden muss [92]. Fraktionelle faktorielle Versuchspläne können bei Bedarf zu vollständigen faktoriellen Versuchsplänen ergänzt werden (*Fold-over*). Denn es kann beispielsweise zu einer Vermengung von Effekten kommen, was bedeutet, dass bei der Auswertung nicht zwischen einzelnen Effekten unterschieden werden kann [92]. Statt einer genauen Zuordnung des Effekts muss dann die Summe der miteinander vermengten Effekte betrachtet werden. Oft kann hier allerdings durch technische Überlegungen entschieden werden, welcher der miteinander vermengten Effekte das Ergebnis bestimmt. Zur

Beschreibung der Art und Menge der auftretenden Vermengungen werden Teilfaktorpläne in Auflösungsklassen eingeteilt (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Einige Auflösungsstufen der statistischen Versuchsplanung

Auflösung	Eigenschaften
III	Haupteffekte sind mit 2fach-Faktorwechselwirkungen (2FWW) vermengt. Das Feld ist dicht besetzt und nur für <i>Screening</i> geeignet.
IV	Haupteffekte sind mit 3FWW vermengt und 2FWW untereinander. Das Feld ist geeignet, um Haupteffekte sicher zu bestimmen, 2FWW lassen sich jedoch nicht eindeutig zuordnen.
V	Haupteffekte sind mit 4FWW vermengt und 3FWW mit 2FWW.

Um quantitative Zusammenhänge zwischen den Faktoren und Zielgrößen im Detail zu untersuchen, werden sog. *Response-Surface*-Pläne mit mehr als zwei Faktorstufen angewendet, wie beispielsweise zentral zusammengesetzte Versuchspläne (engl. *central composite design*; kurz: CCD). Ein CCD besteht aus einem vollständigen oder fraktionellen faktoriellen Versuchsplan mit Mindestauflösung V, dem weitere Versuchspunkte (sog. „Stern“-Punkte) hinzugefügt werden (Bild 2.5) [9, 92, 131]. Alternative Pläne sind beispielsweise D-optimale Pläne, bei denen die Einzelversuche mit Hilfe eines komplexen Algorithmus ausgewählt werden, so dass alle Koeffizienten im Regressionsmodell möglichst genau bestimmt werden können.

2.4.3 Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Auswertung erfolgt für jede der gewählten Zielgrößen und umfasst die Aufbereitung der Daten (eventuell Transformation, Suche nach Ausreißern), die Berechnung der Effekte und ihrer Signifikanz. Mit Hilfe der Regressionsanalyse wird zudem ein mathematisches Modell für den Zusammenhang zwischen den untersuchten Faktoren und einer Zielgröße gebildet. Dazu werden stets nicht-signifikante FWW und quadratische Terme aus dem Regressionsmodell entfernt, lineare Terme (Haupteffekte) können nur entfernt werden, wenn sie in keiner signifikanten FWW vorkommen. Die erstellten Modelle werden auf Plausibilität, Signifikanz und Güte überprüft. Anschließend erfolgt stets eine Validierung des gewählten Modells, indem weitere Experimente durchgeführt und die experimentell ermittelten mit den vorhergesagten Werten verglichen werden.

2.4.4 Grafische Darstellung

Der Einfluss von zwei beliebigen Faktoren auf eine Zielgröße kann anschaulich als Fläche im Raum (sog. Wirkungsfläche, engl. *response surface*) oder als Höhenliniendiagramm bzw. Konturplot (engl. *contour plot*) dargestellt werden [92, 131].

2.4.5 Polyoptimierung bei mehreren Zielgrößen und Faktoren

Meistens sollen mehrere Zielgrößen gleichzeitig optimiert werden. Einige Zielgrößen sollen minimiert oder maximiert werden und andere nur in einem bestimmten Bereich variiert werden. Dabei treten Zielkonflikte auf, denn eine Faktorstufe, die für eine Zielgröße günstig ist, kann für andere Zielgrößen ungünstig sein. Aufgrund der quantitativen Kenntnis der Abhängigkeit der Zielgrößen von den Faktoren können Kompromisse auf verschiedenen Wegen gefunden werden. Die Zusammenfassung der Zielgrößen in der vorliegenden Arbeit erfolgt numerisch, d. h. mit Hilfe der sog. Zielfunktion D (engl.: *Desirability function*) in Gl. 4.12 [8, 131]. Dazu wurde zunächst für jede einzelne Zielgröße eine Teil-Zielfunktion d_i festgelegt. Abhängig davon ob eine Zielgröße y_i minimiert, maximiert oder in einem bestimmten Bereich variiert werden sollte, werden verschiedene Teil-Zielfunktionen verwendet (Gl. (4.9) - (4.11)). Die einzelnen Zielfunktionen d_i und die für alle Zielgrößen zusammengefasste Zielfunktion D liegen jeweils immer zwischen 0 und 1, wobei 0 unerwünscht bzw. nicht zulässig und 1 erwünscht bzw. optimal bedeutet.

3 Ziel der Arbeit

Adipositas und ihre Folgen gehören weltweit zu den zentralen ernährungsbedingten Gesundheitsproblemen. In Deutschland sind 66 % der Männer und 51 % der Frauen übergewichtig oder adipös [123]. Gesundheitliche Folgen sind unter anderem Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ 2, koronare Herzkrankheiten, Schlaganfall, bestimmte Krebs- und degenerative Erkrankungen [41, 198].

Fettreduzierte Lebensmittel können einen Beitrag zur Bekämpfung von Übergewicht und zur Reduktion der damit verbundenen Gesundheitsrisiken leisten. Eine Vielzahl fettarmer Erzeugnisse stößt bei den Konsumenten jedoch auf Ablehnung, da der sensorische Eindruck des Produktes durch den Einsatz von Fettaustauschsystemen nachteilig beeinflusst wird. Neue Ansätze zur Herstellung einsatzfähiger Fettsubstitute bestenfalls auf Basis von pflanzlichen Proteinen sind demnach zwingend erforderlich.

Ein für Lupinensaat entwickeltes Verfahren zur Proteinisolierung liefert ein hochviskoses, fettähnliches und cremiges Isolat, welches bereits erfolgreich als Fettsubstitut in einzelnen Lebensmitteln angewendet wurde. Die Herstellung besteht aus einer Salzextraktion mit anschließender Verdünnungsfällung [13, 19, 20, 42, 50, 68, 97, 98, 125, 126, 139, 204]. Jedoch fehlt es an einer effizienten Herstellung markttauglicher Isolate auf Basis des Lupinenproteins.

Ziel dieser Arbeit ist die systematische Optimierung des Prozesses unter Anwendung geeigneter statischer Versuchsdesigns. Der Einfluss auf die Proteinausbeuten und sensorische Isolatqualität wird dabei als Bewertungsgrundlage herangezogen. Nach umfangreichen *Screening*-Versuchen werden signifikante Prozessfaktoren deren Wechselwirkungen und ein geeigneter Rohstoff ermittelt. Anschließend erfolgt die Optimierung der Extraktion und Fällung im Hinblick auf die Maximierung der Proteinausbeute unter Beibehaltung einer fettähnlichen Struktur des Isolats. Für die industrielle Umsetzung der Proteinisolierung ist dies eine zwingend erforderlich Grundlage.

Diese Arbeit leistet einen entscheidenden Beitrag auf dem Gebiet der Herstellung pflanzlicher Fettsubstitute auf Basis von Proteinen. Die Optimierung der Produktausbeute und -qualität kommt der Forderung der Verbraucher und Lebensmittelindustrie im Bezug auf fettreduzierte Lebensmittelprodukte nach.

4 Material und Methoden

Die zur Herstellung von Proteinisolaten verwendeten Körnerleguminosen und deren Herkunft sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Alle im Rahmen dieser Arbeit im Labormaßstab verwendeten Apparaturen, Hilfsmittel und Chemikalien sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Verwendete Körnerleguminosen

Leguminosenart	Bezugsquelle
Ackerbohne	PZO Pflanzenzucht Oberlimpurg,
<i>Vicia faba</i> L. cv. Divine	Schwäbisch Hall
Bohne, weiß	Müllers Mühle GmbH,
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Gelsenkirchen
Erbse	Limagrain Nickerson,
<i>Pisum sativum</i> L. cv. Attika	Edemissen
Linse	Baktat Gida San. Tic. Ltd. Şti.,
<i>Lens culinaris</i> L.	ÇORUM, Türkei
Lupine	Saatgut Steinach GmbH,
<i>Lupinus angustifolius</i> L. cv. Vitabor	Steinach
Soja	Cargill Deutschland GmbH,
<i>Glycine max</i> L. Prolia [®] 68218	Krefeld

Tabelle 4.2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	Spezifikation / Bestellnummer.
Kalium-Natrium-Tatrat	Sigma-Aldrich, Germany	CAS 6381-59-5; S2377
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt	1.02790.0250
NaCl	Merck, Darmstadt	1.06404.1000
	Th. Geyer, Renningen	1367.1000
NaOH (1 M)	Merck, Darmstadt	1.09137.1000
	Th. Geyer, Renningen	1340.1000
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt	1.12018-100
Salzsäure (1 M)	Th. Geyer, Renningen	1340.1000

Tabelle 4.3: Verwendete Apparaturen, Geräte und Materialien

Apparatur bzw. Material	Hersteller / Bezugsquelle	Spezifikation
Aluminium-Waagschalen	Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland	100 x 7 mm
Analysesieb	Haver & Boecker, Oelde, Deutschland	1,0 oder 1,4 mm
Filter	Munktell, Bärenstein, Deutschland	Grack MG 160; ø 90 mm
Filtertuch	Merck, Darmstadt, Deutschland	Viskose-Polyester-Filter, Calbiochem Micraloth
Küvetten	Brand, Wertheim, Deutschland	Makro und Halbmikro, Best.- Nr.: 759005
Laborrührwerk	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland	Eurostar PCVP 4 mit Ankerrührer
Laborwaagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland	I24000P, UC4100S, U3600, R160P, MC210P
Messermühle	Retsch GmbH, Haan, Deutschland	Grindomix GM 200
Mörser	Haldenwanger, Berlin, Deutschland	Keramik, 55-5 und 56-6a
pH-Meter	wtw Microprozessor, Weilheim, Deutschland Knick, Berlin, Deutschland	pH 537, pH 538 und pH 330 Calimatik 763
Pumpe	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland	101 U
Reaktor 2 und 4 L	Normschliff Gerätebau, Wertheim, Deutschland	LF 150 bzw. GL 14
Silikonschlauch	Sahlberg GmbH & Co. KG, Feldkirchen, Deutschland	Innendurchmesser 4 mm
Spektrometer	Perkin Elmer Instruments, Waltham, USA	UV/VIS Spectrometer Lambda A25
Stickstoffanalysator	Leco Corporation, Michigan, USA	FP-528
Trockensubstanzmessgeräte	Satorius, Göttingen, Deutschland	MA 30, MA 40, MA 100

Apparatur bzw. Material	Hersteller / Bezugsquelle	Spezifikation
Walzenstuhl mit Riffel- und Glattwalzen	Bauermeister, Norderstedt, Deutschland	LRC 250
Wasserbad	Brinkmann, Königshofen, Deutschland	mgw Lauda RM6
Zentrifugen	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland	Sigma 8K
Windsichter	Fraunhofer IVV, Freising, Deutschland	Eigenbau

4.1 Vorbehandlung der verwendeten Leguminosensaaten

Die Vorbehandlung der Saat der *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor (Tabelle 4.1) wurde am Fraunhofer IVV im Pilotmaßstab durchgeführt.

Zunächst wurde die Schale in einem Walzenstuhl (Streckel & Schrader KG, Hamburg) vom Lupinenkern gelöst, wobei der Abstand der beiden rotierenden statischen Riffelwalzen 3 bis 4 mm betrug. Anschließend wurden die Schalen und Kerne mittels Windsichter (Alpine Hosokawa AG & Co. OHG, Augsburg) voneinander getrennt. Die schwere Fraktion, der Fruchtkörper, wurde im darauf folgenden Verfahrensschritt durch zwei gegeneinander rotierende Glattwalzen geführt (Spaltbreite 0,2 mm), um die Oberfläche der Lupinenkerne zu vergrößern. Die hergestellten Lupinenflocken (Ø10 mm) wurden bis zur weiteren Verwendung in verschließbaren Fässern bei 16 °C licht- und luftdicht gelagert.

Zur Entölung der Lupinenflocken wurde eine Extraktion mit Iso-Hexan (Brenntag GmbH, Mühlheim/Ruhr) mittels Perkulations- bzw. Durchlaufverfahren durchgeführt. Die Flocken (~500 kg) wurden in den Perkolator (e&e Verfahrenstechnik, Warendorf) gegeben und mittels Iso-Hexans (~1000 L), das im Plattenwärmeaustauscher (GEA Ahlborn GmbH & Co., Sarstedt) auf ~55 °C erhitzt wurde, perkoliert. Die Öltrennung wurde im Kreislaufverfahren (1000 L·h⁻¹) durchgeführt, wobei die Miscella (Öl-Hexan-Gemisch) unter Vakuum eingengt und das rekondensierte Iso-Hexan dem Kreislauf erneut zugeführt wurde. Insgesamt dauerte die Entölung 4 Tage à 8 - 10 h, wobei die Miscella über Nacht bei 50 °C im Perkolator stehengelassen wurde. Zum Schluss erfolgt die Trocknung der Flocken mit Iso-Hexan-Dampf (110 - 120 °C) und Wasserdampf.

Für einen Rohstoffvergleich (Kapitel 4.3.2) wurde neben der Lupine als Rohwaren außerdem die Körnerleguminosen Ackerbohne, Soja, Erbse, Linse und weiße Bohne verwendet, deren Herkunft und botanische Bezeichnung in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Mit Ausnahme der Sojabohnen, die als entöltes Mehl (PDI 80) geliefert wurden, erfolgte die Vorbehandlung aller weiteren vorkonditionierten Saaten am Fraunhofer IVV. Hierbei wurden die Saaten im Labormaßstab ähnlich der Lupinensaat von den Schalen getrennt und mittels Messermühle unmittelbar vor der Proteinextraktion zerkleinert.

4.2 Prozess zur Herstellung des mizellaren Proteinisolats

Alle Bestandteile der Versuchsapparatur, sowie deren Hersteller und die genaue Spezifikation sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgelistet.

In einem 4 L-Reaktor wurden die vorbehandelten Saaten in einem Verhältnis von 1:8 mit einer 0,5-molaren NaCl-Lösung (58,4 g NaCl auf 2 L) bei 30 °C für 1 h gerührt (128 U·min⁻¹). Der pH-Wert wurde während der Extraktion (pH_E) nicht eingestellt. Im Anschluss an die Extraktion wurde die Suspension über ein Sieb (Maschenweite 1,0 oder 1,4 mm) in Raffinat und Extrakt klassiert. Das Raffinat wurde nach Auswaage und Probennahme verworfen. Das Proteinextrakt wurde für 10 min bei ~20 °C mit 3300 g zentrifugiert und mittels Filtertuch weiter aufgereinigt, um andere störende Bestandteile (z. B. lösliche Fasern) abzutrennen. Vor der weiteren Verarbeitung wurde eine Probe zur Protein- und TS-Bestimmung entnommen.

Das Extrakt wurde über einen Silikonschlauch in Eiswasser (~1 °C) in einem Verhältnis von 1:3 gepumpt (2 L·h⁻¹). Dabei wurde das Gemisch mittels Propellerrührer (60 U·min⁻¹) vermengt. Die Proteine fielen unmittelbar als weißer Niederschlag aus und wurden nach ca. 18 h abzentrifugiert (3300 g). Als Rückstand verblieb das Proteinisolat, wobei der Überstand nach Auswaage und Probennahme verworfen wurde. Das Proteinisolat wurde mit demineralisiertem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert (10 °C, 3300 g, 10 min), um den Salzgehalt im Isolat zu senken. Für weitere analytische Untersuchungen wurde das Mizellenproteinisolat aliquotiert, gefriergetrocknet und mit einem handelsüblichen Mörser vermahlen. Die einzelnen Prozessschritte sind schematisch in Bild 4.1 dargestellt.

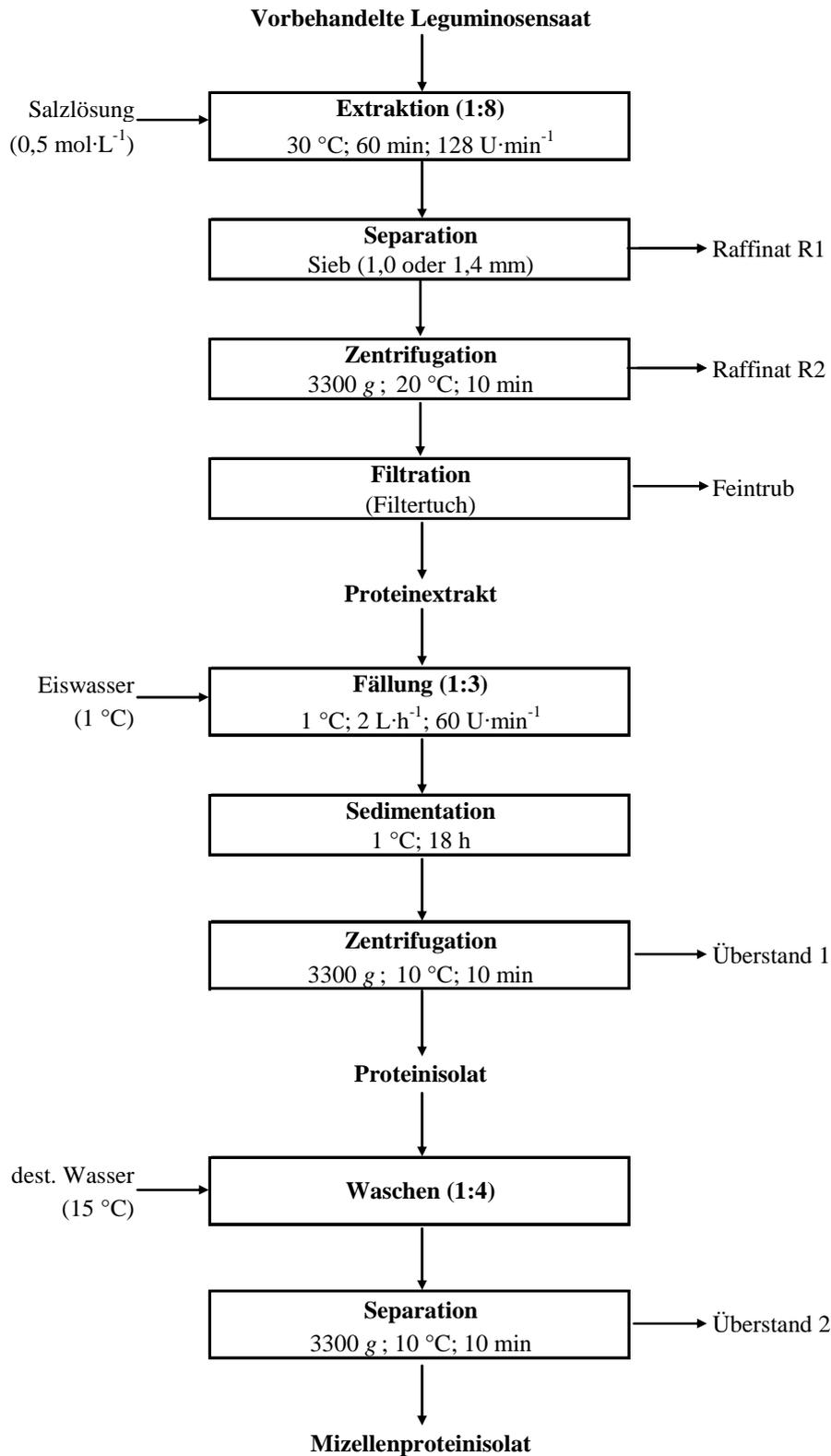


Bild 4.1: Fließschema des Prozesses zur Herstellung des Mizellenproteinisolats

4.3 Optimierung des Prozesses zur Proteinisolierung

Zur Optimierung des Herstellungsprozesses des Mizellenproteinisolats wurden im ersten Schritt signifikante Prozessfaktoren (sog. *Screening* in Kapitel 4.3.1) und ein geeigneter Rohstoff (Kapitel 4.3.2) ermittelt. Nach der quantitativen Erfassung der Abhängigkeiten definierter Zielgrößen (Tabelle 4.4 und Kapitel 4.4.3) von den ausgewählten Einflussgrößen folgte mit Hilfe einer geeigneten *Response Surface* Methode die finale Prozessoptimierung (Kapitel 4.3.3) [92, 131].

Tabelle 4.4: Ausgewählte Zielgrößen und deren Definition bzw. Berechnung

Zielgröße	Definition / Berechnung
Proteingehalt Extrakt ($c_{P_{\text{Extrakt}}}$) /%	$c_{P_{\text{Extrakt}}} = \frac{m_{P_{\text{Extrakt}}}/g}{m_{\text{Extrakt}}/g} \cdot 100 \quad (4.1)$
Proteinausbeute Extraktion (EA) /%	$EA = \frac{m_{P_{\text{Extrakt}}}/g}{m_{P_{\text{Rohstoff}}}/g} \cdot 100 \quad (4.2)$
Proteingehalt Isolat ($c_{P_{\text{Isolat}}}$) /%	$c_{P_{\text{Isolat}}} = \frac{m_{P_{\text{Isolat}}}/g}{m_{\text{Isolat}}/g} \cdot 100 \quad (4.3)$
Proteingehalt im Isolat bezogen auf TS /%	$PGI = \frac{m_{PI}}{m_{TS}} \cdot 100 \quad (4.4)$
Proteingesaamtausbeute (PGA) /%	$PGA = \frac{m_{P_{\text{Isolat}}}/g}{m_{P_{\text{Rohstoff}}}/g} \cdot 100 \quad (4.5)$

4.3.1 Identifikation signifikanter Prozessparameter (*Screening*)

In dieser Phase wurden die Faktoren mit signifikantem Einfluss auf definierte Zielgrößen von den nicht-signifikanten getrennt. Einige Einflussfaktoren wurden einer Voruntersuchung unterzogen, um das *Screening* mit einer angemessenen Faktorenanzahl durchzuführen sowie den Prozess gegebenenfalls zu vereinfachen.

Zum einem wurde der Einfluss unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen (c_{NaCl}) des Extraktionsmediums (0,2; 0,5; 0,8; 1,1; 1,4; 1,7; und 2.0 mol·L⁻¹) auf die extrahierte Proteinausbeute (EA) untersucht. Die Proteinkonzentration ($c_{P_{\text{Extrakt}}}$) im Extrakt wurde dazu mittels Biuret-Methode (Kapitel 4.4.2) bestimmt. Im zweiten Vorversuch wurde der Einfluss der Einleitgeschwindigkeit des Extrakts in das kalte Wasser (1 °C) auf PGA evaluiert. Bisher wurde das Proteinextrakt mit einer Geschwindigkeit von 2 L·h⁻¹ in das Wasser eingeleitet, was in dieser Versuchsreihe mit einer schlagartigen Vermengung

($3600 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. $100 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $1 \text{ L}\cdot 10\text{s}^{-1}$) verglichen wurde. Alle Versuche wurden mindestens in Doppelbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse mittels Zweistichproben t -Test nach Student ausgewertet und als Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben.

Anschließend wurden mit Hilfe der Software Design Expert[®] ein fraktioniert faktoriellen Versuchsplans der Auflösung IV mit vier Zentralpunkten erstellt. Es wurden die Extraktionsparameter pH_E , t_E , c_{NaCl} , RSV und die Temperatur (T_E), sowie die Fällungsparameter pH_F , EWV als auch die Zentrifugen- (t_Z) und Sedimentationszeit (t_S) in den Versuchsplan aufgenommen. Der pH_E wurde mit Natriumhydroxid (NaOH 1,0 M) eingestellt. Der Einfluss dieser zehn Prozessfaktoren auf EA und PGA sowie auf die Isolatqualität (*visTex* siehe Kapitel 4.4.3) wurde untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in randomisierter Reihenfolge und zur Verbesserung der Ergebnisse wurde der Versuchsplan mit Hilfe eines sog. *Fold-overs* erweitert (Tabelle 9.2 im Anhang). Die Ergebnisse wurden mittels Varianzanalyse (engl. *Analysis Of Variance*, ANOVA) ausgewertet. Gegebenenfalls wurden die ermittelten Daten zur besseren Anpassung an die Normalverteilung und Bestimmung eines Regressionsmodells transformiert. Ausgewählt wurde die geeignete Transformation gemäß der Box-Cox-Methode, welche die Transformationsfunktion optimiert [195].

4.3.2 Rohstoffvergleich

Weitere Rohstoffe wurden zur Herstellung des mizellaren Proteinisolats erprobt. Soja, Ackerbohne, Erbse, Linse und weiße Bohne sowie entölte und vollfette Lupinenflocken wurden dabei miteinander verglichen (Tabelle 5.3). Simultan wurden drei wesentliche Extraktionsparameter pH_E , c_{NaCl} und RSV variiert, um eine Anpassung des Prozesses an die einzelnen Leguminosen zu ermöglichen. Die Auswirkungen auf EA und PGA wurden mittels D-optimalen *Response Surface* - Design untersucht. Die Versuche wurden stets in randomisierter Reihenfolge durchgeführt und mit Hilfe der Software Design Expert[®] ausgewertet. Für jede Zielgröße y_i wurde ein Regressionsmodell (Gl. (4.6)) angepasst und dessen Güte überprüft. Die Güte des Modells wurde durch statistische Kenngrößen dem Bestimmtheitsmaß R^2 , dem korrigiertem Bestimmtheitsmaß R_{adj}^2 und Prognose-Bestimmtheitsmaß R_{pred}^2 sowie dem *lack of fit* (LOF) dargestellt. Für weitergehende Informationen

zu diesen statistischen Kenngrößen wird an dieser Stelle auf die einschlägigen Literatur im Bereich der Statistik verwiesen [131, 171].

Durch Verwendung eines D-optimalen Plans bestand zudem die Möglichkeit für jeden einzelnen kategorischen Faktor (Rohstoff) ein Regressionsmodell mit den nicht-kodierten Faktoren zu ermitteln (Gl. (4.7)). Basis jedes Regressionsmodells bilden ausschließlich signifikante Faktoren und FWW. Nicht-signifikante Einzeleffekte wurden lediglich aus hierarchischen Gründen mit in die Regressionsgleichung aufgenommen.

$$\begin{aligned}
 y_i = & \beta_0 + \beta_{pH_E} x_{pH_E} + \beta_{c_{NaCl}} x_{c_{NaCl}} + \beta_{RSV} x_{RSV} + \beta_{Rohstoff} x_{Rohstoff} \\
 & + \beta_{pH_E} x_{pH_E}^2 + \beta_{c_{NaCl}} x_{c_{NaCl}}^2 + \beta_{RSV} x_{RSV}^2 + \beta_{Rohstoff} x_{Rohstoff}^2 \\
 & + \beta_{pH_E \cdot c_{NaCl}} x_{pH_E} x_{c_{NaCl}} + \beta_{pH_E \cdot RSV} x_{pH_E} x_{RSV} + \beta_{pH_E \cdot Rohstoff} x_{pH_E} x_{Rohstoff} \\
 & + \beta_{c_{NaCl} \cdot RSV} x_{c_{NaCl}} x_{RSV} + \beta_{c_{NaCl} \cdot Rohstoff} x_{c_{NaCl}} x_{Rohstoff} + \beta_{RSV \cdot Rohstoff} x_{RSV} x_{Rohstoff}
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

$$\begin{aligned}
 y_i = & \beta_0 + \beta_{pH_E} \cdot pH_E + \beta_{c_{NaCl}} \cdot c_{NaCl} + \beta_{RSV} \cdot RSV \\
 & + \beta_{pH_E} \cdot pH_E^2 + \beta_{c_{NaCl}} \cdot c_{NaCl}^2 + \beta_{RSV} \cdot RSV^2 \\
 & + \beta_{pH_E \cdot c_{NaCl}} \cdot pH_E \cdot c_{NaCl} + \beta_{pH_E \cdot RSV} \cdot pH_E \cdot RSV + \beta_{c_{NaCl} \cdot RSV} \cdot c_{NaCl} \cdot RSV
 \end{aligned} \tag{4.7}$$

Zur Validierung der Modelle wurden beliebige Faktorstufen im untersuchten Bereich ausgewählt und weitere Proteinisolierungen dementsprechend durchgeführt. Im Anschluss wurden die experimentell ermittelten Werte für die Zielgrößen *EA* und *PGA* mit dem durch das jeweilige Modell berechneten Werte verglichen (Tabelle 5.6). Mit Hilfe von Design Expert[®] wurden außerdem der je Zielgröße zugehörige 99%-Vorhersagebereich bestimmt.

4.3.3 Finale Prozessoptimierung

Basis des Versuchsplans zur finalen Optimierung des Isolierungsprozesses bildeten die bis dahin gewonnen Erkenntnisse. Als Rohstoff zur Herstellung des Proteinisolats wurde Schrot ($\varnothing 0,001 - 0,2$ mm) der nicht entöten *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor verwendet. Variiert wurden die signifikanten Prozessfaktoren pH_E (5,0 - 7,0), c_{NaCl} (0,1 - 1,0 mol·L⁻¹), RSV (0,08 - 0,14 bzw. 1:7 - 1:13), pH_F (5,0 - 5,9), EWV (0,2 - 0,5 bzw. 1:5 - 1:2), t_S (0,0 - 60,0 min) und t_Z (10,0 - 60,0 min). Die Auswirkungen auf EA , PGA sowie der Isolatqualität ($visTex$) wurden mit Hilfe eines flächenzentrierten (engl.: *face-centered* (FC)) CCD untersucht (Kapitel 2.4.2). Das bedeutet, dass

die Sternpunkte des Versuchsplans innerhalb des n-dimensionalen Versuchsraums liegen (Bild 4.2). Die Versuche wurden stets in randomisierter Reihenfolge durchgeführt und mit Hilfe der Software Design Expert[®] ausgewertet. Für die Zielgrößen y_i (EA und PGA) wurde ein Regressionsmodell (Gl. (4.8)) angepasst und dessen Güte überprüft. Die Güte des Modells wurde durch die statistischen Kenngrößen dem Bestimmtheitsmaß R^2 , dem korrigierten Bestimmtheitsmaß R^2_{adj} und Prognose-Bestimmtheitsmaß R^2_{pred} sowie dem LOF dargestellt.

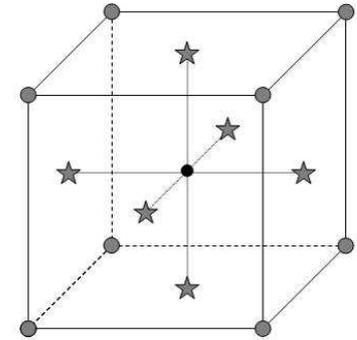


Bild 4.2: Schematische Darstellung eines flächenzentrierten versuchsplans (FC-CCD) mit drei Faktoren und Zentralpunkt

$$\begin{aligned}
 y_i = & \beta_0 + \beta_{pH_E} x_{pH_E} + \beta_{c_{NaCl}} x_{c_{NaCl}} + \beta_{RSV} x_{RSV} + \beta_{t_Z} x_{t_Z} + \beta_{EWV} x_{EWV} + \beta_{pH_F} x_{pH_F} + \beta_{t_S} x_{t_S} \\
 & + \beta_{pH_E}^2 x_{pH_E}^2 + \beta_{c_{NaCl}}^2 x_{c_{NaCl}}^2 + \beta_{RSV}^2 x_{RSV}^2 + \beta_{t_Z}^2 x_{t_Z}^2 + \beta_{EWV}^2 x_{EWV}^2 + \beta_{pH_F}^2 x_{pH_F}^2 + \beta_{t_S}^2 x_{t_S}^2 \\
 & + \beta_{pH_E \cdot c_{NaCl}} x_{pH_E} x_{c_{NaCl}} + \beta_{pH_E \cdot RSV} x_{pH_E} x_{RSV} + \beta_{pH_E \cdot t_Z} x_{pH_E} x_{t_Z} + \beta_{pH_E \cdot EWV} x_{pH_E} x_{EWV} \\
 & + \beta_{pH_E \cdot pH_F} x_{pH_E} x_{pH_F} + \beta_{pH_E \cdot t_S} x_{pH_E} x_{t_S} + \beta_{c_{NaCl} \cdot RSV} x_{c_{NaCl}} x_{RSV} + \beta_{c_{NaCl} \cdot t_Z} x_{c_{NaCl}} x_{t_Z} \\
 & + \beta_{c_{NaCl} \cdot EWV} x_{c_{NaCl}} x_{EWV} + \beta_{c_{NaCl} \cdot pH_F} x_{c_{NaCl}} x_{pH_F} + \beta_{c_{NaCl} \cdot t_S} x_{c_{NaCl}} x_{t_S} + \beta_{RSV \cdot t_Z} x_{RSV} x_{t_Z} \\
 & + \beta_{RSV \cdot EWV} x_{RSV} x_{EWV} + \beta_{RSV \cdot pH_F} x_{RSV} x_{pH_F} + \beta_{RSV \cdot t_S} x_{RSV} x_{t_S} + \beta_{t_Z \cdot EWV} x_{t_Z} x_{EWV} \\
 & + \beta_{t_Z \cdot pH_F} x_{t_Z} x_{pH_F} + \beta_{t_Z \cdot t_S} x_{t_Z} x_{t_S} + \beta_{EWV \cdot pH_F} x_{EWV} x_{pH_F} + \beta_{EWV \cdot t_S} x_{EWV} x_{t_S} + \beta_{pH_F \cdot t_S} x_{pH_F} x_{t_S}
 \end{aligned} \tag{4.8}$$

Basis jedes Regressionsmodells bilden letztlich ausschließlich signifikante Faktoren und FWW. Nicht-signifikante Einzeleffekte wurden aus hierarchischen Gründen mit in die Regressionsgleichung aufgenommen. Aufgrund der quantitativen Kenntnis der Abhängigkeit der Zielgrößen EA , PGA und $visTex$ von den Faktoren wurde wie in Kapitel 4.3.2

beschrieben eine Modellvalidierung durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Polyoptimierung mit Hilfe der Zielfunktion D (Gl. (4.12)) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Teil-Zielfunktionen d_i entsprechend der Gleichungen (4.9) - (4.11) für die Zielgröße und den Faktoren festgelegt in Abhängigkeit davon, ob die Zielgröße y_i bzw. einer der Faktoren minimiert, maximiert oder in einem bestimmten Bereich variiert werden sollte. Dabei ist L_i der niedrigste Wert, U_i der höchste Wert und T_i der Zielwert für die jeweilige Zielgröße y_i .

Soll die Zielgröße y_i maximiert werden, gilt

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L_i \\ \left(\frac{y_i - L_i}{T_i - L_i} \right)^{r_1} & L_i \leq y_i \leq T_i \\ 1 & y_i > T_i \end{cases} \quad (4.9)$$

Soll die Zielgröße y_i minimiert werden, gilt

$$d_i = \begin{cases} 1 & y_i < T_i \\ \left(\frac{U_i - y_i}{U_i - T_i} \right)^{r_1} & T_i \leq y_i \leq U_i \\ 0 & y_i > U_i \end{cases} \quad (4.10)$$

Soll die Zielgröße y_i zwischen der unteren (L_i) und oberen (U_i) Grenze liegen, gilt

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L_i \\ \left(\frac{y_i - L_i}{T_i - L_i} \right)^{r_1} & L_i \leq y_i \leq T_i \\ \left(\frac{U_i - y_i}{U_i - T_i} \right)^{r_2} & T_i \leq y_i \leq U_i \\ 0 & y_i > U_i \end{cases} \quad (4.11)$$

Nachdem für alle Zielgrößen y_i eine Teil-Zielfunktion d_i ermittelt wurde, konnten diese als geometrisches Mittel zu der Gesamt-Zielfunktion D mit q , der Anzahl eingehender

Teil-Zielfunktionen, verbunden werden (Gl. (4.12)). Zusätzlich konnten die einzelnen Zielgrößen y_i in Relation zu den anderen Zielgrößen gewichtet werden. Die Priorität (r_i) variiert von 1 (am wenigsten wichtig) bis 5 (sehr wichtig).

$$D = \left(d_1^{r_1} \cdot d_2^{r_2} \cdot \dots \cdot d_q^{r_q} \right)^{1/q} = \left(\prod_{i=1}^q d_i^{r_i} \right)^{1/q} \quad (4.12)$$

4.4 Analysemethoden

4.4.1 Bestimmung der Trockensubstanz und des Aschegehalts

Die TS der einzelnen Proben wurde entweder mit einem Satorius TS-Messgerät und/oder mit Hilfe des thermo-gravimetrischen Analysesystems Leco TGA 601 (Tabelle 4.3) bestimmt. Dazu wurde die Probe jeweils auf 105 °C aufgeheizt bis sich eine Gewichtskonstante einstellte. Die TS wurde als Masseprozent der Aufgabemenge ausgegeben bzw. mittels gravimetrischer Differenzwägung bestimmt.

4.4.2 Bestimmung des Proteingehalts (Dumas und Biuret)

Methode nach Dumas

Die entgasten Proben wurden in einer Sauerstoffatmosphäre bei 950 °C im Leco TGA 601 verbrannt (Tabelle 4.3). Der verbrannten Probe wurde Helium als Inertgas zugeführt und zusammen mit den Verbrennungsgasen (CO₂, H₂O, NO_x, N₂) gesammelt, gefiltert und gekühlt. 10 mL des Gasgemisches wurde durch Reduktionsrohre, die Kupfer enthielten, geleitet. Stickstoffoxide (NO_x) wurden zu Stickstoff (N₂) reduziert, um eine höhere Empfindlichkeit der Messung zu erreichen. Alle weiteren Verbrennungsgase (CO₂, H₂O) wurden durch geeignete Absorptionssysteme abgetrennt. Die Konzentration des Stickstoffs im Trägergasstrom (Helium) wurde in einer Wärmeleitfähigkeitsmesszelle bestimmt, wobei der mögliche Messbereich für Stickstoff in Feststoffen 1,9 - 23,9 mg und für Flüssigkeiten 0,3 - 1,8 mg betrug. Durch Multiplikation mit dem für Leguminosen spezifischen Konversionsfaktor N x 5,7 wurde der Proteingehalt der jeweiligen Probe berechnet [10, 70].

Biuret-Methode

Das Prinzip der Biuret-Methode beruht auf einer Kompleksalz-Bindung von mindestens zwei Peptidbindungen mit Kupfer, die durch eine rot-violette Färbung sichtbar und mittels Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm photometrisch erfasst wurden. Zur

Durchführung der Methode wurde eine Biuret-Lösung hergestellt, indem 1,5 g Kupfersulfat und 6,0 g Kalium-Natrium-Tatrat unter ständigem Rühren in 250 mL demineralisiertem Wasser aufgelöst und anschließend 300 mL 1 M Natronlauge zugegeben wurden. Die Lösung wurde in einer lichtgeschützten Flasche gelagert. Es wurde eine Kalibrierlösung mit Rinderserumalbumin (BSA) und somit bekannter Proteinkonzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ hergestellt. Dazu wurden 0,5 g BSA in 50 mL NaCl-Lösung definierter Molarität gelöst. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Kalibrierlösung in halbhohen Reagenzgläsern hergestellt (Tabelle 9.1 im Anhang). Die gemessenen Extinktionswerte der Kalibrierreihen wurden gegen die entsprechenden Proteinkonzentrationen aufgetragen und die Kalibriergerade erstellt. Proteinlösungen konnten dementsprechend nur in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ untersucht werden, weswegen diese gegebenenfalls mit der jeweiligen Salzlösung verdünnt worden ist. Zu 0,5 mL Probe wurden jeweils 2 mL der Biuret-Lösung gegeben und sofort gemischt. Die Mischung wurde im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min inkubiert, anschließend für 20 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und schließlich in Küvetten überführt. Es folgte die Messung der Extinktion der einzelnen Proben im Spektrometer (Tabelle 4.3). Es wurden jeweils dreifach Bestimmungen durchgeführt. Einzelne Proteinkonzentrationen wurden über die Steigung der Kalibriergerade unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet (Gl. (4.13)).

$$c_p = \frac{(E - b)}{(a \cdot \text{Verdünnungsfaktor})} \quad (4.13)$$

Dabei ist c_p die Proteinkonzentration in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, E die Adsorption in nm, b der Anstieg des Graphen und a der Schnittpunkt der Ordinate.

4.4.3 Visuelle Texturbewertung (*visTex*)

Um die Textur des produzierten Mizellenproteinisolats zu beurteilen, wurde ein Bewertungsschema ausgearbeitet (Tabelle 4.5). Mittels optischer und sensitiver Eindrücke wurden die Textureigenschaften Konsistenz, Cremigkeit und Viskosität untersucht und benotet. Die Qualitätsnote 1 steht für eine sehr gute Beschaffenheit des Proteinisolats, wohingegen die Note 4 an Isolate vergeben wurde, die nicht als Fettaustauschstoffe geeignet waren.

Tabelle 4.5: Schema für die visuelle Texturbewertung (*visTex*) der Mizellenproteinisolate

Bewertung	Eigenschaft	Foto
Note 1	Perfektes Isolat, sehr cremig, honigartig, hochviskos, frei fließend	
Note 2	Isolat mit geringen Mängeln, cremig, sämig, viskos, frei fließend	
Note 3	Isolat mit deutlichen Mängeln, wenig cremig, grießig, fest, nicht fließend, pastös	
Note 4	Nicht verwendbares Isolat, nicht cremig, inhomogene Masse, fließt (wie Wasser)	

5 Ergebnisse

Da die Isolierung von Proteinen aus Leguminosen von zahlreichen Parametern abhängig ist und eine systematische Vorgehensweise gewisse Einschränkungen erfordert, wurde der Einfluss bestimmter Prozessparameter auf die Proteinausbeuten einzeln untersucht. Somit wurde die Salzkonzentration c_{NaCl} während der Extraktion und Einleitgeschwindigkeit während der Fällung untersucht, um das *Screening* letztlich mit einer angemessenen Faktorenanzahl durchzuführen sowie den Prozess gegebenenfalls zu vereinfachen.

Einfluss von c_{NaCl} auf EA

Da bestimmte Salze durch den sog. Einsalzeffekt einen wesentlichen Einfluss auf die Extraktion bzw. Löslichkeit der Proteine ausüben, wurde zunächst die Natriumchloridkonzentration (c_{NaCl}) schrittweise erhöht. Hierbei zeigte sich, dass eine Steigerung der c_{NaCl} von $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EA signifikant von 23,3 % auf 38,3 % erhöht, während eine weitere NaCl-Zugabe die Löslichkeit der Proteine deutlich verschlechtert (Bild 5.1). Eine höhere c_{NaCl} führt zu einer kontinuierlich sinkenden EA von 35,1 % bei $c_{NaCl} = 0,8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bis 31,7 % bei $c_{NaCl} = 2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

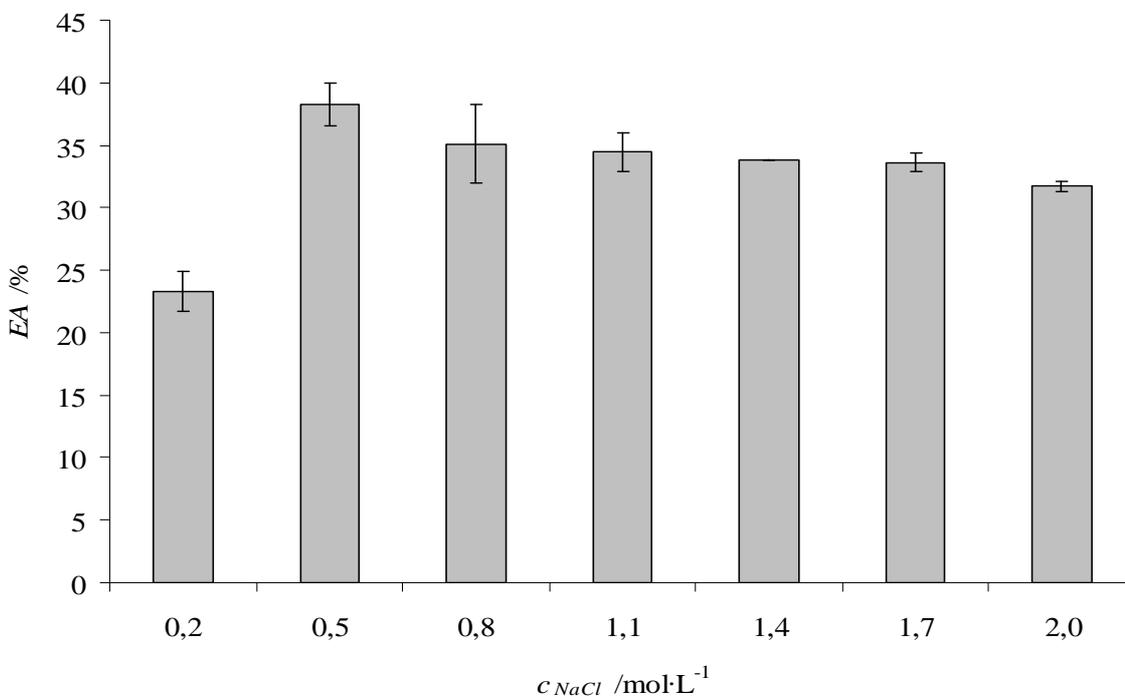


Bild 5.1: Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen des Extraktionsmediums (c_{NaCl}) auf die extrahierbare Proteinausbeute (EA) in %

Einfluss der Einleitgeschwindigkeit auf PGA

Während des Prozessschrittes der Fällung wurde der Proteinextrakt bisher mit einer Geschwindigkeit von $2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ in kaltes Wasser (1°C) eingeleitet. Um die Notwendigkeit eines Pumpsystems abschätzen zu können, wurden die PGA nach langsamer ($2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$) und schlagartiger ($1 \text{ L}\cdot 10 \text{ s}^{-1}$) Verdünnungsfällung miteinander verglichen. Mit einer durchschnittlichen PGA von $22,0 \% \pm 2,5 \%$ bei langsamer und $22,5 \% \pm 2,5 \%$ bei schlagartiger Verdünnung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, weshalb alle weiteren Prozesse bzw. Fällungen mit einer Einleitgeschwindigkeit $100 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ durchgeführt wurden.

5.1 Signifikante Prozessfaktoren

Die Voruntersuchungen zeigten, dass die Einleitgeschwindigkeit keinen wesentlichen Einfluss auf das Prozessergebnis hat, der Natriumchlorid-Gehalt des Extraktionsmittels jedoch erheblich die weitere Prozessgestaltung beeinflusst. Deshalb wurde nachfolgend der Einfluss verschiedener Extraktions- (c_{NaCl} , pH_E , t_E , RSV , T_E), sowie Fällungsparameter (pH_F , EWV , ΔT , Zentrifugen- (t_Z) und Sedimentationszeit (t_S)) auf die EA (Gl. (4.2)), PGA (Gl. (4.5)) und die Isolatqualität (*visTex* siehe Kapitel 4.4.3) mit Hilfe eines fraktioniert faktoriellen Versuchsplans und anschließendem *Fold-over* untersucht (Tabelle 9.2 im Anhang). Der Proteingehalt (c_p) und die TS der Rohware sowie aller anfallenden Extrakte, Überstände und Isolate wurden ermittelt (Tabelle 5.1). Dabei ergab sich für den Rohstoff bei einer eingesetzten Masse von 250,0 g eine TS von 215,8 g (85,7 %), die zu 34,5 % aus Proteinen bestand. In Tabelle 5.1 sind alle weiteren Ergebnisse der chemischen Analyse als auch die ermittelten Zielgrößen EA, PGA und *visTex* dargestellt.

Tabelle 5.1: Daten der chemischen Analyse sowie die ermittelte Zielgrößen des *Screening* in der Reihenfolge der Versuchsdurchführung

RUN ¹	m_{Extrakt} /g	TS _{Extrakt} /%	$c_{P_{\text{Extrakt}}}$ /%	EA /%	m_{Isolat} /g	TS _{Isolat} /%	$c_{P_{\text{Isolat}}}$ ³ /%	PGA /%	<i>visTex</i> ⁴
1	1070,8	7,4	2,3	28,0	4,4	14,1	40,4	0,3	1
2	1090,6	3,8	1,0	12,0	23,0	9,7	37,5	1,0	3
3	1105,0	6,3	3,5	44,7	54,2	41,9	98,0	25,8	1
4	1552,1	6,3	2,5	44,2	18,3	31,5	89,7	6,0	1
5	2375,4	2,6	0,0	0,0	10,2	23,4	76,5	2,1	4
6	2422,8	1,8	0,6	15,5	6,0	16,4	52,1	0,6	4

RUN ¹	m_{Extrakt} /g	TS _{Extrakt} /%	$c_{P_{\text{Extrakt}}}$ /%	EA /%	m_{Isolat} /g	TS _{Isolat} /%	$c_{P_{\text{Isolat}}}$ ³ /%	PGA /%	visTex ⁴
7	1000,6	9,3	4,0	46,4	16,8	31,3	81,5	5,0	1
8	2380,8	6,1	1,5	42,3	15,4	9,7	45,0	0,8	3
9	1560,5	6,3	2,3	41,9	16,6	36,6	93,4	6,6	1
10	2437,0	5,7	0,9	26,0	9,5	13,7	42,8	0,6	2
11	2410,9	5,6	0,9	24,4	4,6	8,2	76,7	0,3	4
12	2427,0	5,8	1,2	33,8	21,7	12,4	52,8	1,7	3
13	1575,8	5,8	2,2	40,6	12,2	29,1	83,0	3,4	1
14	1108,3	4,1	1,5	19,1	14,3	34,7	89,0	5,1	1
15	2431,2	7,2	1,9	53,1	11,0	17,5	36,3	0,8	3
16	1076,0	9,7	4,0	49,4	54,3	34,7	93,4	20,5	1
17	2425,0	6,6	1,6	44,8	14,6	16,7	82,0	2,3	3
18	1116,7	7,1	1,7	21,8	18,8	15,5	34,8	1,2	2
19	1576,3	6,2	2,1	38,4	16,2	29,7	88,6	4,9	1
20	1091,9	3,0	0,8	9,5	10,2	17,0	49,7	1,0	3
21	1016,1	5,6	2,3	27,5	17,7	20,3	60,1	2,5	3
22	2426,9	2,3	0,6	15,8	2,7	11,5	n. b. ²	0,0	4
23	2436,3	2,2	0,4	11,3	23,4	8,2	33,2	0,7	3
24	2432,8	3,6	1,8	51,1	27,6	39,9	100,0	12,8	1
25	1095,6	8,6	3,1	38,8	8,0	24,0	78,6	1,8	1
26	1098,7	6,9	3,7	47,1	22,4	34,6	95,7	8,6	1
27	2440,5	6,4	1,8	50,5	21,1	25,9	66,8	4,2	3
28	1088,4	4,0	1,4	17,6	15,7	26,8	56,1	2,7	3
29	2360,3	3,1	0,9	25,8	7,7	38,9	81,6	2,8	3
30	2384,2	7,3	2,3	63,1	15,0	14,0	51,3	1,2	3
31	2431,6	4,2	2,5	71,4	53,0	42,8	100,1	26,4	1
32	2424,0	6,6	1,8	50,1	10,3	33,4	94,6	3,8	1
33	1070,0	4,5	1,7	21,6	24,1	12,6	39,3	1,4	3
34	2450,2	6,3	1,7	48,9	15,6	31,7	79,0	4,4	1
35	1604,6	6,6	3,7	68,8	42,4	37,1	96,0	17,6	1
36	1102,0	10,5	5,2	66,3	75,7	39,9	95,6	33,6	1
37	1115,4	8,9	3,7	47,8	27,8	20,0	38,6	2,5	2
38	1110,8	5,2	2,7	35,1	36,1	40,7	90,3	15,4	1
39	2410,0	7,5	2,6	72,2	1,2	12,3	n. b. ²	0,0	3
40	1604,2	6,9	3,5	65,0	23,5	34,0	95,8	8,9	1
41	1586,1	7,1	3,6	66,3	41,6	34,9	94,3	15,9	1
42	1082,1	7,7	5,0	63,0	38,9	32,3	94,4	13,8	1
43	1107,4	7,2	4,6	59,7	86,6	36,9	95,8	35,6	1
44	2448,7	2,9	0,6	15,6	27,5	10,1	34,2	1,1	3
45	1034,7	11,0	5,3	63,6	27,2	34,3	85,2	9,2	1
46	2436,4	2,5	0,8	21,8	9,6	20,0	59,4	1,3	4
47	1105,2	9,9	4,8	61,9	5,2	18,5	43,6	0,5	2
48	1112,4	11,0	4,9	63,8	22,9	24,9	91,6	6,1	1
49	2423,4	7,2	2,2	61,4	34,9	29,9	95,4	11,6	1
50	997,3	4,8	2,1	24,8	13,2	22,7	65,6	2,3	2
51	1601,8	7,2	3,5	64,6	31,4	37,0	93,7	12,6	1
52	2446,3	2,5	0,7	19,0	1,1	17,1	n. b. ²	0,0	3

¹RUN: Versuchsnummer; ²n. b.: nicht bestimmbar; aufgrund der geringen Isolatmenge konnte der Proteingehalt einiger Proteinisolate nicht bestimmt werden; ³Proteinkonzentration bezogen auf TS;

⁴visTex: Bewertung der Isolatqualität siehe Kapitel 4.4.3

5.1.1 Signifikanz der Effekte und Modellbildung

Nach Durchführung der Versuchsreihen wurde mit Hilfe der ANOVA untersucht, in wie weit die untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die abhängigen Zielgrößen ausüben. Dazu wurden zunächst die experimentell ermittelten Werte der Zielgrößen zur besseren Anpassung an die Normalverteilung und zur Bestimmung eines Regressionsmodells transformiert. In Tabelle 5.2 sind die transformierten Zielgrößen und deren Haupteffekte (Änderung der Zielgröße in Abhängigkeit von einem Faktor) mit den zugehörigen p-Werten aufgelistet.

Die Extraktionsausbeute (\sqrt{EA}) wird von 4 und die Proteingesamtausbeute (\sqrt{PGA}) von 5 Haupteffekten signifikant beeinflusst (Tabelle 5.2). Für \sqrt{PGA} ist die Salzkonzentration während der Extraktion ($x_{c_{NaCl}}$) und die Temperaturdifferenz zwischen Extrakt und verdünnendem Wasser während der Fällung ($x_{\Delta T}$) mit aufgeführt, da diese Faktoren in einer signifikanten 2FWW vorkommen (Kapitel 2.4.3). Die Isolatqualität ($visTex$) bzw. $\log_{10}(visTex)$ wird von den meisten Haupteffekten signifikant beeinflusst, wobei das EWW während der Fällung (x_{EWW}) - ähnlich wie die zwei Faktoren $x_{c_{NaCl}}$ und $x_{\Delta T}$ bei \sqrt{PGA} - aus hierarchischen Gründen gezeigt ist.

Tabelle 5.2: p-Werte signifikanter Faktoren der transformierten Zielgrößen. Faktoren mit $p > 0,05$ sind aus hierarchischen Gründen mit aufgeführt und in die entsprechende Regressionsgleichung eingegangen

Faktoren	p-Werte		
	\sqrt{EA} /%	\sqrt{PGA} /%	$\log_{10}(visTex)$
x_{pH_E}	< 0,0001	0,0005	< 0,0001
x_{t_E}	0,0002	0,0343	k. A.
$x_{c_{NaCl}}$	< 0,0001	0,1001	0,0167
x_{RSV}	k. A.	< 0,0001	< 0,0001
x_{T_E}	< 0,0001	< 0,0001	0,0286
x_{pH_F}	k. A.	< 0,0001	0,0051
x_{EWW}	k. A.	k. A.	0,9383
$x_{\Delta T}$	k. A.	0,4600	0,0060
x_{t_z}	k. A.	k. A.	0,0362
x_{t_s}	k. A.	k. A.	k. A.

Die Einzeleffekte mit p-Wert (Tabelle 5.2) wurden in die Regressionsmodelle der Zielgrößen (5.1) - (5.3) aufgenommen. Neben den Haupteffekten sind alle signifikante 2FWW mit $p < 0,05$ in die Regressionsmodelle eingegangen.

$$\sqrt{EA} = 6,02 + 0,41x_{pH_E} + 0,73x_{c_{NaCl}} + 0,76x_{T_E} + 0,26x_{t_E} - 0,40x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} + 0,19x_{pH_E}x_{T_E} \quad (5.1)$$

mit $R^2 = 0,90$, $R_{adj}^2 = 0,88$ und $R_{pred}^2 = 0,84$ sowie einer signifikanten Krümmung und *LOF*.

$$\begin{aligned} \sqrt{PGA} = & 1,90 + 0,38x_{pH_E} + 0,38x_{RSV} - 0,13x_{c_{NaCl}} + 0,55x_{T_E} + 0,16x_{t_E} - 0,051x_{\Delta T} - 0,63x_{pH_F} \\ & + 0,25x_{pH_E}x_{RSV} - 0,35x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} + 0,38x_{pH_E}x_{T_E} - 0,25x_{pH_E}x_{\Delta T} - 0,49x_{pH_E}x_{pH_F} + 0,18x_{RSV}x_{c_{NaCl}} \end{aligned} \quad (5.2)$$

mit $R^2 = 0,93$, $R_{adj}^2 = 0,90$ und $R_{pred}^2 = 0,85$ sowie einer signifikanten Krümmung und einem nicht signifikantem *LOF*.

$$\begin{aligned} \log_{10}(visTex) = & 0,28 - 0,092x_{pH_E} - 0,11x_{RSV} - 0,044x_{c_{NaCl}} - 0,041x_{T_E} \\ & + 1,386 \cdot 10^{-3}x_{E_{WV}} - 0,052x_{\Delta T} + 0,053x_{pH_F} + 0,039x_{t_Z} \\ & - 0,038x_{pH_E}x_{RSV} + 0,066x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} + 0,048x_{pH_E}x_{E_{WV}} \end{aligned} \quad (5.3)$$

mit $R^2 = 0,81$, $R_{adj}^2 = 0,76$ und $R_{pred}^2 = 0,62$ sowie einer signifikanten Krümmung und keinem *LOF*.

Neben der Konstanten β_0 wird *EA* durch 9 Terme (Gl. (5.1)) sowie *PGA* durch 13 (Gl. (5.2)) und *visTex* durch 11 Terme beeinflusst. Im Vergleich ist somit die *PGA* von mehr Faktoren bzw. FWW abhängig, als die anderen Zielgrößen. Es zeigt sich außerdem, dass mit Ausnahme von der 2FWW zwischen x_{RSV} und $x_{c_{NaCl}}$ in Gl. (5.2), der pH-Wert während der Extraktion (x_{pH_E}) Teil jeder FWW ist. Dabei sollte allerdings auch die Vermengungsstruktur berücksichtigt werden, welche im Anhang in den Tabelle 9.3 und 9.4 dargestellt sind.

5.1.2 Grafische Darstellung der 2FWW

In den Bildern 5.2 - 5.4 wird die Signifikanz der jeweiligen 2FWW durch die Abweichung der beiden Linien von der Parallelität grafisch dargestellt. Es ist jeweils eine Zielgröße in Abhängigkeit von vier Faktorstufenkombinationen gezeigt, welche denen am jeweiligen Zentralpunkt entsprechen (Tabelle 2.1). Die Verbindungslinien zwischen diesen experimentell ermittelten Werten der Zielgrößen wurden aufgrund des zugehörigen Modells (Gl. (5.1) - (5.3)) berechnet.

5.1.2.1 Signifikante Effekte durch 2FWW in Bezug auf EA

In Bild 5.2a) – b) ist die Zielgröße EA in Abhängigkeit signifikanter 2FWW gezeigt. Bild 5.2a) zeigt EA bei verschiedenen Faktorstufenkombinationen von pH_E und c_{NaCl} . Bei $pH_E = 5,5$ kann durch eine Steigerung des c_{NaCl} von $0,1$ auf $0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ die EA von $20,1$ auf $45,5 \%$ erhöht werden, wohingegen bei $pH_E = 7,0$ und einer niedrigen c_{NaCl} von $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bereits eine EA von $36,3 \%$ erzielt werden kann. Jedoch führt auch bei dieser pH-Einstellung eine Erhöhung der Salzzugabe auf $0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu einer signifikant größeren EA von $47,3 \%$. Vergleicht man nun den Einfluss von pH_E auf die EA bei verschiedenen Temperaturen (Bild 5.2b), so zeigt sich, dass EA bei $T_E = 50^\circ\text{C}$ stets signifikant größer ist, als bei niedrigeren Temperaturen ($T_E = 10^\circ\text{C}$). So ist eine Steigerung der EA von $25,5$ auf $38,2 \%$ ($pH_E = 5,5$) sowie von $30,0$ auf $55,1 \%$ ($pH_E = 7,0$) möglich, wenn T_E von 10 auf 50°C steigt.

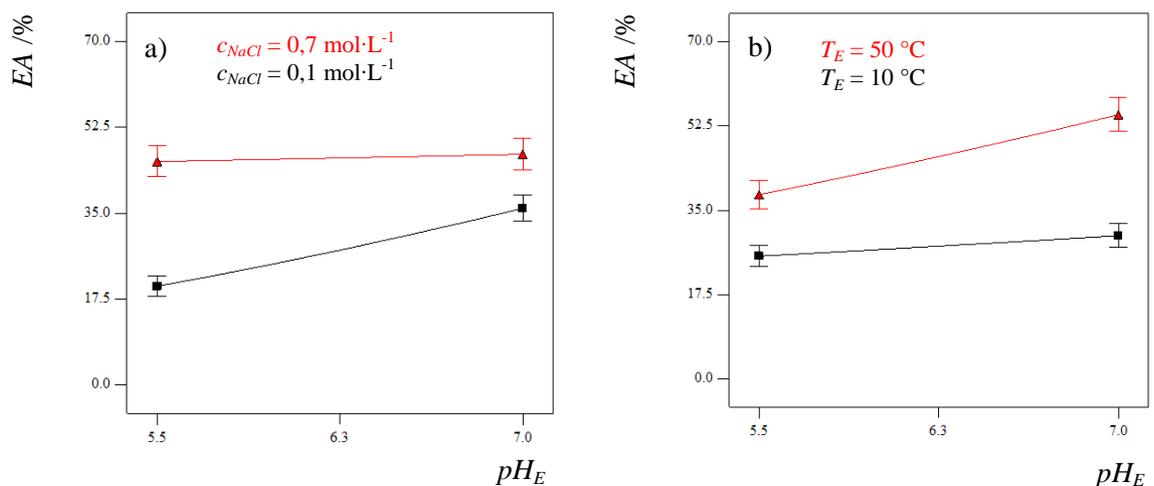


Bild 5.2: Signifikante Wechselwirkungen zweier Faktoren (2FWW) auf die Zielgröße EA. Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit $RSV = 0,11 = 1:9$; $T_E = 30,0^\circ\text{C}$; $t_E = 80,0 \text{ min}$; $EWV = 0,6 = 1:1,6$; $\Delta T = 10,0$; $pH_F = 6,3$; $t_Z = 35,0 \text{ min}$; $t_S = 600,0 \text{ min}$, $pH_E = 6,3$ und $c_{NaCl} = 0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.1.2.2 Signifikante Effekte durch 2FWW in Bezug auf PGA

Im Gegensatz zur EA hängt die PGA von deutlich mehr Faktoren und deren Wechselwirkungen ab (Gl. (5.2)).

Bild 5.3a) stellt die Zielgröße PGA in Abhängigkeit von den Faktoren pH_E und RSV dar. Bei $pH_E = 5,5$ hat es keinen wirklich relevanten Einfluss auf die PGA, ob $RSV = 1:7$ oder

$RSV = 1:13$. Hingegen ist bei $pH_E = 7,0$ mit einem Verhältnis von $1:7$ eine signifikant höhere PGA von $8,4\%$ zu erzielen, als bei $RSV = 1:13$ mit $PGA = 2,7\%$.

Ähnlich zeigt sich der Effekt von c_{NaCl} innerhalb der 2FWW mit pH_E in Bezug auf die jeweilige PGA (Bild 5.3b)). Während bei $pH_E = 5,5$ kein Unterschied zwischen $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ oder $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu identifizieren ist, zeigen sich signifikante Unterschiede bei $pH_E = 7,0$. Die PGA ist mit $7,5\%$ bei $pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ um $4,2\%$ größer als die PGA bei $pH_E = 5,5$ und $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Bild 5.3c) stellt die Zielgröße PGA in Abhängigkeit von pH_E und T_E dar. Hierbei zeigen sich ähnliche Abhängigkeiten wie bei der EA (Bild 5.2b). Allerdings sind die Unterschiede bei niedrigerem pH-Wert etwas geringer. Bei $pH_E = 7,0$ kann erneut durch eine höhere Temperatur (50 °C) eine signifikant höhere PGA von $10,3\%$ erzielt werden als bei niedrigerer Temperatur von 10 °C ($PGA = 1,8\%$).

Neben der Extraktionstemperatur erscheint laut der Regressionsgleichung auch die Temperaturdifferenz ΔT zwischen Extraktions- und Verdünnungsmedium von großer Bedeutung - insbesondere deren Wechselwirkung mit den pH-Wert des Extraktionsmittels (Bild 5.3d)). Bei $pH_E = 5,5$ ist die ΔT irrelevant für die PGA , wohingegen signifikante Unterschiede bei $pH_E = 7,0$ gemessen wurden. Bei einer Temperaturdifferenz von 20 K , d. h. das Extrakt hatte eine Temperatur von $\sim 25\text{ °C}$ und das zugegebene Wasser war $\sim 1\text{ °C}$ kalt, war um eine $2,7\%$ höhere PGA als bei $\Delta T = 0\text{ K}$ (d. h. Extrakt und Wasser eine Temperatur von $\sim 25\text{ °C}$). Um ein Vielfaches mehr kann die PGA allerdings durch eine geschickte Kombination aus dem pH-Wert des Extraktionsmediums (pH_E) sowie des Fällungsmediums (pH_F) gesteigert werden (Bild 5.3e)). Zeigen sich bei einem pH_E von $5,5$ keine signifikanten Unterschiede, werden bei $pH_E = 7,0$ die PGA von $1,3\%$ signifikant auf $11,5\%$ ($pH_F = 5,5$) erhöht.

Die letzte 2FWW (RSV und c_{NaCl}) in Bezug auf die Zielgröße PGA ist in Bild 5.3f) gezeigt. Bei einem hohen RSV von $1:13$ ist eine niedrigere c_{NaCl} von $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ von signifikantem Vorteil ($PGA = 3,3\%$) im Vergleich zu $0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($PGA = 1,5\%$), wohingegen bei $RSV = 1:7$ kein Unterschied festzustellen ist.

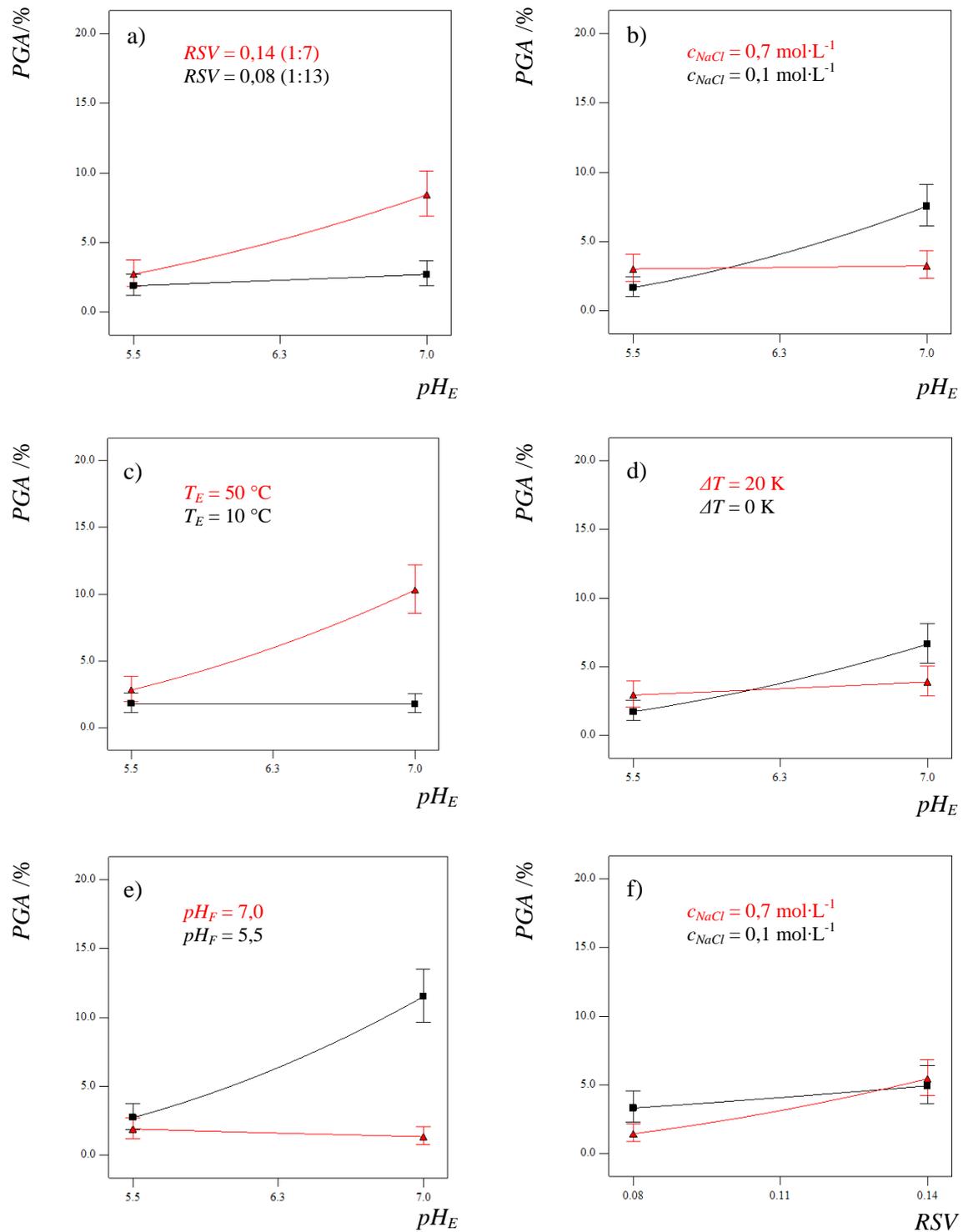


Bild 5.3: Signifikante Wechselwirkungen zweier Faktoren (2FWW) auf die Zielgröße PGA . Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit $RSV = 0,11 = 1:9$; $T_E = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_E = 80,0 \text{ min}$; $EWV = 0,6 = 1:1,6$; $\Delta T = 10,0$; $pH_F = 6,3$; $t_Z = 35,0 \text{ min}$; $t_S = 600,0 \text{ min}$, $pH_E = 6,3$ und $c_{NaCl} = 0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.1.2.3 Signifikante Effekte durch 2FWW in Bezug auf *visTex*

Mit Ausnahme der Extraktions- und Sedimentationszeit sowie dem *EWV* während der Fällung, welches nur aus hierarchischen Gründen aufgeführt wurde, haben alle untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die *visTex* (Tabelle 5.2). Dabei wurden vier Parameter in WW untereinander und die Faktoren T_E , pH_F , ΔT und t_Z mit signifikantem Einfluss identifiziert. In Bild 5.4 ist die *visTex* in Abhängigkeit von den verschiedenen 2FWW dargestellt, z. B. in Bild 5.4a) die FWW zwischen pH_E und *RSV*. Sowohl bei $pH_E = 5,5$ als auch bei $pH_E = 7,0$ ist die Qualität des Isolats besser, wenn $RSV = 1:7$ (Note = 1 - 2) als bei $RSV = 1:13$ (Note = 2 - 3). Ferner führt eine niedrige c_{NaCl} bei $pH_E = 5,5$ zu einer deutlich schlechteren Isolatqualität (Note = 3) als $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Bild 5.4b)), wohingegen keine Qualitätsunterschiede bei höherem pH-Wert ($pH_E = 7,0$) beobachtet werden konnten. Allerdings lag die Isolatqualität bei $pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ unterhalb derer bei $pH_E = 5,5$ (Note = 2). In Bild 5.4c) wird der signifikante Einfluss der 2FWW zwischen pH_E und *EWV* gezeigt. Deutlich ist, dass die Isolatqualität bei $pH_E = 7,0$ tendenziell besser bewertet wurde.

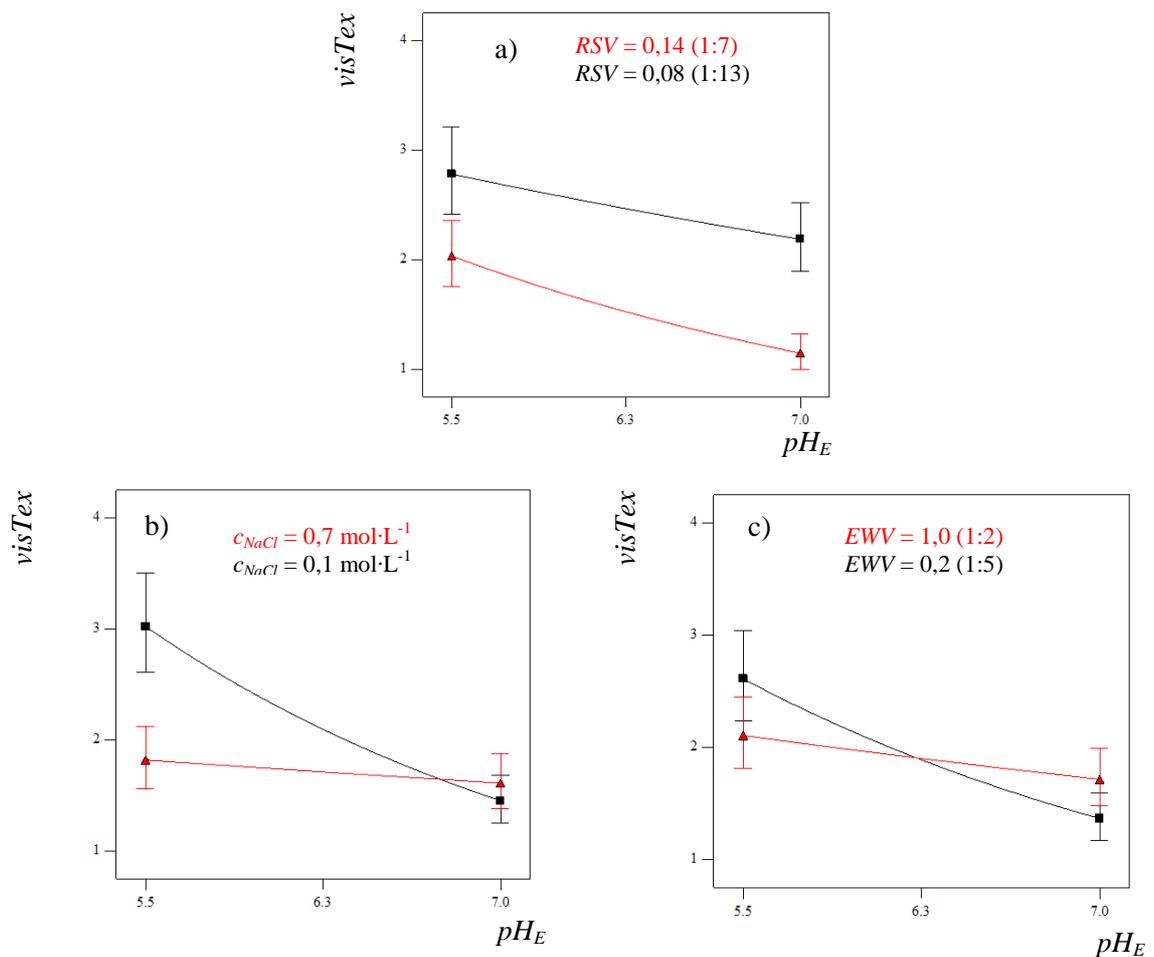


Bild 5.4: Signifikante Wechselwirkungen zweier Faktoren (2FWW) auf die Zielgröße *visTex*. Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit $RSV = 0,11 = 1:9$; $T_E = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_E = 80,0 \text{ min}$; $EWV = 0,6 = 1:1,6$; $\Delta T = 10,0$; $pH_F = 6,3$; $t_Z = 35,0 \text{ min}$; $t_S = 600,0 \text{ min}$, $pH_E = 6,3$ und $c_{NaCl} = 0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.2 Rohstoff-Auswahl

Der für *Lupinus angustifolius* L. standardisierte Prozess wurde auf weitere Körnerleguminosen (Soja, Erbse, Ackerbohne, Linse und weiße Bohne) angewandt, um dessen Übertragbarkeit auf andere Rohstoffe zu prüfen (Tabelle 4.1). Zusätzlich zu den weiteren Rohwaren wurden vollfette und entölte Lupinenflocken mit in die Versuchsreihe aufgenommen. Um den Prozess für jeden einzelnen Rohstoff anzupassen, wurden simultan drei Extraktionsparameter (pH_E , c_{NaCl} und RSV) variiert. Die Auswirkungen auf EA und PGA sowie auf die Qualität der Isolattextur (*visTex* siehe Kapitel 4.4.3) wurden mit Hilfe eines D-optimalen Versuchsplans untersucht (Tabelle 9.5 im Anhang). Ziel war es, weitere

Leguminosen für die Gewinnung des fettähnlichen Proteinisolats in ausreichender Menge zu finden.

Die chemische Zusammensetzung der verwendeten Rohstoffe wurde ermittelt, welche in Tabelle 5.3 aufgeführt sind. Es zeigte sich, dass der Proteingehalt der Körnerleguminosen zwischen 20,5 und 56,5 % variiert, wobei Erbse, Linse, Acker- und weiße Bohne Proteingehalte im Bereich von 20,5 und 27,7 %, Soja und die unterschiedlich vorbehandelten Lupinen im Bereich von 40,1 bis 56,5 % aufweisen.

Tabelle 5.3: Ergebnisse der chemischen Analyse der vorbehandelten Rohstoffe. Die Werte für den Protein-, Fett- und Aschegehalt beziehen sich auf die jeweilige Trockensubstanz (TS).

Verwendeter Rohstoff	Proteingehalt (N x 5,7) / %	Fettgehalt / %	Aschegehalt / %	TS / %
Entöltes Sojabohnenmehl (<i>Glycine max</i> L.)	56,5	1,4	6,4	93,8
Erbsenschrot (<i>Pisum sativum</i> L. cv. Attika)	20,5	2,5	2,7	87,3
Ackerbohnschrot (<i>Vicia faba</i> L.)	27,8	2,0	3,4	86,4
Entölte Lupinenflocken (<i>L. angustifolius</i> L. cv. Vitabor)	43,8	1,1	4,0	89,0
Vollfette Lupinenflocken (<i>L. angustifolius</i> L. cv. Vitabor)	40,2	9,6	4,2	85,7
Linsenschrot (<i>Lens culinaris</i> L.)	27,7	2,1	2,8	89,6
Mehl der weißen Bohne (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	26,5	2,0	3,7	89,6

Die Masse m , TS und der Proteingehalt c_p aller anfallenden Extrakte und Isolate wurden ermittelt, um letztlich die Zielgrößen EA (Gl. (4.2)) und PGA (Gl. (4.5)) zu berechnen (Tabelle 5.4). Danach wurde für die beiden Zielgrößen EA und PGA ein quadratisches Regressionsmodell (gemäß der Gl. (4.6)) generiert, welches alle untersuchten Faktoren (Rohstoff, c_{NaCl} , pH_E und RSV) und deren Wechselwirkung enthält. Die Interpretation des

Modells sowie der enthaltenen Regressionskoeffizienten β_{ij} ist allerdings äußerst schwierig und eine grafische Darstellung kaum möglich. Deshalb wurde zusätzlich für jeden einzelnen Rohstoff eine quadratische Funktion gemäß Gl. (4.7) der numerischen Faktoren je Zielgröße y_i gebildet (Gl. (5.4) und (5.5)).

Tabelle 5.4: Analytikwerte sowie Zielgrößen bei unterschiedlichen Faktorstufen-Kombinationen nach einem D-optimalen Versuchsplan zum Rohstoffvergleich

Ergebnisse der Analysen und Zielgrößen									
RUN ¹	Rohstoff	m_{Extrakt} /g	TS_{Extrakt} /%	$c_{P_{\text{Extrakt}}}$ /%	EA /%	m_{Isolat} /g	TS_{Isolat} /%	$c_{P_{\text{Isolat}}}$ bez. TS_{Isolat}	PGA /%
2	Ackerbohne	2585,5	7,4	1,0	44,2	20,5	10,0	46,3	1,6
4		2612,0	6,8	0,8	36,6	15,9	10,2	43,1	1,2
8		1193,1	4,5	3,0	58,8	32,2	23,7	92,0	11,7
20		2629,6	0,8	0,3	14,1	< 0,2	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
38		1147,5	9,0	2,4	45,4	25,1	16,8	77,2	5,5
44		1646,3	5,5	1,7	46,7	56,4	26,4	87,9	21,9
7	Erbse	2622,0	1,1	0,3	17,6	0,2	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
10		1862,4	3,7	1,2	51,1	28,8	28,7	92,2	17,0
13		2632,8	7,3	0,8	48,8	7,3	11,3	52,1	1,0
14		1057,5	8,9	1,8	42,7	10,3	18,0	81,9	3,4
22		1828,6	6,7	1,2	48,6	9,4	35,2	96,9	7,2
24		1135,2	3,9	2,3	59,0	21,2	16,4	79,5	6,2
11	Linse	1107,6	6,2	1,9	33,7	6,4	11,0	53,5	0,6
16		1128,8	2,2	0,7	12,6	0,3	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
28		2597,4	7,4	0,7	30,6	3,2	20,1	n. b. ²	n. b. ²
29		1125,5	8,8	1,5	27,9	6,3	8,3	60,2	0,5
30		2556,9	4,2	0,9	36,3	12,3	26,8	84,6	4,5
37		2638,8	2,1	1,2	49,3	20,5	13,0	80,7	3,5
5	Entölte Lupine	1438,0	10,6	3,6	52,8	1,5	16,0	n. b. ²	n. b. ²
18		1028,6	7,1	4,4	46,0	16,8	44,7	96,2	7,4
27		2457,7	8,7	2,2	56,2	8,3	42,4	98,3	3,6
31		1459,7	3,1	0,8	12,6	1,3	12,3	n. b. ²	n. b. ²
34		949,3	12,7	4,7	46,1	30,1	42,3	98,1	12,8
36		2480,7	2,3	1,1	27,5	19,9	29,8	80,0	4,9
15	Vollfette Lupine	2546,3	8,6	1,9	55,3	2,3	28,1	n. b. ²	n. b. ²
19		1059,0	11,4	4,2	51,3	2,6	21,7	n. b. ²	n. b. ²
23		2579,4	2,7	1,4	41,9	10,3	37,1	80,9	3,6
32		1036,1	4,8	2,1	25,0	12,3	48,2	87,7	6,0
35		1784,5	5,3	2,3	47,0	43,2	52,8	98,3	26,0
42		1001,5	12,1	4,2	49,3	30,5	46,3	95,5	15,7
1	Entölte Sojabohne	828,5	14,5	6,3	39,2	6,6	18,3	64,2	0,6
3		2579,2	9,7	3,0	58,8	47,8	7,5	91,6	12,7
6		2491,3	4,8	3,1	59,1	1,0	16,6	n. b. ²	n. b. ²

Ergebnisse der Analysen und Zielgrößen

RUN ¹	Rohstoff	m_{Extrakt}	TS _{Extrakt}	$c_{P_{\text{Extrakt}}}$	EA	m_{Isolat}	TS _{Isolat}	$c_{P_{\text{Isolat}}}$ bez.	PGA
		/g	/%	/%	/%	/g	/%	TS _{Isolat}	/%
12		2482,7	4,9	3,3	61,3	< 0,2	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
21		801,3	4,2	1,6	9,7	< 0,2	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
26		931,2	14,8	6,7	46,8	3,8	16,0	n. b. ²	n. b. ²
33		2498,8	10,2	3,0	56,6	30,8	29,9	89,1	6,2
40		900,0	5,6	1,9	12,7	2,5	27,2	n. b. ²	n. b. ²
9		2588,8	4,7	0,9	38,0	2,6	13,2	n. b. ²	n. b. ²
17		1590,1	3,0	1,5	40,7	8,2	13,0	61,6	1,1
25	Weiß	1080,1	6,5	2,1	38,2	3,6	10,7	n. b. ²	n. b. ²
39	Bohne	1560,8	8,3	1,3	32,9	< 0,2	n. b. ²	n. b. ²	n. b. ²
41		2493,8	1,2	0,4	17,2	2,3	12,7	n. b. ²	n. b. ²
43		1092,6	9,0	1,7	30,6	3,2	10,7	n. b. ²	n. b. ²

¹RUN: Versuchsnummer; ²n. b.: Aufgrund der zu geringen Isolatmenge (m_{Isolat}) konnten einige Werte nicht analysiert werden

5.2.1 EA bei unterschiedlichen Rohstoffe

Für EA wurden sieben Regressionsgleichungen (gemäß Gl. 4.7 für jeden einzelnen Rohstoff) ermittelt, wobei EA - unabhängig von dem gewählten Rohstoff - stets signifikant von c_{NaCl} , pH_E und RSV sowie von der 2FWW zwischen pH_E und c_{NaCl} sowie dem pH-Wert zum Quadrat pH_E^2 beeinflusst wurde ($p < 0,01$). Die Modelle für EA entsprechen der Regressionsfunktion (Gl. (5.4)), wobei die sich je Rohstoff verändernden Regressionskoeffizienten β_{ij} sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 in Tabelle 5.5 aufgeführt sind.

$$EA = \beta_0 + 18,90 pH_E + \beta_{c_{\text{NaCl}}} \cdot c_{\text{NaCl}} + \beta_{\text{RSV}} \cdot \text{RSV} - 17,91 pH_E \cdot c_{\text{NaCl}} - 34,31 c_{\text{NaCl}}^2 \quad (5.4)$$

In Tabelle 5.5 schwankt β_0 abhängig von dem gewählten Rohstoff von -90,09 (Ackerbohne) bis -42,74 (Soja), $\beta_{c_{\text{NaCl}}}$ zwischen 136,40 für die weiße Bohne und 161,32 für die vollfette Lupine. β_{RSV} nimmt sowohl positive als auch negative Werte von -263,03 bei der Soja bis +151,45 bei der Ackerbohne an (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5 Regressionskoeffizienten der signifikante Faktoren für die Regressionsmodelle der Zielgrößen *EA* (Gl. (5.4)) und *PGA* (Gl. (5.5)).

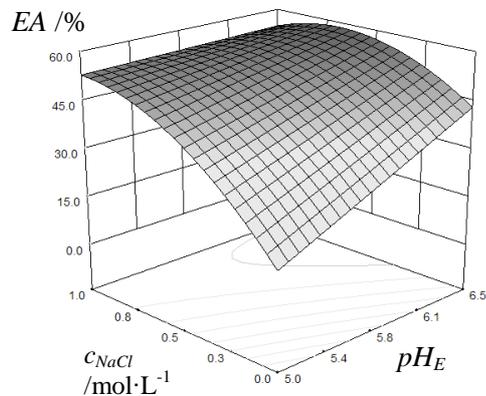
Zielgröße	Koeffizient	Entölte Lupine	Vollfette Lupine	Ackerbohne	Weißbohne	Erbse	Soja	Linse
	R^2	0,91	0,96	0,96	0,98	0,96	0,87	0,95
	R^2_{adj}	0,90	0,96	0,96	0,98	0,96	0,86	0,95
<i>EA</i>	β_0	-75,22	-68,79	-90,09	-90,07	-76,85	-42,74	-63,71
	$\beta_{c_{NaCl}}$	+160,55	+161,32	+144,60	+136,40	+144,96	+151,91	+135,21
	β_{RSV}	-41,48	-88,89	+151,45	+103,48	+57,16	-263,03	-132,16
	R^2	0,76	0,96	0,77	0,86	0,77	0,80	0,71
	R^2_{adj}	0,75	0,96	0,76	0,85	0,76	0,79	0,69
$\ln(PGA + 0,26)$	β_0	-5,65	+6,86	-14,21	-9,58	-13,89	+2,20	-4,04
	β_{pH_E}	+1,36	-0,61	+2,85	+1,71	+2,75	-0,38	+0,92
	$\beta_{c_{NaCl}}$	+16,08	+14,18	+16,77	+15,38	+16,88	+18,41	+16,20

Die Regressionsmodelle für *EA* (Gl. (5.4)) wurde für einige Rohstoffe exemplarisch als Wirkungsflächendiagramme dargestellt (Bild 5.5). Gezeigt ist die Veränderung von *EA* bei variierenden pH_E und c_{NaCl} sowie konstantem *RSV* von 1:9 für die vollfette Lupine, Soja, Linse und Erbse. Die Wirkungsdiagramme der anderen Rohstoffe sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit nicht explizit dargestellt, sondern sind in Klammern beim jeweiligen Äquivalent angegeben. So ähneln sich die vollfette und entölte Lupine (Bild 5.5a)), weiße Bohne und Linse (Bild 5.5c)) sowie die Ackerbohne und Erbse (Bild 5.5d)).

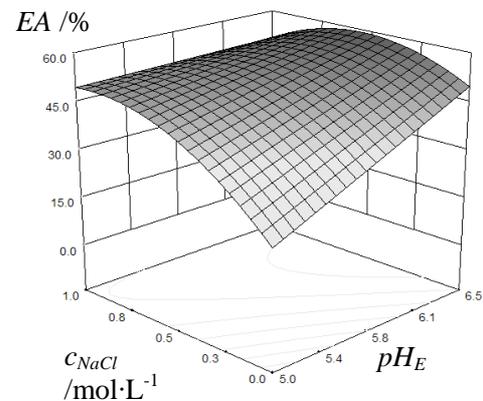
Unabhängig von der Leguminosenart erreicht *EA* stets ein Minimum bei $pH_E = 5,0$ und $c_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, wobei *EA* durch Salzzugabe oder alternativ mittels pH_E -Erhöhung gesteigert werden kann. Bei $c_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ wird durch pH_E -Zunahme von 5,0 auf 6,5 eine Steigerung der *EA* von 14,9 auf 43,2 % für die vollfette Lupine (Bild 5.5a)), von 14,6 auf 42,8 % für die entölte Lupine, sowie von 21,5 auf 49,8 % für die Soja (Bild 5.5b))

erzielt. Ähnlich wie die genannten lipidbasierten Leguminosen verhielten sich auch die stärkebasierten Saaten bei $pH_E = 5,0$ und $c_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Eine Zunahme der EA war zu verzeichnen von 15,6 auf 43,9 % bei der Linse (Bild 5.5c)), von 16,0 auf 44,2 % für die weiße Bohne, von 24,2 auf 52,5 % bei der Erbse (Bild 5.5d)) und von 22,3 zu 50,5 % bei der Ackerbohne. Alternativ konnte EA bei $pH_E = 5,0$ mittels NaCl-Zugabe gesteigert werden (Bild 5.5a)-d)). Allerdings ist insbesondere bei höheren pH_E -Werten zu beobachten, dass EA nach Erreichung eines Maximums mit Erhöhung von c_{NaCl} wieder sinkt. Beispielsweise steigt EA bei Verwendung der Erbse und einem pH_E von 6,0 und $c_{NaCl} = 0,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ von 43,2 % auf 53,1 % bei $c_{NaCl} = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und sinkt auf 48,9 % bei $c_{NaCl} = 0,9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Dieser Effekt konnte bei allen Rohstoffen beobachtet werden.

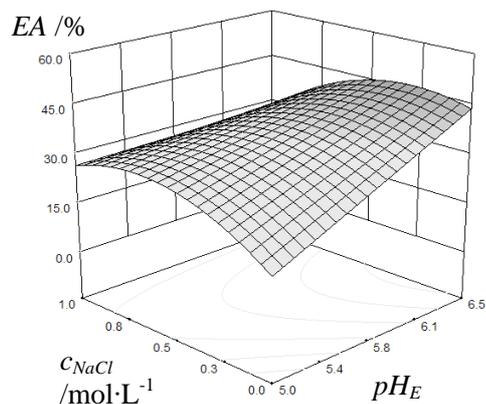
a) vollfette Lupine (entölte Lupine)



b) Soja



c) Linse (weiße Bohne)



d) Erbse (Ackerbohne)

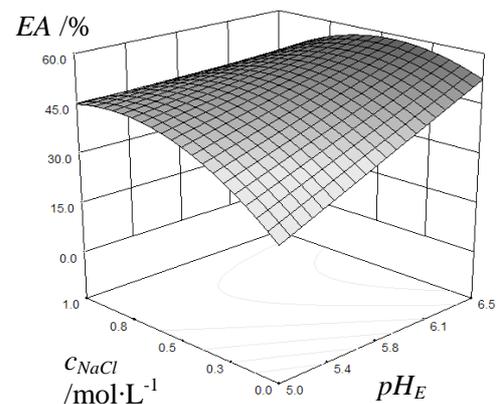


Bild 5.5: Extraktionsausbeute (EA) in % bei variierenden pH_E und c_{NaCl} sowie konstantem RSV von 1:9. Die in Klammern angegebenen Saaten sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum gezeigten Diagramm nicht mit eigenem Wirkungsdiagramm explizit dargestellt.

5.2.2 PGA bei unterschiedlichen Rohstoffe

Anders als bei EA wurde zur besseren Anpassung an die Normalverteilung die ermittelten Werte für PGA zunächst einer Transformation mit dem natürlichen Logarithmus unterzogen, wobei zusätzlich eine Konstante $k = 0,26$ eingefügt wurde. Es konnte sowohl ein Regressionsmodell mit allen untersuchten Faktoren (Rohstoff, c_{NaCl} , pH_E und RSV) als auch sieben einzelne Modelle in Bezug auf die eingesetzten Rohstoffe generiert werden. Auch hier wurde Letzteres für eine bessere Darstellung und Interpretation der Ergebnisse gewählt. Im Gegensatz zu EA wurden die Effekte auf PGA durch c_{NaCl} , pH_E und RSV mittels ANOVA als nicht signifikant eingestuft. Lediglich die 2FWW zwischen pH_E und

c_{NaCl} sowie c_{NaCl} und RSV als auch der quadratische Term c_{NaCl}^2 zeigen signifikanten Einfluss auf PGA . In Gl. (5.5) ist die Regressionsfunktion dargestellt, wobei die linearen Terme der Faktoren aus hierarchischen Gründen einfließen.

$$\ln(PGA + 0,26) = \beta_0 + \beta_{pH_E} \cdot pH_E + \beta_{c_{NaCl}} \cdot c_{NaCl} - 12,13RSV - 2,68pH_E \cdot c_{NaCl} + 31,16c_{NaCl} \cdot RSV - 4,50c_{NaCl}^2 \quad (5.5)$$

Die je Rohstoff variierende Regressionskoeffizienten β_0 , β_{pH_E} und $\beta_{c_{NaCl}}$ sowie die Bestimmtheitsmaße R^2 und R_{adj}^2 sind in Tabelle 5.5 zusammengestellt. β_0 schwankt abhängig von dem gewählten Rohstoff in einem Bereich von -14,21 bei Ackerbohne bis 6,86 bei der vollfetten Lupine, β_{pH_E} zwischen -0,61 für die vollfette Lupine und 2,85 bei der Ackerbohne und $\beta_{c_{NaCl}}$ schwankt im ausschließlich positiven Wertebereich von 14,18 bei der vollfetten Lupine und 18,41 bei der Soja (Tabelle 5.5).

Die grafische Darstellung der PGA erfolgt als Konturplot beispielhaft für Ackerbohne und vollfette Lupine bei variierenden pH_E und c_{NaCl} sowie konstantem RSV (Bild 5.6a) - b)). Die Konturplots aller weiteren Leguminosen sind im Anhang zu finden (Bild 9.1 im Anhang).

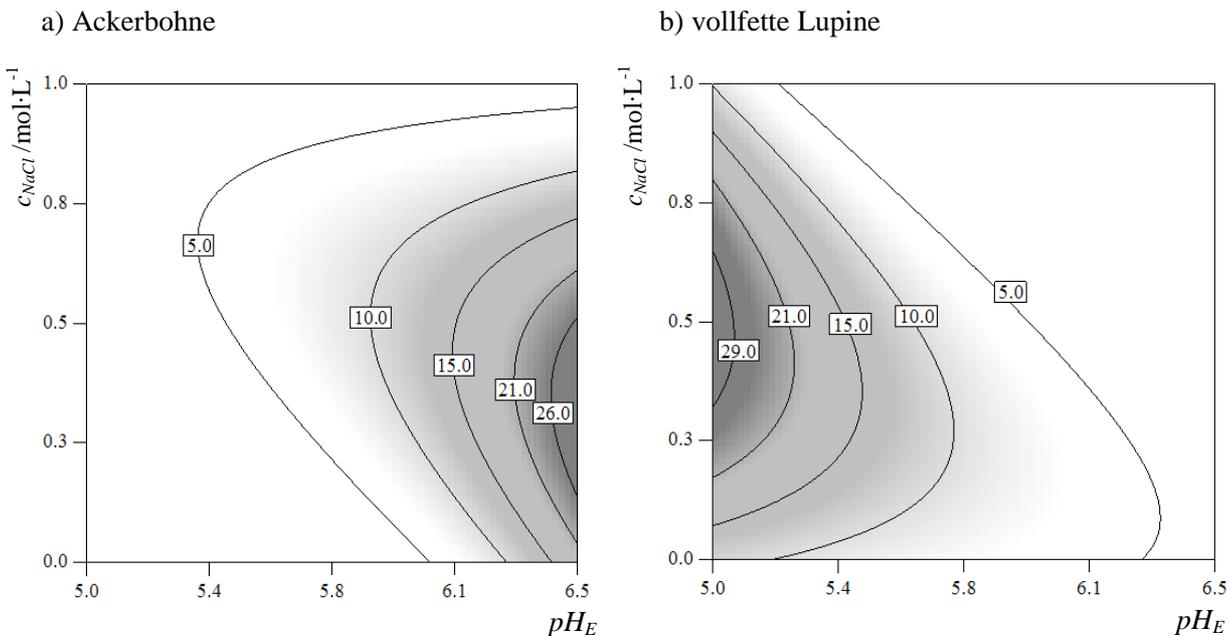


Bild 5.6: Konturplots der Proteingesamtausbeute (PGA) in % (Isolinien im Diagramm) bei variierenden pH_E und c_{NaCl} sowie konstantem RSV von a) 0,08 (1:13) für die Ackerbohne und b) 0,14 (1:7) für die vollfette Lupinenflocken

Die Konturplots für Ackerbohne und vollfette Lupine zeigen deutlich den Unterschied der beiden Saaten in Bezug auf die *PGA*. Während bei der Ackerbohne ein hoher pH-Wert ($pH_E = 6,5$) zur Maximierung der Proteinausbeute angewendet werden sollte ($PGA = 26,0\%$ bei $c_{NaCl} = 0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), zeigt die Lupine bei gleicher Salzkonzentration die höchste Ausbeute ($PGA = 29,0\%$) bei $pH_E = 5,0$.

5.2.3 Validierung der gewählten Modelle

Die generierten Modelle zeigten eine gute Anpassung an die hierfür experimentell erfassten Daten. Inwieweit auf Grundlage dieser Modelle Vorhersagen für *EA* und *PGA* getroffen werden können, wurde mit Hilfe einer weiteren Versuchsreihe (Tabelle 5.6) untersucht. Es wurden beliebige Einstellungen der Extraktionsparameter im untersuchten Bereich gewählt und die experimentell ermittelten Werte für *EA* und *PGA* mit dem durch das jeweilige Modell vorhergesagten Werte verglichen (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6: Vergleich der experimentell und auf Grundlage der Modelle (Gl. (5.4) und (5.5)) berechneten Werte für *PGA* und *EA* in % bei unterschiedlichen Einstellungen der Extraktionsparameter im untersuchten Bereich zur Validierung der Modelle

Faktorstufen				<i>EA</i> /%		<i>PGA</i> /%		
	Rohstoff	pH_E	c_{NaCl} /mol·L ⁻¹	<i>RSV</i>	Vorher. ¹	Exp. ²	Vorher. ¹	Exp. ²
Ackerbohne		6,3	0,7	1:7	57,2	47,3	18,6	6,4
Linse		5,9	0,1	1:13	39,9	30,6	1,7	9,3
Vollfette Lupine		5,3	0,6	1:10	44,9	59,8	18,8	25,4
Entölte Lupine		5,6	0,7	1:7	49,5	58,4	5,9	15,8
Weißer Bohne		6,0	0,3	1:10	41,5	37,9	0,5	0,9
Erbse		6,4	0,6	1:7	58,6	40,0	18,1	6,9
Soja		5,0	1,0	1:7	40,4	42,1	39,8	8,0

¹Vorhergesagter bzw. berechneter und ²experimentell ermittelter Wert

Die Versuchswerte wichen mit Ausnahme der Soja in Bezug auf *EA* sowie für die weiße Bohne in Bezug auf *PGA* und *EA* deutlich von den vorhergesagten Werten ab. So wurde für die Soja bei $pH_E = 5,0$, $c_{NaCl} = 1,0$ und $RSV = 1:7$ eine *EA* von 40,4 % berechnet und 42,1 % experimentell ermittelt, wohingegen für die vollfette Lupine für bei $pH_E = 5,3$, $c_{NaCl} = 0,6$ und $RSV = 1:10$ eine *EA* von 44,9 % vorhergesagt und 59,8 % erzielt. Dennoch lagen alle experimentell ermittelten Werte innerhalb des 99 %-igen Vertrauensbereich des jeweiligen Modells.

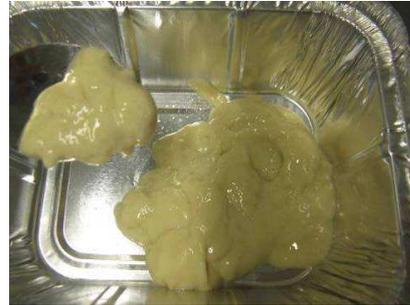
5.2.4 Isolatqualität unterschiedlicher Körnerleguminosen

Neben einer großen Ausbeute ist die Qualität der Proteinisolate für einen späteren Einsatz als Fettersatzstoff von entscheidender Bedeutung. Deswegen wurde im Rahmen der Versuchsreihe zur Validierung der Modelle (Kapitel 5.2.3) die Textur der erhaltenen Proteinisolate anhand des Bewertungsschemas (Tabelle 4.5) benotet. In Bild 5.7a) - f) sind die Proteinisolate der untersuchten Körnerleguminosen abgebildet, welche die qualitativ beste Bewertung erhielten. Dabei konnten lediglich die Proteinisolate der vollfetten und entölten Lupine mit einer 1 bewertet werden, während alle anderen die Note 3 oder im Falle der weißen Bohne die Note 4 erreichten.

a) Soja



b) Erbse



c) entölte Lupine



d) vollfette Lupine



e) Ackerbohne



f) Linse



g) weiße Bohne

**Bild 5.7:** Proteinisolate aus unterschiedlichen Körnerleguminosen

5.3 Finale Prozessoptimierung

Aufgrund der Ergebnisse des Rohstoffvergleichs (Kapitel 5.2) wurden die vollfetten Flocken der Saat *Lupinus angustifolius* L. für die finale Prozessoptimierung verwendet. Simultan wurden die Faktoren pH_E , c_{NaCl} , RSV , pH_F , EWV , t_S und t_Z variiert und die Auswirkungen auf EA und PGA sowie auf die Qualität der Isolattextur (*visTex*) mit Hilfe eines FC-CCD (Bild 4.2) untersucht. Der Versuchsplan bzw. die Faktorstufenkombinationen der einzelnen Versuche sind im Anhang (Tabelle 9.6) aufgeführt. Die chemische Zusammensetzung der verwendeten Rohware wurde bereits in Kapitel 5.1 und 5.2 ermittelt (Tabelle 5.3). Die Masse m , TS und der Proteingehalt c_p aller anfallenden Extrakte und Isolate sowie die ermittelten Zielgrößen EA (Gl. (4.2)) und PGA (Gl. (4.5)) sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Analytikwerte sowie Zielgrößen bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen (Tabelle 9.6 im Anhang) nach einem FC-CCD zur finalen Prozessoptimierung

Ergebnisse der chemischen Analyse und Zielgrößen								
RUN ¹	m_{Extrakt} /g	TS _{Extrakt} /%	$c_{P_{\text{Extrakt}}}$ /%	EA /%	m_{Isolat} /g	TS _{Isolat} /%	$c_{P_{\text{Isolat}}}$ bez. TS _{Isolat}	PGA /%
1	833,8	6,3	3,1	29,5	26,4	51,4	97,6	15,4
2	2470,8	8,5	2,4	70,0	93,0	33,6	86,1	31,3
3	1401,6	9,0	4,2	68,8	101,0	34,0	87,9	35,0
4	889,0	9,1	5,8	60,2	91,4	42,6	94,1	42,5
5	1345,0	9,1	4,2	65,4	108,0	36,8	92,4	42,6
6	2302,6	2,6	1,1	30,2	27,8	46,6	91,8	13,8
7	755,5	6,8	3,1	26,8	24,2	44,7	92,5	11,6
8	1264,0	8,2	3,6	52,4	74,6	39,0	89,8	30,3
9	1419,3	8,4	4,0	66,3	97,6	36,7	93,6	38,9
10	1461,8	7,8	4,1	69,9	91,0	30,7	91,6	29,7
11	1440,2	10,4	4,1	68,2	50,1	27,5	81,2	13,0
12	1467,1	7,5	3,9	66,9	96,9	36,0	95,6	38,7
13	2430,5	8,8	2,7	77,3	50,2	25,2	79,8	11,7
14	2468,4	8,7	2,6	74,5	50,8	31,0	88,8	16,2
15	972,5	12,4	5,4	60,9	53,7	28,4	84,7	15,0
16	1423,0	8,3	3,9	64,3	83,3	29,8	88,6	25,5
17	2385,9	8,9	2,3	62,6	55,9	35,7	82,4	19,1
18	1470,8	8,4	3,8	64,4	105,3	32,9	91,1	36,7
19	2406,8	4,0	2,5	70,4	88,4	38,1	96,8	37,8
20	946,4	8,5	5,0	55,1	101,6	37,5	94,9	42,0
21	1372,0	8,9	4,0	63,6	91,6	34,1	92,1	33,4
22	813,9	13,4	5,2	49,0	12,3	21,0	51,7	1,5
23	975,8	8,0	5,5	62,4	106,1	33,1	92,5	37,8

Ergebnisse der chemischen Analyse und Zielgrößen

RUN ¹	m_{Extrakt}	TS _{Extrakt}	$C_{P_{\text{Extrakt}}}$	EA	m_{Isolat}	TS _{Isolat}	$C_{P_{\text{Isolat}}}$ bez.	PGA /%
	/g	/%	/%	/%	/g	/%	TS _{Isolat}	
24	2376,3	4,1	2,6	72,3	88,0	41,8	96,7	41,3
25	2319,4	3,0	1,3	33,9	22,5	48,3	98,7	12,5
26	1384,0	8,3	3,8	60,4	91,8	34,9	92,6	34,5
27	1429,5	6,0	3,5	58,8	90,0	45,2	95,8	45,2
28	2393,4	9,0	2,3	62,5	76,6	38,5	92,4	31,6
29	1539,6	7,8	3,4	61,5	84,0	39,1	89,1	34,0
30	842,7	12,1	4,7	46,2	37,9	36,3	86,8	13,8
31	1455,2	8,7	3,7	62,2	100,3	33,7	90,4	35,4
32	1391,1	9,0	3,7	59,8	93,7	35,2	91,5	35,0
33	2394,8	9,7	2,3	64,5	29,4	30,0	69,8	7,1
34	958,1	12,7	4,8	53,6	71,3	26,5	91,3	20,1
35	908,2	8,4	5,3	55,7	95,5	41,2	93,0	42,5
36	2437,6	4,1	2,4	68,2	109,3	45,0	96,6	55,1
37	2370,1	3,2	1,1	30,0	27,6	37,9	75,9	9,2
38	823,0	4,9	2,8	26,6	23,5	43,7	90,4	10,8
39	1466,3	8,5	3,6	61,6	97,9	35,8	92,3	37,7
40	2332,0	2,8	1,2	32,2	19,6	38,5	93,0	8,2
41	1003,5	8,0	5,0	58,4	92,2	47,5	95,5	48,5
42	2475,2	9,1	2,5	73,0	14,0	17,3	51,7	1,5
43	1444,3	8,2	3,7	62,9	103,3	33,8	91,7	37,2
44	876,6	13,1	5,1	51,7	70,2	30,4	84,2	20,9
45	939,1	12,6	5,1	55,1	11,7	18,7	64,0	1,6
46	834,3	12,3	4,8	46,7	69,7	37,9	92,9	28,5
47	1422,9	8,6	3,8	62,1	101,4	33,5	91,8	36,2
48	994,8	10,2	4,8	55,9	99,0	33,9	92,6	36,1
49	2387,0	8,6	2,2	62,1	22,7	31,0	72,3	5,9
50	2440,4	6,2	2,4	67,7	97,1	34,8	92,9	36,4

¹RUN: Versuchsnummer

5.3.1 EA bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen

Die Veränderung der EA bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen wurde mittels Regression modelliert (Gl. (5.6)). EA wurde signifikant ($p < 0,05$) von pH_E , RSV und c_{NaCl} , sowie von den 2FWW zwischen pH_E und c_{NaCl} als auch RSV und c_{NaCl} beeinflusst.

$$EA = 57,34 + 6,80x_{pH_E} - 5,04x_{RSV} + 3,79x_{c_{NaCl}} - 4,95x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} - 3,86x_{RSV}x_{c_{NaCl}} \quad (5.6)$$

Mit einer Konstanten β_0 von 57,34 und den dazu vergleichsweise kleinen Regressionskoeffizienten (zwischen $\beta_{RSV} = -5,04$ und $\beta_{pH_E} = 6,80$) kann bei den untersuchten Bedingungen stets davon ausgegangen werden, dass Proteine in Lösung gehen. Die linearen Terme in Gl. (5.6) zeigen, dass der pH-Wert während der Extraktion den, im Vergleich zu

anderen Faktoren, größten Effekt ($\beta_{pH_E} = 6,80$) auf EA ausübt. Die EA steigt bei $pH_E = 7,0$ (da $x_{pH_E} = 1$) somit um 6,8 %. Eine hohe Salzkonzentration ($c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und somit $x_{c_{NaCl}} = 1$) verbessert EA lediglich um 3,8 % (da $\beta_{c_{NaCl}} = 3,79$). Das Verhältnis von Rohstoff zur eingesetzten Salzlösungsmenge bewirkt durch das negative Vorzeichen des Regressionskoeffizienten ($\beta_{RSV} = -5,04$) in den meisten Fällen eine Verringerung der EA . Es sei denn, die Dezimalzahl der approximierten RSV wird minimiert, d. h. $RSV = 0,08$, somit ist $x_{c_{NaCl}} = -1$ und der Term $-5,04x_{RSV} = 5,04$. Da ein RSV von 0,08 ein tatsächliches Massenverhältnis von 1:13 bedeutet, muss das Verhältnis vom Rohstoff zur Salzlösung maximiert werden, um EA zu erhöhen. Allerdings befinden sich die genannten drei Faktoren (pH_E , RSV und c_{NaCl}) in 2FWW, weswegen eine Bewertung nur in Zusammenhang mit dem wechselwirkenden Faktor durchgeführt werden darf, welche in Bild 5.8 gezeigt sind. In Bild 5.8a) ist EA bei $pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mit $EA = 63,0 \%$ um $\sim 20 \%$ größer als bei $pH_E = 5,5$ und $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mit $EA = 41,8 \%$. Zudem wird deutlich, dass die Salzkonzentration bei hohem pH-Werten nicht größer als $0,8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gewählt werden sollte, da es zu einer Verringerung in EA führt, was durch das negative Vorzeichen des Regressionskoeffizienten ($\beta_{pH_E \cdot c_{NaCl}} = -4,95$) im Modell (5.6) berücksichtigt ist. In Bild 5.8b) wird wiederum eine hohe Salzkonzentration bevorzugt ($c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), wobei mit einem RSV von 0,08 bzw. 1:13 eine höhere EA von 70,0 % erzielt werden kann als bei $RSV = 0,14 = 1:7$ ($EA \approx 52,5 \%$). Die optimale Salzkonzentration ist abhängig von der jeweiligen Zielstellung und wird in Kapitel 5.3.6 ermittelt.

Allerdings wurde für das Modell in Gleichung (5.6) mit $R^2 = 0,45$, $R_{adj}^2 = 0,39$ und $R_{pred}^2 = 0,27$ kleine Bestimmtheitsmaße ermittelt. Die mathematische Anpassung an die ermittelten Daten ist somit fehlerhaft und die Prognose der Ergebnisse bei bestimmten Parametereinstellungen eventuell schwierig und muss überprüft werden (Kapitel 5.3.4).

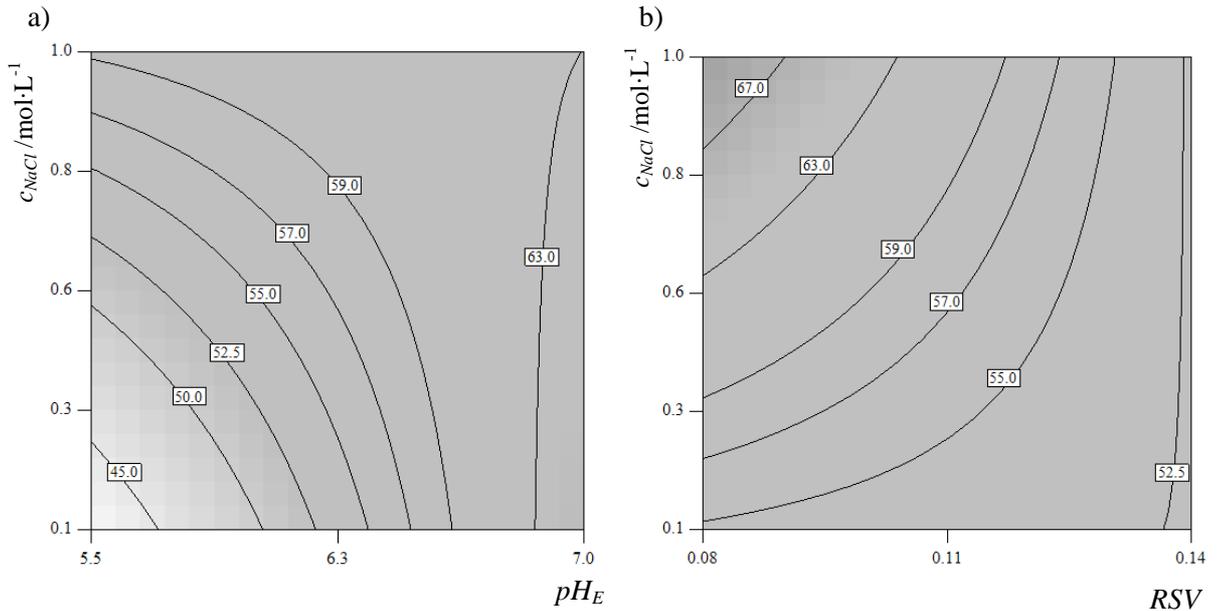


Bild 5.8: Konturplots der Extraktionsausbeute (EA) in % (Isolinien im Diagramm) bei variierenden c_{NaCl} und pH_E und konstantem RSV von 0,11 bzw. 1:9 (a) sowie in Abhängigkeit von der 2FWW c_{NaCl} und RSV und konstantem pH_E von 6,3 (b).

5.3.2 PGA bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen

Die PGA ist abhängig von den Faktoren pH_E , RSV , c_{NaCl} , t_Z , pH_F , t_S und EWV , die alle entweder in einer 2FWW oder quadratischen Term ($x_{t_S}^2$) in Gl. (5.7) aufgeführt sind. Im Vergleich zu EA (Gl. (5.6)) wird die PGA von deutlich mehr Faktoren und FWW beeinflusst.

$$\begin{aligned} \sqrt{PGA} = & 5,69 + 0,54x_{pH_E} - 0,017x_{RSV} - 0,71x_{c_{NaCl}} + 0,29x_{t_Z} - 0,51x_{pH_F} + 0,34x_{t_S} \\ & - 0,34x_{EWV} - 0,90x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} - 0,32x_{RSV}x_{t_Z} \\ & - 0,57x_{c_{NaCl}}x_{pH_F} - 0,77x_{c_{NaCl}}x_{EWV} - 1,30x_{t_S}^2 \end{aligned} \quad (5.7)$$

mit $R^2 = 0,83$, $R_{adj}^2 = 0,78$ und $R_{pred}^2 = 0,69$ und einem signifikanten LOF .

Der Faktor x_{pH_E} hat im Vergleich zu den anderen linearen Termen nicht nur den größten Einfluss auf EA (Gl. (5.6)) sondern auch auf PGA in Gleichung (5.7) mit $\beta_{pH_E} = 0,54$. Das bestätigt somit den wesentlichen Effekt oder Beitrag des pH-Wertes während der Extraktion, welcher wieder in einer 2FWW mit c_{NaCl} auftaucht. Der Zusammenhang dieser beiden Einflussgrößen und deren Auswirkung auf PGA ist in Bild 5.9a) dargestellt. Während eine Erhöhung der Salzkonzentration im untersuchten Bereich vergleichsweise wenig zur Steigerung der PGA beitragen kann und sich bei hohem pH-Wert sogar

verschlechternd auswirkt ($PGA = 21,4 \%$ bei $pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ anstelle von $PGA = 28,6 \%$ bei $pH_E = 5,5$ und $c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), kann mit Steigerung des pH-Werts die maximale PGA von $61,5\%$ bei $pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt werden.

In Bild 5.9b) ist die 2FWW $x_{c_{NaCl}} \cdot x_{pH_F}$ aus Gleichung (5.5) dargestellt. Hier führt eine niedrigere Salzkonzentration $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sogar (im Unterschied zu Bild 5.9a)) über den gesamten pH-Bereich ($pH_F = 5,0 - 5,9$) zu einer höheren PGA ($40,2 \%$ - $41,7 \%$) als höhere Salzkonzentrationen. Beispielsweise variiert PGA bei $c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zwischen $15,3 \%$ und $36,7 \%$.

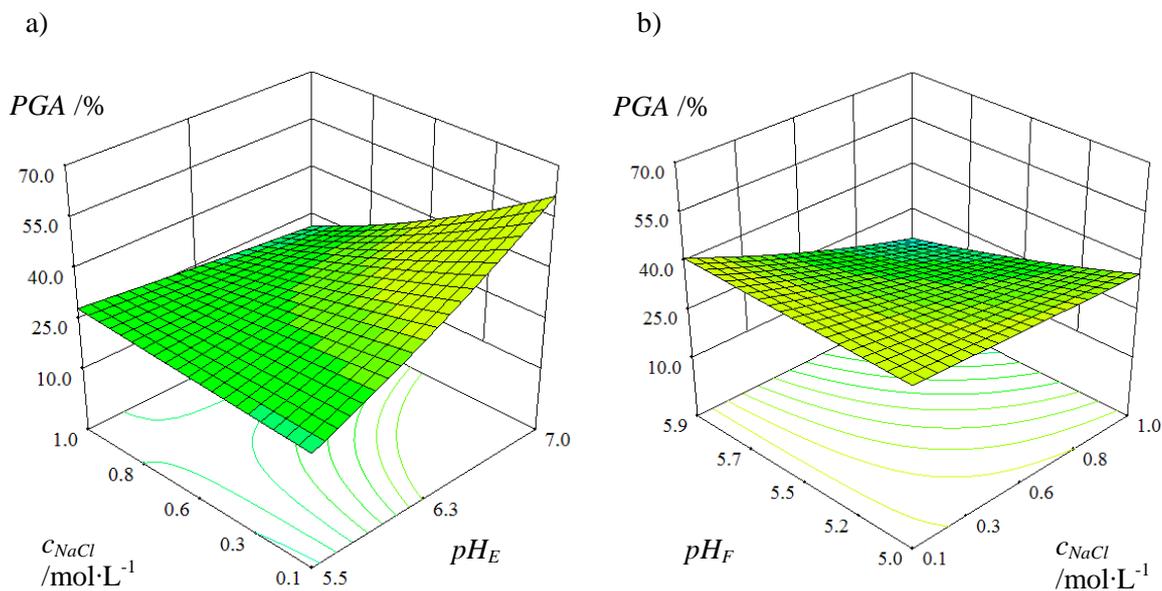


Bild 5.9: Proteingesamtausbeute (PGA) in % bei variierenden pH_E und c_{NaCl} (a) sowie pH_F und c_{NaCl} (b). Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit $RSV = 0,11$ bzw. $1:9$, $EWV = 0,35$ bzw. $1:2,85$, $pH_F = 5,5$, $t_Z = 35,0 \text{ min}$, $t_S = 30,0 \text{ min}$, $pH_E = 6,3$ und $c_{NaCl} = 0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Deswegen ist c_{NaCl} auch in WW mit EWV zu finden (Bild 5.10a)), denn die zur Verdünnung des Extraktes verwendete Wassermenge entscheidet über die Reduktion der Ionenstärke. Ist die Salzkonzentration hoch ($c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), sollte die größtmögliche Verdünnung von $EWV = 0,2 = 1:5$ ($PGA = 37,1 \%$) anstelle von $EWV = 0,5 = 1:2$ mit $PGA = 15,0 \%$ angewandt werden. Allerdings ist bei $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ein Verhältnis von $1:2$ zu wählen ($PGA = 46,6 \%$) anstelle von $1:5$ mit $PGA = 35,6 \%$.

Des Weiteren beeinflusste die Zentrifugationszeit t_Z mit positivem Vorzeichen als linearer Term ($\beta_{t_Z} = 0,29$) und innerhalb der Wechselwirkung mit RSV die Ausbeute (PGA). In Bild 5.10b) ist gezeigt, dass bei Verwendung einer großen Lösungsmittelmenge

($RSV = 0,08 = 1:13$) eine längere Zentrifugationszeit ($t_Z = 60,0$ min) verwendet werden sollte.

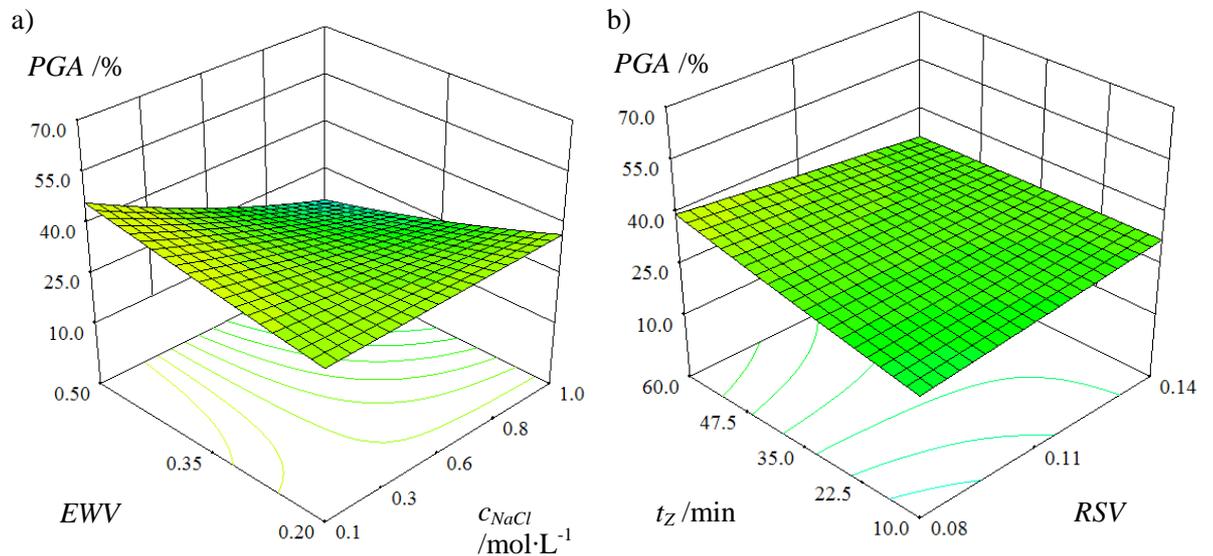


Bild 5.10: Proteingesamtausbeute (PGA) in % bei variierenden EWW und c_{NaCl} (a) sowie t_Z und RSV (b). Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit $RSV = 0,11$ bzw. 1:9, $EWW = 0,35$ bzw. 1:2,85, $pH_F = 5,5$, $t_Z = 35,0$ min, $t_S = 30,0$ min, $pH_E = 6,3$ und $c_{NaCl} = 0,6$ mol·L⁻¹

Die Sedimentationszeit t_S ist innerhalb eines quadratischen Terms mit dem in der Gleichung 5.5 kleinsten Regressionskoeffizienten von $-1,30$ aufgeführt. Letzteres bedeutet, dass die PGA stets negativ wird (d. h. bei $t_S = 60,0$ oder 0 min ist $x_{t_S}^2 = 1$ und $-1,30x_{t_S}^2 = -1,30$) oder gar nicht von der Sedimentationszeit beeinflusst wird (d. h. wenn $t_S = 30,0$ min, dann ist $-1,30x_{t_S}^2 = 0$).

5.3.3 visTex bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen

In Bezug auf die Isolatqualität (*visTex*) hatten alle untersuchten Parameter einen signifikanten Einfluss, wobei pH_E und pH_F nur aus Gründen der Hierarchie in die Modellgleichung (5.8) aufgenommen wurden. Alle Faktoren befinden sich in 2FWW.

$$\begin{aligned}
 visTex = & 1,03 + 0,066x_{pH_E} + 0,22x_{RSV} - 0,24x_{c_{NaCl}} + 0,20x_{t_Z} + 0,056x_{pH_F} - 0,20x_{t_S} \\
 & + 0,46x_{EWW} - 0,19x_{pH_E}x_{pH_F} - 0,15x_{pH_E}x_{t_S} + 0,13x_{RSV}x_{t_Z} - 0,16x_{RSV}x_{pH_F} \\
 & + 0,21x_{RSV}x_{t_S} + 0,18x_{RSV}x_{EWW} + 0,28x_{c_{NaCl}}x_{EWW} + 0,36x_{t_Z}x_{pH_F} + 0,27x_{t_Z}x_{EWW} \\
 & + 0,20x_{pH_F}x_{EWW} - 0,19x_{t_S}x_{EWW} + 0,96x_{t_S}^2
 \end{aligned} \tag{5.8}$$

mit $R^2 = 0,92$, $R_{adj}^2 = 0,87$ und $R_{pred}^2 = 0,64$ und keinem LOF .

Die Konstante β_0 von 1,03 lässt vermuten, dass bei dem Standardprozess stets eine sehr gute Isolatqualität zu erwarten ist, was den Erfahrungen entspricht. Bei Veränderungen der Prozessparameter kann nur durch eine geschickte Kombination erneut die sehr gute Isolatqualität beibehalten, aber die Proteinausbeute erhöht werden. Dies ist der klassische Zielkonflikt zur Verwendung der Zielfunktion, weswegen an dieser Stelle direkt auf die Polyoptimierung in Kapitel 5.3.5 verwiesen wird.

5.3.4 Validierung der Modelle

Inwieweit auf Grundlage dieser Modelle Prognosen für EA , PGA und $visTex$ getroffen werden können, wurde mit Hilfe einer weiteren Versuchsreihe (Tabelle 5.8) untersucht. Es wurden beliebige Einstellungen der Faktoren im untersuchten Bereich gewählt und die experimentell ermittelten Werte für EA und PGA mit dem durch das jeweilige Modell vorhergesagten Werte verglichen (Tabelle 5.8).

Abgesehen davon, dass letztlich alle ermittelten Daten innerhalb des 99 %-igen Vertrauensbereich der Modelle liegen, ist eine gute Prognosen durch das Modell für die EA (Gl. (5.6)) trotz des niedrigen Wertes von 0,27 für R_{pred}^2 möglich. So wurde bei Versuch III in Tabelle 5.8 ein EA von 65,2 % errechnet und 64,0 % bei der Durchführung des Versuches erhalten. Insgesamt wichen die experimentell ermittelten Wert lediglich um 2,4 bis 12,8 % von den errechneten Werten ab.

In Bezug auf PGA zeigten sich trotz des vergleichsweise höheren R_{pred}^2 von 0,69 Unterschiede von bis zu 30,8 % zwischen dem berechneten und experimentell ermittelten Werten. So wurde bei Versuch IV eine Proteinausbeute von 68,1 % errechnet und nur 37,3 % erzielt. Der R_{pred}^2 für das Modell der $visTex$ war mit 0,64 nur unwesentlich kleiner als bei PGA . Hier ließen sich allerdings keine Unterschiede zwischen den vorhergesagten und letztlich durchgeführten Bewertungen feststellen.

Tabelle 5.8: Vergleich der experimentell und auf Grundlage der Modelle (Gl. (5.6), (5.7) und (5.8)) berechneten Werte für PGA und EA in % sowie $visTex$ bei unterschiedlichen Faktorstufenkombinationen zur Validierung der Modelle

Versuchs-Nr.	I	II	III	IV	V
pH_E	6,8	6,0	7,0	7,0	7,0
RSV^1	0,1 = 1:10	0,13 = 1:8	0,11 = 1:9	0,13 = 1:7,7	0,14 = 1:7
$c_{NaCl}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0,80	0,60	0,14	0,10	0,18
pH_F	5,7	5,2	5,7	5,9	5,8
EWV^1	0,33 = 1:3	0,25 = 1:4	0,5 = 1:2	0,5 = 1:2	0,5 = 1:2
t_S/min	20,0	40,0	44,0	36,0	17,0
t_Z/min	30,0	10,0	10,0	10,0	11,0
EA /% Vorher. ²	64,8	52,9	65,2	64,5	63,2
EA /% Exp. ³	62,0	60,1	64,0	57,1	55,0
$visTex$ Vorher. ²	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$visTex$ Exp. ³	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5
PGA /% Vorher. ²	21,6	34,7	58,5	68,1	55,3
PGA /% Exp. ³	16,4	40,2	42,2	37,3	35,5

¹ RSV und EWV wurden durch Verhältniszahlen approximiert: $1:7 = 0,14$; $1:9 = 0,11$ und $1:13 = 0,08$ für RSV sowie $1:2 = 0,5$; $1:2,85 = 0,35$ und $1:5 = 0,2$ für EWV ; ²Vorhergesagter bzw. berechneter und ³experimentell ermittelter Wert

5.3.5 Polyoptimierung

Zur Polyoptimierung wurde die Zielfunktion D (Gl. (4.12)) verwendet, wobei dabei zunächst die Teil-Zielfunktionen d_i gemäß Gl. (4.9) – Gl. (4.11) für jede einzelne Zielgröße y_i und jeden Faktor x_i formuliert wurden (Tabelle 5.9).

Es wurden zwei Optimierungen mit unterschiedlichen Zielstellungen durchgeführt. Bei der ersten Variante (Gl. (5.8)) sollte die *PGA* maximiert werden, wobei gleichzeitig eine sehr gute Isolatqualität angestrebt wurde, d. h. die *visTex* sollte minimiert werden (Gl. (4.9)). Dabei sollte der Zeitaufwand zur Herstellung des Proteinisolats durch Minimierung der Zentrifugationszeit t_Z (Gl. (4.9)) reduziert werden. Alle weiteren Terme der Gleichung (5.8) konnten innerhalb des untersuchten Bereiches variieren. Die Maximierung der *PGA* und Minimierung der *visTex* wurde dabei mit der größten Wichtigkeit von $r = 5$ und alle anderen Teilziele mit $r = 3$ bewertet.

$$D = \left(d(PGA)^5 \cdot d(visTex)^5 \cdot d(x_{pH_E})^3 \cdot d(x_{c_{NaCl}})^3 \cdot d(x_{RSV})^3 \cdot d(x_{pH_F})^3 \cdot d(x_{EWW})^3 \cdot d(x_{t_Z})^3 \cdot d(x_{t_S})^3 \right)^{1/9} \quad (5.8)$$

Bei der zweiten Polyoptimierung (Gl. (5.9)) wurde im Hinblick auf eine spätere Implementierung des Prozesses in den industriellen Maßstab und den daraus resultierenden ökonomischen sowie ökologischen Anforderungen festgelegt, dass c_{NaCl} , t_Z und t_S minimiert werden sollen (Gl. (4.9)). Zudem sollten zur Reduktion des Wasserverbrauchs die Verhältnisse *RSV* (1:7 - 1:13) und *EWW* (1:2 - 1:5) minimiert werden. Allerdings konnten diese Faktoren nur als approximierte Dezimalzahlen (*RSV* mit 0,08 - 0,14 und *EWW* mit 0,2 - 0,5) im Softwareprogramm verwendet und mussten somit gemäß Gl. (4.11) maximiert werden, um das gewünschte Ziel zu erreichen. Die pH-Werte (pH_E und pH_F) konnten im untersuchten Bereich variieren (Gl. (4.10)). Von höchster Priorität ($r = 5$) war auch hierbei die Maximierung der *PGA* bei bestmöglicher Isolatqualität, wobei alle anderen Zielfunktionen mit einer niedrigeren Priorität ($r = 1$) eingestuft wurden.

$$D = \left(d(PGA)^5 \cdot d(visTex)^5 \cdot d(x_{pH_E})^1 \cdot d(x_{c_{NaCl}})^1 \cdot d(x_{RSV})^1 \cdot d(x_{pH_F})^1 \cdot d(x_{EWW})^1 \cdot d(x_{t_Z})^1 \cdot d(x_{t_S})^1 \right)^{1/9} \quad (5.9)$$

In Tabelle 5.9 sind für beide Polyoptimierungen (Gl. (5.8) und (5.9)) drei Lösungsmöglichkeiten und der Grad an Erfüllung (D) der eingegebenen Bedingungen dargestellt. So werden beispielsweise bei der ersten Variante für die Funktion (5.8) folgende Parametereinstellungen vorgeschlagen mit deren Hilfe die formulierten Ziele zu 100,0 % ($D = 1,0$) mit einer *PGA* von 56,7 % erfüllt würden: $pH_E = 6,9$; $c_{NaCl} = 0,15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $RSV = 0,12 = 1:2,85$; $pH_F = 5,6$; $EWW = 0,4 = 1:2,5$; $t_S = 38,7 \text{ min}$ und $t_Z = 10,0 \text{ min}$. Diese Faktorenkonstellation der Variante 3 in Tabelle 5.9 wurde zudem im Labor überprüft, wobei eine *PGA* von 42 % und eine sehr gute Isolatqualität erzielt werden konnte.

Tabelle 5.9: Lösungsvarianten nach Polyoptimierung unter Anwendung der Gl. (5.8) und (5.9). Teil-Zielfunktionen d_i in (4.9) - (4.11) wurden für jede einzelne Zielgröße y_i und Faktor x_i vorgegeben.

Faktor	pH_E	c_{NaCl} /mol·L ⁻¹	RSV^2	pH_F	EWV^2	t_S /min	t_Z /min	PGA /%	$visTex$	D
Vorgabe für d_i in Gl. (5.8)	Im untersuchten Bereich	Im untersuchten Bereich	Im untersuchten Bereich	Im untersuchten Bereich	Im untersuchten Bereich	Im untersuchten Bereich	Minimiere	Maximiere	Minimiere	Gl. (5.8) = 0 - 1
Priorität ¹	3	3	3	3	3	3	3	5	5	
Variante 1	6,9	0,15	0,12	5,6	0,4	38,7	10,0	56,7	1,0	1,000
Variante 2	7,0	0,11	0,13	5,9	0,5	47,5	10,0	62,8	1,0	1,000
Variante 3	7,0	0,14	0,08	5,0	0,5	38,8	10,0	55,2	1,0	1,000
Vorgabe für d_i in Gl. (5.9)	Im untersuchten Bereich	Im Minimiere	Im Maximiere	Im untersuchten Bereich	Im Maximiere	Im Minimiere	Minimiere	Maximiere	Minimiere	Gl. (5.9) = 0 - 1
Priorität ¹	1	1	1	1	1	1	1	5	5	
Variante 4	7,0	0,12	0,14	5,9	0,5	22,2	10,1	64,0	1,0	0,967
Variante 5	6,7	0,10	0,14	5,9	0,5	19,6	10,0	55,3	1,0	0,964
Variante 6	7,0	0,17	0,14	5,9	0,5	20,4	10,0	56,1	1,0	0,958

¹Priorität: Die Teil-Zielfunktionen d_i werden in Bezug auf ihre Wichtigkeit von den Stufen 1 (niedrigste Priorität) bis 5 (höchste Priorität) kategorisiert; ² RSV (Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis) und EWV (Extrakt-Wasser-Verhältnis zur Verdünnungsfällung) wurden bei der Verwendung der Software durch Verhältniszahlen approximiert: 1:7 mit 0,14; 1:9 mit 0,11 und 1:13 mit 0,08 für RSV sowie 1:2 mit 0,5; 1:2,85 mit 0,35 und 1:5 mit 0,2 für EWV

6 Diskussion

Die Gewinnung von Proteinisolaten aus Körnerleguminosen mittels salzinduzierter Extraktion und anschließender Verdünnungsfällung wurde in vielen Studien bereits dokumentiert [19, 20, 42, 50, 68, 97, 98, 126, 128, 139, 204]. Darunter verwendeten ausschließlich EL-ADAWY et al. (2001), LAMPART-SZCZAPA (1996) und ZACHERL et al. (2008) Lupinensamen, wobei hier vielfach die *Lupinus albus* L. und *L. termis* L. eingesetzt wurde [50, 97, 98, 204]. Die systematische, statistisch unterlegte Prozessoptimierung (Kapitel 2.4) mittels *L. angustifolius* L. cv. Vitabor zur Gewinnung eines Proteinisolats mit fettähnlichen Eigenschaften wurde bislang in dieser Form noch nie untersucht und bietet Grundlage für weiterführende Forschungsarbeiten und ein hohes Potential für die Lebensmittelindustrie bei Einsatz des Isolats als Fettsubstitut.

Da die Isolierung von Proteinen aus Leguminosen von zahlreichen Parametern abhängig ist, wurde zunächst ein *Screening* relevanter Einflussfaktoren (Kapitel 6.1) durchgeführt, ein geeigneter Rohstoff ausgewählt (Kapitel 6.2). Im Anschluss wurden die Prozessparameter mit dem Ziel einer maximalen Proteinausbeute bei gleich bleibender Isolatqualität optimiert (Kapitel 6.3).

6.1 Signifikante Prozessfaktoren bei der Proteinisolierung

Um das *Screening* letztlich mit einer angemessenen Faktorenanzahl durchzuführen und den Prozess gegebenenfalls zu vereinfachen wurden zwei Prozessparameter vorab einzeln untersucht: die Salzkonzentration c_{NaCl} während der Extraktion und Einleitgeschwindigkeit während der Fällung.

Einfluss der c_{NaCl} auf die EA der Proteine von *L. angustifolius* L.

Wie zu erwarten, hatte die c_{NaCl} einen signifikanten Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine und somit auf EA (Bild 5.1). Die Löslichkeit von Proteinen wird in einem vergleichsweise kleinen Konzentrationsbereich ($0,2 - 0,8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) gefördert, was in der Literatur als Einsalzeffekt (engl. *salting-in*) bezeichnet wird [32, 33, 67, 113]. Interaktionen zwischen Proteinladungsträger mit den Salzionen verhindern inter- bzw. intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Eiweißmolekülen. Zudem begünstigen die Salzionen, aufgrund ihrer hydratisierenden Eigenschaften die Anlagerung von Wassermolekülen am Protein [183, 197]. In diesem Bereich nimmt die Löslichkeit proportional zur Ionenstärke zu. Wird c_{NaCl} darüber hinaus erhöht ($\geq 1,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),

kommt es zum sog. Aussalzeffekt (engl. *salting-out*), was in Bild 5.1 ab einer Salzkonzentration von $1,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu beobachten ist [32, 33, 65]. Hierbei konkurrieren Protein und Salz um die Wassermoleküle zugunsten von Protein-Protein-Interaktionen. Dieser *salting-in* und *salting-out* Effekt ist zwar bekannt, hängt jedoch abgesehen von der jeweiligen Proteinquelle auch von der Struktur und dem chemischen Aufbau der Proteine ab und muss deshalb vor jeder Prozessetablierung gezielt untersucht werden.

Einfluss der Einleitgeschwindigkeit auf die PGA der Proteine von *L. angustifolius* L.

Um die Notwendigkeit eines Pumpensystems abschätzen zu können, wurde die PGA nach langsamer ($2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$) und schlagartiger ($100 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$) Verdünnungsfällung miteinander verglichen. Da kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, wurden alle weiteren Fällungen mit einer Einleitgeschwindigkeit von $100 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ durchgeführt und somit eine deutliche Zeitersparnis und Prozessvereinfachung erzielt.

Anschließend wurde das *Screening* mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung mit einem vereinfachten Prozess durchgeführt. Dabei wurde der signifikante Einfluss der Extraktionsparameter (c_{NaCl} , pH_E , t_E , RSV , T_E) und Fällungsparameter (pH_F , EWV , ΔT , t_Z und t_S) auf die Zielgrößen EA , PGA und Isolatqualität (*visTex*) untersucht. Mit den signifikanten Faktoren wurde ein Regressionsmodell gebildet, wobei nicht-signifikante lineare Terme (Haupteffekte) aus Gründen der Hierarchie in der Gleichung vorkommen können (Kapitel 2.4.3). Prinzipiell können Haupteffekte, die in einer 2FWW sind, nur zusammen mit dem wechselwirkenden Parameter interpretiert werden.

6.1.1 Faktoren der Extraktionsausbeute (EA)

Mit Ausnahme der RSV haben alle untersuchten Extraktionsparameter (c_{NaCl} , pH_E , t_E und T_E) gemäß Tabelle 5.2 einen signifikanten Einfluss auf EA (Gl. (5.1)). Als Haupteffekt wurde ausschließlich die Extraktionszeit t_E bestimmt, wobei alle anderen Faktoren (c_{NaCl} , pH_E und T_E) in 2FWW eingebunden sind.

$$\sqrt{EA} = 6,02 + 0,41x_{pH_E} + 0,73x_{c_{\text{NaCl}}} + 0,76x_{T_E} + 0,26x_{t_E} - 0,40x_{pH_E}x_{c_{\text{NaCl}}} + 0,19x_{pH_E}x_{T_E} \quad (5.1)$$

Signifikanz der Extraktionszeit (t_E) auf die EA beim Screening

Die Extraktionszeit t_E wurde eindeutig als Haupteffekt (Tabelle 5.2) - allerdings mit vergleichsweise niedrigem Regressionskoeffizienten ($\beta_{t_E} = 0,26$) - ermittelt. Das bedeutet, dass t_E einen signifikanten Einfluss auf EA hat, die absolute Auswirkung auf EA allerdings klein ist. In Bild 6.1 ist die Abhängigkeit der EA von t_E bei unterschiedlichen Einstellungen der anderen Faktoren dargestellt. Verlauf a) zeigt beispielsweise nach 60 min Extraktionsdauer eine EA von 55,5 %, nach weiteren 40 min 63,5 %. Veränderte Einstellungen im pH_E , RSV , c_{NaCl} , T_E bestätigten (Verlauf b) und c)), dass trotz der ermittelten Signifikanz von t_E der Unterschied in EA gering ist.

So wurde für die weiterführenden Untersuchungen eine Extraktionsdauer von 60 min aus wirtschaftlichen wie auch mikrobiologischen Gründen für ausreichend erachtet, was auch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt [18, 167]. RUIZ et al. (1976) beobachteten bereits nach 30,0 min keine weitere Steigerung der Löslichkeit von Lupinenproteinen, jedoch zeigte sich in Vorversuchen zu dieser Arbeit, dass für die verwendete Lupinensaat 60,0 min zu deutlich höheren Proteinausbeute führt [159, 181].

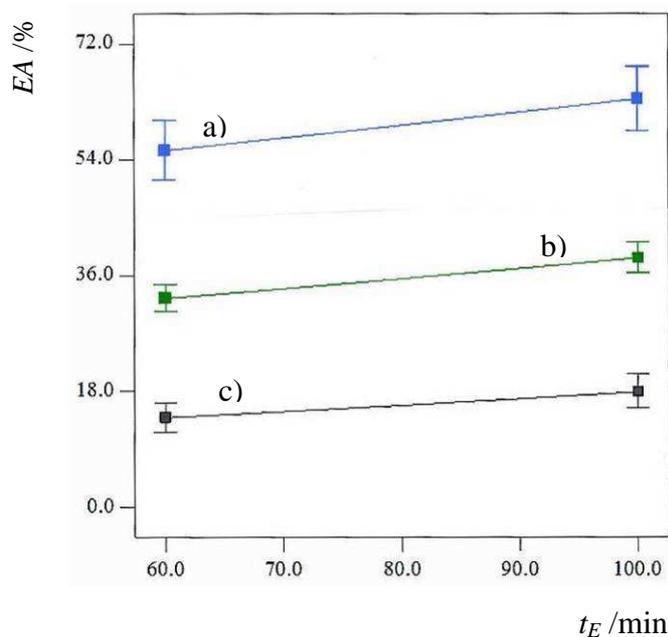


Bild 6.1: Abhängigkeit der Extraktionsausbeute (EA) in % von der Extraktionszeit (t_E) in min bei unterschiedlichen Faktoreinstellungen: a) $pH_E = 7,0$; $RSV = 0,08 = 1:13$; $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $T_E = 50,0 \text{ }^\circ\text{C}$; b) $pH_E = 6,3$; $RSV = 0,11 = 1:9$; $c_{NaCl} = 0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $T_E = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und c) $pH_E = 5,5$; $RSV = 0,11 = 1:9$; $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $T_E = 10,0 \text{ }^\circ\text{C}$

Signifikante 2FWW pH_E und c_{NaCl} auf die EA (Bild 5.2a))

Die Signifikanz der 2FWW zwischen pH_E und c_{NaCl} war zu erwarten, da ein derartiger Effekt bereits in zahlreichen Literaturstellen beschrieben wurde [42, 45, 50, 70, 97, 159]. Aufgrund dieser gegenseitigen Beeinflussung müssen die jeweiligen Einstellungen dieser Parameter spezifisch für jedes Protein und jede Zielstellung erneut untersucht werden.

Die maximale EA wurde bei den jeweiligen Grenzeinstellungen ($pH_E = 7,0$ und $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) beider Parameter ermittelt, sog. Randmaxima, was meist als zu kleiner oder falsch gesetzter Versuchsraum gedeutet wird [21, 131]. Allerdings wurden in diesem Falle die Grenzen aus verschiedenen Gründen in dieser Form gewählt. Alkalische Bedingungen während der Extraktion ($pH > 7,0$) sollten vermieden werden, um eine vorzeitige, alkalisch induzierte Reaktionen zu unterdrücken, z.B. Denaturierung der Proteine, Racemisierung der Aminosäuren, Bildung von Lysinoalanin, Reduktion der Verdaulichkeit sowie Reduktion des Anteils an essentiellen Aminosäuren (Kapitel 2.3) [56, 59, 84, 102, 111, 122]. Hinzu kommt, dass die Forschergruppe um ISMOND et al. (1990) zwischen einem pH_E von 7,0 und 9,0 nahezu keine Proteinmasse isolieren konnten [82, 84]. Niedrigere pH-Werte ($< 5,5$) wurde nicht untersucht, da EL-ADAWY et al. (2001) bereits zeigen konnten, dass dies zu schlechteren Ausbeuten führt und Veränderungen in den technofunktionellen und sensorischen Eigenschaften der Proteinisolate nicht ausgeschlossen werden können [25, 50, 122].

Die Salzkonzentration könnte hingegen aufgrund der Vorversuche (Bild 5.1) eventuell bis $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gesteigert werden, das bedeutet, dass hier noch ein Spielraum von $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ vorliegt (maximal mögliche Salzkonzentration beim Screening $0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Signifikante 2FWW T_E und pH_E auf die EA (Bild 5.2b))

Neben der Salzkonzentration spielen zudem Interaktionen zwischen pH_E und T_E eine wesentliche Rolle. Wie bei vielen chemischen und biologischen Prozessen spielt die Reaktionstemperatur eine ausschlaggebende Rolle auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Prozessen. So auch im Falle der Proteinextraktion. Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit ergibt sich aus der RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) bzw. ARRHENIUS-Gleichung. Bild 5.2b) verdeutlicht die signifikante Steigerung von EA bei Erhöhung der Extraktionstemperatur (T_E) von 10 auf 50°C . Der Zusammenhang zwischen Temperatur und pH-Wert ist durch den veränderten Dissoziationsgrad und der BROWNSchen Molekularbewegung erklärbar. Mit steigender Temperatur nehmen

Dissoziation und Bewegung der im System befindlichen Substanzen (z. B. Salze, Proteine) sowie die von Wasser zu. Somit wird der Stofftransport aufgrund des steigenden Diffusionskoeffizienten (FICK'sche Gesetz) beschleunigt und es können vermehrt Protein-Salz-Interaktionen entstehen.

Auch in anderen Studien wurde eine höhere Ausbeute von Leguminosenproteinen durch höhere Extraktionstemperaturen erzielt [37, 146, 159, 160]. Laut WANG et al. kann die verbesserte Löslichkeit in einem Temperaturbereich von 30 - 70 °C auch durch eine Auf-faltungen der Proteinstruktur begründet sein, wodurch eine größere Anzahl von Protein-Wasser-Wechselwirkungen möglich sind [194].

6.1.2 Faktoren der Proteingemaltausbeute (PGA)

Im Gegensatz zur *EA* hängt die *PGA* von deutlich mehr Faktoren und deren Wechselwirkungen ab (Gl. (5.2)). Die ermittelten signifikanten Faktoren pH_E , RSV , T_E und pH_F (Tabelle 5.2) befinden sich dabei jeweils in Wechselwirkung mit anderen Faktoren (Bild 5.3a) - f)).

$$\sqrt{PGA} = 1,90 + 0,38x_{pH_E} + 0,38x_{RSV} - 0,13x_{c_{NaCl}} + 0,55x_{T_E} + 0,16x_{t_E} - 0,051x_{\Delta T} - 0,63x_{pH_F} + 0,25x_{pH_E}x_{RSV} - 0,35x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} + 0,38x_{pH_E}x_{T_E} - 0,25x_{pH_E}x_{\Delta T} - 0,49x_{pH_E}x_{pH_F} + 0,18x_{RSV}x_{c_{NaCl}} \quad (5.2)$$

Signifikante 2FWW pH_E und RSV auf die PGA (Bild 5.3a))

Bei allen Versuchen, die für diese Versuchsreihe bei $pH_E = 7,0$ durchgeführt wurden, führte eine RSV von 1:7 zu höheren PGA , als ein größeres Verhältnis von 1:13 (Bild 5.3a)). Hinsichtlich des Einflusses der Lösungsmittelmenge auf die Proteinlöslichkeit liegen in der Literatur konträre Meinungen vor. Während einige Studien ebenfalls verringerte Löslichkeiten bei Steigerung der Lösungsmittelmenge fanden, gibt es zahlreiche Arbeiten, die eine Zunahme der Proteinlöslichkeit mit steigender Lösungsmittelmenge erzielen konnten [40, 101, 135, 143, 153, 160, 167]. Eine mögliche Ursache ist die erhöhte Anzahl an Salzionen im Lösungsmittel. Die Salzkonzentration wird je RSV zwar angepasst, jedoch erhöht sich die Anzahl der Salzionen absolut. So stehen je Proteinmolekül eine größere Menge Salzionen zur Verfügung, was die partielle Aussalzung der Proteine induziert, welche dann im Raffinat zurückbleiben, da diese zu große Agglomerate gebildet haben [115, 135]. Die Komplexbildung von Proteinen mit Polysacchariden könnte ein weiterer Grund für die geringeren Ausbeuten sein [135, 189]. Dies würde auch die 2FWW zwischen c_{NaCl} und RSV erklären (Bild 5.3f)).

Signifikante 2FWW c_{NaCl} und pH_E auf die PGA (Bild 5.3b))

Während bei niedrigem pH_E von 5,5 eine signifikant höhere EA durch Salzzugabe ($c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) erzielt werden konnte (Bild 5.2a)), wurde bei PGA nach Salzzugabe sogar niedrigere Mengen an Protein gewonnen (Bild 5.3b)). Für eine maximale PGA sind somit andere Parametereinstellungen zu bevorzugen, als zur Maximierung der EA . Diese WW wurde in der finalen Prozessoptimierung verifiziert und wird erst auf Grundlage der dort erzielten Ergebnisse in Kapitel 6.3.2 diskutiert.

Signifikante 2FWW T_E und pH_E auf die PGA (Bild 5.3c))

Auch diese Wechselwirkung, wie die 2FWW zwischen c_{NaCl} und pH_E , ist bereits für EA als signifikante FWW identifiziert worden (Bild 5.2b)). Anders als bei der diskutierten 2FWW zwischen c_{NaCl} und pH_E zeigen sich hier äquivalente Auswirkungen durch eine höhere Temperatur während der Extraktion (50 °C) in Bezug auf EA und PGA . In beiden Fällen führt es zur Verbesserung der Proteinausbeute, deren Gründe bereits in Kapitel 6.1.1 erläutert wurden (z. B. FICK'sche Gesetz, ARRHENIUS-Gleichung, Auffaltung der Proteinstruktur, Dissoziationsgrad).

Signifikante 2FWW ΔT und pH_E auf die PGA (Bild 5.3d))

In der 2FWW ΔT (Temperaturdifferenz zwischen Extrakt und Fällungsmittel) und pH_E zeigte sich erneut die Abhängigkeit zwischen pH-Wert und der Temperatur des Systems. Doch ähnlich wie bei t_E in Bezug auf EA wurde bei der Überprüfung dieser Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen $\Delta T = 20$ oder 0 K beobachtet (Bild 6.2). Die Fehlerbalken der roten Kurve ($\Delta T = 20,0 \text{ K}$) und die der schwarzen Kurve ($\Delta T = 0,0 \text{ K}$) überlappen sich bei den gezeigten Parametereinstellung a) – c) in Bild 6.2. Somit wurde für weiterführende Untersuchungen eine Temperaturdifferenz von 20 K gewählt.

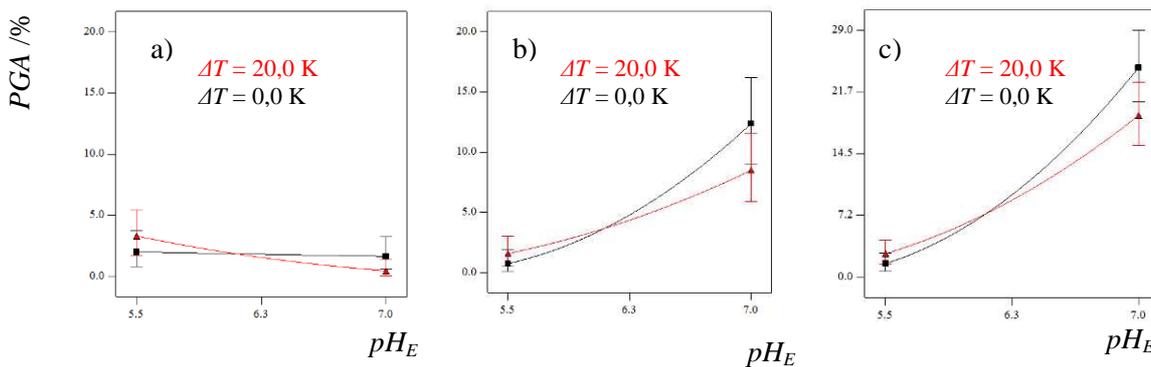


Bild 6.2: Signifikante 2FWW zwischen ΔT und pH_E auf die Zielgröße PGA . Nicht dargestellte Faktoren sind konstant mit a) $RSV = 0,08 = 1:13$; $T_E = 50,0$ °C; $t_E = 100,0$ min; $EWV = 1,0 = 1:2$; $pH_F = 7,0$; $t_Z = 60,0$ min; $t_S = 1080,0$ min und $c_{NaCl} = 1,0$ mol·L⁻¹, bei b) $RSV = 0,14 = 1:7$; $T_E = 10,0$ °C; $t_E = 60,0$ min; $EWV = 0,2 = 1:5$; $pH_F = 5,5$; $t_Z = 10,0$ min; $t_S = 120,0$ min und $c_{NaCl} = 0,1$ mol·L⁻¹ und c) $RSV = 0,11 = 1:9$; $T_E = 50,0$ °C; $t_E = 60,0$ min; $EWV = 1:2$; $pH_F = 5,5$; $t_Z = 10,0$ min; $t_S = 120,0$ min und $c_{NaCl} = 0,4$ mol·L⁻¹

Außerdem ist bei dieser 2FWW auf die sog. Vermengungsstruktur (Tabelle 2.1) hinzuweisen. Die Verwendung eines faktoriellen Versuchsplans der Auflösung VI (Tabelle 2.2) könnte dazu geführt haben, dass diese 2FWW gezeigt, aber eigentlich die Vermengungsstruktur gemeint ist (Kapitel 2.4.2). Effekte einzelner Faktoren sind mit 3FWW vermengt und 2FWW untereinander (Tabelle 9.4 im Anhang). Die eindeutige Zuordnung der 2FWW ist nicht immer möglich [92, 171]. D. h. zum Beispiel, dass anstelle des pH_E auch pH_F der entscheidende Faktor sein kann, was an dieser Stelle nicht ausreichend geklärt werden konnte, aber bei der finalen Prozessoptimierung verifiziert wird.

Signifikante 2FWW pH_E und pH_F auf die PGA (Bild 5.3e))

Bei der 2FWW pH_E und pH_F (Bild 5.3e)) sticht analog zu Bild 5.3a) und c) eine Faktorstufen-Kombination mit einer vergleichsweise hohen PGA besonders heraus: $pH_E = 7,0$ und $pH_F = 5,5$. Zur besseren Löslichkeit der Proteine während der Extraktion wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt, der bei der anschließenden Fällung das Extrakt auf ein pH-Wert von 5,5 abgesenkt wurde. Extraktion und Fällung verfolgen unterschiedliche Ziele: Bei der Extraktion sollen durch vergleichsweise hohe pH-Werte die Proteine soweit verändert werden, dass diese bevorzugt in Lösung gehen. Bei der anschließenden Fällung sollen die Proteine einen Ladungszustand annehmen, der die Protein-Protein-Interaktion

sowie Aggregation der Proteinmoleküle begünstigt [31, 50, 159]. Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der alkalischen Extraktion mit anschließender isoelektrischer gilt es hier im Rahmen einer Optimierung zu prüfen inwieweit der pH-Wert variiert werden kann ohne die fettähnliche Textur der Proteinisolate zu gefährden.

Signifikante 2FWW c_{NaCl} und RSV auf die PGA (Bild 5.3f)

Bei großem Verhältnis ($RSV = 1:13 = 0,08$) ist eine geringere Salzkonzentration ($c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) realisierbar und führt sogar zu einer höheren PGA als $c_{NaCl} = 0,7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Bild 5.3f)). Mögliche Ursachen, wie beispielsweise die Aussalzung einiger Proteinmoleküle aufgrund der höheren Anzahl an Salzionen, sind bereits beschrieben worden: Die Salzkonzentration wird je RSV zwar angepasst, jedoch erhöht sich die Anzahl der Salzionen absolut. So stehen je Proteinmolekül eine größere Menge Salzionen zur Verfügung, was die partielle Aussalzung der Proteine induziert, welche dann im Raffinat zurückbleiben, da diese zu große Agglomerate gebildet haben [115, 135].

Dennoch handelt es sich an dieser Stelle lediglich um Tendenzen und Vermutungen. Der Einfluss von RSV wurde bei der finalen Prozessoptimierung näher untersucht (Kapitel 5.3) und wird in Kapitel 6.3.2 ausführlich diskutiert.

6.1.3 Faktoren der Isolatqualität (*visTex*)

Mit Ausnahme der Extraktions- und Sedimentationszeit sowie dem EWW, haben alle untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die *visTex*. Dabei wurden vier Parameter in WW untereinander und vier Haupteffekte (T_E , pH_F , ΔT und t_Z) mit signifikantem Einfluss identifiziert (Gl. (5.3)).

$$\begin{aligned} \log_{10}(\text{visTex}) = & 0,28 - 0,092x_{pH_E} - 0,11x_{RSV} - 0,044x_{c_{NaCl}} - 0,041x_{T_E} \\ & + 1,386 \cdot 10^{-3}x_{EWW} - 0,052x_{\Delta T} + 0,053x_{pH_F} + 0,039x_{t_Z} \\ & - 0,038x_{pH_E}x_{RSV} + 0,066x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} + 0,048x_{pH_E}x_{EWW} \end{aligned} \quad (5.3)$$

Dabei führt ein niedriges Verhältnis ($RSV = 1:7$) bei $pH_E = 7,0$ nicht nur zu einer verbesserten Ausbeute (Bild 5.3a)), sondern auch zu einer sehr guten Isolatqualität (Bild 5.4a)). Zudem sollte der pH_E stets 7,0 betragen, um die bestmögliche Textur des Isolats zu erzielen (Bild 5.4a)-c)). Aufgrund der im Vergleich zu den Modellen für die Proteinausbeuten (Gl. (5.1) und (5.2)) niedrigen Bestimmtheitsmaße der *visTex* ($R_{adj}^2 = 0,76$ und $R_{pred}^2 = 0,62$) wird an dieser Stelle auf weitere Interpretationen und

Bewertungen unterschiedlicher Faktoreinstellungen bewusst verzichtet. Ein faktorieller Versuchsplan ist für eine mathematische Modellierung dieser Zielgröße letztlich zu vage. Allerdings konnten wesentliche Faktoren identifiziert und bei der finalen Prozessoptimierung berücksichtigt werden.

6.1.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung des Screenings

Für die Zielgrößen EA , PGA und $visTex$ sind c_{NaCl} , pH_E , t_E , RSV , T_E , pH_F , ΔT , EWV und t_Z als signifikante Faktoren bestimmt worden. Allerdings wurden drei dieser Parameter bei weiteren Untersuchungen konstant eingestellt, um die finale Prozessoptimierung mit einer angemessenen und sinnvollen Faktorenanzahl durchzuführen:

1. t_E wurde als wesentlicher Parameter bzw. Haupteffekt für EA bestimmt und konnte bereits interpretiert werden. Dabei zeigte sich, dass - wie auch in anderen Studien - trotz der ermittelten Signifikanz kaum Unterschiede zwischen 60 und 100 min gemessen werden konnten [18, 167]. Allerdings sind 60 min für die verwendete Lupinensaat in jedem Falle notwendig, weswegen alle zukünftigen Extraktionen bei minimalem Zeitaufwand von 60 min durchgeführt worden sind [181].
2. Für T_E könnte ein Optimum innerhalb des untersuchten Temperaturbereichs gesucht werden, um die Energiekosten niedrig zu halten. Jedoch ist aus mikrobiologischen Gründen eine Temperatur von 50°C allen darunter liegenden Temperaturen vorzuziehen. Eine Extraktionstemperatur von 10°C wäre denkbar, führt aber stets zu einer schlechteren Ausbeute. Höhere Temperaturen sind aufgrund unerwünschter Veränderungen der Proteine zu vermeiden. Somit wurde eine konstante T_E von 50°C festgelegt.
3. ΔT wurde in WW mit pH_E als signifikanter Einflussfaktor auf die PGA identifiziert. Aufgrund verschiedener Unschärfen im Versuchdesign - wie bereits beschrieben - konnte bei der Überprüfung dieser Parameter kein deutlicher Unterschied zwischen 20 und 0 K beobachtet werden. Deshalb wurde ein $\Delta T = 20\text{ K}$ festgelegt.

Letztlich wurden die Faktoren c_{NaCl} , pH_E , RSV , pH_F , EWV , t_S und t_Z für die finale Prozessoptimierung aus unterschiedlichen Gründen festgelegt. Für pH_E und c_{NaCl} wurden Randmaxima gezeigt, jedoch ist ein höherer pH-Wert ($pH_E > 7,0$) aus bereits genannten Gründen nicht realisierbar. Hingegen kann c_{NaCl} zur Verbesserung der EA um $0,3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

in zukünftigen Untersuchungen gesteigert werden. Allerdings führt eine niedrigere c_{NaCl} ($pH_E = 7,0$) zu einer höheren PGA . D. h. für eine maximale EA sind andere Parametereinstellungen zu bevorzugen, als zur Maximierung der PGA . Welche Einstellung nun für den gesamten Prozess zu wählen ist, muss verifiziert werden. RSV wurde als signifikanter Faktor in Bezug auf die Zielgrößen PGA sowie $visTex$ ermittelt. Da hierbei ein Verhältnis von 1:8 einem Verhältnis von 1:13 eventuell vorzuziehen ist, galt es diesen Faktor im Folgenden näher zu untersuchen. EWV ist lediglich aus Gründen der Hierarchie in Gl. (5.3) durch die $2FWW$ mit pH_E in Erscheinung getreten, wurde aber insbesondere aufgrund des entscheidenden Einflusses auf die Ionenstärke des Mediums bei der Optimierung einbezogen. t_S ist im Gegensatz zu t_Z bei keiner Zielgröße als signifikante Größe identifiziert worden. Jedoch wurde t_S in einem Bereich von 120 bis 1080 min variiert und es ist aus ökonomischen und arbeitstechnischen Gründen zu überprüfen, ob eine weitere Reduktion der Sedimentationszeit ($< 120,0$ min) möglich ist.

6.2 Die Rohstoff-Auswahl

Der für *Lupinus angustifolius* L. standardisierte Prozess wurde auf weitere Körnerleguminosen übertragen (Soja, Erbse, Ackerbohne, Linse und weiße Bohne), um dessen Einsatz zur Produktion eines Fettsubstituts zu überprüfen. Der ermittelte Proteingehalt der verwendeten Saaten entspricht weitestgehend den Literaturdaten, wobei die Sojabohne die höchsten Proteinanteil von 56,5 % (N x 5,7) im entölten Sojabohnenmehl aufwies (Tabelle 4.1) [23, 28, 53, 191].

Um den Prozess für jeden einzelnen Rohstoff anzupassen, wurden simultan drei Faktoren (pH_E , c_{NaCl} und RSV) variiert und die Auswirkungen auf EA und PGA sowie auf die Qualität der Isolattextur ermittelt. Dabei wurde festgestellt (Tabelle 5.4), dass bei 65 % der vermessenen Proteinmassen die Proteinkonzentration ($c_{P_{Isolat}}$) kleiner als 90 % ist und somit nicht der Definition eines Proteinisolats entsprechen [42, 203]. Dennoch werden, der besseren Verständlichkeit wegen, die Proteinpräparate weiterhin Isolate genannt.

6.2.1 Extraktionsaubeute (EA) beim Rohstoffvergleich

Es konnte für jeden einzelnen Rohstoff eine eigene Regressionsgleichung ermittelt werden, wobei EA - unabhängig von dem gewählten Rohstoff - stets signifikant von c_{NaCl} , pH_E und RSV sowie von der $2FWW$ zwischen pH_E und c_{NaCl} und dem pH-Wert zum Quadrat pH_E^2 beeinflusst wurde (Gl. (5.4)).

$$EA = \beta_0 + 18,90 pH_E + \beta_{c_{NaCl}} \cdot c_{NaCl} + \beta_{RSV} \cdot RSV - 17,91 pH_E \cdot c_{NaCl} - 34,31 c_{NaCl}^2 \quad (5.4)$$

Einfluss von RSV auf EA bei unterschiedlichen Körnerleguminosen

In Abhängigkeit des eingesetzten Rohstoffs variieren die Regressionskoeffizienten $\beta_{c_{NaCl}}$ und β_{RSV} je Rohstoff (Tabelle 5.5), wobei RSV stets als Haupteffekt ermittelt wurde. In Gleichung (5.4) unterscheidet sich EA vor allem in den Vorzeichen für β_{RSV} , welche bei Ackerbohne, Erbse und weißen Bohne positiv und bei Lupine, Soja und Linse negativ sind (Tabelle 5.5). Somit empfiehlt es sich bei Soja, Linse, der entölte und vollfette Lupinensaat kleine Verhältnisse zwischen eingesetzter Rohware und Salzlösung einzusetzen, wohingegen bei allen anderen Spezies eine möglichst große Lösungsmittelmenge für eine bessere Proteinausbeute einzustellen ist. D. h. nicht für alle Saaten gilt die in der Literatur oft beschriebene Zunahme der Proteinlöslichkeit mit steigender Lösungsmittelmenge [101, 135, 153, 160]. Die jeweilige Proteinquelle, deren Zusammensetzung und Struktur spielt dabei vermutlich eine entscheidende Rolle. Eine weitere Ursache ist eine eventuelle Komplexbildung der Proteine mit Polysacchariden (Stärke), weshalb mehr Lösungsmittel für die Extraktion der Proteine benötigt wird [189]. Dies würde den Vorteil eines großen Lösungsmittelverhältnisses für die Ackerbohne, Erbse und weiße Bohne erklären. Allerdings müsste dann auch die Linse ein solches Verhalten zeigen, doch das Gegenteil ist der Fall. Auffällig ist zudem, dass die Linse nach den lipidreichen Saaten Soja und Lupine die höchste Proteinkonzentration hat, was wiederum den Schluss nahelegt, dass neben der Proteinzusammensetzung und -struktur, auch der Proteingehalt der verwendeten Saat eine wichtige Rolle spielt [135, 170]. Die dargelegten Vermutungen müssten jedoch in weitergehenden Experimenten intensiver untersucht werden.

Einfluss von pH_E und c_{NaCl} auf EA bei unterschiedlichen Körnerleguminosen

Wie im *Screening* ist beim Rohstoffvergleich die 2FWW zwischen pH_E und c_{NaCl} als signifikante Einflussgröße für EA ermittelt worden. Dabei haben alle untersuchten Leguminosen ein Minimum bei $pH_E = 5,0$ und $c_{NaCl} = 0,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Durch Salzzugabe oder pH_E -Erhöhung kann die EA jeweils gesteigert werden. Allerdings ist bei hohem pH_E zu beobachten, dass die EA nach Erreichung eines Maximums durch eine weitere Erhöhung von c_{NaCl} wieder sinkt. Die verbesserte Löslichkeit der Leguminosenproteine bei

vergleichsweise kleinen Salzkonzentrationen und deren Verschlechterung bei höheren NaCl-Konzentrationen ist als Ein- und Aussalzeffekt bekannt und wurde im Abschnitt 6.1 bereits beschrieben [32, 33, 64-67, 83, 113]. Obwohl beide Effekte von der jeweiligen Proteinquelle, der Struktur und dem chemischen Aufbau der Proteine abhängen, konnte der direkte Übergang vom Ein- zum Aussalzeffekt für die verschiedenen Leguminosen innerhalb des Versuchsraums erfasst werden (Bild 5.5).

Analog zum Einfluss von RSV , konnte auch bei pH_E eine signifikante Abhängigkeit der EA von der Leguminosenart festgestellt werden. Nach der salzinduzierten Proteinextraktion der vorbehandelten Soja-, Lupinen-, Erbsen- und Ackerbohrensaat konnte bei entsprechender Einstellung eine EA von mehr als 55 % erzielt werden, wohingegen bei Linse maximal 49 % und der weißen Bohne maximal 41 % erreicht wurden. MWASARU et al. ermittelten für Erbsen und Bohnen niedrigere EA von 40 % bzw. 37 %, was vermutlich auf unterschiedliche pH-Wert-Einstellungen zurückzuführen ist [119, 130]. Ansonsten sind die Ausbeuteergebnisse der untersuchten Saaten weitestgehend konform zu bereits durchgeführten Studien [1, 23, 82, 129, 164]. Dabei ist festzuhalten, dass mit Linse und weißer Bohne - im Vergleich zu den anderen Körnerleguminosen - lediglich 10 % geringere EA realisierbar sind. Für die Auswahl eines Rohstoffs zur Herstellung eines Fettsubstituts sind jedoch letztlich die Zielgrößen PGA und insbesondere Texturqualität von entscheidender Bedeutung.

6.2.2 Proteingemischtausbeute (PGA) beim Rohstoffvergleich

Anders als bei EA wurden die Parameter c_{NaCl} , pH_E und RSV lediglich aus hierarchischen Gründen in das Modell für die PGA (Gl. (5.5)) aufgenommen. Signifikant waren primär die 2FWW zwischen c_{NaCl} und pH_E als auch c_{NaCl} und RSV sowie der quadratische Term c_{NaCl}^2 .

$$\ln(PGA + 0,26) = \beta_0 + \beta_{pH_E} \cdot pH_E + \beta_{c_{NaCl}} \cdot c_{NaCl} - 12,13RSV - 2,68pH_E \cdot c_{NaCl} + 31,16c_{NaCl} \cdot RSV - 4,50c_{NaCl}^2 \quad (5.5)$$

Die Regressionskoeffizienten β_0 , β_{pH_E} , $\beta_{c_{NaCl}}$ und die Bestimmtheitsmaße R^2 und R_{adj}^2 variieren je Rohstoff (Tabelle 5.5). Im Vergleich zu den Modellen für EA sind die Werte für die Bestimmtheitsmaße der Gl. (5.5) kleiner, was eine schlechtere Anpassung der Gleichungen an die ermittelten Daten widerspiegelt. Im Gegensatz zur Ermittlung von EA , ist die Anzahl einwirkender Parameter bei der Zielgröße PGA größer und somit die

Versuchsanzahl zur Bestimmung von *PGA* vermutlich zu gering. Dies konnte bei der Validierung in Kapitel 5.2.3 bestätigt werden, bei der die vorhergesagten Werte für *PGA* von den experimentell ermittelten Daten stark abwichen (Tabelle 5.6), obwohl diese im Vertrauensbereich lagen. Dennoch kann das Modell (Gl. (5.5)) Tendenzen aufzeigen, die im nachfolgenden erläutert werden.

So zeigen die Konturplots der Ackerbohne und Lupine (Bild 5.6), dass für beide Saaten *PGA* von über 26 % realisierbar sind, allerdings bei völlig unterschiedlichem pH_E . Während bei Verwendung der Ackerbohne (Bild 5.6a) ein hoher pH-Wert von 6,5 zur Maximierung der Ausbeute eingestellt werden sollte, liegt das Maximum für *PGA* bei der Lupine bei einem pH_E von 5,0 (Bild 5.6b)). Beide Maxima befinden sich am Rand des untersuchten pH-Bereiches, der allerdings aus den in Kapitel 6.1.1 genannten Gründen nicht erweitert werden kann. Alkalische Bedingungen können zu Denaturierung der Proteine, Racemisierung der Aminosäuren, Bildung von Lysinoalanin, Reduktion der Verdaulichkeit sowie Reduktion des Anteils an essentiellen Aminosäuren führen [56, 59, 84, 102, 111, 122]. Hinzu kommt, dass bei einem pH_E von 7,0 und 9,0 als auch $< 5,5$ in anderen Studien nahezu keine Proteinmasse isoliert werden konnte [25, 50, 82, 84, 122].

Das Intervall für die Salzkonzentration ist hingegen ausreichend, wobei die maximale *PGA* für Ackerbohne und Lupine jeweils bei mittleren Konzentrationen von 0,3 - 0,5 mol·L⁻¹ lag. Die Unterschiede in den Parametereinstellungen ergeben sich zum größten Teil aus den unterschiedlichen Proteinfraktionen der verwendeten Rohware.

Für eine genauere Interpretation, Prognose und Diskussion sollte das Modell durch weitere Versuche ergänzt werden. An dieser Stelle wurde die Erweiterung des Versuchsplans nicht durchgeführt, da die Texturqualitäten der Proteinisolate deutliche Unterschiede aufwiesen, was die Entscheidung für einen Rohstoff bereits möglich machte (Kapitel 5.2.4).

6.2.3 Isolatqualität unterschiedlicher Körnerleguminosen

Die Ergebnisse zur Qualitätsüberprüfung zeigen deutliche Unterschiede zwischen den hergestellten Isolate aus verschiedenen Saaten (Kapitel 5.2.4). Lediglich die Proteinisolate der vollfetten und entölten Lupine wurden mit 1 bewertet, während alle anderen die Note 3 oder im Falle der weißen Bohne die Note 4 erreichten. Nur die Isolate der Lupine haben eine angenehm glatte, cremige Textur und weisen somit ein sehr hohes Potential für den Einsatz als pflanzliches Fettsubstitut auf. Alle anderen Isolate - selbst die der Sojabohne,

trotz der Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung zur Lupine - zeigten eine gallertartige, wässrige und weniger cremige Struktur.

Diese unterschiedliche Textur kann nicht auf ein Vorhandensein von Stärke zurückgeführt werden, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass bezogen auf die TS in den Isolaten der Ackerbohne, Erbse, Lupine und Soja keine Stärke enthalten ist. BHATTY et al zeigten ebenfalls, dass die Proteinisolate der Erbse (*Pisum sativum* L), Bohne (*Vicia faba* L. spp. minor) und Linse (*Lens culinaris* L. cv. Medik.) nahezu frei von Stärke und Zucker sind [23].

Ausschlaggebend ist vermutlich die Proteinzusammensetzung der Körnerleguminosen. Bei einer Extraktion mit Salz gehen vor allem die Globuline in Lösung, deren Gehalt mit ~90 % in Sojabohne und Lupine höher ist als bei Erbse und Ackerbohne mit ~60 - 66 % [69]. Die unterschiedlichen Mengen an Globulinen in der Saat könnten lediglich Ausbeuteunterschiede, nicht jedoch Texturunterschiede erklären, zumal die Sojabohne einen ebenso hohen Globulinanteil wie die Lupine besitzt. Die Globulineinheit selbst besteht wiederum aus verschiedenen Untereinheiten, welche je nach Saat unterschiedliche Bezeichnungen (Kapitel 2.2.2), allerdings denselben Sedimentationskoeffizienten von 7 und 11 S haben. Diese sind Vicilin (7 S) und Legumin (11°S) bei der Ackerbohne und Erbse bzw. β -Conglutin (7 S) und α -Conglutin (11 S) für die Lupine. Der wesentliche Unterschied besteht im Verhältnis dieser beiden Proteinfractionen zueinander [69]. Während bei der Sojabohne und Lupine das Verhältnis 7 S:11 S 1,6:1 bzw. 1,3:1 beträgt, ist das Vicilin:Legumin-Verhältnis bei Erbse und Ackerbohne ca. 1:2 [38, 46, 69, 151, 186, 200]. Somit besitzt die Lupine den größten Anteil an vicilinartigen β -Conglutin (7 S). Da Vicilin im Wesentlichen für die Bildung der Mizellenstruktur und somit vermutlich für das fettähnliche Mundgefühl des Proteinisolats verantwortlich ist, erklärt sich die besonders cremige Textur des Lupinenproteinisolats [83]. Dabei ist unbedeutend, ob die Lupinensaat vorher entölt wurde, da beide Proben (Bild 5.7c) und d)) diese charakteristische Konsistenz aufwiesen.

6.2.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung des Rohstoffvergleichs

Für eine spätere Implementierung des Prozesses in den industriellen Maßstab ist der zu verwendende Rohstoff für die Herstellung eines Fettsubstituts von zentraler Bedeutung. Die verwendete Rohware hat einen hohen Einfluss auf die Ausbeuten und Qualität der Proteinisolate. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen zeigten lediglich Ackerbohne,

Erbse, Sojabohne und Lupine ausreichend hohe Proteinausbeuten. Allerdings unterschieden sich die Texturen der Proteinisolate deutlich, wobei ausschließlich mit der Lupinensaat eine angenehm glatte und vor allem cremige Textur des Proteinisolats erzielt werden konnte. Die vergleichsweise große Menge einer 7 S-Proteinfraktion scheint verantwortlich für die besonderen textuellen Eigenschaften des Lupinenproteinisolats zu sein. Somit wurde *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor als Rohstoff für die Herstellung eines Fettsubstituts festgelegt.

6.3 Finale Prozessoptimierung

Mit den ermittelten Faktoren pH_E , c_{NaCl} , RSV , pH_F , EWV , t_S und t_Z (Kapitel 6.1.3) wurde die Prozessoptimierung mit Hilfe eines FC-CCD durchgeführt (Tabelle 9.6). Dazu wurden aufgrund der Ergebnisse des Rohstoffvergleichs (Kapitel 6.2) vollfette Flocken der Saat *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor verwendet. Als Zielgrößen wurden EA (Gl. (5.6)), PGA (Gl. (5.7)) und die Qualität der Isolattextur (Gl. (5.8)) ermittelt.

6.3.1 EA in Abhängigkeit signifikanter Faktoren

Mittels ANOVA und Regressionsanalyse wurde erneut ein Modell generiert, dass die Abhängigkeit der Zielgröße EA (Gl. (5.6)) von den Extraktionsparametern pH_E , RSV und c_{NaCl} und deren 2FWW untereinander widerspiegelt (Kapitel 5.3.1).

$$EA = 57,34 + 6,80x_{pH_E} - 5,04x_{RSV} + 3,79x_{c_{NaCl}} - 4,95x_{pH_E}x_{c_{NaCl}} - 3,86x_{RSV}x_{c_{NaCl}} \quad (5.6)$$

EA bei variierenden pH_E und c_{NaCl}

Die Gleichung zeigt, dass die Löslichkeit der Lupinenproteine entscheidend von den beiden Parametern pH_E und c_{NaCl} abhängig ist, was die bisherigen Ergebnisse wie auch die anderer Studien bestätigt [42, 45, 50, 70, 97, 159]. Die Koeffizienten verdeutlichen, dass insbesondere pH_E aber auch c_{NaCl} und deren 2FWW einen großen quantitativen Einfluss auf EA ausüben. Dabei wurde für pH_E - wie auch im *Screening* - ein Randmaximum bei 7 ermittelt. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes wäre nun zu überprüfen, ist jedoch aus den in Kapitel 2.3 genannten Gründen nicht praktikabel [56, 59, 84, 102, 111, 122]. Im Gegensatz dazu wurde für c_{NaCl} ein ausreichend großer Versuchsraum gewählt.

Wie bereits erwähnt, besteht Lupinenprotein zum großen Teil aus Globulin und Albumin, welche im Wesentlichen aus Asparagin- und Glutaminsäure bestehen [50, 103, 106-108]. Bei der Zugabe von NaOH könnten die Carboxyl- und Amino-Gruppen mit den

eingebrachten Hydroxidionen reagieren, was vermutlich die elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen oder innerhalb der Proteinmoleküle zu Gunsten sich abstoßender Ladungen verändert [83, 116]. Eine NaCl-Zugabe in geringen Mengen führt ebenfalls zu Ladungs- und Strukturänderungen durch Wechselwirkungen der Salzionen mit der Globulinfraktion [11, 66, 113]. Es könnten direkte Ionen-Bindungen und somit eine Veränderung der Nettoladung und/oder eine gesteigerte Hydratisierung durch Anbindung von Kationen am polaren Proteinteil der Globulinmoleküle entstehen [11, 113, 116, 154]. Deswegen führt beides - eine pH-Erhöhung als auch Salz-Zugabe (in geringen Mengen) - zu einer verbesserten Proteinlöslichkeit.

EA bei variierenden RSV und c_{NaCl}

Wird bei einer Extraktion ein höherer Anteil an Lösungsmittel verwendet, so kann bis zum Konzentrationsausgleich eine größere Stoffmenge in Lösung gehen (FICK'schen Gesetz). Ein im Vergleich zur Feststoffmenge hoher Lösungsmittelanteil ist demnach effektiver, was bei der Prozessoptimierung durch eine bessere EA bei steigendem RSV bestätigt werden konnte (Bild 5.9b)) [4, 40, 88, 101, 105, 135, 153, 159, 160, 167].

Dies widerspricht den Ergebnissen des *Screening* und Rohstoffvergleich, was durch eine veränderte Partikelgröße des verwendeten Rohstoffes erklärbar sein könnte [165]. Beim *Screening* und Rohstoffvergleich wurden Lupinenflocken (Ø10 mm) verwendet. Da sich während der Arbeit zeigte, dass Schrot der Saat *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor aufgrund der vergrößerten Oberfläche zu einer verbesserten Ausbeute führt ohne die einfache Prozessführung nachteilig zu beeinflussen, wurde bei der finalen Prozessoptimierung Lupinenschrot (Ø0,001 - 0,2 mm) verwendet. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine Partikelgröße von 0,13 - 1,43 mm die Diffusion begünstigen kann, jedoch hätte es beim Batch-Verfahren auch zur verstärkten Zusammenlagerung der Schrotpartikel, zu Verstopfungen von Rohr- und Schlauchleitungen im industriellen Maßstab und somit zur schlechtern Ausbeute führen können [5, 159, 165].

Dennoch ist die Änderung der Partikelgröße des Rohstoffes im Rahmen der Prozessoptimierung durchaus möglich, da *Screening*, Rohstoffvergleich und die finalen Untersuchungen geschlossene, von den anderen Experimenten unabhängige Versuchsreihen sind. D. h. der systematische Fehler wird von der Berechnung der Faktoreffekte getrennt [171].

Dabei konnte nun festgestellt werden, dass ein hoher Lösungsmittelanteil effektiver ist. Bei Verwendung von Lupinenschrot tritt im untersuchten Bereich vermutlich kein Aussalzeffekt, wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben, statt. Es können vermehrt Proteine in Lösung gehen, da die Wegstrecke für das Lösungsmittel in das Rohstoffpartikel und auch für den Transport der Proteinmoleküle aus dem Zellinneren verkürzt ist (Kapitel 2.3.1). Eine höhere Anzahl von Salzionen bei großem RSV trifft demnach auf eine höhere, zur Verfügung stehende Proteinmenge [4, 5].

6.3.2 PGA in Abhängigkeit signifikanter Faktoren

Im Vergleich zur EA (Gl. (5.6)) wird das Modell für die PGA (Gl. (5.7)) von deutlich mehr Faktoren und Faktorwechselwirkungen signifikant beeinflusst.

$$\begin{aligned} \sqrt{PGA} = & 5,69 + 0,54x_{pH_E} - 0,017x_{RSV} - 0,71x_{c_{NaCl}} + 0,29x_{t_Z} - 0,51x_{pH_F} + 0,34x_{t_S} \\ & - 0,34x_{E_{WV}} - 0,90x_{pH_E} x_{c_{NaCl}} - 0,32x_{RSV} x_{t_Z} \\ & - 0,57x_{c_{NaCl}} x_{pH_F} - 0,77x_{c_{NaCl}} x_{E_{WV}} - 1,30x_{t_S}^2 \end{aligned} \quad (5.7)$$

PGA bei variierenden pH_E und c_{NaCl}

Die Regressionsgleichung bzw. die darin enthaltenen Koeffizienten machen deutlich, dass erneut die 2FWW zwischen pH_E und c_{NaCl} einen signifikanten Einfluss auf die PGA ausüben. Dies entspricht den Ergebnissen, die bei den *Screening*-Versuchen ermittelt werden konnten. Dabei widersprechen sich die Parametereinstellungen zur Maximierung von EA und PGA . Während in Bild 5.2a) und Bild 5.8a) bei niedrigem pH_E von 5,5 eine signifikant höhere EA durch Salzzugabe erzielt werden konnte, macht die Höhe der Salzkonzentration bei $pH_E = 5,5$ für PGA keinen Unterschied. Ganz im Gegenteil, bei $pH_E = 7,0$ ist sogar ein niedriger Salzgehalt ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) von Vorteil (Bild 5.3b) und Bild 5.9a)). Somit sind - wie bereits vermutet (Kapitel 6.1.4) - für eine maximale EA andere Faktorstufen zu bevorzugen, als zur Maximierung der PGA .

Ursache sind die unterschiedlichen Ziele der Extraktion und Fällung. Beim Extraktionsvorgang sollen möglichst viele Proteine in Lösung gebracht werden, wobei eine im untersuchten Bereich hohe Salzkonzentration förderlich ist [32, 33, 50, 64, 66, 67, 113, 128]. Bei der Fällung sollen Proteine in Wechselwirkung treten und aggregieren, wozu die Ionenstärke wiederum reduziert werden muss [50, 82, 83, 128, 204]. Letzteres scheint von derart großer Wichtigkeit zu sein, dass in den Gleichungen für die PGA (Gl. (5.2) und (5.7)) die c_{NaCl} letztlich im Unterschied zu den Regressionsgleichungen für die EA (Gl.

(5.1) und (5.6)) mit negativen Regressionskoeffizienten aufgeführt sind. Welche Einstellungen dieser Parameter nun zu bevorzugen sind, hängt von der jeweiligen Zielstellung ab und wird mit der Funktion D in Kapitel 5.3.6 für unterschiedliche Zielvorgaben dargestellt.

PGA bei variierenden pH_F und c_{NaCl}

Bei näherer Betrachtung des pH-Wertes bei der Fällung zeigt sich, dass eine Senkung des pH-Wertes im untersuchten Bereich auf 5 bei hoher Salzkonzentration zu bevorzugen ist (Bild 5.9b)). Niedrige pH-Werte induzieren eine Proteinfällung durch Reduktion der Nettoladung von Proteinen, welche dadurch in Wechselwirkung treten und Aggregate bilden [205]. Die Proteinlöslichkeit der Lupinenproteine hat ein Minimum bei pH-Werten zwischen 4,0 und 5,0, wobei LQARI et al. (2002) und EL-ADAWY et al. (2001) diesen Bereich auf 4,3 - 4,9 weiter eingrenzen konnten [25, 50, 108, 159]. Hier handelt es sich allerdings um isoelektrische Fällungsbedingungen, die zur Herstellung eines mizellaren Proteinisolats aufgrund reduzierter Ausbeute sowie veränderte Isolatqualität nicht geeignet sind [19, 50, 84].

Bei kleinen c_{NaCl} ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sind bei pH-Werten zwischen 5,0 und 5,9 stets große Ausbeuten möglich. Die Reduktion der Ionenstärke ist – wie bereits beschrieben - von entscheidender Bedeutung für die Mizellenbildung und Textur des Isolats [50, 82, 83, 126]. Auch hier gilt es, die optimalen Einstellungen dieser Parameter mit der Funktion D in Kapitel 5.3.6 für unterschiedliche Zielvorgaben zu betrachten.

PGA bei variierenden EWV und c_{NaCl}

Die zur Verdünnung des Extraktes verwendete Wassermenge entscheidet über die Reduktion der Salzkonzentration und Ionenstärke, weshalb die c_{NaCl} auch in WW mit EWV ermittelt wurde (Gl. (5.7)). Während bei $c_{NaCl} = 1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eine möglichst große Wassermenge zugeführt werden sollte ($EWV = 1:5$), ist bei $c_{NaCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mit geringerer Wassermenge ($EWV = 1:2$) sogar eine um 10,5 % höhere Ausbeute möglich. Bei niedriger c_{NaCl} kann somit eine geringe Wassermenge zur Fällung der Proteine zugegeben werden, was zudem zahlreiche wirtschaftliche und ökologische Vorteile mit sich bringt.

PGA bei variierenden t_Z und RSV

Je größer RSV und somit die Menge an Fällungsgemisch desto länger dauert die Separation von fester und flüssiger Phase (Bild 5.10b)). Sind die Proteine von einer größeren Lösungsmittelmenge umgeben, haben die einzelnen Proteinmoleküle und -aggregate eine längere Wegstrecke zurückzulegen, um zu sedimentieren und gegenseitig in Wechselwirkung zu treten. Zudem verändert sich die Dichte und somit die Viskosität des Mediums. Nach dem Gesetz von STOKES wird dadurch das Zentrifugations- und Sedimentationsverhalten der Proteinaggregate beeinflusst.

Da sich bisher abzeichnet, dass ein geringes RSV eventuell bei Verwendung der Lupinensaat einstellbar ist, besteht aber die Möglichkeit t_Z auf kleiner Stufe einzustellen und somit eine Zeitersparnis zu erzielen.

6.3.3 Validierung der Modelle

Mit Hilfe der Versuchsreihe in Tabelle 5.9 wurden die ermittelten Modelle (5.5), (5.6) und (5.7) validiert. Für EA war das Prognose-Bestimmtheitsmaß sehr niedrig ($R_{pred}^2 = 0,27$), d.h. der Zusammenhang zwischen der abhängigen und unabhängigen Variablen ist mit diesem Modell schlecht darstellbar und eine Vorhersage durch diese Gleichung ist kaum möglich. Allerdings konnte bei der Validierung eine Abweichung der berechneten von den experimentell ermittelten Werten von maximal 12,8 % festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass Modell (5.5) im Bereich hoher pH-Werte ($pH_E = 6,0 - 7,0$) durchaus seine Gültigkeit hat und lediglich den niedrigen pH-Bereich nicht abbilden kann. Bei der Validierung wurden nur pH-Werte zwischen 6 und 7 überprüft und somit sind die geringen Abweichungen der experimentellen von den Prognose-Werten gering. Bei der Modellierung führte somit die schlechte Approximation im niedrigen pH-Bereich ($pH_E < 6,0$) zu einem kleinem R_{pred}^2 .

Bei Modell (5.6) für die Beschreibung der PGA wichen die experimentellen Werte trotz des vergleichsweise hohen R_{pred}^2 von 0,69 bis zu 30,8 % von den vorhergesagten Ergebnissen ab. Dies ist vermutlich auf die höhere Faktorenzahl zurückzuführen, die das Modell für PGA - im Unterschied zu EA - beeinflusst. Dadurch können weitere Fehler eingetragen worden sein. Da dennoch alle experimentell ermittelten Werte (Tabelle 5.9) sich innerhalb des 99 %-igen Vertrauensbereichs des jeweiligen Modells befinden, konnte mit den Gleichungen (5.6) und (5.7) die Polyoptimierung durchgeführt werden.

6.3.4 Polyoptimierung

Es wurden zwei Polyoptimierungen mit unterschiedlichen Zielstellungen durchgeführt. Zunächst galt es die *PGA* bei sehr guter Isolatqualität zu maximieren, wohingegen im zweiten Schritt festgelegt wurde, dass c_{NaCl} , t_Z und t_S sowie das *RSV* und *EWV* minimiert werden sollten. Dies ist im Hinblick auf eine spätere Implementierung des Prozesses in den industriellen Maßstab von wesentlicher Bedeutung. Als industriell praktikabel und umsetzbar erwies sich die Extraktion von Schrot der vollfetten Lupine bei einem pH-Wert von 7 und einer Salzkonzentration von $0,14 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in einem *RSV* von 1:9. Bei der anschließenden Fällung sollte der pH-Wert des Extraktes auf 5,9 eingestellt und in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt werden. Nach 22-minütiger Sedimentation und 10-minütiger Zentrifugation konnte im Labor schließlich eine *PGA* von 42 % bei sehr guter Isolatqualität erzielt werden. D.h. mit dieser optimierten Parameterkonstellation kann die maximal mögliche *PGA* realisiert werden, die im Vergleich zum Standard-Prozess (Bild 4.1) verdoppelt wurde. Dabei wurde die Salzkonzentration um 76 %, der Wasserverbrauch während der Extraktion um 13 % und während der Verdünnungsfällung um 33 % verringert sowie die Sedimentationszeit um 98 % verkürzt.

6.3.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung der Prozessoptimierung

Für jede der untersuchten Zielgrößen (*EA*, *PGA* und *visTex*) konnte ein Regressionsmodell mit den jeweiligen signifikanten Einflussfaktoren generiert werden. Für die *PGA*, welche letztlich neben der Isolatqualität die entscheidende Zielgröße darstellt, wurde erneut pH_E , c_{NaCl} , *RSV*, pH_F , *EWV*, t_Z und t_S als signifikante Faktoren bestätigt. Nach erfolgreicher Validierung dieser Modelle konnte schließlich die Polyoptimierung folgen. Dabei galt es die *PGA* bei sehr guter Isolatqualität zu maximieren. Im Hinblick auf eine spätere Implementierung des Prozesses in den industriellen Maßstab und den daraus folgenden ökologischen und ökonomischen Anforderungen wurde in einem zweiten Schritt festgelegt, dass c_{NaCl} , t_Z und t_S sowie das *RSV* und *EWV* minimiert werden sollen. Die damit errechnete Parameterkonstellation (Bild 6.3) wurde im Labor überprüft und eine *PGA* von 42 % sowie eine sehr gute und fettähnliche Isolatqualität erzielt. D. h. im Vergleich zum Standard-Prozess (Bild 4.1) konnte die Ausbeute verdoppelt werden. Außerdem konnte die Salzkonzentration um 76 %, der Wasserverbrauch während der Extraktion um 12,5 % und während der Verdünnungsfällung um 33,3 % verringert sowie

die Sedimentationszeit um 98 % verkürzt werden. Der Prozess zur Herstellung eines proteinbasierten Fettsubstituts aus Lupinen wurde somit erfolgreich optimiert. Die Voraussetzungen für nachfolgende Umsetzungsentscheidungen sind damit geschaffen.

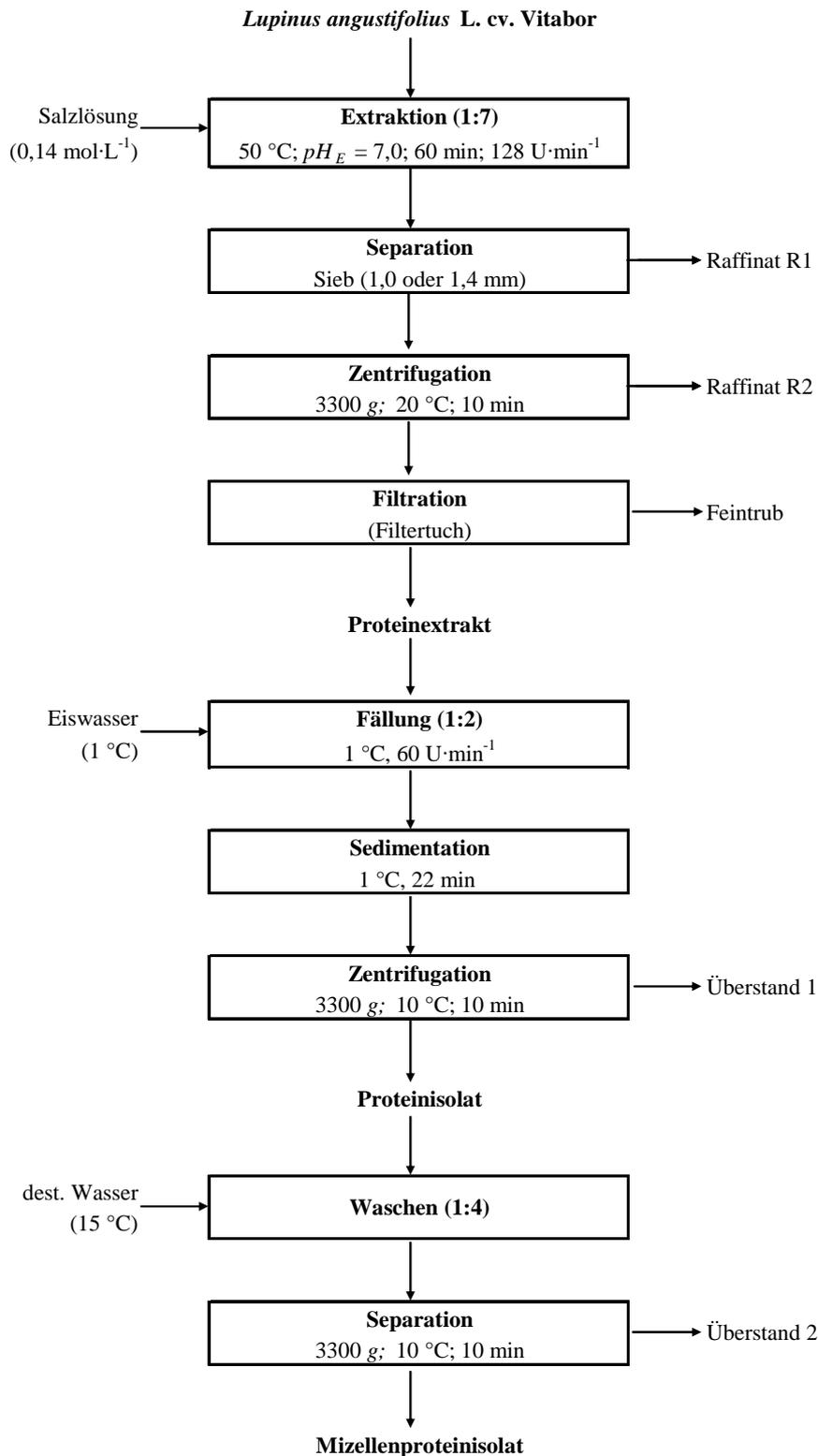


Bild 6.3: Fließschema des optimierten Prozesses zur Herstellung des Mizellenproteinisolats

7 Zusammenfassung

Übergewicht und insbesondere dessen Folgeerkrankungen gehören weltweit zu den zentralen ernährungsbedingten Gesundheitsproblemen und belasten unser Gesundheitssystem mit gewaltigen Kosten, welche nach Schätzungen von Experten bei 11 Milliarden Euro jährlich liegen. Bei der Prävention und Bekämpfung von Übergewicht und den damit verbundenen Gesundheitsrisiken können fettreduzierte Lebensmittel einen wertvollen Beitrag leisten. Zur Produktion fettreduzierter Lebensmittel werden meist energiearme Zutaten eingesetzt, welche die Funktion von Fett im Lebensmittel simulieren sollen. Jedoch konnten sich bislang Fettsubstitute, insbesondere Austauschstoffe auf Proteinbasis, aufgrund der hohen Herstellungskosten sowie dem verminderten Genusswert der damit hergestellten Produkte industriell nicht durchsetzen. Deswegen ist die Herstellung pflanzlicher Fettsubstitute auf Basis von Proteinen - auch im Hinblick höherer Versorgungssicherheit - von überaus hohem Interesse sowohl in der wissenschaftlichen Forschung als auch in der Lebensmittelindustrie.

Ein für Lupinen entwickeltes und vergleichsweise einfaches Verfahren zur Proteinisolierung liefert ein cremiges, fettähnliches Isolat, welches bereits erfolgreich als Fettaus-tauscher in einzelnen Lebensmitteln angewandt wurde. Die Herstellung besteht aus einer Salzextraktion mit anschließender Verdünnungsfällung; ein Verfahren, das bereits in anderen Studien am Beispiel von Körnerleguminosen beschrieben wurde. Eine systematische, statistisch unterlegte Prozessoptimierung fehlt jedoch bislang gänzlich, obwohl dies eine zwingend notwendige Grundlage für eine spätere Implementierung dieses Prozesses in den industriellen Maßstab darstellt. Deshalb wurde im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens am Beispiel von *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor die Gewinnung eines Proteinisolats mit fettähnlichen Eigenschaften unter Verwendung einer geeigneten statistischen Versuchsplanung optimiert.

In einem ersten Abschnitt wurden zunächst umfangreiche *Screening*-Versuche durchgeführt, um die signifikanten Einflussgrößen des Prozesses zu ermitteln. Dazu wurden einige Einflussfaktoren (Salzkonzentration c_{NaCl} während der Extraktion und Einleitgeschwindigkeit während der Fällung) einer Voruntersuchung unterzogen, um das *Screening* mit einer angemessenen Faktorenanzahl durchzuführen sowie den Prozess gegebenenfalls zu vereinfachen. Die Voruntersuchungen zeigten, dass die Einleit-

geschwindigkeit keinen wesentlichen Einfluss auf das Prozessergebnis hat, die c_{NaCl} des Extraktionsmittels jedoch erheblich die weitere Prozessgestaltung beeinflusst. Nachfolgend wurde der Einfluss der Extraktions- (c_{NaCl} , pH_E , t_E , RSV , T_E) und Fällungsparameter (pH_F , EWV , ΔT , Zentrifugen- (t_Z) und Sedimentationszeit (t_S)) auf die EA und PGA sowie die Isolatqualität ($visTex$) mit Hilfe eines fraktioniert faktoriellen Versuchsplans und anschließendem *Fold-over* untersucht.

Für die Zielgrößen EA , PGA und $visTex$ sind insgesamt letztlich c_{NaCl} , pH_E , t_E , RSV , T_E , pH_F , ΔT , EWV und t_Z als signifikante Faktoren bestimmt worden. Drei dieser Parameter (t_E , T_E und ΔT) wurden bei den weiteren Untersuchungen konstant eingestellt, um die finale Prozessoptimierung mit einer angemessenen und sinnvollen Faktorenanzahl durchzuführen. Außerdem wurde t_S mit in die finale Prozessoptimierung aufgenommen, obwohl dieser Faktor bei keiner Zielgröße als signifikante Größe identifiziert worden ist. Jedoch wurde t_S zwischen 120 und 1080 min variiert und aus ökonomischen und arbeitstechnischen Gründen galt es zu überprüfen, ob eine weitere Reduktion der Sedimentationszeit (< 120 min) möglich ist.

In einem zweiten Abschnitt wurden weitere Körnerleguminosen (Soja, Ackerbohne, Erbse, Linse und weiße Bohne sowie entölte und vollfette Lupinenflocken) zur Herstellung eines proteinbasierten Fettsubstituts miteinander verglichen. Um den Prozess für jeden einzelnen Rohstoff anzupassen, wurden simultan drei Extraktionsparameter (pH_E , c_{NaCl} und RSV) variiert. Die Auswirkungen auf EA und PGA sowie auf die Qualität der Isolattextur wurden mit Hilfe eines D-optimalen Versuchsplans untersucht. Ziel war es, weitere Leguminosen für die Gewinnung des fettähnlichen Proteinisolats in ausreichender Menge zu finden. Durch Verwendung eines D-optimalen Plans konnte für jeden einzelnen Rohstoff ein Regressionsmodell ermittelt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Rohware einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeuten und Qualität der Proteinisolate hat. Lediglich mit der Ackerbohne, Erbse, Sojabohne und Lupine konnten ausreichend hohe Proteinausbeuten erzielt werden. Allerdings unterschieden sich die Texturen der Proteinisolate deutlich, wobei ausschließlich mit der Lupinensaat eine angenehm glatte und vor allem cremige Textur des Proteinisolats erzielt werden konnte. Somit wurde *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor als Rohstoff für die Herstellung eines Fettsubstituts und finalen Prozessoptimierung festgelegt.

Im dritten Abschnitt wurde mit den signifikanten Faktoren pH_E , c_{NaCl} , RSV , pH_F , EWV , t_Z und t_S die Prozessoptimierung durchgeführt. Dazu wurden aufgrund der Ergebnisse des Rohstoffvergleichs die Saat *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor verwendet und die Auswirkungen auf EA , PGA sowie der Isolatqualität mit Hilfe eines FC-CCD untersucht. Es bestätigte sich dabei die Signifikanz der Parameter in Bezug auf PGA . Dabei konnte für jeden Zielgröße (EA , PGA und $visTex$) ein Regressionsmodell generiert werden, wobei sich die Signifikanz aller sieben Parameter in Bezug auf PGA bestätigte. Nach erfolgreicher Validierung dieser Modelle konnte schließlich die Polyoptimierung unter Anwendung der *Desirability*-Funktion folgen. Dabei galt es die PGA bei sehr guter fettähnlicher Isolatqualität zu maximieren. Im Hinblick auf eine spätere Implementierung des Prozesses in den industriellen Maßstab und den daraus folgenden ökologischen und ökonomischen Anforderungen wurde in einem zweiten Schritt festgelegt, dass c_{NaCl} , t_Z und t_S sowie das RSV und EWV minimiert werden sollen. Die damit errechnete Parameterkonstellation ($pH_E = 7,0$, $pH_F = 5,9$, $c_{NaCl} = 0,14 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $RSV = 1:7$, $EWV = 1:2$, $t_S = 22,0 \text{ min}$ und $t_Z = 10,0 \text{ min}$) wurde im Labor überprüft und eine PGA von 42 % sowie eine sehr gute Isolatqualität erzielt. Im Vergleich zum Standard-Prozess konnte die Ausbeute somit verdoppelt werden. Außerdem konnte die Salzkonzentration um 76 %, der Wasserverbrauch während der Extraktion um 13 % und während der Verdünnungsfällung um 33 % verringert sowie die Sedimentationszeit um 98 % verkürzt werden.

Der Prozess zur Herstellung eines fettähnlichen Proteinisolats aus *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor konnte somit erfolgreich optimiert werden. Damit liefert diese Arbeit den zwingend erforderlichen Beitrag auf dem Gebiet der Herstellung pflanzlicher Fettsubstitute auf Basis von Proteinen. Die gewonnen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Herstellung dieses Fettsubstituts im industriellen Maßstab. Die Maßstabübertragung und die damit verbundene Prozessanpassung, Anlagenkonzeption und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung sollte Gegenstand von weitergehenden Forschungsarbeiten sein. Dabei sollte die fettähnliche Textur des Proteinisolats gewährleistet bleiben, wozu die Entwicklung einer messtechnischen, beispielsweise rheologischen Methode, zur quantitativen Erfassung des cremigen Eindrucks von sehr großer Bedeutung für Industrie und Wissenschaft wäre.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Abdel-Aal, E.-S. M., Shehata, A. A., El-Mahdy, A. R., et al.: Extractability and functional properties of some legume proteins isolated by three different methods. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37 (1986), S. 553-559
- [2] Aggarwal, A. M., Camilleri, M., Phillips, S. F., et al.: Olestra, a nondigestible, nonabsorbable fat. In: *Digestive Diseases and Sciences*, 38 (1993), Nr. 6, S. 1009-1014
- [3] Aguilera, J. M.: Development of processes and uses of lupins for foods. In: *World congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs*, Singapur: 1988
- [4] Aguilera, J. M.: Solid-Liquid Extraction, In: Tzia, C. und Liadakis, G.: *Extraction Optimization in Food Engineering*, New York: Marcel Dekker, Inc., 2003, S. 35-55
- [5] Aguilera, J. M. und Garcia, H. D.: Protein extraction from lupin seeds: a mathematical model. In: *International Journal of Food Science and Technology*, 24 (1989), Nr. 1, S. 17-27
- [6] Alamanou, S., Bloukas, J. G., Paneras, E. D., et al.: Influence of protein isolate from lupin seeds (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*) on processing and quality characteristics of frankfurters. In: *Meat Science*, 42 (1996), Nr. 1, S. 79-93
- [7] Alamanou, S. und Doxastakis, G.: Physico-chemical properties of lupin seed proteins (*Lupinus albus*, ssp. *Graecus*). In: *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28 (1995), Nr. 6, S. 641-643
- [8] Alamprese, C., Datei, L. und Semeraro, Q.: Optimization of processing parameters of a ball mill refiner for chocolate. In: *Journal of Food Engineering*, 83 (2007), Nr. 4, S. 629-636
- [9] Anderson, M. J. und Whitcomb, P. J.: *RSM Simplified - Optimizing Processes - Using Response Surface Methods for Design of Experiments*, New York: Productivity Press, 2004
- [10] AOAC: Method 968.06. Protein (crude) in animal feed., In: AOAC: *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, Washington DC, 1990
- [11] Arakawa, T. und Timasheff, S. N.: Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. In: *Biochemistry*, 23 (1984), Nr. 25, S. 5912-5923
- [12] Archer, B. J., Johnson, S. K., Devereux, H. M., et al.: Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. In: *The British journal of nutrition*, 91 (2004), S. 591-599
- [13] Arntfield, S. D., Murray, E. D. und Ismond, M. A.: Effect of salt on the thermal stability of storage proteins from fababean (*Vicia Faba*). In: *Journal of food science*, 51 (1986), Nr. 2, S. 371-377
- [14] Arozarena, I., Bertholo, H., Empis, J., et al.: Study of the total replacement of egg by white lupine protein, emulsifiers and xanthan gum in yellow cakes. In: *European Food Research and Technology*, 213 (2001), S. 312-316
- [15] Ash, M. und Dohlmann, E.: *Oil crops situation and outlook yearbook*, Electronic outlook report from the economic research service, Departement of Agriculture, Market and Trade Economic division, 2005. http://www.agmrc.org/media/cms/ocs2005_557D6F958C2AD.pdf (03.02.2011)

- [16] Asher, Y. J., Mollard, M. A., Thomson, S., et al.: *Whey protein product: method for its production and use thereof in foods.*, WO/1992/020239, 1992
- [17] Baltes, W.: *Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Berlin: Springer, 2007
- [18] Barbosa, A. C. L., Lajolo, F. M. und Genovese, M. I.: Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. In: *Food Chemistry*, 98 (2006), Nr. 4, S. 757-766
- [19] Barker, L. D., Barker, L. R. J., Green, B. E., et al.: *Continuous process for production of oil seed protein isolate*, US 7625588 B2, 2008
- [20] Barker, L. D., Barker, L. R. J., Martens, R. W., et al.: *Production of oil seed protein isolate*, US 7687087 B2, 2010
- [21] Bas, D. und Boyaci, I. H.: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. In: *Journal of Food Engineering*, 78 (2007), Nr. 3, S. 836-845
- [22] Bez, J., Schott, M. und Seger, A.: Application of lupin protein ingredients in muffin, biscuit and extruded snacks. In: *Healthy Pro-Food: 2005*
- [23] Bhatt, R. S. und Christison, G. I.: Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates. In: *Plant foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 34 (1984), S. 41-51
- [24] Blundell, J. E. und MacDiarmid, J. I.: Fat as a Risk Factor for Overconsumption: Satiation, Satiety, and Patterns of Eating. In: *Journal of the American Dietetic Association*, 97 (1997), Nr. 7, Supplement 1, S. 63-69
- [25] Boye, J., Zare, F. und Pletch, A.: Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. In: *Food Research International*, 43 (2010), Nr. 2, S. 414-431
- [26] Bray, G. A. und Popkin, B. M.: Dietary fat intake does affect obesity! In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (1998), S. 1157-1173
- [27] Brown, C. R. T., Norton, I. T. und Wilding, P.: *Protein product*, EP 0352144 A1, 1990
- [28] Chakraborty, P., Sosulski, F. und Bose, A.: Ultracentrifugation of salt-soluble proteins in ten legume species. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30 (1979), Nr. 8, S. 766-771
- [29] Cheftel, J. C. und Dumay, E.: Microcoagulation of proteins for development of "creaminess". In: *Food Reviews International*, 9 (1993), Nr. 4, S. 473-502
- [30] Chen, W., Henry, G. A., Gaud, S. M., et al.: *Microfragmented ionic polysaccharide/protein complex dispersions*, US 5104674, 1992
- [31] Chew, P. G., Casey, A. J. und Johnson, S. K.: Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. In: *Food Chemistry*, 83 (2003), Nr. 4, S. 575-583
- [32] Cohn, E. J.: The physical chemistry of the proteins. In: *Physiological reviews*, 5 (1925), S. 349-437
- [33] Cohn, E. J. und Edsall, J. T.: *Proteins, amino acids and peptides and dipolar ions.*, New York: Reinhold Publishing Co., 1943
- [34] Constandache, M.: The influence of fortification of bread with exogenous proteins on the protein digestibility. In: *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, XIII (2007), Nr. 2, S. 461-466
- [35] D'Agostina, A., Antonioni, C., Resta, D., et al.: Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties

- and minimum thermal damage. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006), S. 92-98
- [36] de Boer, J., Helms, M. und Aiking, H.: Protein consumption and sustainability: Diet diversity in EU-15. In: *Ecological Economics*, 59 (2006), Nr. 3, S. 267-274
- [37] Deak, N. und Johnson, L.: Effects of Extraction Temperature and Preservation Method on Functionality of Soy Protein. In: *Journal of the American oil chemists' society*, 84 (2007), Nr. 3, S. 259-268
- [38] Derbyshire, E., Wright, D. J. und Boulter, D.: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. In: *Phytochemistry*, 15 (1976), Nr. 1, S. 3-24
- [39] Dervas, G., Doxastakis, G., Hadjisavva-Zinoviadi, S., et al.: Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. In: *Food Chemistry*, 66 (1999), Nr. 1, S. 67-73
- [40] Dev, D. K., Quensel, E. und Hansen, R.: Nitrogen extractability and buffer capacity of defatted linseed (*Linum usitatissimum* L.) flour. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37 (1986), Nr. 2, S. 199-205
- [41] DGE: *Ernährungsbericht*, Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE), mit Förderung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. DGE-Medienservice, 2004
- [42] Doxastakis, G.: Lupin seed proteins. In: *Developments in food science*, 41 (2000), S. 7-38
- [43] Doxastakis, G., Papageorgiou, M., Mandalou, D., et al.: Technological properties and non-enzymatic browning of white lupin protein enriched spaghetti. In: *Food Chemistry*, 101 (2007), Nr. 1, S. 57-64
- [44] Drakos, A., Doxastakis, G. und Kiosseoglou, V.: Functional effects of lupin proteins in comminuted meat and emulsion gels. In: *Food Chemistry*, 100 (2007), Nr. 2, S. 650-655
- [45] Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., et al.: The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. In: *Trends in Food Science & Technology*, 19 (2008), Nr. 12, S. 624-633
- [46] Duranti, M., Restani, P., Poniatowska, M., et al.: The seed globulins of *Lupinus albus*. In: *Phytochemistry*, 20 (1981), Nr. 9, S. 2071-2076
- [47] Eckardt, T., Haag, F. und Dieterich, R.: Der Einfluss von Wuchstyp, Saatzeitpunkt und Saatstärke auf den Kornertrag von Blauen Süßlupinen (*Lupinus angustifolius*), In: Wink, M.: *Lupinen 2001 Ergebnisse aus Forschung, Anbau und Verwertung*, Dossenheim: Romneya-Verlag Dr. Coralie Wink, 2002
- [48] Egbert, W. R.: Isolated soy protein: technology, properties and applications., In: KeShun, L.: *Soybeans as functional foods and ingredients.*, Champaign, Illinois: AOCS Press, 1997, S. 145-173
- [49] Eisner, P., Müller, K., Knauf, U., et al.: *Method for producing a vegetable protein ingredient for ice cream and ice cream containing said protein ingredient*, WO/2006/076889, 2006
- [50] El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A., et al.: Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. In: *Food Chemistry*, 74 (2001), S. 455-462
- [51] El-Adawy, T. A. und Taha, K. M.: Characteristics and composition of different seed oils and flours. In: *Food Chemistry*, 74 (2001), Nr. 1, S. 47-54
- [52] Evans, A. J., Cheung, P. C.-K. und Cheetham, N. W. H.: The carbohydrate composition of cotyledons and hulls of cultivars of *Lupinus angustifolius* from

- Western Australia. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61 (1993), Nr. 2, S. 189-194
- [53] Evans, R. und Kerr, M.: Protein Isolation, Extraction and Precipitation of Nitrogenous Constituents of Dry Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11 (1963), Nr. 1, S. 26-29
- [54] FAO: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (06.09.2010)
- [55] Fechner, A., Schweiggert, U., Hasenkopf, K., et al.: Lupine Kernel Fiber: Metabolic Effects in Human Intervention Studies and Use as a Supplement in Wheat Bread, In: Victor, R. P., Ronald Ross, W. und Vinood, B. P.: *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*, San Diego: Academic Press, 2011, S. 463-473
- [56] Feeney, R. E.: Overview on the chemical deteriorative changes of proteins and their consequences: *Chemical Deterioration of Proteins*: American Chemical Society, 1980, S. 1-47
- [57] Fletcher, A.: *Lupin sector defends safety of its ingredient*, www.foodnavigator.com, 2006
- [58] Flick, B. J. und Pisani, J. P.: *Cottage cheese creaming mixture*, US 3506456, 1970
- [59] Friedmann, M.: Lysinoalanine in food and in antimicrobial proteins, In: Jackson, L. S.: *Impact of processing of food safety*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999
- [60] Frøst, M. B. und Janhøj, T.: Understanding creaminess. In: *International Dairy Journal*, 17 (2007), Nr. 11, S. 1298-1311
- [61] Fudiyansyah, N., Petterson, D. S., Bell, R. R., et al.: A nutritional, chemical and sensory evaluation of lupin (*L. angustifolius*) tempe. In: *International Journal of Food Science & Technology*, 30 (1995), Nr. 3, S. 297-305
- [62] Glencross, B. D.: *Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds*, In: *Department of Fisheries - Research Division: Grains Research Council (GRC)*, Australia: Department of Fisheries - Research Division, 2001
- [63] Glück, C. J., Streicher, P. A., Illig, E. K., et al.: Dietary fat substitutes. In: *Nutrition Research*, 14 (1994), Nr. 10, S. 1605-1619
- [64] Green, A. A.: Studies in the physical chemistry of the proteins. IX. The effect of electrolytes on the solubility of hemoglobin in solutions of varying hydrogen ion activity with a note on the comparable behaviour of casein. In: *Journal of Biological Chemistry*, 93 (1931), S. 517-542
- [65] Green, A. A.: Studies in the physical chemistry of the proteins. VIII. The solubility of hemoglobin in concentrated salt solutions: a study of the salting out of proteins. In: *Journal of Biological Chemistry*, 93 (1931), S. 495-516
- [66] Green, A. A.: Studies in the physical chemistry of the proteins. X. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentration. In: *Journal of Biological Chemistry*, 95 (1932), S. 47-66
- [67] Green, A. A.: Studies in the physical chemistry of the proteins. XII. The solubility of human hemoglobin in concentrated salt solutions. In: *Journal of Biological Chemistry*, 109 (1935), S. 631-634
- [68] Green, B. E., Milanova, R. und Logie, J.: *Process for preparation of flax protein isolate*, US 7842330 B2, 2010

- [69] Gueguen, J.: Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. In: *Plant foods for human nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 32 (1983), S. 267-303
- [70] Gueguen, J., Cerletti, P. und Hudson, B. J.: Proteins of some legume seeds: soyabean, pea, fababean and lupin, In: Hudson, B. J.: *New and developing sources of food proteins*, London: Chapman and Hall, 1994, S. 145-193
- [71] Güémes-Vera, N., Pena-Bautista, R. J., Jiménez-Martínez, C., et al.: Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (2008), S. 1135-1143
- [72] Gutierrez, D., Conde, A., Duran, S., et al.: Contact urticaria form lupin. In: *Contact Dermatitis*, 36 (1997), Nr. 6, S. 311-311
- [73] Haag, F.: 10 Jahre Züchtung Blauer Süßlupinen in der Saatzucht Steinach, Station Bornhof, In: Wink, M.: *Lupinen 2001 Ergebnisse aus Forschung, Anbau und Verwertung*, Dossenheim: Romneya-Verlag Dr. Coralie Wink, 2002
- [74] Hanelt, P.: *Die Lupinen - Zur Botanik und Geschichte landwirtschaftlich wichtiger Lupinenarten*, Wittenberg Lutherstadt DDR: A. Ziemsen Verlag, 1960
- [75] Hefle, S. L., Lemanske, R. F. und Bush, R. K.: Adverse reaction to lupine-fortified pasta. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94 (1994), Nr. 2, Part 1, S. 167-172
- [76] Heynes, J. T. und Vakaleris, D. G.: *Preparation of a low fat cream cheese product*, US 3929892, 1975
- [77] Hiersig, H. M.: *Lexikon Produktionstechnik, Verfahrenstechnik*, Düsseldorf: VDI-Verlag GmbH, 1995
- [78] Hieta, N., Hasan, T., Mäkinen-Kiljunen, S., et al.: Lupin allergy and lupin sensitization among patients with suspected food allergy. In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 103 (2009), Nr. 3, S. 233-237
- [79] Hoffmann, W. und Buchheim, W.: Fettaustauschstoffe auf Proteinbasis, In: Warwel, S. und Weber, N.: *Fettersatzstoffe, Fettaustauschstoffe, Designer-Lipide*, Münster-Hiltrup: Landwirtschaftsverlag, 1999
- [80] Hondelmann, W.: *Die Lupine, Geschichte und Evolution einer Kulturpflanze*, Braunschweig: Selbstverlag der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, 1996
- [81] Hudson, B. J. F., Fleetwood, J. G. und Zand-Moghaddam, A.: Lupinus species as new oilseed crops. In: *Actes Congr. Mond. - Soc. Int. Etude Corps Gras, 13th, Symp. 9* (1976), S. 61-67
- [82] Ismond, M. A., Georgiou, C., Arntfield, S. D., et al.: Role of noncovalent forces in micellization using legumin from *Vicia faba* as a study system. In: *Journal of Food Science*, 55 (1990), S. 1638-1642
- [83] Ismond, M. A. H., Murray, E. D. und Arntfield, S. D.: The role of non-covalent forces in micelle formation by vicilin from *Vicia faba*. II. The effect of stabilizing and destabilizing anions on protein interactions. In: *Food Chemistry*, 21 (1986), S. 27-46
- [84] Ismond, M. A. H., Murray, E. D. und Arntfield, S. D.: The role of non-covalent forces in micelle formation by vicilin from *Vicia faba*. The effect of pH variations on protein interactions. In: *Food Chemistry*, 20 (1986), S. 305-318
- [85] James, C.: *BRIEF 37 Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007*, In: *ISAAA Briefs*, Ithaca, NY: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2007

- [86] Johnson, S. K., McQuillan, P. L., Sin, J. H., et al.: Sensory acceptability of white bread with added Australian sweet lupin *Lupinus angustifolius* kernel fibre and its glycaemic and insulinaemic responses when eaten as a breakfast. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (2003), Nr. 13, S. 1366-1372
- [87] Kessler, H. G.: *Destillieren - Extrahieren - Hochdruckextraktion*, Nachdruck der vierten überarbeiteten und erweiterten Auflage, München Verlag A. Kessler, 2006
- [88] Khedr, M. A. und Mohamed, S. S.: Ternary diagram of extract proteins solvent systems: Sesame, soybean and lupine proteins. In: *Grasas Y Aceites*, 55 (2004), Nr. 3, S. 242-250
- [89] Kilcast, D. und Clegg, S.: Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure. In: *Food Quality and Preference*, 13 (2002), S. 609-623
- [90] Kingwell, R.: *Extracting value from protein variation in lupins*, Fisheries, Western Australia: Department of Fisheries, 2005
- [91] Kiosseoglou, A., Doxastakis, G., Alevisopoulos, S., et al.: Physical characterization of thermally induced networks of lupin protein isolates prepared by isoelectric precipitation and dialysis. In: *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (1999), Nr. 3, S. 253-263
- [92] Kleppmann, W.: *Taschenbuch Versuchsplanung - Produkte und Prozesse optimieren*: Carl Hanser Verlag München Wien, 2008
- [93] Kulling, S.: *Fettaustauschstoffe und Fettersatzstoffe*, Römpp - Die ganze Welt der Chemie, Georg Thieme Verlag, 2005. <http://www.roempp.com/prod/> (2005)
- [94] Kunz, B.: *Lexikon der Lebensmitteltechnologie*, Berlin: Springer Verlag, 1993
- [95] Kunz, B.: *Grundlagen der Lebensmittelbiotechnologie*, Hamburg: Behr's Verlag, 2006
- [96] Kyprianou, M.: Commission Directive 2006/142/EC. In: *Official Journal of the European Union*, (2006)
- [97] Lampart-Szczapa, E.: Preparation of protein from lupine seeds. In: *Nahrung*, 40 (1996), Nr. 2, S. 71-74
- [98] Lásztity, R., Khalil, M. M., Haraszi, R., et al.: Isolation, functional properties and potential use of protein preparations from lupin. In: *Nahrung/Food*, 45 (2001), Nr. 6, S. 396-398
- [99] Lemaux, P. G.: Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part II). In: *Annual Review of Plant Biology*, 60 (2009), S. 511-559
- [100] Leveille, G. A. und Finley, J. W.: Macronutrient Substitutes. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 819 (1997), Nr. 1, S. 11-21
- [101] Liadakis, G. N., Tzia, C., Orepoulou, V., et al.: Protein Isolation from Tomato Seed Meal, Extraction Optimization. In: *Journal of Food Science*, 60 (1995), Nr. 3, S. 477-482
- [102] Liener, I. E.: Implications of antinutritional components in soybean foods. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31 (1994), Nr. 1, S. 31-67
- [103] Lilley, G. G.: Isolation of conglutin d, a sulfur-rich protein from the seeds of *Lupinus angustifolius* L. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37 (1986), Nr. 1, S. 20-30
- [104] Lindvik, H., Holden, L., Løvik, M., et al.: Lupin sensitization and clinical allergy in food allergic children in Norway. In: *Acta Pædiatrica*, 97 (2008), Nr. 1, S. 91-95
- [105] Liu, K.: *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*, New York: Springer US, 1997

- [106] Lqari, H., Pedroche, J., Giron-Calle, J., et al.: Purification and partial characterization of storage proteins in *Lupinus angustifolius* seeds. In: *Grasas y Aceites*, 55 (2004), S. 364-369
- [107] Lqari, H., Pedroche, J., Girón-Calle, J., et al.: Interaction of *Lupinus angustifolius* L. [alpha] and [gamma] conglutins with 13-hydroperoxide-11,9-octadecadienoic acid. In: *Food Chemistry*, 80 (2003), Nr. 4, S. 517-523
- [108] Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., et al.: *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. In: *Food Chemistry*, 76 (2002), Nr. 3, S. 349-356
- [109] Lucca, P. A. und Tepper, B. J.: Fat replacers and the functionality of fat in foods. In: *Trends in Food Science & Technology*, 5 (1994), Nr. 1, S. 12-19
- [110] Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., et al.: Experimental design and optimization. In: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42 (1998), Nr. 1-2, S. 3-40
- [111] Maga, J. A.: Lysinoalanine in foods. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (1984), Nr. 5, S. 955-964
- [112] Mattes, R. D.: Position of the American Dietetic Association: Fat Replacers. In: *Journal of the American Dietetic Association*, 98 (1998), Nr. 4, S. 463-468
- [113] Maurer, R. W., Sandler, S. I. und Lenhoff, A. M.: Salting-in characteristics of globular proteins. In: *Biophysical Chemistry*, 156 (2011), Nr. 1, S. 72-78
- [114] Mavrakis, C., Doxastakis, G. und Kiosseoglou, V.: Large deformation properties of gels and model comminuted meat products containing lupin protein. In: *Journal of Food Science*, 68 (2003), Nr. 4, S. 1371-1376
- [115] Mazza, G. und Biliaderis, C. G.: Functional Properties of Flax Seed Mucilage. In: *Journal of Food Science*, 54 (1989), Nr. 5, S. 1302-1305
- [116] Melander, W. und Horváth, C.: Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183 (1977), Nr. 1, S. 200-215
- [117] Miller, M. S.: Proteins as Fat Substitutes, In: Hettiarachchy, N. S. und Ziegler, G. R.: *Protein Functionality in Food Systems*, Chicago: Marcel Dekker, Inc., 1994
- [118] Miraglio, A. M.: Nutrient substitutes and their energy values in fat substitutes and replacers. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62 (1995), Nr. 11, S. 1175-1184
- [119] Mizubuti, I. Y., Biondo Júnior, O., de Oliveira Souza, L. W., et al.: Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. In: *Food Chemistry*, 70 (2000), Nr. 2, S. 259-265
- [120] Mleko, S. und Achremowicz, B.: Obtaining a fat substitute by microcoagulation of a whey protein isolate and whey protein concentrate. In: *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 5/46 (1996), Nr. 3, S. 13-24
- [121] Moses, V.: Biotechnology products and European consumers. In: *Biotechnology Advances*, 17 (1999), S. 647-678
- [122] Moure, A., Sineiro, J., Dominguez, H., et al.: Functionality of oilseed protein products: A review. In: *Food Research International*, 39 (2006), Nr. 9, S. 945-963
- [123] MRI: *Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht Teil 1*, Karlsruhe: Max Ruber-Institut (MRI) - Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel mit Förderung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2008
- [124] Mubarak, A. E.: Chemical, nutritional and sensory properties of bread supplemented with lupin seed *Lupinus albus* products. In: *Nahrung/Food*, 45 (2001), Nr. 4, S. 241-245

- [125] Murray, E. D., Maurice, T. J., Barker, L. D., et al.: *Process for isolation of proteins using food grade salt solutions at specified pH and ionic strength*, Canada 4208323, 1980
- [126] Murray, E. D., Myers, C. D. und Barker, L. D.: *Protein product and process for preparing same*, Canada 4169090, 1979
- [127] Murray, E. D., Myers, C. D. und Barker, L. D.: *Protein isolate product*, Canada 4285862, 1981
- [128] Murray, E. D., Myers, C. D., Barker, L. D., et al.: Functional attributes of proteins - a noncovalent approach to processing and utilizing plant proteins, In: Stanley, D., Murray, E. D. und Lees, D. H.: *Utilization of Protein Resources*, Westport, Connecticut: Food & Nutrition Press, 1981, S. 158-176
- [129] Muschiolik, G. und Schmandke, H.: *Funktionelle Eigenschaften von Ackerbohnenprodukten (Vicia faba)*, Aachen: Shaker Verlag, 2000
- [130] Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., et al.: Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. In: *Food Chemistry*, 67 (1999), Nr. 4, S. 435-443
- [131] Myers, R. H., Montgomery, D. C. und Anderson-Cook, C. M.: *Response Surface Methodology. Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 3. Auflage, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008
- [132] Nawar, W. W.: Lipids, In: Fennema, O.: *Food Chemistry*, New York: Marcel Dekker, 1996, S. 225-320
- [133] Oberender, P. und Zerth, J.: Adipositas aus gesundheitsökonomischer Sicht: Herausforderung für das Gesundheitssystem. In: *Pharmazie in unserer Zeit*, 35 (2006), Nr. 6, S. 536-541
- [134] Oomah, B. D. und Bushuk, W.: Characterization of Lupine Proteins. In: *Journal of Food Science*, 48 (1983), Nr. 1, S. 38-41
- [135] Oomah, B. D., Mazza, G. und Cui, W.: Optimization of protein extraction from flaxseed meal. In: *Food Research International*, 27 (1994), Nr. 4, S. 355-361
- [136] Paddon-Jones, D., Westman, E., Mattes, R. D., et al.: Protein, weight management, and satiety. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (2008), Nr. 5, S. 1558-1561
- [137] Paquin, P.: Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. In: *International Dairy Journal*, 9 (1999), Nr. 3-6, S. 329-335
- [138] Paredes-López, O.: Safflower proteins for food use., In: Hudson, B.: *Development in food proteins.*, London and New York: Elsevier Science Publishers Ltd., 1991, S. 1-34
- [139] Paredes-López, O. und Ordorica-Falomir, C.: Production of safflower protein isolates: composition, yield and protein quality. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37 (1986), S. 1097-1103
- [140] Petterson, D. S.: Composition and food uses of lupins, In: Gladstones, J. S., Atkins, C. und Hamblin, J.: *Lupins as crop Plant: Biology, Production and Utilization*: Wallingford: CAB International, 1998
- [141] Petterson, D. S.: The use of lupins in feeding systems - review. In: *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16 (2000), Nr. 6, S. 861-882
- [142] Petterson, D. S. und Colin, W.: Lupin: Overview: *Encyclopedia of Grain Science*, Oxford: Elsevier, 2004, S. 166-174

- [143] Pickardt, C., Neidhart, S., Griesbach, C., et al.: Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. In: *Food Hydrocolloids*, 23 (2009), Nr. 7, S. 1966-1973
- [144] Pimentel, D. und Pimentel, M.: Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. In: *American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (2003), Nr. 3, S. 660-663
- [145] Pollard, N. J., Stoddard, F. L., Popineau, Y., et al.: Lupin Flours as Additives: Dough Mixing, Breadmaking, Emulsifying, and Foaming. In: *Cereal Chem*, 79 (1983), Nr. 5, S. 662-669
- [146] Popello, I. A., Suchkov, V. V., Grinberg, V. Y., et al.: Liquid/liquid phase equilibrium in the globulin/salt/water systems. Vicilin. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54 (1991), Nr. 2, S. 239-244
- [147] Prince, C. D. M. und Welschenbach, L. M. A.: Olestra: A New Food Additive. In: *Journal of the American Dietetic Association*, 98 (1998), Nr. 5, S. 565-569
- [148] Queguiner, C., Dumay, E., Salou-Cavalier, C., et al.: Microcoagulation of a whey protein isolate by extrusion cooking at acid pH. In: *Journal of Food Science*, 57 (1992), Nr. 3, S. 609-616
- [149] Rahma, E. H., Dudek, S., Mothes, R., et al.: Physicochemical characterisation of mung bean (*Phaseolus aureus*) protein isolates. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000), S. 477-483
- [150] Reinhard, H., Rupp, H., Sager, F., et al.: Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. In: *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006), Nr. 1-2, S. 353-360
- [151] Restani, P., Duranti, M., Cerletti, P., et al.: Subunit composition of the seed globulins of *Lupinus albus*. In: *Phytochemistry*, 20 (1981), Nr. 9, S. 2077-2083
- [152] Richardson, N. J., Booth, D. A. und Stanley, N. L.: Effect of homogenization and fat content on oral perception of low and high viscosity model creams In: *Journal of Sensory Studies*, 8 (1993), Nr. 2, S. 133-143
- [153] Rivas, R. N., Dench, J. E. und Caygill, J. C.: Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32 (1981), Nr. 6, S. 565-571
- [154] Robinson, D. R. und Jencks, W. P.: The Effect of Concentrated Salt Solutions on the Activity Coefficient of Acetyltetraglycine Ethyl Ester. In: *Journal of the American Chemical Society*, 87 (1965), Nr. 11, S. 2470-2479
- [155] Rodriguez-Ambriz, S. L., Martinez-Ayala, A. L., Millan, F., et al.: Composition and Functional Properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates. In: *Plant foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 60 (2005), Nr. 3, S. 99-107
- [156] Roller, S. und Jones, S. A.: *Handbook of Fat Replacers*, Florida: CRC Press, 1996
- [157] Römer, P.: *Lupinen, Verwertung und Anbau*, Gesellschaft zur Förderung der Lupine e. V., 2007.
<http://www.masf.brandenburg.de/sixcms/media.php/4055/lupine07.pdf>
(16.10.2010)
- [158] Röhlein, B.: *Nachhaltige Nahrung*, Gesundheit, 2010.
http://www.fraunhofer.de/Images/weiter-vorn_4-10_54_tcm7-64485.pdf
(03.02.2011)
- [159] Ruiz, L. P. und Hove, E. L.: Conditions affecting production of a protein isolate from lupine seed kernels. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27 (1976), Nr. 7, S. 667-674

- [160] Rustom, I. Y. S., Ópez-Leiva, M. H. und Nair, B. M.: Optimization of extraction of peanut proteins with water by response surface methodology. In: *Journal of Food Science*, 56 (1991), Nr. 6, S. 1660-1663
- [161] Sanchez, C. und Paquin, P.: Food proteins and their applications, In: Damodaran, S. und Paraf, A.: *Protein and protein-polysaccharide microparticles*, New York: Marcel Dekker Inc., 1997, S. 503-527
- [162] Schneider, R.: Relevanz und Kosten der Adipositas in Deutschland. In: *Ernährungs-Umschau*, 43 (1996), S. 369-374
- [163] Schweiggert, U., Lanig, K., Eisner, P., et al.: *Entwicklung ballaststoffangereicherter Backwaren mit Cholesterin senkendem Potential*, In: *Symposium of Functional Food*, Kiel: 2009
- [164] Schwenke, K. D., Dudek, S., Seifert, A., et al.: Isolation of faba bean legumin - a comparative study of various methods. In: *Food/Nahrung*, 38 (1994), Nr. 6, S. 559-567
- [165] Schwister, K.: *Taschenbuch der Verfahrenstechnik*: Fachbuchverlag Leipzig, 2000
- [166] Schyver, T. und Smith, C.: Reported Attitudes and Beliefs toward Soy Food Consumption of Soy Consumers versus Nonconsumers in Natural Foods or Mainstream Grocery Stores. In: *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 37 (2006), Nr. 6, S. 292-299
- [167] Sefa-Dedeh, S. und Stanley, D.: Cowpea proteins. 1. Use of response surface methodology in predicting cowpea (*Vigna unguiculata*) protein extractability. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27 (1979), Nr. 6, S. 1238-1243
- [168] Setser, C. S. und Racette, W. L.: Macromolecule Replacers in Food Products. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1992), Nr. 2, S. 275-297
- [169] Shaw, J., Roberts, G., Grimshaw, K., et al.: Lupin allergy in peanut-allergic children and teenagers. In: *Allergy*, 63 (2008), S. 99-105
- [170] Shih, Y. C., Prausnitz, J. M. und Blanch, H. W.: Some characteristics of protein precipitation by salts. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 40 (1992), S. 1155-1164
- [171] Siebertz, K., van Bebber, D. und Hochkirchen, T.: *Statistische Versuchsplanung*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010
- [172] Singer, N. S.: Microparticulated Proteins as Fat Mimetics, In: Roller, S. und Jones, S. A.: *Handbook of Fat Replacers*, Florida: CRC Press, 1996
- [173] Singer, N. S. und Dunn, J. M.: Protein microparticulation: The principle and the process. In: *Journal of the American College of Nutrition*, 9 (1990), S. 388-397
- [174] Singer, N. S., Moser, R. H. und Altschul, A. M.: Microparticulated proteins as fat substitutes: *Low-Calorie Foods Handbook*, New York, 1993, S. 171-178
- [175] Singhal, R. S., Gupta, A. K. und Kulkarni, P. R.: Low-calorie fat substitutes. In: *Trends in Food Science & Technology*, 2 (1991), S. 241-244
- [176] Sipsas, S.: Lupin products - concepts and reality. In: *"Lupins for health and wealth" 12th International lupin conference*, Australia: 2008
- [177] Sipsas, S. und Glencross, B.: *Implications of variability amongst Lupin cultivars in processing*, Fremantle, Western Australia: Department of Fisheries, 2005
- [178] Sironi, E., Seesa, F. und Duranit, M.: A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. In: *European Food Research and Technology*, 221 (2005), S. 145-150
- [179] Smith, R. E., Finley, J. W. und Leveille, G. A.: Overview of SALATRIM: A family of low-calorie fats. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994), Nr. 2, S. 432-434

- [180] Stieß, I. und Hayn, D.: *Ernährungsstile im Alltag - Ergebnisse einer repräsentativen Untersuchung*, Diskussionspapier Nr. 5, 2005
- [181] Sussmann, D., Pickardt, C., Schweiggert, U., et al.: Influence of different processing parameters on the isolation of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) protein isolates: a preliminary study. In: *Journal of Food Process Engineering*, in Press (2011)
- [182] Taha, F. S., Mohamed, S. S. und El-Nockrashy, A. S.: The use of soya bean, sunflower and lupine seeds in the preparation of protein bases for nutritious beverages. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37 (1986), Nr. 12, S. 1209-1216
- [183] Tanford, C.: *Physical Chemistry of Macromolecules*, New York: Wiley, 1960
- [184] Tanford, C.: Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphiles. In: *Journal of Molecular Biology*, 67 (1972), S. 59-74
- [185] Tanford, C.: *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, New York: John Wiley and Sons, 1973
- [186] Thanh, H. und Shibasaki, K.: Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25 (1976), Nr. 6, S. 1117-1121
- [187] Tolstoguzov, V.: Some thermodynamic considerations in food formulation. In: *Food Hydrocolloids*, 17 (2003), Nr. 1, S. 1-23
- [188] Tolstoguzov, V.: Thermodynamic considerations of starch functionality in foods. In: *Carbohydrate Polymers*, 51 (2003), Nr. 1, S. 99-111
- [189] Tolstoguzov, V. B.: Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. In: *Food Hydrocolloids*, 4 (1991), Nr. 6, S. 429-468
- [190] Torres, A., Frias, J., Granito, M., et al.: Chemical, biological and sensory evaluation of pasta products supplemented with alpha-galactoside-free lupin flours. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (2007), Nr. 1, S. 74-81
- [191] Tyler, R. T., Youngs, C. G. und Sosulski, F. W.: Air Classification of Legumes. I. Separation Efficiency, Yield, and Composition of the Starch and Protein Fractions. In: *Cereal Chemistry*, 58 (1981), Nr. 2, S. 144-148
- [192] Vanderveen, J. E. und Glinsmann, W. H.: Fat substitutes: a regulatory perspective. In: *Annual Review Nutrition* 12 (1992), S. 473-487
- [193] von Sengbusch, R.: *Süßlupinen und Öllupinen. Die Entstehungsgeschichte einiger neuer Kulturpflanzen.*, Berlin: Verlag Paul Parey, 1942
- [194] Wang, C. R. und Zayas, J. F.: Water retention and solubility of soy proteins and corn germ proteins in a model system. In: *Journal of Food Science*, 56 (1991), Nr. 2, S. 455-458
- [195] Wappis, J. und Jung, B.: *Taschenbuch Null-Fehler-Management*, 2. Auflage, München: Carl Hanser Verlag, 2008
- [196] Weissmann, E. und Weissmann, S.: Allergenität von Lupinenprodukten, In: Wink, M.: *Lupinen 2001 Ergebnisse aus Forschung, Anbau und Verwertung*, Dossenheim: Romneya-Verlag Dr. Coralie Wink, 2002
- [197] Westphal, G., Gerber, G. und Lipke, B.: *Proteine - nutritive und funktionelle Eigenschaften*, New York: Springer, 2003
- [198] WHO: *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*, In: *WHO Technical report*, Geneva: WHO (World Health Organization), 2000
- [199] Wittig de Penna, E., Avendano, P., Soto, D., et al.: Chemical and sensory characterization of cakes enriched with dietary fiber and micronutrients for the elderly. In: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53 (2003), S. 74-83

- [200] Wright, D. J. und Boulter, D.: A comparison of acid extracted globulin fractions and vicilin and legumin of *Vicia faba*. In: *Phytochemistry*, 12 (1973), Nr. 1, S. 79-84
- [201] Wüthrich, B.: Anaphylactic reaction to lupine flour because of a primary sensitization. In: *Allergy*, 63 (2008), S. 476-477
- [202] Wüthrich, B., Mittag, B. und Ballmer-Weber, B.: Die Pizza: eine Quelle von unerwarteten Allergenen – anaphylaktische Reaktion auf Lupinenmehl im Pizzateig und in einem Lebkuchen. In: *Allergologie*, 27 (2004), S. 495-502
- [203] Xu, L. und Diosady, L. L.: Proteins from plant materials, In: Tzia, C. und Liadakis, G.: *Extraction Optimization in Food Engineering*: Marcel Dekker Inc., 2003, S. 217-234
- [204] Zacherl, C., Eisner, P., Pickardt, C., et al.: *Highly concentrated plant protein preparation and method for producing the same*, WO2008/000213 A2, 2008
- [205] Zayas, J. F.: *Functionality of proteins in food*, Berlin, Heidelberg und New York: Springer, 1997
- [206] Zunft, H. J. F. und Ragotzky, K.: Strategien zur Fettsubstitution in Lebensmitteln. In: *Fett/Lipid*, 99 (1997), Nr. 6, S. 204-213

9 Anhang

Tabelle 9.1: Verdünnungsreihe der Kalibriergeraden für die Biuret Methode

Proteinkonzentra- tion c_p /mg·mL ⁻¹	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
Wasser /mL	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
Kalibrierlösung /mL	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,00

Tabelle 9.2: Fraktioniert faktorieller Versuchsplan zum *Screening* in der Reihenfolge der Versuchsdurchführung

RUN ¹	pH _E	RSV ²	c_{NaCl} /mol L ⁻¹	T_E /°C	t_E /min	EWV ²	ΔT /K	pH _F	t_Z /min	t_S /min
1	7,0	1:7	0,7	10	100	1:2	20	7,0	60	120
2	5,5	1:7	0,1	10	100	1:5	0	7,0	10	120
3	7,0	1:7	0,1	50	60	1:2	0	5,5	10	120
4	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
5	5,5	1:13	0,1	50	60	1:5	0	5,5	10	1080
6	5,5	1:13	0,1	10	100	1:2	0	5,5	60	120
7	5,5	1:7	0,7	50	100	1:2	20	5,5	10	120
8	5,5	1:13	0,7	50	60	1:5	0	7,0	60	120
9	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
10	5,5	1:13	0,7	10	60	1:2	20	5,5	10	1080
11	7,0	1:13	0,7	10	60	1:5	0	5,5	10	120
12	5,5	1:13	0,7	10	100	1:5	20	7,0	60	1080
13	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
14	7,0	1:7	0,1	10	100	1:2	20	5,5	10	1080
15	7,0	1:13	0,7	50	100	1:2	0	7,0	10	1080
16	7,0	1:7	0,7	50	100	1:5	0	5,5	60	1080
17	7,0	1:13	0,7	50	60	1:2	20	5,5	60	1080
18	5,5	1:7	0,7	10	60	1:2	0	7,0	60	1080
19	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
20	5,5	1:7	0,1	10	60	1:5	20	5,5	60	120
21	5,5	1:7	0,1	50	100	1:2	20	7,0	60	1080
22	7,0	1:13	0,1	10	60	1:5	0	7,0	60	1080
23	5,5	1:13	0,1	10	60	1:2	20	7,0	10	120
24	7,0	1:13	0,1	50	100	1:5	20	5,5	10	120
25	7,0	1:7	0,7	50	60	1:5	20	7,0	10	1080
26	7,0	1:7	0,1	50	100	1:5	0	7,0	60	120
27	5,5	1:13	0,7	10	100	1:5	20	7,0	60	1080
28	5,5	1:7	0,1	10	60	1:5	20	5,5	60	120
29	5,5	1:13	0,1	50	60	1:5	0	5,5	10	1080
30	5,5	1:13	0,7	50	60	1:5	0	7,0	60	120
31	7,0	1:13	0,1	50	100	1:5	20	5,5	10	120
32	7,0	1:13	0,7	10	60	1:5	0	5,5	10	120
33	5,5	1:7	0,1	10	100	1:5	0	7,0	10	120
34	5,5	1:13	0,7	10	60	1:2	20	5,5	10	1080
35	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
36	7,0	1:7	0,7	50	100	1:5	0	5,5	60	1080

RUN ¹	pH_E	RSV ²	c_{NaCl} /mol L ⁻¹	T_E /°C	t_E /min	EWV ²	ΔT /K	pH_F	t_Z /min	t_S /min
37	5,5	1:7	0,7	10	60	1:2	0	7,0	60	1080
38	7,0	1:7	0,1	10	100	1:2	20	5,5	10	1080
39	7,0	1:13	0,7	50	100	1:2	0	7,0	10	1080
40	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
41	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
42	7,0	1:7	0,1	50	100	1:5	0	7,0	60	120
43	7,0	1:7	0,1	50	60	1:2	0	5,5	10	120
44	5,5	1:13	0,1	10	60	1:2	20	7,0	10	120
45	5,5	1:7	0,7	50	100	1:2	20	5,5	10	120
46	5,5	1:13	0,1	10	100	1:2	0	5,5	60	120
47	7,0	1:7	0,7	10	100	1:2	20	7,0	60	120
48	7,0	1:7	0,7	50	60	1:5	20	7,0	10	1080
49	7,0	1:13	0,7	50	60	1:2	20	5,5	60	1080
50	5,5	1:7	0,1	50	100	1:2	20	7,0	60	1080
51	6,3	1:9	0,4	30	80	1:0,7	10	6,3	35	600
52	7,0	1:13	0,1	10	60	1:5	0	7,0	60	1080

¹RUN: Versuchsnummer; ²RSV (Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis) und EWV (Extrakt-Wasser-Verhältnis) wurde bei der Verwendung der Software durch Verhältniszahlen approximiert: 1:7 mit 0,14; 1:9 mit 0,11 und 1:13 mit 0,08 bzw. 1:5 mit 0,2; 1:0,7 mit 0,7 und 1:2 mit 1

Tabelle 9.3: Vermengungsstruktur der signifikanten Faktoren und 2FWW der Zielgröße EA. Aufgrund des großen Umfangs der jeweiligen Vermengungsstruktur werden die Faktoren als Buchstaben dargestellt. Dabei ist $A = x_{pH_E}$, $B = x_{RSV}$, $C = x_{c_{NaCl}}$, $D = x_{T_E}$, $E = x_{t_E}$, $F = x_{E_{WV}}$, $G = x_{\Delta T}$, $H = x_{pH_F}$, $J = x_{t_Z}$ und $K = x_{t_S}$.

Faktor bzw. 2FWW	Vermengungsstruktur
A	ABE ABF ABG ABH ABK ACF ACG ACH ACJ ADH ADJ AEF AEG AEH AEK AFG AFH AGH AHJ AHK AJK BCD BCE BCF BCG BCH BCJ BDE BDF BDG BDH BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGK BHJ BHK BJK CDE CDH CDJ CDK CEF CEG CEH CEJ CFG CFH CFJ CGH CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DFG DFH DFK DGH DGK DHJ DHK DJK EFH EFK EGH EGJ EGK EHJ EHK EJK FGH FGJ FGK
C	ABE ABF ABG ABH ABJ ABK ACF ACG ACH ACJ ADH ADJ ADK AEF AEG AEH AEJ AEK AFG AFH AFJ AGH AGJ AHJ AHK AJK BCD BCE BCF BCG BCJ BDE BDF BDG BDH BDJ BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGJ BGK BHJ BJK CDE CDH CDJ CEF CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DEJ DFG DFH DFJ DFK DGH DGJ DGK DHJ DHK DJK EFJ EFK EGH EGJ EGK EHJ EJK FGH
D	ABE ABF ABG ABH ABK ACF ACG ACH ACJ ACK ADH ADJ AEF AEG AEH AEK AFG AFH AGH AHJ AHK AKJ BCD BCE BCF BCG BCH BCJ BDE BDF BDG BDH BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGK BHJ BHK BJK CDE CDH CDJ CEF CEG CEH CEJ CFG CFH CFJ CGH CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DFG DFH DFK DGH DGK DHJ DHK DJK EFH EFK EGH EGJ EGK EHJ EHK EJK FGH FGJ FGK
E	ABD ABE ABF ABH ABJ ABK ACF ACG ACH ACJ ADE ADF ADG ADH ADJ AEG AEH AEJ AEK AFG AFH AFJ AFK AGH AGJ AGK AHK AJK BCD BCE BCF BCH BCJ BCK BDE BDF BDH BDJ BEH BEJ BEK BFG BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CDH CDJ CEG CEH CEJ CEK CFG CFH CFJ CFK CGH CGJ CGK CHK CJK DEG DEH DEJ DFG DFH DFJ DFK DGH DGJ DGK DHK DJK
AC	BE BF BG BH BJ BK CF CG CH CJ DH DJ DK EF EG EH EJ EK FG FH FJ GH GJ HJ HK JK
AD	BE BF BG BH BK CF CG CH CJ CK DH DJ EF EG EH EK FG FH GH

Tabelle 9.4: Vermengungsstruktur der signifikanten Faktoren und 2FWW der Zielgröße *PGA*. Aufgrund des großen Umfangs der jeweiligen Vermengungsstruktur werden die Faktoren als Buchstaben dargestellt. Dabei ist $A = x_{pH_E}$, $B = x_{RSV}$, $C = x_{c_{NaCl}}$, $D = x_{T_E}$, $E = x_{t_E}$, $F = x_{E_{WV}}$, $G = x_{\Delta T}$, $H = x_{pH_F}$, $J = x_{t_Z}$ und $K = x_{t_S}$.

Faktor bzw. 2FWW	Vermengungsstruktur
A	ABC ABE ABF ABG ABH ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ADH ADJ AEF AEG AEH AEK AFG AFH AFK AGH AGK AHJ AHK AJK BCD BCE BCF BCG BCH BCJ BDF BDG BDH BDK BEH BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BGK BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CDH CDJ CDK CEF CEG CEH CEJ CFG CFH CFJ CGH CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DEK DFH DFK DGH DGK DHJ DHK DJK EFH EFJ EFK EGH EGJ
B	ABC ABD ABE ABF ABH ABJ ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ADE ADF ADG ADH ADJ AEG AEH AEJ AEK AFG AFJ AFK AGH AGJ AGK BCD BCE BCF BCH BCJ BCK BDE BDF BDH BDJ BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CEG CEH CEJ CEK CFG CFH CFK CGH CGJ CGK CHK CJK DEG DEH DEJ DEK DFG DFJ DFK DGH DGJ DGK DHK DJK EFG EFH EFJ EGH
C	ABC ABE ABF ABG ABH ABJ ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ADH ADJ ADK AEF AEG AEH AEJ AEK AFG AFH AFJ AFK AGH AGJ AGK AHJ AHK AJK BCD BCE BCF BCG BCJ BDE BDF BDG BDH BDJ BDK BEJ BFH BFJ BFK BGH BGJ BGK BHJ BJK CDE CDF CDG CDH CDJ CEF CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DEJ DEK DFG DFH DFJ DFK DGH DGJ DGK DHJ DHK DJK EFH
D	ABC ABE ABF ABG ABH ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ACK ADH ADJ AEF AEG AEH AEK AFG AFH AFK AGH AGK AHJ AHK AJK BCD BCE BCF BCG BCH BCJ BDF BDG BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BGK BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CDH CDJ CEF CEG CEH CEJ CFG CFH CFJ CGH CGJ CHJ CHK CJK DEF DEG DEH DEK DFH DFK DGH DGK DHJ DHK DJK EFH EFJ EFK EGH
E	ABC ABD ABE ABF ABH ABJ ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ADE ADF ADG ADH ADJ AEG AEH AEJ AEK AFG AFH AFJ AFK AGJ AGK BCD BCE BCF BCH BCJ BCK BDE BDF BDH BDJ BDK BEH BEJ BEK BFG BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CEG CEH CEJ CEK CFG CFH CFJ CFK CGH CGK CHK CJK DEG DEH DEJ

Faktor bzw. 2FWW	Vermengungsstruktur
G	DEK DFG DFH DFJ DFK DGJ DGK DHK DJK EFH EFJ EGH ABC ABD ABE ABF ABH ABJ ABK ACE ACF ACG ACH ACJ ADE ADF ADG ADH ADJ AEG AEH AEJ AEK AFG AFJ AFK AGJ AGK BCD BCE BCF BCH BCJ BCK BDE BDF BDH BDJ BDK BEF BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BHK BJK CDE CDF CDG CEG CEH CEJ CEK CFG CFH CFK CGH CGK CHK CJK DEG DEH DEJ DEK DFG DFJ DFK DGJ DGK DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI
H	ABC ABF ABG ABH ABK ACE ACF ACG ACJ ADH AEF AEG AEH AEK AFH AFK AGH AGK AJK BCD BCE BCF BCG BCJ BDF BDG BDH BDK BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BGK BHJ BJK CDE CDF CDG CDJ CEF CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK DEF DEG DEH DEK DFH DFK DGH DGK DJK EFH EFJ EFK EGH EGJ EGK EHI EJK FGK FHJ FJK GHJ GJK
AB	BD BE BF BH BJ BK CF CG CH CJ DE DF DG DH DJ EG EH EJ EK FG FH FJ FK GH GJ GK HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK FGH
AC	BE BF BG BH BJ BK CF CG CH CJ DH DJ DK EF EG EH EJ EK FG FH FJ GH GJ HJ HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK FGH FGJ
AD	BE BF BG BH BK CF CG CH CJ CK DH DJ EF EG EH EK FG FH GH HJ HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK FGH FGJ FGK FHJ FJK
AG	BD BE BF BH BJ BK CE CF CG CH CJ DE DF DG DH DJ EG EH EJ EK FG FH FJ FK GH GJ GK HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF

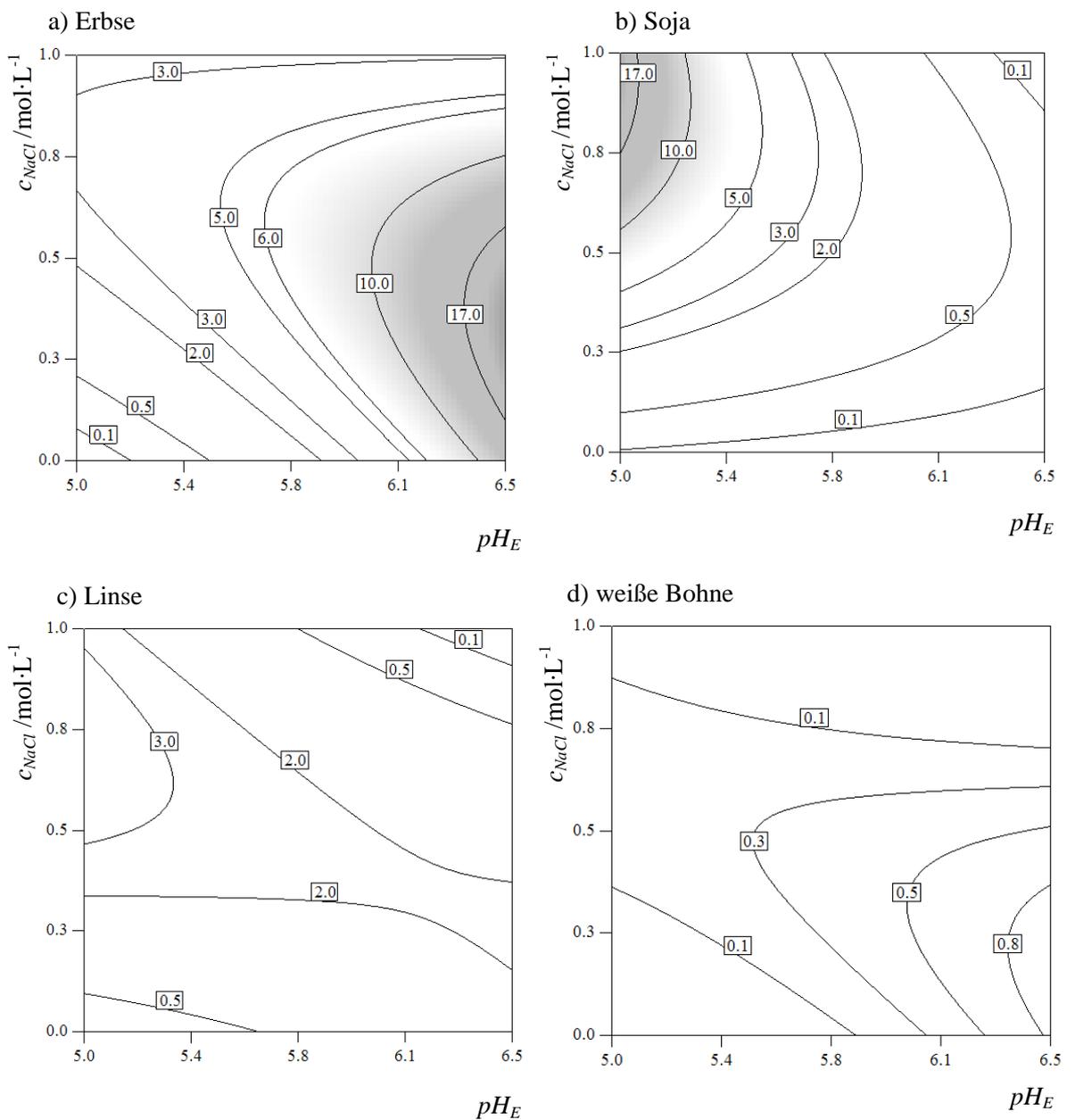
Faktor bzw.	Vermengungsstruktur
2FWW	BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK
AH	BE BF BG BH BK CF CG CH CJ DH DJ EF EG EH EK FG FH GH HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK FGH FGJ FGK FHI FJK GHI
BC	BE BF BH CE CH CJ DH DJ EG EH FG FH FK GH GK HK JK ABC ABE ABF ABH ACE ACH ACJ ADH ADJ AEG AEH AFG AFH AFK AGH AGK AHK AJK BCE BCF BCJ BDE BDF BDH BDK BEH BEJ BEK BFH BFJ BFK BGH BGJ BHJ BJK CDF CDG CDH CDJ CEG CEJ CFG CFJ CGJ CHK CJK DEG DEH DEK DFG DFH DGH DHK DJK EFH EFJ EGH EGJ EGK EHI EJK FGH FGJ FGK FHI FJK GHI GJK

Tabelle 9.5: Faktorstufen-Kombinationen nach einem D-optimalen Versuchsplan zum Rohstoffvergleich (Kapitel 5.2)

RUN ¹	Rohstoff	pH_E	$c_{NaCl} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSV ²
2	Ackerbohne	6,5	1,0	1:13
4		6,5	1,0	1:13
8		6,5	0,0	1:7
20		5,0	0,0	1:13
38		5,0	1,0	1:7
44		5,8	0,5	1:9
7	Erbse	5,0	0,0	1:13
10		6,1	0,3	1:10
13		6,5	1,0	1:13
14		5,0	1,0	1:7
22		5,4	0,8	1:10
24		6,5	0,0	1:7
11	Linse	6,5	0,5	1:7
16		5,0	0,0	1:7
28		6,5	1,0	1:13
29		5,8	1,0	1:7
30		5,0	0,5	1:13
37		6,5	0,0	1:13
5	Entölte Lupine	6,5	1,0	1:9
18		6,5	0,0	1:7
27		5,0	1,0	1:13
31		5,0	0,0	1:9
34		5,0	1,0	1:7
36		5,8	0,0	1:13
15	Vollfette Lupine	5,8	1,0	1:13
19		6,5	1,0	1:7
23		6,5	0,0	1:13
32		5,8	0,0	1:7
35		5,4	0,3	1:10
42		5,0	1,0	1:7
1	Entölte Sojabohne	6,5	1,0	1:7
3		5,0	1,0	1:13
6		6,5	0,0	1:13
12		6,5	0,0	1:13
21		5,0	0,0	1:7
26		6,5	1,0	1:7
33		5,0	1,0	1:13
40		5,0	0,0	1:7

RUN ¹	Rohstoff	pH_E	$c_{NaCl} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSV ²
9	Weiße Bohne	6,5	0,5	1:13
17		6,5	0,0	1:9
25		5,0	0,5	1:7
39		5,0	1,0	1:9
41		5,0	0,0	1:13
43		6,5	1,0	1:7

¹RUN: Versuchsnummer; ²RSV (Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis) wurde bei der Verwendung der Software durch Verhältniszahlen approximiert: 1:7 mit 0,14; 1:9 mit 0,11 und 1:13 mit 0,08



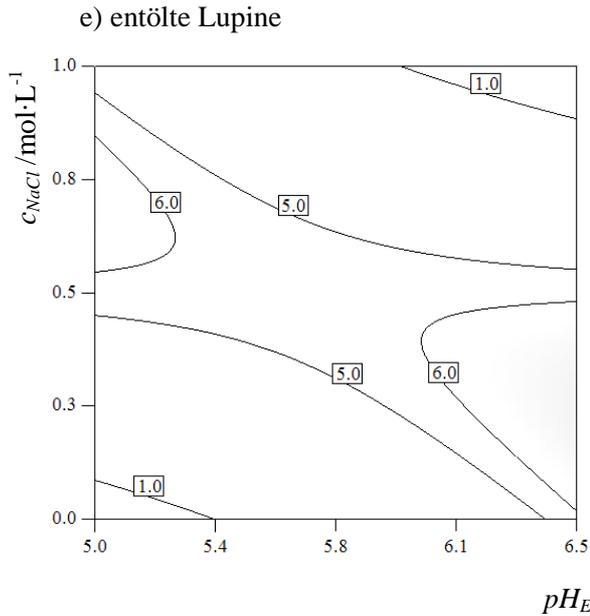


Bild 9.1: Konturplots der PGA in % bei variierenden pH_E und c_{NaCl} sowie konstantem RSV von 0,11 (1:9) für die a) Erbse, b) Soja, c) Linse, d) weiße Bohne und e) entölte Lupine.

Tabelle 9.6: Faktorstufen-Kombinationen nach einem FC-CCD zur finalen Prozessoptimierung

RUN ¹	pH_E	c_{NaCl} /mol·L ⁻¹	RSV ²	t_Z /min	EWV ²	pH_F	t_S /min
1	5,5	0,1	1:7	10	1:2	5,0	60
2	7,0	1,0	1:13	60	1:5	5,0	0
3	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
4	7,0	0,1	1:7	60	1:5	5,0	0
5	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,0	30
6	5,5	0,1	1:13	60	1:5	5,0	60
7	5,5	0,1	1:7	10	1:5	5,9	0
8	5,5	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
9	6,3	0,6	1:9	35	1:5	5,5	30
10	6,3	0,6	1:9	35	1:2	5,5	30
11	6,3	1,0	1:9	35	1:2,85	5,5	30
12	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	60
13	7,0	1,0	1:13	10	1:5	5,9	0
14	7,0	1,0	1:13	60	1:5	5,9	60
15	7,0	1,0	1:7	10	1:2	5,0	60
16	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,9	30
17	5,5	1,0	1:13	60	1:5	5,9	0
18	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
19	7,0	0,1	1:13	10	1:2	5,9	0
20	7,0	0,1	1:7	10	1:5	5,0	60
21	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
22	5,5	1,0	1:7	10	1:2	5,9	0
23	7,0	0,1	1:7	10	1:2	5,9	60
24	7,0	0,1	1:13	60	1:5	5,9	0

RUN ¹	pH_E	c_{NaCl} /mol·L ⁻¹	RSV ²	t_Z /min	EWV ²	pH_F	t_S /min
25	5,5	0,1	1:13	60	1:2	5,0	0
26	6,3	0,6	1:9	10	1:2,85	5,5	30
27	6,3	0,1	1:9	35	1:2,85	5,5	30
28	5,5	1,0	1:13	10	1:5	5,0	60
29	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
30	5,5	1,0	1:7	60	1:2	5,0	0
31	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
32	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	0
33	5,5	1,0	1:13	60	1:2	5,0	60
34	7,0	1,0	1:7	60	1:5	5,9	0
35	7,0	0,1	1:7	10	1:2	5,0	0
36	7,0	0,1	1:13	10	1:2	5,0	60
37	5,5	0,1	1:13	10	1:5	5,9	60
38	5,5	0,1	1:7	60	1:5	5,9	60
39	6,3	0,6	1:9	60	1:2,85	5,5	30
40	5,5	0,1	1:13	60	1:2	5,9	60
41	7,0	0,1	1:7	60	1:2	5,0	60
42	7,0	1,0	1:13	60	1:2	5,9	0
43	6,3	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
44	5,5	1,0	1:7	10	1:5	5,9	60
45	7,0	1,0	1:7	60	1:2	5,9	60
46	5,5	1,0	1:7	10	1:5	5,0	0
47	7,0	0,6	1:9	35	1:2,85	5,5	30
48	6,3	0,6	1:7	35	1:2,85	5,5	30
49	5,5	1,0	1:13	10	1:2	5,0	0
50	6,3	0,1	1:13	35	1:2,85	5,5	30

¹RUN: Versuchsnummer; ²RSV (Rohstoff-Salzlösungs-Verhältnis) und EWV (Extrakt-Wasser-Verhältnis zur Verdünnungsfällung) wurden bei der Verwendung der Software durch Verhältniszahlen approximiert: 1:7 mit 0,14; 1:9 mit 0,11 und 1:13 mit 0,08 für RSV sowie 1:2 mit 0,5; 1:2,85 mit 0,35 und 1:5 mit 0,2