

Einfluss der Entkeimung von Lupinensaatgut und Lupinenproteinisolaten auf ausgewählte ernährungsphysiologische, sensorische und technofunktionelle Eigenschaften

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl. Lebm.-Chem. Denise Melde
geboren am 19.05.1985 in Hoyerswerda

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Juli 2016
im Institut für Lebensmittelhygiene (Universität Leipzig) angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle, TU Dresden

Prof. Dr. med. vet. habil. Peggy G. Braun, Universität Leipzig

Datum der Einreichung: 28.03.2017

Datum der Disputation: 30.06.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Stand des Wissens	4
2.1	Die Lupine	4
2.1.1	Anbau und Verbreitung	4
2.1.2	Einsatz von Lupinenprodukten und -proteinen in der Humaner- nährung	5
2.1.3	Inhaltsstoffe und deren Verteilung	5
2.1.4	Lupinenproteine	10
2.1.4.1	Einteilung und Struktur der Lupinenproteine	10
2.1.4.2	Lupinenproteine und Allergenität	12
2.1.5	Eigenschaften der verschiedenen Lupinenproteinfraktionen	13
2.1.5.1	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	13
2.1.5.2	Funktionelle Eigenschaften	15
2.1.5.3	Modifikation der Proteinstruktur	15
2.1.5.4	Herstellung verschiedener Lupinenproteinpräparate	16
2.1.5.5	Micellare Proteine	17
2.2	Möglichkeiten der Fettreduktion in Lebensmitteln	18
2.2.1	Fettaustauschstoffe	18
2.2.1.1	Fettaustauschstoffe auf Proteinbasis (Mikropartikulier- te Proteine)	18
2.2.1.2	Fettaustauschstoffe auf Kohlenhydratbasis	19
2.2.1.3	Quellstoffe	19
2.2.2	Fattersatzstoffe	19
2.2.2.1	Spezielle Triglyceride	20
2.2.2.2	Kohlenhydratpolyester	20
2.2.2.3	Retrofette	20
2.3	Herstellung des lupinenproteinbasierten Fettaustauschstoffes	20
2.4	Saatgutbehandlung	21
2.4.1	Methoden der Lebensmittelkonservierung	22
2.5	Proteinfunktionalität	25
2.5.1	Definition und Zusammenhang zu Proteinen	25
2.5.2	Ausgewählte funktionelle Eigenschaften	26
2.5.2.1	Wasserbindevermögen	26
2.5.2.2	Ölbindevermögen	26
2.5.2.3	Löslichkeit	27
2.5.2.4	Emulgiervermögen	27
2.5.2.5	Schaumbildungsvermögen	28
2.5.2.6	Gelbildungsvermögen	29
2.5.2.7	Oberflächenhydrophobität	30

2.5.2.8	Bedeutung für die Lebensmittelentwicklung	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Material	32
3.1.1	Saatgut	32
3.1.2	Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Software	32
3.1.3	Pufferlösungen	39
3.1.4	Herstellung Bradford-Reagenz, 5-fach	39
3.1.5	Auswahl der Vergleichssubstanzen	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Herstellung der Proteinisolate	40
3.2.2	Mikrobiologische Analysen	41
3.2.3	Bestimmung der Trockenmasse	41
3.2.4	Bestimmung des Proteingehalts	42
3.2.5	Thermische Behandlungsmethoden im Prozess	42
3.2.5.1	UHT-Erhitzung des Extraktes	42
3.2.5.2	Pasteurisierung des Isolats	44
3.2.6	Saatgutentkeimung	44
3.2.6.1	UVC-Bestrahlung	44
3.2.6.2	Trockene Erhitzung	45
3.2.6.3	Autoklavieren	46
3.2.7	Sensorische Untersuchungen	46
3.2.8	Proteinfunktionalität	47
3.2.8.1	Ölbindevermögen	47
3.2.8.2	Wasserbindevermögen	47
3.2.8.3	Gelbildungsvermögen	47
3.2.8.4	Emulgiereigenschaften	47
3.2.8.5	Schaumbildungsvermögen	48
3.2.8.6	Proteinlöslichkeit	48
3.2.8.7	Oberflächenhydrophobität	49
3.2.9	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	50
3.2.9.1	<i>in-vitro</i> -Verdaubarkeit	50
3.2.9.2	Maillard-Produkte	50
3.2.9.3	Nachweis reduzierender Zucker	50
3.2.9.4	Nachweis von Glykoproteinen	50
3.2.9.5	Polyphenolgehalt der Lupinenflocken und Proteinisolate	51
3.2.10	Proteincharakterisierung	51
3.2.10.1	Lichtmikroskopie	51
3.2.10.2	Dynamische Differenzkalorimetrie	51
3.2.10.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	52
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Thermische Behandlungsmethoden im Prozess	54
4.1.1	UHT-Erhitzung des Extraktes: Einfluss auf Mikrobiologie und Proteinausbeute	54
4.1.2	Pasteurisierungsversuche: Einfluss auf Mikrobiologie und Proteinqualität	55

4.2	Saatgutentkeimung - Mikrobiologie und Proteinausbeute	56
4.2.1	Versuchsreihe I	56
4.2.2	Versuchsreihe II	61
4.3	Sensorische Untersuchungen	63
4.3.1	Verkostungen	64
4.3.2	Farbmessung der Proteinisolate und Flocken	65
4.4	Proteinfunktionalität	69
4.4.1	Wasser- und Ölbindevermögen	69
4.4.2	Gelbildungsvermögen	72
4.4.3	Emulgierereigenschaften	74
4.4.4	Schaumbildungsvermögen	78
4.4.5	Proteinlöslichkeit	81
4.4.6	Oberflächenhydrophobität	83
4.5	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	86
4.5.1	Maillard-Produkte	86
4.5.2	Nachweis reduzierender Zucker	87
4.5.3	Nachweis von Glykoproteinen	87
4.5.4	Verdaubarkeit	88
4.5.5	Polyphenolgehalte	89
4.6	Proteincharakterisierung	91
4.6.1	Lichtmikroskopie	91
4.6.2	Dynamische Differenzkalorimetrie	95
4.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	98
5	Zusammenfassung	105
	Anhang	109

Abkürzungsverzeichnis

λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
°C	Grad Celsius
g	Gravitationskonstante $6,67408 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunde
ACS	American Chemical Society
ANS	8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
BMI	Body Mass Index
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Glycin
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Citronensäure
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
dest.	destilliert
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSC	Differential Scanning Calorimetry - Dynamische Differenzkalorimetrie
EAI	Emulsionsaktivitätsindex
EC	CO_2 -entölte Lupinenflocken
EH	Hexan-entölte Lupinenflocken
EN	Europäische Norm
ESI	Emulsionsstabilitätsindex
FI	Fluoreszenzintensität
Flk.	Flüssigkeit
g	Gramm
GAE	Gallussäure-Äquivalente
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
ISO	International Organization for Standardization
J	Joule
K	Kelvin

KbE	koloniebildende Einheiten
kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton - atomare Masseinheit
kg	Kilogramm
kGy	Kilogray
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kHz	Kilohertz
kPa	Kilopascal
krist.	kristallisiert
kV	Kilovolt
KW	Kruskal-Wallis
l	Liter
LGC	Least Gelation Concentration
M	molar [mol · l ⁻¹]
m	Meter
M _r	relatives Molekulargewicht im nicht-reduzierten Zustand
max	maximal
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLUA	Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg
mM	millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
n	Fallzahl, Anzahl der Proben
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O .	Borax
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄	Ammonium
nm	Nanometer
NV	Normalverteilung
o. g.	oben genannt
OAC	Oil Absorption Capacity - Ölbindevermögen
p	Wahrscheinlichkeit
p.a.	pro analysi - zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PG	Proteingehalt
pH	pH-Wert
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate - Natriumlaurylsulfat
T	Temperatur
TCA	Trichloressigsäure
TM	Trockenmasse
u. a.	unter anderem
UHT	Ultrahocherhitzung
usw.	und so weiter
UVC	Bereich C der Ultraviolettstrahlung
v. a.	vor allem
W	Watt
WAC	Water Absorption Capacity - Wasserbindevermögen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

2.1	Lupinen	4
2.2	Herstellung des Proteinisolats aus Flocken	21
3.1	UHT-Pilotanlage in der MLUA Oranienburg	43
3.2	Versuchsaufbau zur UVC-Entkeimung	45
3.3	Versuchsaufbau zur trockenen Erhitzung	45
4.1	Gesamtkeimzahl des Proteinisolats vor und nach der Pasteurisierung . .	55
4.2	Gesamtkeimzahl und Proteinausbeute von unbehandelten und unterschiedlich entkeimten Rohstoffen	58
4.3	Gesamtkeimzahl und Proteinausbeute von unbehandelten und unterschiedlich entkeimten Hexan-entöhlten Flocken	62
4.4	Gesamtkeimzahl und Proteinausbeute von unbehandelten und unterschiedlich entkeimten CO ₂ -entöhlten Flocken	63
4.5	Farbänderung der Proteinisolate	66
4.6	Lab-Farbwerte der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken	66
4.7	Lab-Farbwerte verschieden behandelte Lupinenflocken	67
4.8	ΔL , Δa , Δb und ΔE der Proteinisolate nach unterschiedlicher Behandlung Hexan- und CO ₂ -entöhlter Lupinenflocken	67
4.9	ΔL , Δa , Δb und ΔE Hexan- und CO ₂ -entöhlter Lupinenflocken nach unterschiedlicher Behandlung	68
4.10	WAC der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken	70
4.11	OAC der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken	71
4.12	WAC und OAC der Standardsubstanzen	71
4.13	LGC der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken	72
4.14	EAI der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in NaCl	75
4.15	ESI der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in NaCl	75
4.16	EAI der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser	76
4.17	ESI der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser	77
4.18	EAI der Standardsubstanzen	78
4.19	ESI der Standardsubstanzen	78
4.20	FC der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser	79
4.21	FS der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser	80
4.22	FC und FS der Standardsubstanzen	80
4.23	Proteinlöslichkeit der Proteinisolate verschieden behandelte CO ₂ -entöhlte Lupinenflocken	82
4.24	Proteinlöslichkeit der Proteinisolate verschieden behandelte Hexan-entöhlte Lupinenflocken	82
4.25	Proteinlöslichkeit der Standardsubstanzen	83
4.26	Oberflächenhydrophobität der Standardsubstanzen	84

4.27 Oberflächenhydrophobität der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken	84
4.28 Verdaubarkeit der Standardsubstanzen	88
4.29 Polyphenolgehalte verschieden behandelte CO ₂ -entölte Lupinenflocken und derer Proteinisolate	89
4.30 Polyphenolgehalte verschieden behandelte Hexan-entölte Lupinenflocken und derer Proteinisolate	90
4.31 Polyphenolgehalte der Rohstoffe	90
4.32 Lichtmikroskopische Darstellung des Proteinisolats unbehandelte Hexan-entölte Lupinenflocken, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau	92
4.33 Lichtmikroskopische Darstellung der Proteinisolate verschieden behandelte CO ₂ -entölte Lupinenflocken	92
4.34 Lichtmikroskopische Darstellung großer Agglomerate der Proteinisolate Hexan-entölte Lupinenflocken	93
4.35 Lichtmikroskopische Darstellung der Proteinisolate verschieden behandelte Hexan-entölte Lupinenflocken	94
4.36 Lichtmikroskopische Darstellung von Casein und Simplesse	95
4.37 DSC-Thermogramme der Proteinisolate verschieden behandelte CO ₂ -entölte Lupinenflocken	96
4.38 Bandenmuster nach SDS-PAGE der Proteinisolate, kleine Gele	98
4.39 Bandenmuster nach SDS-PAGE der Proteinisolate, großes Gel	99
4.40 Bandenmuster nach SDS-PAGE der Proteinisolate, löslicher Proteinanteil (0,5 M NaCl)	101
4.41 Bandenmuster nach SDS-PAGE der Proteinisolate, unlöslicher Proteinanteil (0,5 M NaCl)	103

Tabellenverzeichnis

2.1	Lupinenprodukte	6
2.2	Nährstoffzusammensetzung einiger Leguminosen	8
2.3	Aminosäure-Zusammensetzung von Lupinenflocken und micellarem Proteinisolat	10
2.4	Industrielle Methoden der Lebensmittelkonservierung	23
3.1	Verwendete Geräte	32
3.2	Verbrauchsmaterial	35
3.3	Verwendete Chemikalien und Nährmedien	36
3.4	Verwendete Software	38
3.5	Herstellung der Pufferlösungen	39
3.6	Referenzsubstanzen	40
3.7	Temperatur-Zeit-Regime der UHT-Erhitzung	43
3.8	Temperatur-Zeit-Regime der Pasteurierungsreihe	44
3.9	Reihenfolge der sensorischen Untersuchungen und Untersuchungsziele	46
4.1	Ergebnisse der UHT-Erhitzung	54
4.2	Änderung der Proteinausbeuten durch Saatgutentkeimung	59
4.3	Ergebnisse der Verkostungen der Proteinisolate	65
4.4	Lysinblockierung, Furosin- und Lysingehalt der Proteinisolate	86
4.5	Denaturierungstemperaturen der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken	96
4.6	Denaturierungsenthalpien der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken	97
A.1	Trockenmassen und Proteingehalte der Proteinisolate	109

1 Einleitung und Zielstellung

Nach den Ergebnissen der zweiten Nationalen Verzehrsstudie sind in Deutschland bereits 66 % der Männer und 51 % der Frauen übergewichtig ($\text{BMI} \geq 25$) oder adipös ($\text{BMI} \geq 30$) [BMELV, 2008]. Bei Männern über 30 Jahren und Frauen über 50 Jahren sind weniger als 50 % der Personen normalgewichtig [DGE, 2012]. Die Tatsache, dass Übergewicht einen Risikofaktor für die typischen Zivilisationskrankheiten wie u. a. Diabetes, Bluthochdruck und Arteriosklerose darstellt, ist zwar weitgehend bekannt, dennoch ist die Tendenz vermehrter Fettleibigkeit, vor allem durch einen zu hohen Fettverzehr, in der Bevölkerung steigend [DGE, 2012].

Neben einer Vielzahl anderer Faktoren ist die Umstellung der Ernährung auf weniger fettreiche Kost ein wichtiger Punkt in der Bekämpfung von Übergewicht. Zu diesem Zweck wurden fettfreie und fettreduzierte Lebensmittel von den Nahrungsmittelherstellern schon länger als Marktlücke erkannt. Bisher auf dem Markt befindliche „Light-Lebensmittel“ mit Fettaustausch- bzw. Fettersatzstoffen weisen jedoch häufig sensorische Mängel, wie ein fehlendes cremiges Mundgefühl oder eine wenig ansprechende Textur, auf. Auch die schlechte Aromabindung führt dazu, dass die Akzeptanz dieser Produkte beim Verbraucher eher gering ist.

Aus diesem Grund wurde in dem durch das BMWi geförderte Projekt „Pflanzliche Fettaustauschstoffe aus sphärischen Proteinmizellen“ zwischen Juli 2008 und Dezember 2011 gemeinsam mit dem Kooperationspartner Fraunhofer IVV Freising ein neuartiger Fettaustauschstoff auf Basis von Lupinenprotein entwickelt. Im Gegensatz zu anderen marktgängigen Produkten besitzt dieses Proteinisolat eine fettähnliche cremige Textur, ein glattes Mundgefühl und ist zur Aromabindung in der Lage. Zudem wurde es in vielen Lebensmittelapplikationen erfolgreich getestet (z. B. Rohwurst, Brühwurst, Schmelzkäse, Desserts, Süßwaren, Feinkost) [Sußmann et al., 2012]. Wie aus dem Projekttitle hervorgeht, ist das Protein in der Lage in hydratisierter Form micellare, d. h. globuläre Strukturen mit hydrophober Oberfläche auszubilden, die auf der Zunge das Gefühl von Fettkügelchen erzeugen [Sußmann et al., 2012]. Gegenüber anderen Fettaustausch- und Fettersatzstoffen besitzt das Proteinisolat somit deutliche sensorische Vorteile. Weiterhin handelt es sich um ein natürliches Pflanzenprotein, das im Körper metabolisierbar ist und somit einen, im Gegensatz zum Fett (9 kcal/g) geringeren energetischen Beitrag zum Lebensmittel leistet (4 kcal/g). Demnach setzt durch den Verzehr eines lupinenproteinhaltigen, fettreduzierten Lebensmittels trotzdem ein Sättigungsgefühl ein. Die Kalorienaufnahme ist jedoch im Vergleich zum vollfetten Produkt stark verringert. Zusätzlich verhindert die erhöhte Zufuhr von Proteinen während einer Diät den Abbau der fettfreien Muskelmasse [Layman, 2009].

Neben der ansprechenden Sensorik war ein weiteres Ziel in der Entwicklung dieses neuen Fettaustauschstoffes die mikrobiologische Stabilität des Proteinisolats. Da es sich hierbei um ein für Proteine typisches leichtverderbliches Produkt handelt und der Rohstoff für die Herstellung dieses Proteins, das Lupinensaatgut, anbau- und erntebedingt v. a. mit sporenbildenden Bakterien (z. T. *Bacillus cereus*) belastet ist, war die

Notwendigkeit einer mikrobiellen Stabilisierung des Produktes besonders hoch. Bei dem Verfahren der Extraktion des micellaren Lupinenproteins handelt es sich um einen sehr schonenden Prozess. Deshalb kann eine Abwesenheit von Sporen, selbst bei zwischengeschaltetem Pasteurisierungsschritt, nicht angenommen werden. Folglich können sporenbildende Bakterien unter für sie günstigen Konditionen Lebensmittelverderb oder gegebenenfalls lebensmittelassoziierte Erkrankungen auslösen.

Zum mikrobiologischen Status von Proteinisolaten aus Pflanzen, speziell aus Leguminosen, gibt es bisher nur wenig Literatur. Eine Studie von D'Agostina et al. [2006] bewertete isoelektrisch und durch Ultrafiltration hergestellte Lupinenproteinisolate. Die Autoren ermittelten Gesamtkeimzahlen von 10^4 - 10^9 KbE/g, und schlussfolgerten die Notwendigkeit eines adäquaten Pasteurisierungsschrittes für hoch belastete Proteinisolate sowie eine mikrobiologisch sichere Prozessführung. Eine Gesamtkeimzahl von 10^4 KbE/g wurde als Richtwert für kommerziell erhältliche Pflanzenproteine festgelegt. Da die ermittelten Keimzahlen jedoch überwiegend durch sporenbildende Bakterien verursacht wurden, ist diese Aussage als kritisch zu betrachten.

Die vorliegende Arbeit soll Maßnahmen zur Entkeimung von Proteinisolaten näher beleuchten. Es wurden dafür prozessbegleitende (Pasteurisierung, UHT-Erhitzung) sowie dem Prozess vorangestellte Methoden (Saatgutentkeimung) ausgewählt. Da all diese Verfahren mehr oder weniger starke Erhitzungsschritte beinhalten, wird eine Modifikation der Proteine in verschiedenen Bereichen erwartet. Die in dieser Arbeit evaluierten Verfahren betreffen den Einfluss auf die mikrobiologische Belastung, die Ausbeute an Proteinisolat, ernährungsphysiologische, sensorische sowie technofunktionelle Eigenschaften der Proteine. Aufgrund des Fehlens standardisierter Methoden zur Beurteilung der Technofunktionalität eines Proteins ergänzen Analysen zur Proteincharakterisierung (Lichtmikroskopie, DSC, SDS-PAGE) die Arbeit.

Folglich wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein dreistufiges Gesamtkonzept zur mikrobiologisch sicheren Herstellung des Proteinisolats entwickelt. Dieses besteht aus einer Saatgutentkeimung (ganze Saat, geschälte Saat, verschieden entölte Flocken) am Prozessbeginn, einer Pasteurisierung des Isolats während des Prozesses und einer Sprühtrocknung am Prozessende. Die vorliegende Arbeit befasst sich im ersten Abschnitt mit der Evaluierung geeigneter physikalischer Methoden der Saatgutentkeimung (trockene Erhitzung, UVC-Bestrahlung, Autoklavieren) sowie der Ermittlung zweckmäßiger prozessbegleitender Erhitzungsregime (Pasteurisierung, UHT-Erhitzung).

Es wird vermutet, dass die Saatgutentkeimung den wahrscheinlich größten Einfluss auf die Qualität des Proteinisolats ausübt. Infolgedessen befasst sich der zweite Teil der Arbeit mit den Auswirkungen ausgewählter Entkeimungsmethoden auf die technofunktionellen, sensorischen sowie ernährungsphysiologischen Eigenschaften des Lupinenproteinisolats. Diese Eigenschaften sind für die Entwicklung verschiedener lupinenproteinhaltiger Lebensmittel essentiell [Lucas et al., 2015] und werden durch die Prozessierung des zur Proteinisolation vorliegenden Rohstoffes maßgeblich beeinflusst [Morr & Ha, 1993]. Die sensorische Qualität wurde dabei anhand von spektralphotometrischen Farbmessungen der Proteinisolate und Lupinenflocken vor und nach der Entkeimung der Flocken ermittelt. Weiterhin wurden die Proteinisolate durch ein Sensorikpanel verkostet und in Bezug auf Cremigkeit, Röstaromen und Beliebtheit beurteilt. Zur Erfassung ausgewählter ernährungsphysiologischer Aspekte wurde die *in-vitro*-Verdaubarkeit der Proteinisolate untersucht, um eine eventuelle Verschlechterung dieser durch die Entkeimungsmethoden festzustellen. Des Weiteren wurde der Gehalt an Polyphenolen in

den Flocken und Proteinisolaten vor und nach der Entkeimung analysiert. Phenolische Verbindungen gelten als natürliche Antioxidantien mit gesundheitsfördernder Wirkung und wurden in Lupinensamen nachgewiesen [Czubinski et al., 2014]. Durch die Saatgutbehandlung konnten aufgrund der hohen Temperaturen (110-140 °C) Bräunungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Um mögliche Ursachen und Auswirkungen zu klären, wurden ausgewählte Maillard-Produkte bestimmt. Lichtmikroskopische Aufnahmen sollten mögliche Änderungen der micellaren Struktur aufzeigen. Weitere Aussagen zum Einfluss der Entkeimungen auf die Proteinstruktur, beispielsweise durch Denaturierung, wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und DSC-Analyse untermauert. Um letztendlich die generellen Einsatzmöglichkeiten des Proteinisolats in verschiedenen Lebensmittelgruppen einzuschätzen, wurde die Arbeit um die Analyse der wichtigsten technofunktionellen Eigenschaften ergänzt. Hierfür wurde pH-Wert-abhängig die Proteinlöslichkeit ermittelt, wodurch sich das Verhalten in neutralen, sauren und basischen Lebensmitteln voraussagen lässt. Das Wasser- und Ölbindevermögen ist beispielsweise bei der Wurstherstellung von Bedeutung, ebenso das Gelbildungsvermögen, welches durch die Erhitzung der Proteinlösungen ermittelt werden sollte. Für emulsionsbasierte Lebensmittel (bspw. Mayonnaise, Saucen etc.) sind die Emulgierereigenschaften von besonderer Relevanz. Emulsionsaktivitäts- und -stabilitätsindex wurden hierbei mittels Trübungsmessung photometrisch bestimmt. Für aufgeschlagene Lebensmittel und Schäume spielen die Schaumkapazität und -stabilität eine große Rolle. Diese wurden durch volumetrische Messung nach der Verschäumung der Proteinisolate berechnet. Mit Hilfe der Oberflächenhydrophobität, welche durch Fluoreszenz-Messung ermittelt wurde, konnten Aussagen zur Interaktion mit anderen Lebensmittelbestandteilen getroffen und Korrelationen zu verschiedenen technofunktionellen Eigenschaften geprüft werden.

2 Stand des Wissens

2.1 Die Lupine

2.1.1 Anbau und Verbreitung



Abbildung 2.1: *Lupinus* spp.

Die Gattung der Lupine (*Lupinus*), von der mehrere hundert Varietäten bekannt sind, zählt zur Ordnung der Schmetterlingsblütenartigen (*Fabales*) und darin zur Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae* oder *Leguminosae*). Laut einem Bericht der G.F.L. [2007] zählte Deutschland bis 2006 innerhalb der EU als größtes Anbauland für Lupinen, weltweit ist Australien auf Platz 1, im Jahre 2014, gefolgt von Polen, Russland und Deutschland auf den Plätzen 2 bis 4 [FAO, 29.03.2016]. Seit 1997 wird in Deutschland fast ausschließlich die Blaue Süßlupine *Lupinus angustifolius* L. (Alkaloidgehalt < 0,05%), auch Schmalblättrige Lupine genannt, angebaut, welche somit die Gelbe (*Lupinus luteus* L.) und Weiße (*Lupinus albus* L.) Lupine verdrängt hat.

Neben ihrem Einsatz in der Tier- und Humanernährung ist der Lupinenanbau unter der Absicht der Bodenverbesserung (Bodenauflockerung, Phosphatmobilisierung, Stickstofffixierung) ein wichtiger Faktor. Die Blauen Süßlupinen gedeihen am besten auf sandig-lehmigen, kalkarmen Böden mit niedrigem pH-Wert ($\leq 6,8$) und sind, auch aufgrund ihrer Frostverträglichkeit bis -8°C und der im Vergleich zu Gelben und Weißen Lupinen kürzesten Vegetationsperiode, für alle Klimatalagen Deutschlands geeignet. Hauptanbauflächen in Deutschland sind jedoch Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg und Sachsen-Anhalt. [G.F.L., 2007]

Als einheimische europäische Pflanze stellt die Lupine eine bedeutende Alternative zur Sojabohne dar, die in Europa zu 70 % zur Deckung des Bedarfs an pflanzlichen Proteinen importiert werden muss [Lucas et al., 2015].

2.1.2 Einsatz von Lupinenprodukten und -proteinen in der Humanernährung

Seit 2000 Jahren werden Lupinen im Mittelmeerraum (v. a. Süditalien, Spanien, Nordafrika), abhängig von lokalen Verzehrsgewohnheiten, als Snack (eingelegte gequollene, gesalzene Lupinensamen) konsumiert, während die Lupine in Zentral- und Nordeuropa, Nordamerika und Australien zu Ernährungszwecken weitgehend unbekannt ist [G.F.L., 2007; Duranti et al., 2008]. Dennoch gibt es eine große Anzahl an Lupinen-Produkten, -Rohstoffen und -Proteinerzeugnissen, die derzeit auf dem Markt zur menschlichen Ernährung zu finden sind, vor allem aufgrund der guten technofunktionellen Eigenschaften der Lupinenproteine und deren Ähnlichkeit zu Sojaproteinen, die sie als potenziellen Sojaersatz erscheinen lassen [Doxastakis, 2000].

In der EU wird Lupinenmehl als Nahrungsmittelzutat seit den 90er Jahren verwendet [Jappe & Vieths, 2008]. Folglich stellen Lupinen und deren Inhaltsstoffe kein Novel Food im Sinne der EU-Verordnung 258/97 (Novel Food Verordnung) dar [G.F.L., 2007]. Lucas et al. [2015] sehen einen Einsatz von lupinenbasierten Lebensmitteln vorerst im Fleisch-Ersatz-Segment (Fleischalternativen, vegetarische Aufstriche, Desserts, Eis, pflanzliche Getränke), weiterhin in glutenfreien (z. B. Frühstückscerealien) und eiweißreichen Produkten wie Backwaren, Pasta, Snacks, Getränken und Brot. Tabelle 2.1 fasst eine Auswahl verschiedener Produkte aus Lupine zusammen.

Laut Aussagen der G.F.L. [2007] sind Weiße Lupinen aufgrund ihres neutraleren Geschmacks anderen Lupinensorten zur Herstellung von Lebensmitteln vorzuziehen. Da die Versorgung mit dem Rohstoff jedoch unsicherer ist, findet meist die Blaue Lupine Verwendung. Lupinen sind derzeit nicht gentechnisch verändert, was einen deutlichen Vorteil gegenüber Soja, v. a. bezüglich der Verbraucherakzeptanz, darstellt.

2.1.3 Inhaltsstoffe und deren Verteilung

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die Verteilung der Hauptinhaltsstoffe in verschiedenen Lupinen und Lupinenflocken im Vergleich zu anderen Leguminosen. Leguminosen lassen sich generell in öl- und stärkehaltige Saaten unterteilen [Gueguen, 1983; Doxastakis, 2000], wobei Lupinen und Soja zur ersten Gruppe zählen. Die Kichererbse bildet eine Ausnahme, da sie sowohl einen hohen Fett- als auch einen hohen Stärkegehalt aufweist.

Leguminosen enthalten antinutritive Inhaltsstoffe wie Protease-Inhibitoren, Lektine, Flatulenzfaktoren, Polyphenole und Phytate. Das Vorhandensein von Lektinen und der Trypsin-Inhibitor-Gehalt einiger Leguminosen führen zur schlechteren Verdaubarkeit dieser [Duranti & Gius, 1997; Carbonaro et al., 2000]. Diesem Problem kann jedoch durch eine Wärmebehandlung entgegengewirkt werden [Gueguen, 1983; Duranti & Gius, 1997; Carbonaro et al., 2000; Rehman & Shah, 2005].

Tabelle 2.1: Auswahl an Lupinenrohstoffen, -produkten und -proteinergänzen für die menschliche Ernährung

Produkt	Beschreibung	Einsatzbereiche	Hersteller
LUPISAN	Lupinenmehl	Backwaren, Fettfüllungen, Aufstriche, Süßwaren	Soja Austria (www.soja.at)
LUPIGRAN	Lupinengranulat	Backwaren, Müsliriegel, Fertigmehle	
FRALU-NT-A	enzymaktives Mehl	Brot, Backwaren	Frank Food Products (www.frankfoodproducts.com)
FRALU-BITS/GRITS	geröstetes Granulat		
FRALU-T	geröstetes Mehl		
FRALU-T-NF	geröstetes Mehl mit Faser		
FRALU-HULLS	gemahlene Schalen		
FRALU-CON	Proteinkonzentrat		
PEPILUP	Lupinengrieß	Brot, Cerealien	TERRENA LUP'INGREDIENTS (www.lupin.fr)
FARILUP	Lupinenmehl	Brot, Backwaren, Eiersatz, Texturverbesserung	
PROTILUP	Proteinpulver	glutenfreie Pasta, Backwaren, Fleischprodukte	
FLOCOLUP	Lupinenflocken	Cerealien, Gebäck, Müsliriegel, Fleisch	
Café Pino	Lupinenkaffee		Bioland
gefüllte Lupinenbällchen	vegetarische Fertiggerichte		Multikost (www.multikost.de)
Lupinenschnitzel			
Lupinenrolle			
Lupinen-Spieße			
Lupinen-Crossies			
Lupinenwürstchen	vegane Fertiggerichte		Purvegan GmbH (www.purvegan.de)
Lupinengyros			
Lupinengeschnetzeltes			
Lupinenschnitzel			
Lupinenburger			
Lupinen-Tempeh			
Lupinen-Brotaufstich			
Lupinen-Sauce Bolognese			
Lupinenproteinkonzentrat	Sportlernahrung		VEGJi - plant based nutrition

Produkt	Beschreibung	Einsatzbereiche	Hersteller
Lupinenproteinextrakt Lupinenfaser	Fleisch- und Wurstwaren, Backwaren, Eiersatz, Milchersatz zur Emulsionsstabilisierung und Wasserbindung, Ballaststoffanreicherung		Lupino AG Deutschland (www.lupino-ag-deutschland.com)
Lupinenproteinisolat Lupinenfaser Lupinenöl Lupinenschalen	Milch-/Fleisch-/Eiersatz, Backwaren, Feinkost, Teigwaren Ballaststoffanreicherung und Fettersatz in Wurst- und Fleischwaren Back-/Teig-/Wurstwaren, Fleischprodukte Verbesserung der Frischhaltung von Backwaren		Prolupin GmbH (www.prolupin.de)
Lupinen-Aufstriche Lupinen-Desserts Lupinen-Salatmayonnaise Lupinen-Drinks Lupinen-Joghurt-Alternative Lupinen-Nudeln			Prolupin GmbH (www.madewithluve.de)

In Lupinensamen konnten nur geringe Mengen harnsäurebildender Purine, Phytinsäure, Phenole und Tannine (ca. 0,1 % in Süßlupinen [Rahma & Rao, 1984]) sowie keine Protease-Inhibitoren, Hämagglutinine bzw. Lektine und Pyrimidinbasen nachgewiesen werden [Hudson, 1979; Sathe et al., 1982; Gueguen, 1983; BFR, 2005; G.F.L., 2007; Duranti et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008], wobei letztere beim Verzehr von z. B. Ackerbohnen Favismus auslösen können. Demnach zählt die Lupine zu den Leguminosen mit dem geringsten Gehalt an antinutritiven Inhaltsstoffen [Lampart-Szczapa et al., 2003]. Zusätzlich werden diese Substanzen während der Herstellung verschiedener Proteinisolate fast vollständig entfernt [Arntfield et al., 1985; Rodríguez-Ambríz et al., 2005].

Tabelle 2.2: Nährstoffzusammensetzung von Lupinensamen im Vergleich zu anderen Leguminosen, nach Kylan & McCready [1975]; Gefrom et al. [2013]; Muranyi et al. [2013]; Bähr et al. [2014]; Beyer et al. [2015]; Pelgrom et al. [2015]

Rohstoff	Wasser [%]	Protein [% TM]	Fett [% TM]	Ballaststoffe [% TM]	Asche [% TM]
Sojabohne ^{a,b}	8,4	38,2	20,1	5,1 ^d	4,6
Linse ^{a,b}	9,6	26,1	1,6	4,6 ^d	2,6
Mungbohne ^{a,b}	10,1	22,9	1,4	4,9 ^d	3,4
Ackerbohne ^b	10,7	31,0	1,8	8,5	3,6
Erbse ^b	10,3	23,4	1,8	7,7	3,5
Lupine (<i>L. angustifolius</i>) ^b	9,5-11,0	31,1-40,6	6,3-7,3	49,2-55,0	2,6-3,7
Lupine (<i>L. angustifolius</i>) ^c	9,1-33,0	38,8-43,5	8,0-9,8	38,4-39,1	3,7-4,2
Lupine (<i>L. albus</i>) ^c	10,0	49,1	12,7	30,5	4,7
Lupine (<i>L. luteus</i>) ^c	10,8	55,3	8,2	21,0	5,1
Sojabohne ^c	8,3	49,2	4,3		6,6

^a bezogen auf Frischgewicht

^b ganze Saat

^c Flocken, vollfett

^d Rohfaser

Die Gehalte an Saponinen (1,1-1,7 %), Blähungen auslösenden Oligosacchariden (ca. 4-6 %) sowie die Zusammensetzung des Lupinenöls entsprechen denen der Sojabohne [Hudson, 1979; Gueguen, 1983; Jappe & Vieths, 2008; Beyer et al., 2015]. An Oligosacchariden überwiegt Stachyose, gefolgt von Raffinose und Verbascose [Gefrom et al., 2013]. Der Stärkegehalt von ca. 1,5 % der TM ist im Vergleich zu anderen Leguminosen sehr gering (z. B. Erbse: 48 %) [Gefrom et al., 2013; Pelgrom et al., 2015]. Mit weiteren 1,5-3,5 % Saccharose ist der Anteil verdaulicher Kohlenhydrate in Lupinen allgemein als gering einzustufen [BFR, 2005]. Die Extraktion des Proteins mit Wasser oder Alkohol löst die Raffinose-Oligosaccharide aus den Samen, sodass diese in so hergestellten Proteinisolaten und -konzentraten nicht mehr bzw. in nur sehr geringen Mengen vorhanden sind [Hudson, 1979; Gueguen, 1983].

Lupinen enthalten von Natur bis zu 2 % Bitterstoffe, sog. Chinolizidinalkaloide (z. B. Lupanin, Spartein), welche den Verzehr durch den Menschen beeinträchtigen [Duranti & Gius, 1997]. Erst mit der Züchtung der Süßlupinen um 1930 [Sengbusch, 1931] wurden diese für die Humanernährung interessant. Süßlupinen enthalten weniger als

0,05 % Alkaloide, einige Sorten sogar unter 0,02 % [Hudson, 1979; Wäsche et al., 2001]. Ein Alkaloidgehalt von 0,02 % sollte zum Einsatz für die menschliche Ernährung nicht überschritten werden [G.F.L., 2007]. Aufgrund der Wasserlöslichkeit der Alkaloide sind diese jedoch in wässrig extrahierten Proteinisolaten nicht zu erwarten [El-Adawy et al., 2001; Rodríguez-Ambriz et al., 2005].

Als phenolische Verbindungen in Lupinensamen wurden Flavone (Apigenin-Glykoside [Czubinski et al., 2014]), Phenolsäuren (Gallus-, Protocatechu-, *p*-Hydroxybenzoe-, Kaffee-, *p*-Cumar-, Vanillin-, Ferula-, Chlorogensäure [Siger et al., 2012; Lampart-Szczapa et al., 2003]), Isoflavone (Genistein-Derivate) und Tannine [Khan et al., 2015] beschrieben. Polyphenole kommen, im Gegensatz zu den freien Phenolsäuren, hauptsächlich in den Kotyledonen der Hülsenfrüchte vor [Lampart-Szczapa et al., 2003], wobei sie an die Proteine, v. a. an Lysin und Methionin der nativen 7S- und 11S-Globuline, gebunden sind [Duranti & Gius, 1997; Carbonaro et al., 2000]. Phenolische Verbindungen beeinflussen die sensorischen Eigenschaften und werden für die antioxidative Wirkung verschiedener Pflanzen verantwortlich gemacht. Die antioxidative Aktivität von Lupinensamen wird wahrscheinlich nicht ausschließlich durch phenolische Verbindungen bestimmt [Khan et al., 2015]. Für die Phenole der Samenschale wurden antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen [Lampart-Szczapa et al., 2003].

Lupinenöl besitzt eine ausgewogene Fettsäurezusammensetzung und enthält bioaktive Lipide (Kalogeropoulos et al., 2010). Es besteht zu 78 % aus ungesättigten Fettsäuren, davon sind etwa 25 % mehrfach ungesättigt [Doxastakis, 2000]. 8-9 % der Fettsäuren sind α -Linolensäure [Hudson, 1979], der metabolische Vorläufer der langkettigen mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren. In der Lipid-Fraktion von *L. termis* wurden ca. 1,2 % Phytosterole (v. a. β -Sitosterol, gefolgt von Campesterol und Stigmasterol) nachgewiesen [Khan et al., 2015]. Weiterhin besitzen Lupinen einen hohen Gehalt an Tocopherolen, v. a. γ -Tocopherol (ca. 20 mg/100 g im Samen von *L. albus*) [Khan et al., 2015] und 0,02-0,14 mg/100 g β -Carotin [Hudson, 1979].

Lupinensamen enthalten bis zu 44 % Proteine und etwa 40 % Ballaststoffe [Lucas et al., 2015], wobei der Proteingehalt standortbedingten Schwankungen unterliegt [G.F.L., 2007]. Als limitierende Aminosäuren gelten Methionin und Cystein [Hudson, 1979], gefolgt von Valin und Tryptophan (<1 %) bzw. Threonin in Proteinisolaten [El-Adawy et al., 2001]. Der Gehalt an ausgewählten limitierenden Aminosäuren (v. a. Lysin, Tryptophan, Methionin) ist jedoch höher als in Bohnen oder Erbsen, was zu einer höheren ernährungsphysiologischen Wertigkeit der Lupinensamen gegenüber diesen Leguminosen führt [D'Agostina et al., 2006; Jappe & Vieths, 2008]. Lediglich Soja übertrifft die Menge dieser Aminosäuren [Jappe & Vieths, 2008]. Der im Vergleich zu Weizen erhöhte Lysingehalt wird als vorteilhaft für eine Kombination von Lupinen- und Weizenmehl bei Backwaren erachtet [El-Adawy et al., 2001; Villarino et al., 2015], da Getreide reich an schwefelhaltigen Aminosäuren, jedoch arm an Lysin ist.

Allgemein ist Lupinenprotein reich an Arginin, Glutamin/Glutaminsäure und Asparagin/Asparaginsäure, enthält jedoch nur geringe Mengen der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (jeweils <1 % in Lupinenflocken und -proteinisolaten) [El-Adawy et al., 2001; Muranyi et al., 2016].

Im Vergleich zu Soja- und Erbsenprotein ist der Anteil saurer Aminosäuren im Lupinenprotein deutlich erhöht, wobei das Verhältnis von sauren (Asparagin- und Glutaminsäure) zu basischen (Arginin, Histidin, Lysin) für *Lupinus albus* 2,4 beträgt [Benjamin et al., 2014]. Der Gehalt polarer Aminosäuren beträgt 15,1 % und ist mit dem

von Soja- und Erbsenprotein vergleichbar, wohingegen unpolare Aminosäuren (30,8 %) einen deutlich geringeren Anteil darstellen (vgl. Soja und Erbse: ca. 38 %) [Benjamin et al., 2014]. Eine Übersicht über die Aminosäurezusammensetzung in Lupinenflocken im Vergleich zu micellarem Lupinenproteinisolat gibt Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Aminosäure-Zusammensetzung in mol-% des Gesamtproteins von vollfetten Lupinenflocken (*L. angustifolius* Vitabor) und micellarem Proteinisolat und Einteilung der Aminosäuren, nach Muranyi et al. [2016]

Aminosäure	Flocken [mol-%]	MPI ^a [mol-%]	Polar	Unpolar
Arginin	20,09 ± 4,09	9,97 ± 0,21	x	
Asparaginsäure ^b	11,25 ± 0,42	12,92 ± 0,25	x	
Cystein	0,47 ± 0,03	0,82 ± 0,01	x	
Glutaminsäure ^c	19,78 ± 2,12	21,43 ± 0,50	x	
Histidin	4,37 ± 0,16	4,01 ± 0,14	x	
Lysin	4,40 ± 0,33	4,06 ± 0,23	x	
Serin	3,46 ± 0,09	3,80 ± 0,17	x	
Threonin	2,95 ± 0,05	3,02 ± 0,16	x	
Tyrosin	2,91 ± 0,14	3,91 ± 0,20	x	
Alanin	4,80 ± 0,22	4,23 ± 0,17		x
Glycin	6,34 ± 0,24	6,31 ± 0,14		x
Isoleucin	3,19 ± 0,45	4,75 ± 0,05		x
Leucin	4,56 ± 0,49	6,37 ± 0,27		x
Methionin	0,11 ± 0,08	0,03 ± 0,01		x
Phenylalanin	2,32 ± 1,02	4,06 ± 0,61		x
Prolin	5,53 ± 0,16	6,60 ± 0,46		x
Valin	3,71 ± 0,13	4,12 ± 0,08		x

^a Micellares Proteinisolat

^b Asparaginsäure + Asparagin

^c Glutaminsäure + Glutamin

2.1.4 Lupinenproteine

2.1.4.1 Einteilung und Struktur der Lupinenproteine

Die Lupine gilt neben Soja als eine der proteinreichsten Leguminosen, wobei der Proteingehalt je nach Spezies differiert [Duranti et al., 1981]. Der Großteil der Lupinenproteine sind als Speicherproteine (v. a. Globuline) in den Vakuolen der Keimblätter lokalisiert [Duranti et al., 2008], wo sie als Nährstoffe für die Reifung und Keimung des Sämlings zur Verfügung stehen [Duranti & Gius, 1997; Doxastakis, 2000].

Das Protein der Lupinensamen besteht hauptsächlich aus Albuminen und Globulinen, wobei letztere den größeren Anteil darstellen (ca. 90 % [BFR, 2005]). Lupinenproteine werden in α -, β -, γ - und δ -Conglutine unterteilt, wo bei α -, β - und δ -Conglutin saurer Natur sind, während γ -Conglutin ein basisches Globulin darstellt [Duranti et al., 2008]. Die Aminosäurezusammensetzung ähnelt sich für die Proteine desselben Conglutins, ebenso die Menge (γ - > α - > β -Conglutin) und Zusammensetzung (v. a. Mannose und Galactose) der proteingebundenen Kohlenhydrate [Duranti et al., 1981].

α -Conglutin gehört zur Familie der 11S-Globuline und wird oft als Legumin-ähnliches Protein bezeichnet [Duranti et al., 2008]. Der ermittelte Sedimentationskoeffizient beträgt jedoch ca. 13S [Sousa et al., 1996]. Seine Quartärstruktur beschreibt ein Hexamer mit einem relativen Molekulargewicht von 330-430 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5,1-5,8 [Duranti et al., 2008]. Es besteht aus sechs mal zwei über Disulfidbrücken verbundenen Monomeren - einer teilweise glykosylierten (u. a. *N*-Acetylglucosamin [Duranti et al., 1981]) sauren, N-terminalen α -Untereinheit (pI: 4,5-4,7; MW: 42-54 kDa) und einer nicht glykosylierten basischen, C-terminalen β -Untereinheit (pI: 6,7-8,6; M_r : 20-22 kDa) [Duranti et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008; Sirtori et al., 2010].

Im Erbsen-Legumin besitzt letztere eine sehr geordnete Sekundärstruktur (80% β -Faltblatt im Gegensatz zu 30% in der α -Untereinheit), wodurch die hydrophilen α -Untereinheiten im globulären Protein nach außen gerichtet sind, während das β -Polypeptid im Inneren lokalisiert ist [Subirade et al., 1994]. Die Sekundärstruktur von 11S-Globulinen wird insgesamt hauptsächlich durch β -Faltblatt-Strukturen beschrieben [Subirade et al., 1994; Schwenke, 2001; Carbonaro et al., 2008, 2012]. Bei sehr niedrigen pH-Werten kann das Legumin-Molekül dissoziieren [Duranti & Gius, 1997].

Den größten Anteil der Globulinfraction bildet das β -Conglutin (7S-Gobulin oder Vicilin-ähnlich), wobei die im Boden vorkommende Menge an Schwefel einen starken Einfluss auf das Verhältnis von α - zu β -Conglutin hat [Duranti et al., 1981]. Generell beträgt das Verhältnis α - zu β -Conglutin in Lupinen etwa 1,3:1, wobei vermutet wird, dass die Ursache für die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Leguminosproteine auf die differierenden Verhältnisse von 7S- zu 11S-Globulin zurückzuführen sind [Gueguen, 1983].

β -Conglutin ist ein aus drei durch ihre relativen Molekulargewichte voneinander differenzierbaren Monomeren aufgebautes Trimer (pI: 5,0-6,0; M_r : 143-260 kDa) [Duranti et al., 2008], welches keine Disulfidbrücken enthält, sondern über hydrophobe und Wasserstoffbrückenbindungen assoziiert ist [Kinsella, 1979] und pH- und Ionenstärkeabhängig dissoziiert bzw. assoziiert [Duranti & Gius, 1997]. Die Untereinheit mit dem höchsten relativen Molekulargewicht (53-80 kDa) hat einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,1 und 5,7 und liegt glykosyliert vor [Duranti et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008]. Die beiden anderen Untereinheiten (M_r : 25-46 bzw. 17-20; pI: 5,3-8,4 bzw. 4,2-5,0) liegen als teilweise glykosylierte Proteine vor [Duranti et al., 2008]. β -Conglutine bilden oft verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten [Islam et al., 2012].

Da diese Gruppe der Conglutine kaum schwefelhaltige Aminosäuren sowie sehr wenig Tryptophan besitzt, ist ihr Nährwert geringer als der der α -Conglutine [Duranti et al., 1981]. Vicilin aus Bohnen wird als besser löslich und besser koagulierbar als Legumin beschrieben, ersteres durch die höhere Glykosylierung [Sathe, 2002]. Auch in Erbsen bildet Vicilin im Gegensatz zu Legumin Gele aus. Für Sojaglobuline existieren widersprüchliche Ergebnisse [Kinsella, 1979; Bora et al., 1994].

Auch β -Conglutin besteht hauptsächlich aus β -Faltblatt Strukturen [Hermansson, 1978; Carbonaro et al., 2012]. β -Konformationen in Proteinen gelten aufgrund ihres hohen Anteils aromatischer Aminosäuren (Thyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) sowie durch β -verzweigte Aminosäuren (Threonin, Valin, Isoleucin) generell als hydrophober als die α -Helix [Carbonaro et al., 2012].

γ -Conglutin (MW \approx 45 kDa bzw. $M_r = 200$ kDa, pI = 7,9), ein glykosyliertes 7S-Globulin mit sehr hohem Schwefelgehalt, besteht aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Polypeptidketten (tetramere oder hexamere Struktur im Oligomer) mit relativen Molekulargewichten von etwa 28 kDa (glykosylierte α -Untereinheit, pI: 8,2-8,9) bzw. 17 kDa (nicht glykosylierte β -Untereinheit, pI: 5,8-6,6) und ist gleichermaßen in Wasser und Salzlösungen löslich [Duranti et al., 2008; Czubinski et al., 2015; Jimenez-Lopez et al., 2015].

Das Protein ist reich an Serin, Threonin und Asparagin, die Bindungsstellen für Kohlenhydrate darstellen, was die von allen Conglutinen höchste Glykosylierung erklärt [Duranti et al., 1981]. Der Lysingehalt ist im Vergleich zu den anderen Proteinfractionen hoch (57,7 mg/g Protein) [D'Agostina et al., 2006].

Die Menge an γ -Conglutin im Lupinensamen scheint Varietäten-unabhängig zu sein [Islam et al., 2012], macht jedoch in Weißen Lupinen nur ca. 4-5 % der Globuline aus [Duranti et al., 2008]. γ -Conglutin ist z. T. sequenzhomolog mit Glykosidase-Inhibitoren, besitzt aber keine proteolytische Aktivität [Czubinski et al., 2015]. Weiterhin ist γ -Conglutin im nativen Zustand resistent gegenüber einer Proteolyse durch Pankreatin und Trypsin [Czubinski et al., 2014], was zu der Annahme führt, dass es kein Speicherprotein ist [Duranti et al., 2008]. Es besitzt flavonoid-bindende Eigenschaften [Czubinski et al., 2014] und eine den Blutzuckerspiegel senkende Wirkung durch seine Insulin-ähnliche Aktivität und seine Fähigkeit an Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren zu binden [Terruzzi et al., 2011; Czubinski et al., 2015] (s. Kapitel 2.1.5.1).

Der Sedimentationskoeffizient für das als Monomer vorliegende δ -Conglutin wird mit 2S angegeben [Sousa et al., 1996; Duranti et al., 2008; Czubinski et al., 2015]. Der isoelektrische Punkt liegt im sauren pH-Bereich, die relative Molekülmasse bei 13 kDa [Duranti et al., 2008]. Beide das Monomer aufbauende Untereinheiten (M_r : 9 bzw. 4; pI: 4,1-4,3 für die größere Untereinheit) sind nicht glykosyliert und kovalent über Disulfidbrücken miteinander verknüpft [Duranti et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008].

Dieses Conglutin ist reich an Glutaminsäure und Cystein, jedoch arm an Lysin, Valin, Threonin und aromatischen Aminosäuren [Duranti et al., 1981]. Es handelt sich um ein schwefelreiches, wasserlösliches Albumin [Czubinski et al., 2015]. Für δ -Conglutin wird sowohl eine Speicherprotein- als auch eine Schutzfunktion vermutet [Duranti et al., 2008].

Diese vier beschriebenen Proteine stellen ca. 85-88 % der Gesamtproteinmenge der Lupinensaat dar [Duranti et al., 2008], wobei der Anteil jeder Fraktion an der Gesamtglobulinmenge in folgender Reihenfolge abnimmt: β -Conglutin (44,3 %) > α -Conglutin (33,2 %) > δ -Conglutin (12,5 %) > γ -Conglutin (6,0 %) [Duranti et al., 1981].

2.1.4.2 Lupinenproteine und Allergenität

Seit 2006 unterliegt der Einsatz von Lupinen in Lebensmitteln der Allergen-Kennzeichnungspflicht, da Intoxikationen durch die orale Aufnahme lupinenhaltiger Nahrungsmittel sowie durch die Inhalation von Lupinenmehl beschrieben wurden [BFR, 2005; Holden et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008]. Dabei stehen alle Lupinen-Conglutine als allergene Proteine in Diskussion, wobei die größte Reaktivität dem α -Conglutin zugeschrieben wird [BFR, 2005; Holden et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008] und die sehr hitzestabilen Hauptallergene Molekulargewichte von 20 bzw. 34,5 kDa besitzen sollen

[Álvarez-Álvarez et al., 2005; Guillamón et al., 2008].

Von Kreuzreaktionen v. a. bei Erdnussallergikern sowie mit anderen Leguminosen wird ebenfalls berichtet [Jappe & Vieths, 2008; Jimenez-Lopez et al., 2015]. Als Ursache hierfür werden strukturelle Ähnlichkeiten der Speicherproteine vermutet [Duranti et al., 2008; Jappe & Vieths, 2008]. Jedoch differiert die genaue Zusammensetzung der Proteine zwischen den einzelnen Varietäten verschiedener Lupinenspezies [Tai & Bush, 1997; Islam et al., 2012]. Durch das ungleiche Auftreten allergener Proteine in den verschiedenen Varietäten wird von einer unterschiedlichen Allergenität der einzelnen Lupinenvarietäten ausgegangen, bzw. diese für Züchtungen weniger bzw. nicht allergener Lupinen angenommen [Islam et al., 2012].

Im Allgemeinen wird von einer geringeren Allergenität von Proteinen ausgegangen, wenn diese eine schnelle *in-vitro*-Verdaubarkeit zeigen [Astwood et al., 1996]. Diese Aussage ist jedoch zweifelhaft, da auch für nicht allergene Proteine eine hohe Stabilität gegenüber dem simulierten gastralen und intestinalen Verdau nachgewiesen werden konnte [Fu et al., 2002]. Auch beim Auftreten bestimmter Magen-Darm-Erkrankungen, beispielsweise einer Hypoazidität, können Proteine durch das unbeschadete Überstehen der Magenpassage zu Allergenen werden [Jensen-Jarolim & Untersmayr, 2005].

2.1.5 Eigenschaften der verschiedenen Lupinenproteinfraktionen

2.1.5.1 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Die Aufnahme von Lupinenprotein wird mit verschiedenen positiven ernährungsphysiologischen Aspekten in Verbindung gebracht. So wiesen Radtke et al. [2015] im Mausmodell die γ -Conglutin-Fraktion als ursächlich für die Reduktion des Serumcholesterins nach Aufnahme von Lupinenproteinen nach. Zu einem ähnlichen Ergebnis, sowie einem Anstieg des HDL-Cholesterins und einem Hochregulieren des LDL-Rezeptors durch γ -Conglutin, kamen Sirtori et al. [2004] bei Untersuchungen an Ratten. Die Autoren ermittelten zusätzlich den Gehalt an Isoflavonen (sog. Phytoöstrogenen) in Samen Weißer Lupinen sowie in deren Proteinextrakt und einem Isolat an γ -Conglutin. Für letztere lag der Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze, woraus zu schlussfolgern ist, dass die Cholesterin-senkende Wirkung nicht auf das Vorhandensein von Isoflavonen, wie es bei Soja z. T. diskutiert wird, zurückzuführen ist. Ein *in-vitro*-Versuch von Yoshie-Stark et al. [2004] bestätigt die Tierstudien, wobei ein vorwiegend γ -Conglutin enthaltendes Lupinenproteinisolat Typ F (s. Kapitel 2.1.5.4) durch eine hohe Gallensäurebindung gekennzeichnet ist, die deutlich schlechter ist als die eines Sojaproteins. Das Vermögen eines Stoffes Gallensäuren zu binden, wird mit einer Reduktion des Serumcholesterins in Verbindung gebracht.

Bähr et al. [2015] stellten bei Probanden mit Hypercholesterinämie eine signifikante Reduktion des LDL- und des Gesamtcholesterins, der Triglyceride sowie der Homocystein- und der Harnsäurekonzentration im Blut nach oraler Gabe von 25 g Lupinenprotein (Typ E, s. Kapitel 2.1.5.4) über 28 Tage fest. Die Autoren vermuten den hohen Arginin-Gehalt des Lupinenproteins als ursächlich für einige dieser Ergebnisse. Auch andere Arbeitsgruppen erhielten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Lupinenprotein und Cholesterin [Sirtori et al., 2012]. Ebenso wiesen Bähr et al. [2013] blutdrucksenkende Eigenschaften des Lupinenproteins sowie eine Reduktion des LDL:HDL-Verhältnisses nach. Demnach kann das Risiko für koronare Herzkrankheiten durch die Aufnahme von 25 g Lupinenprotein, in diesem Fall eine Mischung aus α -, β - und δ -

Conglutin, um 20 % gesenkt werden. Für Proteinhydrolysate aus Weißen Lupinen wurde eine erhöhte Inhibition des Angiotensin Converting Enzyme festgestellt (bei α - und β -Conglutin stärker als bei γ -Conglutin), wobei eine CO₂-Entölung zu schlechteren Ergebnissen führte als eine Hexan-Entölung [Yoshie-Stark et al., 2004]. Somit sind durch den Verzehr von Lupinenprotein auch positive Effekte für Personen mit Hypertonie anzunehmen.

Speziell für γ -Conglutin wurde die Senkung des Blutzuckerspiegels sowohl in Humanstudien [Duranti et al., 2008] als auch im Tiermodell [Vargas-Guerrero et al., 2014] nachgewiesen. Vargas-Guerrero et al. [2014] beobachteten ebenfalls einen Anstieg der Expression des Insulin-1-Gens, des pankreatischen Insulingehalts sowie der Insulinkonzentration im Blut nach oraler Gabe von γ -Conglutin aus Weißen Lupinen an zuckerkrankte Ratten. Der niedrige glykämischer Index der Lupinensamen ist allgemein vorteilhaft für Personen mit Diabetes, da der Blutzuckerspiegel nicht erhöht wird [G.F.L., 2007].

Eine entzündungshemmende Wirkung von Lupinensamenextrakten und -proteinhydrolysaten wurde ebenfalls beschrieben [Khan et al., 2015].

Auch für andere Bestandteile der Lupinensamen wurden ernährungsphysiologisch bedeutsame Eigenschaften aufgezeigt. So wurde für einige Polysaccharide eine antioxidative Aktivität festgestellt, die sich wahrscheinlich auf den hohen Anteil des Einfachzuckers Galactose und die daraus gebildeten Galacto- und Glucomannane sowie Galactane zurückführen lässt [Thambiraj et al., 2015]. Die selbe Studie weist einen immunstimulierenden Effekt der Polysaccharide durch den hohen Gehalt an Galactose und Mannose sowie die Fähigkeit Eisen zu komplexieren nach. Eine anti-kanzerogene Wirkung wird vermutet.

Der je nach Varietät schwankende Gehalt an Polyphenolen [Lampart-Szczapa et al., 2003] wird mit einer erhöhten antioxidativen Kapazität der Lupinen in Verbindung gebracht [Villarino et al., 2015]. Es gibt jedoch auch zahlreiche Studien, die andere Inhaltsstoffe, wie Carotinoide, Tocopherole und Peptide für die antioxidative Wirkung verantwortlich machen bzw. den Zusammenhang zwischen Polyphenolgehalt und Radikalfänger-Eigenschaften [Yoshie-Stark et al., 2006; Khan et al., 2015]. γ -Conglutin besitzt im Gegensatz zu α - und β -Conglutin die besseren Radikalfänger-Eigenschaften [Yoshie-Stark et al., 2004].

Den Ballaststoffen der Lupinensamen wird ebenfalls eine positive Wirkung auf die Darmgesundheit (z. B. erhöhtes Stuhlvolumen, vermehrte Ausscheidung an kurzkettigen Fettsäuren, geringerer pH-Wert und höherer Wassergehalt im Stuhl) und eine damit einhergehende vorteilhafte Modifikation einiger Darmkrebs-Risikofaktoren zugeschrieben [Johnson et al., 2006]. Auch sie können zu einer Reduktion des Gesamt- und LDL-Cholesterins beitragen [Hall et al., 2005].

Wie obenstehendem Abschnitt zu entnehmen ist, sind die gesundheitsfördernden Effekte von Lupinenprotein und anderen Inhaltsstoffen der Lupine belegt, dennoch wurden aber bisher keine Health-Claims für die Lupine erlaubt, da klinische Studien in größerem Umfang noch fehlen [Lucas et al., 2015].

2.1.5.2 Funktionelle Eigenschaften

Lupinenproteine sind, abhängig von der jeweiligen Extraktionsmethode, für diverse technofunktionelle Eigenschaften, wie ein hohes Wasserbindevermögen, gute Emulgierfähigkeit und -stabilität sowie gute Schaumbildungseigenschaften und Wasserlöslichkeit, bekannt [D'Agostina et al., 2006; G.F.L., 2007; Jappe & Vieths, 2008; Benjamin et al., 2014]. Diese werden in Kapitel 2.5.2 genauer beschrieben.

2.1.5.3 Modifikation der Proteinstruktur

Proteinmodifizierungen in Lebensmitteln spielen v. a. zur Optimierung der funktionellen oder ernährungsphysiologischen Eigenschaften eine Rolle. Dabei wird in enzymatische und chemische Modifizierungen unterteilt.

Über die enzymatische Hydrolyse von Lupinenprotein und -mehl mit einem proteolytischen Enzym berichten Lqari et al. [2005]. Diese trägt demnach zu einer erhöhten Proteinlöslichkeit, v. a. am isoelektrischen Punkt, einer besseren Fettbindung und höheren Schaumkapazität bei, im Wesentlichen durch die hydrolysebedingte Reduktion der Molekülgröße. Jedoch wurde die Schaumstabilität negativ beeinflusst. Gleiches gilt für die Emulgieraktivität und -stabilität. Schwenke [2001] beschreibt eine Abtrennung der hydrophilen, nach außen gerichteten Regionen der α -Untereinheiten des 11S-Globulins durch beschränkte tryptische Hydrolyse und einen damit verbundenen Anstieg der mittleren Hydrophobität, welche mit besseren Emulgiereigenschaften einhergeht. Eine enzymatische Hydrolyse kann sich auch laut Raymundo et al. [1998a], abhängig vom eingesetzten Enzym, positiv auf die Schaumbildung auswirken. Diese sowie die thermische Denaturierung werden als bevorzugte Methoden der Proteinveränderung im Bezug auf den Parameter Schaumbildung erachtet.

Als chemische Modifizierungen finden Alkylierung, Oxidation, Acylierung, Veresterung und Amidierung Anwendung [Moure et al., 2006].

Eine Studie zur Succinylierung und Acetylierung von Lupinenproteinen und deren Einfluss auf die Schaumbildung [Raymundo et al., 1998a] legt dar, dass eine Verbesserung des Schaumvermögens v. a. durch letztere Methode möglich ist, jedoch keine Korrelation zum Grad der Acetylierung besteht. Eine Succinylierung führt zu negativ geladenen Amino-Gruppen und damit zu einer stärkeren Abstoßung der Proteinkomplexe untereinander (partielle Auffaltung [Schwenke, 2001]), was die Filmbildung negativ beeinträchtigt, während durch die Acetylierung neutrale Amino-Gruppen eingeführt werden (Anstieg der Hydrophobität und damit verbesserte Emulgiereigenschaften [Schwenke, 2001]). Die Succinylierung trägt zur besseren Schaumbildung, einer verringerten Gelbildungstemperatur und durchscheinenderen Gelen bei [Schwenke, 2001].

Die Modifizierung kann auch durch eine Glykosylierung der ϵ -Aminogruppen des Lysins mit verschiedenen Kohlenhydraten durchgeführt werden [Pedrosa et al., 1997]. Pedrosa et al. [1997] gelang damit bei Erbsen-Vicilin eine Verbesserung der Emulgieraktivität und -stabilität, der Löslichkeit sowie, je nach Kohlenhydrat, der Schaumkapazität. Im Gegensatz zur Acylierung machen die Autoren für die Änderung der funktionellen Eigenschaften keine Auffaltung des Proteins oder strukturelle Modifikation verantwortlich, sondern eine Variation in den Protein-Lösungsmittel- bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Neben chemischen und enzymatischen Modifizierungen von Proteinen, können diese durch physikalische Einflüsse verändert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Denaturierung durch eine Wärmebehandlung, welche durch die hier durchgeführten Methoden der Saatgutbehandlung (s. Kapitel 2.4) einen Einfluss auf die technofunktionellen Eigenschaften der Proteinisolate ausüben kann.

2.1.5.4 Herstellung verschiedener Lupinenproteinpräparate

Berghout et al. [2015b] unterteilten die Herstellung von Proteinpräparaten in verschiedene Fraktionierungen: trockene, konventionell nasse (inklusive Ölextraktionsschritt) und wässrige (exklusive Ölextraktionsschritt) Fraktionierungen, die in Mehle, Proteinkonzentrate und Proteinisolate münden.

Pelgrom et al. [2015] beschrieben ein Verfahren zur Herstellung von Lupinenproteinkonzentraten durch Windsichten nach einer Vermahlung (sog. „Trockene Fraktionierung“): Die durch die Vermahlung von größeren zellulären Bestandteilen getrennten kleinen proteinreichen Fragmente werden, abhängig von der Geschwindigkeit des Sichtrades sowie dem Luftstrom, durch die Windsichtung je nach Größe und Dichte voneinander separiert. Dadurch lassen sich Proteinkonzentrate mit 54-59 % Protein in der Trockenmasse erhalten [Pelgrom et al., 2014]. Als zusätzliches Verfahren, in Kombination mit der Windsichtung oder auch alleinstehend, nutzten die Autoren die elektrostatische Separation von Lupinenmehl, die ebenfalls in Proteinkonzentraten mit bis zu 59 % Protein (bezogen auf die TM, $N \times 6,25$) resultierten [Pelgrom et al., 2015]. Die trockene Fraktionierung findet in der Regel bei stärkehaltigen Leguminosen Anwendung [Gueguen, 1983; Doxastakis, 2000; Sathe, 2002].

Eine andere Möglichkeit der Herstellung von Proteinkonzentraten ist die Extraktion der löslichen nicht-Protein-Bestandteile aus entölten Leguminosen [Doxastakis, 2000]. Vorab findet eine feuchte Wärmebehandlung des Mehls statt, um die Proteine in einen unlöslichen Zustand zu überführen.

Bei der wässrigen/nassen Fraktionierung wird vor allem die Löslichkeit der Proteine in verschiedenen Lösungsmitteln (organische Lösungsmittel, Wasser, Salzlösungen) und bei unterschiedlichen pH-Werten genutzt. Es lassen sich Proteinisolate mit einem Proteingehalt von über 90 % erzielen. Ein ernährungsphysiologischer Vorteil der wässrigen gegenüber der trockenen Fraktionierung ist die deutliche Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe durch die wässrige Extraktion [Gueguen, 1983]. Es stehen folgende nasse Verfahren zur Verfügung, die sich durch die Zusammensetzung der jeweils extrahierten Proteinfractionen unterscheiden:

Eine wässrige Extraktion kann durch Solubilisierung der Proteine in alkalischen Medien (Trennung der Proteine von unlöslicher Faser) und anschließende isoelektrische Fällung (Trennung der Proteine von löslichen Kohlenhydraten) durchgeführte werden [Berghout et al., 2015b]. Für die Herstellung des isoelektrischen Lupinenproteinisolats wird bei $\text{pH} = 4,5$ gefällt, wobei die Proteine z. T. aufgefaltet werden und somit denaturieren [Muranyi et al., 2013]. Eine Alternative zur isoelektrischen Fällung stellt die Gewinnung der Proteine aus dem Extrakt mittels Ultrafiltration dar [Gueguen, 1983], welche zusätzlich zu den Globulinen im isoelektrischen Isolat auch die Albumine erfasst, die folglich zu anderen technofunktionellen Eigenschaften des Proteinisolats führen [Makri et al., 2005].

Des Weiteren besteht die Möglichkeit ein sogenanntes micellares Lupinenproteinisolat herzustellen, wobei die Proteine kugelförmige Strukturen bilden [Muranyi et al., 2013; Sußmann et al., 2013b]. Dabei wird während der Extraktion in Salzlösung der sog. Einsalzeffekt genutzt. Eine Fällung der Proteine wird anschließend durch das Verdünnen des Extraktes und somit ein Absenken der Ionenstärke erzielt. Generell ist der Proteingehalt micellarer Proteinisolate höher als der der isoelektrisch gewonnenen, die Proteinausbeute geringer und die Aminosäurezusammensetzung vergleichbar [Muranyi et al., 2013, 2016]. Es gibt jedoch bedeutende Unterschiede im Gehalt der einzelnen Conglutine [Muranyi et al., 2016] (s. Kapitel 2.1.5.5).

Das Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV Freising) entwickelte ein halb-industrielles Verfahren zur Herstellung zweier Proteinisolate, Typ E und Typ F, die durch eine saure (pH 4,5; TypF) bzw. neutrale/wässrige (pH 7; TypE) Extraktion mit anschließender Ultrafiltration (Typ F) bzw. saurer/isoelektrischer Fällung (Typ E) gewonnen werden [Wäsche et al., 2001].

Sie zeichnen sich durch unterschiedliche technofunktionelle Eigenschaften, bedingt durch die verschiedenen Proteinfractionen in jedem Typ, aus. Im Isolat Typ E wurden α -, β - und δ -Conglutin nachgewiesen, während das Isolat Typ F hauptsächlich aus γ -Conglutin besteht [Yoshie-Stark et al., 2004; D'Agostina et al., 2006; Duranti et al., 2008]. Das Isolat E besitzt aufgrund der starken Fragmentierung der β -Conglutin-Peptide eine sehr hohe Emulgierkapazität und -stabilität, während das Isolat F über einen breiten pH-Bereich sehr gut löslich ist und eine starke Schaumaktivität und -stabilität aufweist [D'Agostina et al., 2006; Duranti et al., 2008].

2.1.5.5 Micellare Proteine

Neben den Casein-Micellen der Milch sind auch die globulären Speicherproteine vieler Pflanzen in der Lage, Micellen auszubilden [Ismond et al., 1991]. Bereits Ende der 1970er Jahre gab es mehrere patentierte Methoden zur Isolation dieser micellaren Proteine (z. B. Murray et al. [1979]).

Zur Herstellung dieser wird der sogenannte „Einsalzeffekt“ genutzt. Beim Lösen von Proteinen in verdünnten Salzlösungen lagern sich die dissoziierten Salzionen an ebenfalls geladene Peptidketten der Proteine, wobei die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen geschwächt werden. Das Protein geht in Lösung. Durch die Verdünnung dieser Lösung sinkt die Ionenstärke, die elektrostatischen Wechselwirkungen werden wieder gestärkt und es bilden sich verstärkt Protein-Protein-Bindungen und somit neue Proteinaggregate. Die Formation dieser Aggregate erfolgt im Sinne der thermodynamisch stabilsten Konformation. Dabei wenden sich die hydrophoben Seitenketten des amphiphilen Proteinmoleküls nach innen, um einen hydrophoben Kern zu bilden, während die hydrophilen Reste zur wässrigen Umgebung gerichtet sind [Ismond et al., 1991; Muranyi et al., 2013]. Es bilden sich „Proteinmicellen“. Ist die Aggregation jedoch zu stark durch elektrostatische Wechselwirkungen und zu wenig durch hydrophobe gesteuert, wird die Ausbildung von Micellen unterdrückt [Ismond et al., 1991]. Generell wird ein intramolekulares „hydrophil-hydrophob-Gleichgewicht“ zur Bildung von Proteinmicellen vorausgesetzt [Ismond et al., 1986a].

Die Aminosäurezusammensetzung scheint keinen Einfluss auf das Vermögen eines Proteinisolats zur Ausbildung von Proteinmicellen zu haben [Muranyi et al., 2016]. Jedoch werden von Muranyi et al. [2016] die nur geringe Menge an δ -, der hohe Ge-

halt an α - und das Vorhandensein von γ -Conglutin im Vergleich zum isoelektrischen Proteinisolat als mögliche Einflussfaktoren betrachtet. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen der Wasserlöslichkeit des δ -Conglutins und dessen Interaktion mit der wässrigen Phase als Grund für das Ausbleiben der Micellenbildung bei δ -Conglutin-reichen Proteinisolaten.

Für micellare Proteinisolate wird ein um 25 % höherer Gehalt an schwefelhaltigen sowie an essentiellen Aminosäuren beschrieben, als für isoelektrische. Der Chemical Score (Verhältnis der Gehalte essentieller Aminosäuren im Testprotein zum Referenzprotein, meist Milch- oder Eiprotein) für letztere ist deshalb ebenfalls geringer (62 gegenüber 48 %) [El-Adawy et al., 2001].

Durch den geringen Denaturierungsgrad und damit die hohe Nativität micellarer Proteinisolate werden diesen bessere funktionelle und ernährungsphysiologische Eigenschaften als beispielsweise isoelektrisch gefällten nachgesagt [Cordero-de-los-Santos et al., 2005]. Beispielsweise führen die hydrophoben Wechselwirkungen während der Ausbildung der Micellen im Präzipitationsschritt (s. Abbildung 2.2) zur fast vollständigen Eliminierung vieler antinutritiver Inhaltsstoffe [Arntfield et al., 1985].

2.2 Möglichkeiten der Fettreduktion in Lebensmitteln

Die Herstellung eines Lebensmittels unterliegt meist langjähriger Produkt- bzw. Rezeptentwicklung und ist oft verbunden mit der Überwindung verschiedener technologischer Herausforderungen. So ist es nicht möglich bei der Herstellung eines Lebensmittels lediglich den Bestandteil Fett zu entziehen, das gleiche Lebensmittel zu erhalten und es als „fettarm“ oder „fettfrei“ zu bezeichnen.

Um den fehlenden Bestandteil auszugleichen, bietet der Markt deshalb verschiedene Produkte zur Substitution des Fettes: sogenannte Fettaustausch- oder Fettersatzstoffe.

2.2.1 Fettaustauschstoffe

Fettaustauschstoffe sind natürlichen Ursprungs und simulieren die sensorischen Eigenschaften des Nahrungsfettes, leisten dabei aber nur einen geringen energetischen Beitrag zum Lebensmittel ($0-4 \text{ kcal/g}$ [Akoh, 1998]). Vorteile sind neben ihrem fettähnlichen Mundgefühl, ihre weitgehend bekannten physiologischen Effekte und die toxikologische Unbedenklichkeit. Einen Nachteil stellt jedoch die Unbrauchbarkeit zum Backen, Braten und Kochen dar, denn Fettaustauschstoffe besitzen meist eine nur geringe Wärmetoleranz [Zunft & Ragotzky, 1997]. Beispiele sind Produkte aus mikropartikulierten Proteinen, polymere Kohlenhydrate oder stark wasserbindende Quellstoffe.

2.2.1.1 Fettaustauschstoffe auf Proteinbasis (Mikropartikulierte Proteine)

Die Herstellung dieser Produkte erfolgt durch Zerkleinerung von Proteinen in Proteinkonzentraten (z. B. Sojaproteine, Albumine und Globuline in Casein, Molkenprotein, Hühnereiweiß) auf $0,1-3 \mu\text{m}$. Die dabei entstehenden Partikel werden auf der Zunge als cremig empfunden und geben dadurch den Anschein eines fetthaltigen Lebensmittels. Kleinere Partikel werden als wässrig, größere als pudrig bzw. sandig ($> 8 \mu\text{m}$) empfunden [Hübner, 2013].

Meist kommen mikropartikulierte Proteine in wenig erhitzten Milchprodukten zum Einsatz, da sie nur eine geringe Temperaturstabilität (meist $T < 65\text{ °C}$) aufweisen [Hübner, 2013]. 1 g Protein ersetzt dabei nach Quellung in 2 g Wasser 3 g Fett (bzw. 4 kcal ersetzten 27 kcal) [Belitz et al., 2008]. Da der Herstellungsprozess keine chemischen Veränderungen im Produkt bewirkt und auch die ernährungsphysiologischen Eigenschaften nicht beeinflusst, gelten mikropartikulierte Proteine als Lebensmittel [Zunft & Ragotzky, 1997]. Hierzu zählen u. a. Simplese (Milch-/Ei-Protein-basiert) oder Dairy-Lo (basierend auf modifiziertem, denaturiertem Molkenprotein). Vorteilhaft ist ihr positiver Beitrag zur Funktionalität im Lebensmittel. So sorgen sie meist für bessere Emulgierbarkeit, eine fettähnliche Trübung und sie besitzen eine gute Aroma-Freisetzung [Miraglio, 1995]. Für proteinbasierte Fettaustauschstoffe wird im Bezug auf das Aroma-Profil ein ähnliches Verhalten wie für Fett beschrieben [Schirle-Keller et al., 1994].

2.2.1.2 Fettaustauschstoffe auf Kohlenhydratbasis

Hierbei handelt es sich v. a. um Ballaststoffe, welche im Dünndarm unverdaulich sind, aber teilweise im Dickdarm mikrobiell zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut und resorbiert werden und somit im Gegensatz zu verdaulichen Kohlenhydraten nur einen Brennwert von ca. 2 kcal aufweisen [Belitz et al., 2008]. Vorteil der Ballaststoffe ist die Möglichkeit der gezielten Veränderung ihrer funktionellen Eigenschaften durch verschiedene chemische Modifikationen (z. B. Veresterung, Veretherung oder Reduktion zu Zuckeralkoholen) [Zunft & Ragotzky, 1997]. In diese Gruppe zählen u. a. auch die resistente Stärke, Inulin, Polydextrose (1 kcal/g) und mikrokristalline Cellulose (z. B. Avicel - im Dün- und Dickdarm unverdaulich, d. h. akalorisch). Ihr Einsatz im Lebensmittel beeinflusst vor allem Struktur, Viskosität und Cremigkeit, wodurch Fett simuliert werden kann [Miraglio, 1995]. Weiterhin lassen sich im Handel diverse Ballaststoffkonzentrate erwerben (Erbsenfaser, Apfelfaser, Weizenkleie usw. mit 0-2,8 kcal/g [Miraglio, 1995]).

2.2.1.3 Quellstoffe

Zu dieser Gruppe werden Gelbildner und Dickungsmittel auf Basis von Kohlenhydraten mit Ballaststoffcharakter (z. B. Gelbildner: Alginat, Pektin, Carrageen; Dickungsmittel: Gummi arabicum, Johannisbrotkernmehl) oder Proteinen (z. B. Gelatine) gezählt. Der fettsimulierende Charakter beruht hauptsächlich auf der starken Wasserbindung [Miraglio, 1995] - 1 g Pektin kann bis zu 60 g Wasser aufnehmen [Zunft & Ragotzky, 1997] - und der damit verbundenen Möglichkeit Gele oder hochviskose Lösungen auszubilden. Da nur geringe Mengen an Quellstoffen notwendig sind, um die durch das entzogene Fett entstandene Lücke zu schließen, kommt es hier zu einem Verdünnungseffekt des eingetragenen Brennwertes.

2.2.2 Fettersatzstoffe

Im Gegensatz zu den Fettaustauschstoffen sind die physikalischen Eigenschaften von synthetischen Fettersatzstoffen (Aussehen, Schmelzverhalten, Hydrophobie, Temperaturbeständigkeit) analog denen der Nahrungsfette. Sie sind jedoch z. T. nicht metabolisierbar und leisten somit keinen oder einen nur geringen energetischen Beitrag

zum Lebensmittel. Auch Fettersatzstoffe haben einige Nachteile: So können sie zu Verdauungsproblemen führen und die Bioverfügbarkeit fettlöslicher Vitamine herabsetzen. Zusätzlich belasten sie die Umwelt, da sie nicht abbaubar sind [Hübner, 2013]. Auch die Langzeiteffekte sind meist noch unbekannt. Beispiele sind spezielle Triglyceride sowie Fettersatzstoffe ohne Triglyceridstruktur, wie Fettsäureether, Retrofette oder Kohlenhydrat-Polyester, z. B. der Fettersatzstoff Olestra, der jedoch aufgrund seiner Nebenwirkungen (Magenkrämpfe, verringerte Vitaminaufnahme) in Deutschland nicht zugelassen ist [Zunft & Ragotzky, 1997; Hübner, 2013]. Für die Herstellung von Produkten der zweiten Gruppe werden Glycerin, Fettsäuren oder Esterbindungen durch Alkohole, langkettige Carbonsäuren oder Etherbindungen ausgetauscht.

2.2.2.1 Spezielle Triglyceride

Diese Triglyceride besitzen einen verminderten physiologischen Brennwert, da sie im Gastrointestinaltrakt nicht vollständig resorbiert werden bzw. z. T. aus kurzkettigen Fettsäuren bestehen (z. B. asymmetrische Triglyceride wie Caprenin und Salatrim), welche einen niedrigeren Energiewert (ca. 5 kcal/g [Miraglio, 1995]) haben als langkettige [Zunft & Ragotzky, 1997]. In diese Gruppe, für die keine Nebenwirkungen beschrieben sind, zählen ebenfalls die mittelkettigen Triglyceride sowie die Liposomen.

2.2.2.2 Kohlenhydratpolyester

Zur Herstellung fettähnlicher Produkte werden Mono-, Oligo-, und Polysaccharide mit Fettsäuren verestert. Meist ist Saccharose Ausgangsstoff, beispielsweise bei Olestra, wobei ein hoher Veresterungsgrad angestrebt wird, um eine Hydrolyse der Esterbindungen im Magen-Darm-Trakt zu vermeiden und ein wachsartiges statt flüssiges Produkt zu erhalten [Zunft & Ragotzky, 1997; Belitz et al., 2008].

2.2.2.3 Retrofette

Werden inverse Esterbindungen eingeführt, spricht man von den sog. Retrofetten [Belitz et al., 2008]. Es entstehen Ester mehrwertiger Säuren mit langkettigen Alkoholen, die durch Pankreaslipasen nicht angreifbar sind und somit keinen energetischen Beitrag leisten [Zunft & Ragotzky, 1997].

2.3 Herstellung des lupinenproteinbasierten Fettaustauschstoffes

Die Herstellung des micellaren Lupinenproteinisolats folgt einem Verfahren mittels Salzextraktion [Sußmann et al., 2013b]. Dabei wird die Globulinfraktion der vorher geschälten und zu Flocken verarbeiteten Lupinensamen durch 0,5molare NaCl-Lösung gelöst und anschließend der Extrakt von den festen Bestandteilen (proteinabgereicherte Lupinenflocken = Raffinat) getrennt. Aus dem Extrakt werden die Proteine danach durch eine Verdünnungsfällung mit entionisiertem Wasser gewonnen. Das Proteinisolat setzt sich dabei als hochviskose Masse am Boden ab und muss nach dem Dekantieren des Fällungsüberstandes mit Wasser salzfrei gewaschen werden. Das Fließschema zur Proteinisolierung ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

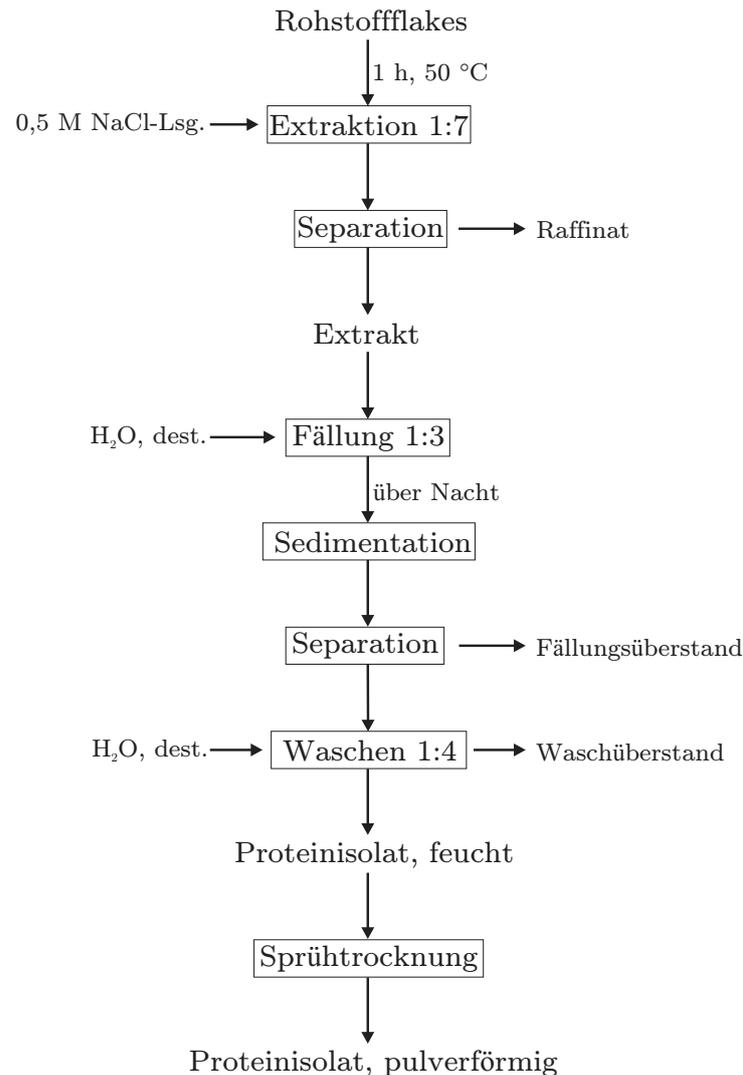


Abbildung 2.2: Herstellung des Proteinisolats aus Flocken in Anlehnung an Sußmann et al. [2013b]

Da die Denaturierung der ersten γ -Conglutinfractionen des Isolats ab ca. 70 °C einsetzt [Sirtori et al., 2010; Bader et al., 2011], ist eine abschließende Wärmebehandlung nur eingeschränkt möglich. Als Konsequenz dessen kann davon ausgegangen werden, dass bestimmte hitzeresistente Bakterienarten, bspw. sporenbildende grampositive Bazillenarten, den Erhitzungsprozess unbeschadet überstehen und somit bei der weiteren Verarbeitung des Isolats im Lebensmittel zum Verderb führen oder aufgrund möglicher Toxinbildung eine potenzielle Gesundheitsgefahr für den Verbraucher darstellen.

2.4 Saatgutbehandlung

Um ein mikrobiologisch sicheres Proteinisolat herzustellen, ist es deshalb notwendig bereits zu Beginn des Herstellungsprozesses auf eine größtmögliche Keimreduktion zu achten. Dies soll durch eine Saatgutentkeimung erzielt werden. Unter der Annahme, dass es nur zu einer vernachlässigbaren Rekontamination des Isolats kommt, können sich dadurch während des Prozesses keine Bakterien vermehren.

2.4.1 Methoden der Lebensmittelkonservierung

Industriell sind bereits einige Methoden zur Saatgutbehandlung etabliert. Tabelle 2.4 zeigt eine Zusammenfassung im Vergleich zu standardisierten Erhitzungen weniger gängiger und in der Entwicklung befindlicher Methoden der Lebensmittel- und Saatgutbehandlung zu Entkeimungszwecken und ihrer Vor- und Nachteile in Bezug auf den Entkeimungserfolg und den Einfluss auf das behandelte Gut.

Die in Tabelle 2.4 aufgezeigten Methoden induzieren eine Inaktivierung von Mikroorganismen im jeweiligen Lebensmittel. Dabei haben die Behandlungen unterschiedliche Einflüsse auf das Endprodukt. So kann eine Schädigung von Proteinen durch Erhitzung oder Bestrahlung von Lebensmitteln nicht ausgeschlossen werden. Diesen Methoden gegenüber stehen Anwendungen zur Eliminierung von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Produkten. Hier kann im Bezug auf Saatgut das Abbürsten oder Waschen genannt werden [Wilbois et al., 2007]. Bei diesen Methoden ist der Einfluss auf das Endprodukt minimal und eine Schädigung des Proteins eher unwahrscheinlich.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden nasse (Autoklavieren) und trockene (trockene Erhitzung) sowie die bislang nicht für alle Lebensmittel zugelassene UVC-Bestrahlung als Möglichkeiten der Saatgutbehandlung evaluiert.

Bakterien sind gegenüber feuchter Hitze empfindlicher als gegenüber trockener, da mit sinkendem a_W -Wert die Hitzeresistenz der Mikroorganismen steigt [Weber, 2010]. Somit wird eine stärkere Inaktivierung mittels Autoklavieren erwartet. Die feuchte Hitze führt zur Proteindenaturierung in Mikroorganismen. Ebenso sind Veränderungen im Lupinenprotein zu erwarten, die beim Autoklavieren wahrscheinlich stärker ausgeprägt sind als beim trockenen Erhitzen, weshalb eine Behandlung mit trockener Hitze in die Arbeit einbezogen wurde.

Die Notwendigkeit der Untersuchung der Wirkung von UV-Licht auf feste Lebensmittel und dessen Auswirkungen auf Sensorik, Ernährungsparameter und die Haltbarkeit wurde von Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas [2004] herausgestellt. Der Entkeimungserfolg mittels UV-Bestrahlung ist stark dosisabhängig, da die Mikroorganismen sehr unterschiedlich auf UV-Licht reagieren [Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004]. Die zur Inaktivierung notwendige UV-Bestrahlungsdosis sollte bei minimal 400 J/m^2 in allen Teilen des Produktes liegen [Sastry et al., 2000]. Die Inaktivierungskurve von Mikroorganismen durch UV-Licht ist sigmoidal: Es gibt eine initiale Schädigungsphase (Plateau), gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg bis zum Überschreiten der maximalen Schädigungsrate, in der die Überlebensrate der Mikroorganismen schnell absinkt. Am Ende kommt es zu einem sogenannten Tailing (Abflauen der Inaktivierung), da die Bakterien zunehmend UV-resistenter werden [Sastry et al., 2000].

Tabelle 2.4: Auswahl industrieller Methoden zur Entkeimung von Lebensmitteln und deren Vor- und Nachteile (nach Earnshaw et al. [1995]; Sala et al. [1995]; Bintsis et al. [2000]; Dehne et al. [2000]; Franke [2000]; Koutchma [2008]; Weber [2010]; Olaimat & Holley [2012]; Reinecke et al. [2013]; Li & Farid [2016])

Methoden	Eigenschaften	Vorteile	Nachteile	Einsatzbereich
Elektrische Volumenerhitzung	Anregung von Molekülen und Ionen durch elektromagnetisches Feld	Wärme entsteht im Lebensmittel selbst, Vermeidung von Temperaturgradienten, hohe Erhitzungsgeschwindigkeiten	z. B. Mikrowellen: geringe Eindringtiefe (einige cm)	Pasteurisierung von Fertiggerichten, Gemüse, Fleisch, Gewürze
Hochspannungsimpulsverfahren	20-80 kV/cm (1-100 μ s), Zerstörung der Zellmembran vegetativer Mikroorganismen in flüssigen Medien	hilfreich auch bei Aufschlussverfahren für Lebensmittel, geringe Temperaturentwicklung während der Behandlung	keine Inaktivierung von Bakteriensporen möglich, nicht für feste Lebensmittel	Pasteurisierung von flüssigen Gütern
Lichtimpulsverfahren	Lichtimpulse (170-2600 nm zur Inaktivierung von Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen, Viren, Bakteriensporen) für 1 μ s - 100 ms zur Oberflächenbehandlung	Durchdringung von Verpackungen - Dekontamination verpackter Güter möglich	geringere Entkeimungserfolge bei stark strukturierten Oberflächen durch Verschattung	Backwaren, Meeresfrüchte, Fleisch, Eier, Obst, Gemüse, Flüssigkeiten
Magnetimpulsverfahren	Inaktivierung vegetativer Mikroorganismen mittels starker Magnetfelder (5-50 Tesla für 10 μ s - 1 ms)	geringer Energiebedarf, Behandlung verpackter Produkte möglich		Haltbarkeitsverlängerung pasteurisierter Produkte
Ultraschallbehandlung	20-100 kHz, Kavitation (Implosion von Gasblasen erzeugt lokal sehr hohe Temperaturen und Druckanstieg bis 10000 bar), Bildung freier Radikale in Flüssigkeiten	höhere Proteinausbeuten möglich bei Vorschaltung vor Proteinextraktion	Intensitäten, die Lebensmittelqualität nicht beeinträchtigen, sind nicht ausreichend zur Keimreduktion, Sporen sind sehr resistent (Kombination mit Wärme oder Druck nötig)	flüssige Lebensmittel während der Herstellung

Methoden	Eigenschaften	Vorteile	Nachteile	Einsatzbereich
Gasplasma-Verfahren	Ionisation von Gas zur Erzeugung von u. a. Ionen und Elektronen	geringe Temperaturen, kostengünstig im Vergleich zu thermischen Prozessen	lange Behandlungszeiten für Sporen (abhängig vom Gas) durch höhere Resistenz notwendig	Gewürze, Meerestiere, Fertigsuppen, Verpackungsmaterial, verpackte Lebensmittel
Ionisierende Strahlung	γ - (< 10 kGy) und Elektronenstrahlen schädigen Zellenzyme und DNA, Radikalbildung	nichtthermisches Verfahren, gute Eindringtiefe bei γ -Strahlen (bis 40 cm; Elektronenstrahlen: bis 8 cm), für verpackte Güter geeignet	chemische und sensorische Veränderungen in Lebensmitteln, z. T. Vitaminverluste, Sporen sind resistenter (v. a. bei γ -Strahlung)	getrocknete aromatische Kräuter, Gewürze
Hochdruckbehandlung	Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen durch hydrostatischen Druck (> 6000 bar)	nichtthermisches Verfahren, schonende Methode in Bezug auf Erhalt der Inhaltsstoffe, Farbe, Geschmack, Aussehen	hohe Drücke (> 10000 bar) und Kombinationsverfahren (mit Temperaturerhöhung) für Viren und Bakteriensporen nötig, Fettoxidation bei tierischen Produkten erhöht, Änderung der Sekundär-/Tertiär-/Quartärstruktur von Proteinen, nicht für trockene Lebensmittel geeignet (H ₂ O-Gehalt < 15%)	Fruchtsäfte, Fruchtzubereitungen
Heißdampfbehandlung	Entkeimung durch heißen Wasserdampf und Druck	Endprodukt bleibt relativ trocken	nicht für weiche Lebensmittel geeignet	Kakaobohnen
UV-Bestrahlung	Wellenlängen um 250-260 nm (UVC) (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) inaktivieren Mikroorganismen durch DNA-Schädigung, auch als gepulstes Licht einsetzbar (100-1100 nm)	auch Bakteriensporen können abgetötet bzw. hitzlabiler werden (sind aber resistenter), sehr geringer Energieverbrauch	je nach Bestrahlungsart und -stärke: Beschleunigung autoxidativer Prozesse (Fett-, Vitamin-, Farbstoffzersetzung), Bildung von Peroxiden und Ozon, Geschmacksbeeinflussung, geringe Eindringtiefe (UVC), starke Erwärmung der Kammer bei gepulstem Licht	Trinkwasser, Obst, Gemüse, Hartkäse

2.5 Proteinfunktionalität

Der nachfolgende Abschnitt gibt einen Überblick über die wichtigsten funktionellen Eigenschaften von Proteinen im Bezug auf ihren Einsatz im Lebensmittel.

2.5.1 Definition und Zusammenhang zu Proteinen

Kroll et al. [2007] bezeichnet die technofunktionellen Eigenschaften als jene Eigenschaften von Lebensmittelbestandteilen, die „Rückschlüsse auf das verfahrens- und anwendungstechnische Verhalten“ dieser Substanzen erlauben. Dies sind physikochemische Eigenschaften, die Struktur, Erscheinung, Textur, Viskosität, Mundgefühl und Aromabindung beeinflussen [Morr & Ha, 1993]. Im Gegensatz dazu bezeichnet das „funktionelle Potential“ die „strukturbedingte Funktionalität der Pflanzenproteine, die die Gesamtheit an technofunktionellen Eigenschaften, die ein Protein aufgrund seiner nativen Struktur besitzt“, darstellt [Schwenke, 2001; Kroll et al., 2007]. Hierzu zählen auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Inhaltsstoffen sowie Proteinmodifizierungen. Folglich spiegeln die technofunktionellen Eigenschaften eines Proteins dessen intrinsische Eigenschaften (Zusammensetzung, Aminosäuresequenz, Konformation, Struktur) wider, die von Wechselwirkungen mit Lebensmittelbestandteilen (Wasser, Ionen, Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Aromen) sowie dem unmittelbaren Umgebungsmilieu (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke etc.) beeinflusst werden [Kinsella, 1979].

Morr & Ha [1993] teilen technofunktionelle Eigenschaften in hydrationsbezogene (auf Protein-Wasser-Wechselwirkungen basierend: Dispergierbarkeit, Löslichkeit, Quellung, Viskosität, Geliervermögen), oberflächenbezogene (Emulsionsbildung, Schaumbildung, Adsorption an Luft-Wasser- und Öl-Wasser-Grenzflächen) und sonstige Eigenschaften (Diffusion, Denaturierung) ein. Kinsella [1979] und Moure et al. [2006] gliedern in die hydrationsbezogenen Eigenschaften das Wasser- und Ölbindevermögen, die Löslichkeit, die Verdickung sowie Benetzbarkeit. Als zweite Gruppe nennen die Autoren Eigenschaften, die in Verbindung mit der Proteinstruktur und der Rheologie stehen (Viskosität, Elastizität, Klebrigkeit, Aggregation, Gelbildung). Die dritte Gruppe bilden oberflächenbezogene Eigenschaften, wie Emulgierbarkeit, Schaumbildung, Bildung von Protein-Lipid-Filmen und Aufschlagbarkeit. Auch organoleptische Eigenschaften eines Proteins (Farbe, Geruch, Geschmack, Mundgefühl, Textur etc.) werden teilweise zu den funktionellen Eigenschaften gezählt [Kinsella, 1979]. Das Vermögen eines Proteins, eine dieser funktionellen Eigenschaften auszuüben, steht nach Morr & Ha [1993] in Bezug zu pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur, Viskosität und dem Vorhandensein anderer Stoffe, wie beispielsweise mehrwertige Ionen, Zucker, Proteine oder Hydrokolloide, in der Matrix.

Im Bezug auf Proteine werden deren technofunktionelle Eigenschaften von der Prozessführung während der Proteinisolation, durch Wechselwirkungen mit Nichtprotein-komponenten sowie durch die Art des resultierenden Proteinproduktes (Mehl, Konzentrat mit Proteingehalten > 60 %, Isolat mit Proteingehalten > 85 %) beeinflusst [Kroll et al., 2007]. Hinsichtlich der Prozessbedingungen wird micellaren Proteinisolaten eine höhere Funktionalität als alkaliextrahierten oder isoelektrisch gefällten nachgesagt [Kroll et al., 2007]. Generell weisen Proteinisolate eine höhere Funktionalität auf als Proteinkonzentrate [Doxastakis, 2000].

Je nach Menge der im Lebensmittel eingesetzten Proteinkomponente (Hauptbestandteil oder Zutat) sind entweder deren technofunktionelle oder ernährungsphysiologische Eigenschaften vordergründig zu betrachten [Schwenke, 2001].

2.5.2 Ausgewählte funktionelle Eigenschaften

Als lebensmitteltechnologisch bedeutendste funktionelle Eigenschaften gelten das Wasser- und Ölbindevermögen, die Löslichkeit, die Emulgiereigenschaften sowie das Gel- und Schaumbildungsvermögen. Diese wurden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Oberflächenhydrophobität von Proteinen wurde als zusätzlicher Parameter zur Bestimmung der Technofunktionalität herangezogen. Nachfolgend sollen die wichtigsten Aspekte kurz im Zusammenhang mit Proteinen beschrieben und der Einfluss verschiedener Parameter auf die funktionellen Eigenschaften erläutert werden.

2.5.2.1 Wasserbindevermögen

Das Wasserbindevermögen eines Proteins bezeichnet die Fähigkeit des Proteins Wasser aufzunehmen und gegen die Schwerkraft zu behalten, was die Textur und das Mundgefühl eines Lebensmittels beeinflusst [Moure et al., 2006; Piornos et al., 2015]. Hierzu zählen gebundenes Wasser, hydrodynamisches Wasser, Kapillarwasser sowie physikalisch eingeschlossenes Wasser [Moure et al., 2006]. Es wird beeinflusst von der Verfügbarkeit polarer Aminosäuren für Protein-Wasser-Wechselwirkungen bzw. allgemein dem Aminosäureprofil und ist abhängig von der Proteinkonformation sowie den Rahmenbedingungen des jeweiligen Experiments [Rodríguez-Ambriz et al., 2005; Moure et al., 2006].

Im Bezug auf Lupinenproteinisolate ist das Wasserbindevermögen abhängig von den Extraktionsbedingungen. Während micellare Proteinisolate 1,3-2,3 g Wasser pro Gramm Protein binden können [El-Adawy et al., 2001; Rodríguez-Ambriz et al., 2005], wurden für isoelektrisch gefällte Isolate bis zu 6 g/g beschrieben [King et al., 1985]. Im Vergleich wurden für natives Sojaprotein 4 g/g [Sorgentini et al., 1995], für hitzebehandeltes ca. 7,5 g/g ermittelt [King et al., 1985].

2.5.2.2 Ölbindevermögen

Das Ölbindevermögen stellt einen wichtigen Parameter dar, um die Aroma- und Geschmackserhaltung eines Produkts vorauszusagen sowie das Mundgefühl zu verbessern [Khan et al., 2011]. Weiterhin spielt es eine Rolle bei auf Emulsionen basierenden Lebensmitteln [Piornos et al., 2015] und für die Entwicklung gebratener Produkte [Sathe, 2002]. Ein hohes Ölbindevermögen ergibt sich, indem unpolare Seitenketten der Proteine an die Kohlenwasserstoffketten der Lipide binden [Rodríguez-Ambriz et al., 2005]. Als weiterer Punkt wird der physikalische Einschluss des Öls zwischen den Proteinmolekülen in Abhängigkeit vom Schüttgewicht des Proteinpulvers diskutiert [Dench et al., 1981].

Micellare Lupinenproteinisolate weisen ein Ölbindevermögen von 2,2 ml bis 2,9 g pro Gramm Protein auf [El-Adawy et al., 2001; Rodríguez-Ambriz et al., 2005]. Für isoelektrisch gefällte Isolate wurden ca. 1,4 g/g ermittelt [Piornos et al., 2015]. Das Ölbindevermögen von bspw. Sojaprotein beträgt 1,5-2,5 ml/g, in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode [Rodríguez-Ambriz et al., 2005].

2.5.2.3 Löslichkeit

Die Löslichkeit eines Proteins bezeichnet die Ausprägung des Gleichgewichts zwischen hydrophilen Protein-Lösungsmittel- und hydrophoben Protein-Protein-Wechselwirkungen [Schwenke, 2001]. Sie hängt stark von der Aminosäurezusammensetzung der Proteinoberfläche, dem Molekulargewicht des Proteins sowie dessen Sekundär- und Tertiärstruktur ab, wobei eine geringe Zahl hydrophober Reste, eine hohe Oberflächenladung, elektrostatische Abstoßung sowie Hydratation der Oberflächenproteine mit einer höheren Löslichkeit einhergehen [Morr & Ha, 1993; Moure et al., 2006]. Dies geschieht vor allem ober- und unterhalb des isoelektrischen Punktes eines Proteins.

Die technologische Vorgeschichte der Proteinpräparate, z. B. Denaturierung durch Wärmebehandlung, Ein- und Aussalzeffekte [Moure et al., 2006], beeinflusst die Löslichkeit, wobei jene der Globuline pH- und Ionenstärke-abhängig ist [Kroll et al., 2007]. Sie steigt abseits des isoelektrischen Punktes sowie in Anwesenheit geringer Mengen einwertiger Ionen, welche die inter- und intramolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Carboxyl- und ϵ -Aminogruppen schwächen [Morr & Ha, 1993]. Eine höhere Stickstoff-Löslichkeit des nativen Proteins korreliert mit besseren technofunktionellen Eigenschaften (Schaumbildung, Emulgierbarkeit) [Neto et al., 2001; Yoshie-Stark et al., 2004; Moure et al., 2006; Piornos et al., 2015].

In pH-Wert-abhängigen Untersuchungen wurden für viele Pflanzenproteine Löslichkeitskurven ermittelt, die eine minimale Löslichkeit der Proteine zwischen pH 4 und 5 beschreiben. Auch für Lupinenproteine liegt in diesem Bereich der isoelektrische Punkt [Piornos et al., 2015], an welchem Proteine die schlechteste Löslichkeit besitzen (12-15 % [Yoshie-Stark et al., 2004]). In Richtung eines stärker sauren oder basischen pH-Wertes verbessert sich die Proteinlöslichkeit deutlich [King et al., 1985; Neto et al., 2001; Lqari et al., 2005]. Die beste Löslichkeit ist um pH 10 zu erwarten (89-98 % [Rodríguez-Ambriz et al., 2005; Piornos et al., 2015]).

2.5.2.4 Emulgiervermögen

Emulsionen bestehen aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, der kontinuierlichen (äußere) Phase und der dispersen (innere) Phase. Emulgatoren bieten die Möglichkeit, die Trennung dieser, als Dispersion kleiner Tropfen der einen Phase in der anderen vorliegenden Emulsion, zu verlangsamen, indem sie die Grenzflächenspannung zwischen beiden Phasen herabsetzen. Es kommt zu einer partiellen Auffaltung der Proteine und der Hinwendung hydrophober Aminosäurereste zur Ölphase [Morr & Ha, 1993]. Die Destabilisierung der Emulsion erfolgt durch Flokkulierung (Bildung von Aggregaten), Koaleszenz (Zusammenfließen von Öltröpfchen), Aufräumen oder Sedimentation [Hermansson, 1979].

Die Messung des Emulgiervermögens erfolgt oft mit Hilfe des Emulsionsaktivitätsindex (EAI), welcher die Größe der Phasengrenzfläche angibt, die von einem Gramm Protein belegt wird. Eine weitere Methode besteht in der Messung der Emulgierkapazität (EC), die das Volumen an Öl, welches von einem Gramm Protein im Lösungsmittel emulgiert werden kann, darstellt. Eine dritte Kenngröße ist die Emulsionsstabilität (ES) und bezieht sich auf den Anteil des Ausgangsvolumens der Emulsion der nach einer definierten Lagerungsperiode oder verschiedenen Beanspruchungen der Emulsion (Erhitzen, Zentrifugieren) messbar ist.

Emulsionsaktivität und -stabilität proteinstabilisierter Emulsionen werden beein-

flusst durch den pH-Wert und die Ionenstärke des wässrigen Mediums, die Art des Öls, das Volumen der Ölphase, die Proteinkonzentration, das Photometer sowie die Art und Geschwindigkeit des Homogenisators [Pearce & Kinsella, 1978]. Eine Denaturierung der Proteine führt zu einer höheren Hydrophobität der Proteinoberfläche und damit zu besseren Emulgiereigenschaften [Moure et al., 2006].

Für Lupinenproteinextrakte wurden Emulsionsstabilitätsindizes von 45-72 m²/g beschrieben [Hojilla-Evangelista et al., 2004], für Sojaproteine 6-102 m²/g, abhängig von den Extraktionsbedingungen [Wu et al., 1998; Hojilla-Evangelista et al., 2004; Onsaard et al., 2010]. Für ein Erbsenprotein wurden 85 m²/g ermittelt [Pedrosa et al., 1997]. Die Emulsionsstabilität für Lupinenproteine soll höher als jene für Sojaproteine sein (ca. 25 bzw. 15 min) [Hojilla-Evangelista et al., 2004].

2.5.2.5 Schaumbildungsvermögen

Beim Aufschäumen einer Proteindispersion wird Luft in Form von Blasen in die Flüssigkeit eingebracht, wobei die amphiphilen Proteinmoleküle an den Luftblasen adsorbieren [Doxastakis, 2000]. Sie wirken somit als Emulgatoren und setzen die Grenzflächenspannung herab [Makri et al., 2005]. Das Protein muss dabei möglichst schnell an der Luft-Wasser-Grenzfläche adsorbieren, Konformationsänderungen und Umlagerungen durchführen (partielle Auffaltung, um hydrophobe Aminosäurereste der Luft zuzuwenden) und durch intermolekulare Wechselwirkungen (Ausbildung von Disulfidbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken) einen kohäsiven, viskoelastischen Film ausbilden, der v. a. für eine gute Schaumstabilität wichtig ist [Morr & Ha, 1993; Doxastakis, 2000].

Das Vermögen zur Schaumbildung kann in der Schaumkapazität und Schaumstabilität ausgedrückt werden. Erstere beschreibt dabei die Volumenzunahme durch einen definierten Aufschäumprozess (durch Aufschlagen, Schütteln oder Gaseintrag) in Bezug auf das Ausgangsvolumen der Proteinlösung. Zur Ermittlung der Schaumstabilität wird entweder das nach einer festgelegten Standzeit verbleibende Volumen im Vergleich zum Volumen nach dem Aufschlagen oder die während dieser Zeit aus dem Schaum austretende Flüssigkeit herangezogen.

Schaumbildungs- und Emulgierverhalten sind abhängig vom zur Entölung verwendeten Lösungsmittel [Doxastakis, 2000]. Demnach löst n-Hexan apolare Lipide (Triglyceride), wohingegen polare Lipide (Fettsäuren, Phospholipide) im Rohstoff erhalten bleiben. Es kommt zu einer gewissen Denaturierung der Proteine und damit einem Einfluss auf die Schaum- und Emulsionsbildung. Weiterhin besteht eine Abhängigkeit von molekularen Gegebenheiten, wie Proteinkonformation, -flexibilität (verbunden mit der Menge an die Tertiärstruktur stabilisierenden Disulfidbrücken) und -größe, Ladung und Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Reste in der Primärstruktur, sowie von äußeren Faktoren, wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und anderen um die Adsorption an die Grenzfläche konkurrierenden Lebensmittelbestandteilen [Morr & Ha, 1993; Moure et al., 2006; Benjamin et al., 2014]. Im Vergleich zu niedermolekularen oberflächenaktiven Substanzen (z. B. Phospholipide, Mono- und Diglyceride) bilden Proteine trotz ihrer geringeren Wirksamkeit zur Reduktion der Oberflächenspannung stabilere Schäume und Emulsionen [Moure et al., 2006].

Für Lupinenproteine werden Schaumkapazitäten zwischen 50 % und 220 % erwartet [Sathe et al., 1982; El-Adawy et al., 2001; Rodríguez-Ambriz et al., 2005]. Je nach

Schaumvorrichtung und Proteinanteil in der Lösung können Werte bis zu 2000 % erreicht werden [D'Agostina et al., 2006]. Sathe et al. [1982] ermittelten Schaumstabilitäten von 32 % bis 64 % für entölte, bzw. nicht-entölte Lupinenproteinkonzentrate nach einer Standzeit von 2 h. Ackerbohnen- und Erbsenproteinisolate wiesen Schaumkapazitäten zwischen 250 % und 350 % im Falle von isoelektrischen Isolaten, bzw. bis zu 550 % bei durch Ultrafiltration gewonnenen Isolaten auf.

2.5.2.6 Gelbildungsvermögen

Ein Gel wird als Zwischenzustand zwischen fest und flüssig bezeichnet [Moure et al., 2006]. Proteine können dabei dreidimensionale Quervernetzungen in Lebensmitteln bilden, v. a. durch große Moleküle und abhängig von ihrem Vermögen zur Denaturierung [Moure et al., 2006]. Durch eine partielle Auffaltung der Tertiärstruktur bilden sich lange Ketten, ohne dass es zur Lösung kovalenter Bindungen kommt [Moure et al., 2006].

Mine [1995] und Sun & Arntfield [2010] fassen den Prozess der Gelbildung bei Eiweißen bzw. globulären Proteinen folgendermaßen zusammen: Nach einer initialen Denaturierung und Auffaltung des Proteins (Freilegen hydrophober Gruppen) kommt es in einem ersten Schritt zur Trübung aufgrund der Bildung sphärischer Aggregate durch intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen. Nachfolgend versteifen bzw. agglomerieren diese Aggregate durch die Bildung von Disulfidbrücken, welche die Stabilität des Gels erhöhen können. Im dritten Schritt steigt die Elastizität des Gels durch die Kühlung stark an. Hierbei bilden sich in kurzer Zeit viele Wasserstoffbrücken. Ein Gel-Netzwerk entsteht. Der Großteil des Lösungsmittels wird dabei physikalisch im Gel eingeschlossen und somit immobilisiert [Morr & Ha, 1993].

Das Geliervermögen ist abhängig von Proteinkonformation, Aminosäurezusammensetzung, Molekulargewicht, isoelektrischem Punkt, Ladung, Hydrophobität, Glykosylierung, struktureller Flexibilität und der physikalisch-chemischen Umgebung (pH-Wert, Ionen-Zusammensetzung, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Temperatur) [Morr & Ha, 1993; Sathe, 2002]. Während Temperaturen bis 80 °C durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zur Ausbildung eines „Pseudogels“ bei Lupinenproteinen führen, bilden sich ab 90 °C Disulfidbrücken und dreidimensionale Strukturen [Doxastakis, 2000]. Eine NaCl-Konzentration bis 0,5 mol/l hat dabei einen stabilisierenden Effekt. Bei Proteingelen wird zwischen transparenten und koagulierten Gelen unterschieden. Erstere werden verstärkt von Proteinen mit hydrophilen Aminosäuren gebildet, letztere durch unpolare Reste [Moure et al., 2006]. Jedoch entscheiden auch Proteinkonzentration, pH-Wert, Ionen im Lösungsmittel, Aufheizrate und Temperatur über die Transparenz und Elastizität der Gele [Morr & Ha, 1993]. Auch die Anwesenheit von Nicht-Protein-Komponenten (Kohlenhydrate, Fette) spielt eine Rolle [Sathe, 2002]. Während die Gelbildung eine geordnete Restrukturierung der entfalteten Polypeptide beschreibt, ist die Koagulation durch eine ungeordnete Aggregation der Polypeptide gekennzeichnet [Kinsella, 1979].

Da Gele in der Lage sind Wasser, Fett, Zucker, Aromastoffe und andere Substanzen einzuschließen, spielen sie in der Produktentwicklung eine große Rolle [Hermansson, 1979; Rodríguez-Ambriz et al., 2005].

Meist wird bei der Bestimmung des Gelbildungsvermögens eines Proteins die LGC (Least Gelation Concentration) bestimmt, also die geringste zur Ausbildung eines Gels notwendige Menge an Protein.

Die LGC für Sojaproteinisolat beträgt 8-9% [Sorgentini et al., 1995; Rodríguez-Ambriz et al., 2005]. Für salzextrahierte Erbsenproteinisolat wurden 5,5% [Sun & Arntfield, 2010], für micellare Lupinenproteinisolat 8% und für isoelektrisch gefällte 6-20% beschrieben [Rodríguez-Ambriz et al., 2005; Piornos et al., 2015]. Durch ein Dialyseverfahren konnte ein Lupinenproteinisolat mit einer LGC von nur 4% hergestellt werden [Kiosseoglou et al., 1999]. Die Gelbildung der Proteine ist somit stark von den Extraktionsbedingungen abhängig.

2.5.2.7 Oberflächenhydrophobität

Die Oberflächenhydrophobität (SH) bezeichnet die Menge an hydrophoben Gruppen an der Oberfläche eines Proteinmoleküls [Jiang et al., 2014], die mit anderen Lebensmittelbestandteilen wechselwirken können. Ein Anstieg der Oberflächenhydrophobität führt zu besseren Gel- und Emulgiereigenschaften [Duranti & Gius, 1997; Khan et al., 2011]. Weiterhin wird eine hohe Oberflächenhydrophobität im Zusammenhang mit nur wenig aggregierten Proteinen, also einem geringen Denaturierungsgrad, betrachtet [Hojilla-Evangelista et al., 2004]. Eine Korrelation der Oberflächenhydrophobität eines Proteins mit verschiedenen funktionellen Eigenschaften desselben wird diskutiert [Morr & Ha, 1993; Schwenke, 2001]. Dabei wird zwischen der experimentell mittels Fluoreszenz-Methoden (Bindung von Molekülen zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen) ermittelten Oberflächenhydrophobität sowie der rechnerisch aus den freien Energien des Transfers von Aminosäureseitenketten von einer organischen in eine wässrige Umgebung ermittelten sog. mittleren Hydrophobität des Proteins nach Bigelow [1967] unterschieden, wobei eher die Hydrophobität und Ladungsverteilung der Proteinoberfläche für dessen Funktionalität verantwortlich gemacht werden [Schwenke, 2001].

Bei der Analytik dieses Parameters mittels Fluoreszenz-Messung wird zwischen aliphatischer (bestimmt mittels CPA - *cis*-parinaric acid) und aromatischer (bestimmt mittels 8-Anilidonaphthalin-1-sulfonsäure) Hydrophobität unterschieden, je nach Bindungsvorlieben und Struktur des jeweiligen Reagenz [Hayakawa & Nakai, 1985].

Für Lupinenmehl wurden SH-Werte um ca. 813 ermittelt [Lampart-Szczapa et al., 2006]. Säuregefällte Lupinenproteinextrakte wiesen eine Oberflächenhydrophobität von SH = 302, durch Ultrafiltration hergestellte von SH = 429 auf [Hojilla-Evangelista et al., 2004]. Im Vergleich dazu wurden für die entsprechenden Sojaproteinextrakte SH-Werte von 530 bzw. 844 ermittelt [Hojilla-Evangelista et al., 2004], während durch isoelektrische Fällung Isolate mit SH \approx 200 gewonnen werden konnten [Jiang et al., 2014].

2.5.2.8 Bedeutung für die Lebensmittelentwicklung

Laut Miraglio [1995] kann Fett v. a. durch die Struktur, Viskosität und Cremigkeit eines Lebensmittels simuliert werden. Alle oben erwähnten funktionellen Eigenschaften in Verbindung mit sensorischen Untersuchungen lassen somit Aussagen zu, die sowohl die allgemeine Anwendbarkeit der hier untersuchten Proteinisolat als auch Einflüsse auf deren fettähnlichen Charakter nach der Behandlung der Rohstoffe betreffen.

Die funktionellen Eigenschaften selbst sind für jeweils unterschiedliche Lebensmittel von besonderer Bedeutung: Beispielsweise spielt die Löslichkeit vor allem bei Getränken eine Rolle, während die Gelbildung bei Fleischerzeugnissen, Käse und Quark und das Schaumvermögen v. a. bei Desserts und anderen aufgeschlagenen Speisen ausschlaggebend sind [Kinsella, 1979].

Neben der Eignung eines Proteins im Lebensmittel aus technologischer und funktioneller Sicht, sollten Lebensmittelsicherheitskriterien und ernährungsphysiologische Eigenschaften zusätzlich beachtet werden [Kinsella, 1979]. Im Bezug auf micellare Lupinenproteine soll diese Arbeit einen signifikanten Beitrag zu Teilen dieser Themen leisten, denn der Einsatz eines Proteins im Endprodukt ist für dessen Textur, Sensorik und Nährwertprofil von Bedeutung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Saatgut

Die Lupinensamen von *Lupinus angustifolius* Vitabor und Boregine entstammen der Saatzucht Steinach (Saatzucht Steinach GmbH & Co. KG, Wittelsbacherstraße 15, 94377 Steinach). Die Samen wurden im Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (Fraunhofer IVV, Giggenhauser Straße 35, 85354 Freising) geschält, gesichtet, flockiert und entölt. Des Weiteren wurde eine größere Menge an Extrakt für die UHT-Versuche sowie feuchtes Proteinisolat für die Pasteurisierungsversuche im Technikum des Fraunhofer IVV hergestellt und für diese Arbeit verwendet.

3.1.2 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Software

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Absaugsystem	Turbosog Prozessabsauger TUR2/6300 mit Vorabscheider TVK/6320	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Analysenwaage	Excellence XS 104	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Autoklav	vertikaler Standautoklav, VX-120	Systec GmbH, Linden
Block-Aufschlusseinheit	Kjeldatherm KB manuell mit TR-Regler	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Bioscience AG, Wallisellen
Datenlogger für Pasteurisierungsversuche	ALMEMO 2590-4S (Temperaturfühler ZA 9020-FS Thermo E4, NiCr-Ni Typ K, FTA15L0100)	Ahlborn Mess- und Regelungstechnik GmbH, Holzkirchen
Destillationsapparatur	Vapodest 50	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Differentialkalorimeter	DSC Q100 Tzero Sample Press	TA Instruments, New Castle TA Instruments, New Castle
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN 3 Cell PROTEAN II xi Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Entkeimungsstrahler	Puritec HNS 15 W G13 OFR, 254 nm, Ozon-frei	Osram GmbH München
Gefriertrocknungsanlage	Maxi-Dry Lyo	Heto-Holten A/S, Allerød
Geldokumentation	MultiImage™ Light Cabinet TFX-20.M	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée (Frankreich)
Geltrocknung	Gel Drying Frames, 24x24 cm, K421.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Inkubator	BD 115	Binder GmbH, Tuttlingen
Kjeldahl-Kolben	G-14, 12-0301	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Kontaktthermometer	ETS-D5	IKA GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer	IKAMAG RH	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, IKA-Labortechnik, Staufen
	RET basic	IKA GmbH & Co. KG, Staufen
Messermühle	Grindomix GM 200, Mahlbehälter aus PP; Messer: 02.446.0014	Retsch GmbH, Haan
Mikroskope	Eclipse Ni-U, Objektiv: 100x, Ölimmersion Olympus CH20	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam Olympus Optical Co., Tokyo
pH-Meter	pH 340i	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipetten	Pipetman P20 Pipetman P100 Pipetman P200 Pipetman F1000 Pipetman P1000 Pipetman P10ml	Gilson, Inc., Middleton Gilson, Inc., Middleton Gilson, Inc., Middleton Gilson, Inc., Middleton Gilson, Inc., Middleton Gilson, Inc., Middleton
Planeten-Kugelmühle	PM 100, Mahlbecher: 1.4034 (Rostfreier Stahl), 250 ml, 4 Kugeln ($\varnothing = 3$ cm)	Retsch GmbH, Haan
Rondoflame		Technomara Deutschland GmbH, Fernwald
Schüttelwasserbad	GFL 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttler	IKA-Vibro-Fix VF2, max. 2500 1/min MS2 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen IKA Works, INC, Wilmington
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS12, Sicherheitsklasse 2	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralfluorometer	FluoroMax-2	Instruments S.A., Inc., Jobin Yvon-Spex, Edison (USA)
Spektralphotometer	CM-600d mit Glasküvette CR-A504	Konica Minolta Inc., Osaka
	Spekol 1200	Analytik Jena AG, Jena
Stabmixer mit Schneebesenaufsatz	220 Volt, 60 Hz, 250 Watt, Art.-Nr. 40970	Gastroback GmbH, Hollenstedt
Stomacher	400 Circulator	Seward Limited, London
Thermomixer	comfort mit Thermoblock 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank	FD 240	Binder GmbH, Tuttlingen
UHT-Anlage	Indirekte UHT-Pilot-Erheizungsanlage	GEA Finnah GmbH, Ahaus
Ultraschallbad	USG 50 Schallwanne + Generator	VEB Messgerätewerk, Ballenstedt
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD 2200 (HF-Generator: GM 2200, Ultraschallwandler: UW 2200, Boosterhorn: SH 213 G, Mikrospitze: MS 73)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultra-Thurrax	T 25 basic, Dispergierwerkzeug: S 25N 18G	IKA GmbH & Co. KG, Staufen
Waagen	440-47N, max. 2000 g, d = 0,1 g	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
	PCB 6000-1, max. 6000 g, d = 0,1 g	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad (für Gelbildungsversuche)	Typ WB 10, 1,6 kW, 230 V, 50/60 Hz, DIN 12879	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zentrifugen	Heraeus Biofuge Primo, Rotor: 7590	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
	5415 D, Rotor: F-45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg
	5804 R, Rotor: F-34-6-38	Eppendorf AG, Hamburg
	Universal 16 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Abwägeschiffchen	MN 808, 58 x 10 x 10 mm, Stickstoff-frei	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
DSC Deckel	Tzero hermetic lids, T 131106, 901684.901	TA Instruments, New Castle
DSC Tiegel	Tzero hermetic pans, T 110516, 901683.901	TA Instruments, New Castle
Glasplatten u. a. für SDS-PAGE	10,1 x 7,3 cm (innen), 20-30-114 mit 0,75 mm Spacer, 7,3 cm x 10,1 cm, 20-30-116 Mini-PROTEAN Comb, 10-well, 0,75 mm, 33 µl PROTEAN II xi Inner Plate, 20 cm, 1651823 PROTEAN II xi Outer Plate, 20 cm, 1651824 PROTEAN II xi Comb, 20-well, 1,0 mm, 1651867 Flat Spacer, 22,3 cm lang, 1 mm stark, 20-32-108	biostep GmbH, Jahnsdorf biostep GmbH, Jahnsdorf Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München biostep GmbH, Burkhardtsdorf
Homogenisierbeutel	BBag 03, Polyethylen, steril, 190 mm x 300 mm, 400 ml, Seitenfilter, Filterstärke 70 µm, EP17.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Küvetten	Polystyrol, 10 x 10 x 55 mm, REF: 67.749 PMMA, 12,5 x 12,5 x 45 mm, REF: 67.755	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Mira cloth	Viscose-Polyesterfiltermedium, Porengröße: 20-25 µm	EMD Millipore Corporation, Billerica
Objektträger	Menzel-Gläser, geschnitten, 76 x 26 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Parafilm	PM-996	Bemis Corp., Neenah
Pipettenspitzen	blau, 50-1000 µl klar, graduert, 1-200 µl, TreffLab	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim Treff AG, Degersheim
Reaktionsgefäße	mit Deckel, Polypropylen, 2 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Siedesteine	Typ B	J.P. Pöllath - Labor-Technologie, Bamberg
Spritzenvorsatzfilter	PES-Membran, 0,20 µm, 431229, steril	Corning Incorporated, Corning
Zentrifugenröhrchen	Polypropylen 50 ml konisch (91050), 14 ml konisch (91015), 12 ml flach (91019)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen

Tabelle 3.3: Verwendete Chemikalien und Nährmedien

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Acrylamid	Rotiphorese Gel30 (37, 5:1), 3029.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	≥ 98 %, p.a., ACS, 9592.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
8-Anilino-1-naphthalin- sulfonsäure, Ammoniumsalz	ANS, zur Fluoreszenz, ≥ 97 % (HPLC), 10417-5G-F	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	≥ 99,8 %, p.a., ACS, ISO, 6943.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Indikator	Chemapol, Prag
Carbol-Gentianaviolett- Lösung		Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Citronensäure-Monohydrat	≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO, 3958.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Columbia-Agar mit Schafblut Plus (Blutagar)	PB5039A	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Coomassie Brilliantblau	G250, 27815	Fluka Chemie AG, Buchs
Ethanol	≥ 96 %, vergällt mit ca. 1 % MEK, T171.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	≥ 99,5 %, Ph.Eur., reinst, 5054.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbelösung	PageBlue™ Protein Staining Solution, 24620	Thermo Scientific, Rockford (U.S.A.)
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	1.09001.0100	Merck KGaA, Darmstadt
Fuchsin-Lösung nach Gram		Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Gallussäure	wasserfrei, zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	≥ 99,5 %, p.a., wasserfrei, 3783.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Pufferan, ≥ 99 %, p.a., 3908.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphos- phat	≥ 99 %, p.a., ACS, 3904.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumnatriumtartrat- Tetrahydrat	p.a., ACS, ISO, 108087	Merck KGaA, Darmstadt
Kjeltabs	CX, AA16	Thompson & Capper Ltd, Runcorn
Kupfer-(II)-sulfat- Pentahydrat	> 98 %, krist., 8175.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Laufpuffer für Gelelektrophorese	Rotiphorese 10xSDS-Page, 3060.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lugolsche Lösung	Iod-Kaliumiodid-Lösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Mazola	100 % reines Keimöl	Unilever Deutschland, Hamburg
2-Mercaptoethanol	≥ 99 %, M7522	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	≥ 99,5 %, Ph.Eur., reinst, CP43.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nährbouillon I	TN1172	Sifin Diagnostics GmbH, Berlin
Natriumchlorid	≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO, 3957.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	zur Analyse, ISO	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 99 %, p.a., ACS, wasserfrei, P030.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	≥ 99,5 %, p.a., 4984.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	≥ 99 %, p.a., ISO, 6771.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	≥ 99 %, für die Biochemie, 4360.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-Natriumtetraborat Decahydrat	≥ 99,5 %, p.a., ACS, T880.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge	Rotipuran, ≥ 32 %, p.a., T196.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pancreatin	from porcine pancreas, P1750-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepsin	from porcine gastric mucosa, 800-2500 units/mg Protein, P7000-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepton aus Casein	tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie, 8986.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	≥ 99,0 % (T), 78830	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ortho-Phosphorsäure	85 %, reinst, 9079.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Plate-Count-Agar (APHA)	PO5013A	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
2-Propanol	≥ 99,5 %, Ph.Eur., reinst, CP41.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Salzsäure	0,1N, Maßlösung, K024.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	37 %, reinst, 9277.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure	Rotipuran, 98 %, X945.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	99 %, p.a., für die Elektrophorese, 2367.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure	10 %, wässrige Lösung, p.a., 9383.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	Ultra Qualität, PUFFERAN, \geq 99,9 %, 5429.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 3.4: Verwendete Software

Messung	Bezeichnung	Version	Hersteller
DSC	Advantage for Q Series Version	Thermal Advantage Release 5.5.17, QAdvX.exe 2.9.396	TA Instruments Waters LLC, New Castle
	Universal Analysis 2000	Version 4.5A, Build 4.5.0.5	TA Instruments Waters LLC, New Castle
Farbmessung	SpectraMagic NX	CM-S100w 2.50.0002	Konica Minolta Inc., Osaka
Fluoreszenz	Fluorssence TM	Version 2.1	HORIBA Jobin Yvon Inc., Edison, USA
Gelwertung	GelAnalyzer 2010	2010a	Istvan Lazar & Dr. Istvan Lazar
Geldokumenta- tion	AlphaEase TM , ChemiImager 4400	5.5	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
Mikroskop (Nikon)	NIS Elements	4.2000.967.0	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam
Statistische Auswertung	GraphPad Prism for Windows	Version 4.00	GraphPad Software, Inc., San Diego California, USA

Die statistische Auswertung [Sachs & Hedderich, 2006] der Keimzahlen erfolgte durch einen „Kruskal-Wallis-Test“ mit nachgeschaltetem „Dunn’s Multiple Comparison post test“. Zur Auswertung der Ausbeuten an Proteinisolat wurde die „One-way ANOVA“ mit einem „Bonferroni’s post test“ gewählt. Die statistischen Berechnungen aller anderen Parameter erfolgte ebenfalls mit ANOVA und Bonferroni’s post test, mit Ausnahme

der Parameter, welche keine Normalverteilung oder eine Varianzeninhomogenität aufwiesen (bei Hexan-entölten Isolaten: WAC, FS, FC; bei CO₂-entölten Isolaten: LGC, Verdaubarkeit; Polyphenolgehalte der Flocken und Rohstoffe). Das Signifikanzniveau α wurde, wenn nicht anders angegeben, auf 0,05 festgelegt.

3.1.3 Pufferlösungen

Sämtliche Pufferlösungen wurden nach den in Tabelle 3.5 angegebenen Rezepturen hergestellt. Zum Auffüllen wurde dest. Wasser benutzt.

Tabelle 3.5: Herstellung der Pufferlösungen

pH-Wert	Komponente A	Komponente B	Mischung A + B
2,0	C ₂ H ₅ NO ₂ ; 7,505 g/l + NaCl; 5,85 g/l	HCl; 0,1N	520 ml + 480 ml
4,0	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O; 21,01 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O; 35,60 g/l	614 ml + 386 ml
6,0	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O; 21,01 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O; 35,60 g/l	368 ml + 632 ml
7,0	Na ₂ HPO ₄ ; 1,4196 g/l	KH ₂ PO ₄ ; 1,3609 g/l	577 ml + 423 ml
8,0	KH ₂ PO ₄ ; 9,078 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O; 11,876 g/l	31 ml + 969 ml
10,0	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	NaOH; 0,1 mol/l	4,77 g + 183 ml mit H ₂ O auf 1 l auffüllen

3.1.4 Herstellung Bradford-Reagenz, 5-fach

Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurden 0,125 g Coomassie Brilliantblau in 60 ml reinem Ethanol gelöst und mit 125 ml ortho-Phosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde mit dest. Wasser auf 250 ml aufgefüllt und im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt.

3.1.5 Auswahl der Vergleichssubstanzen

Zu Kalibrierzwecken und zum Vergleich ernährungsphysiologischer und techno-funktionaler Eigenschaften der micellaren Lupinenproteinisolate mit handelsüblichen Produkten wurden folgende, in Tabelle 3.6 aufgeführte, Referenzsubstanzen ausgewählt.

Simplex 100, im folgenden Text nur noch als „Simplex“ bezeichnet, ist ein mikropartikulierte Molkenprotein mit Partikelgrößen zwischen 0,5 und 2,5 μ m und kommt als Fettaustauschstoff auf Proteinbasis zum Einsatz. Dieser wurde in allen Untersuchungen zur Proteinfunktionalität als direkter Fettaustauschstoff-Vergleich herangezogen.

Auch Fettaustauschstoffe auf Kohlenhydratbasis sollten als Vergleichssubstanzen dienen - Inulin und Erbsenfaser. Ovalbumin (monomerisches Phosphoglycoprotein; pI: 4,5; MW: 44,5 kDa; T_d: 84 °C [Mine, 1995]) wurde als Standardsubstanz für die Schaum- und Gelbildung eingesetzt. Na-Caseinat und Lecithin kamen als Standard-Emulgatoren zum Einsatz.

Tabelle 3.6: Referenzsubstanzen

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Albumin	aus Eiern, 20771.236	VWR International GmbH, Darmstadt
Albumin Fraction V	BSA, pH 7.0, A 1391,0025	Applichem GmbH, Darmstadt
Ammonium-Standardlösung	Certipur, 1000 mg/l NH ₄ , 1.19812.0500	Merck KGaA, Darmstadt
Casein	≥ 95 %, alkalilöslich, 7555.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Casein Natrium	≥ 88 % Milcheiweiß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Erbsenfaser	kalorienarmer Ballaststoff	Lavita-Natürlich, Kempen
Inulin	from chicory, I2255-25G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lecithin	≥ 97 %, für die Biochemie, 9812.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Protein Marker I	PageRuler™, Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa, 26616	Thermo Scientific, Rockford (U.S.A.)
Protein Marker II	Unstained Protein Molecular Weight Marker, 14,4-116 kDa, 26610	Thermo Scientific, Rockford (U.S.A.)
Simplese 100	Microparticulated whey protein concentrate, product sample	CP Kelco U.S., Inc., Atlanta

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Proteinisolate

Analog Sußmann et al. [2013b] (Abbildung 2.2) wurden für die Versuche zur Saatgutentkeimung jeweils 100 g ungeschälte und geschälte Lupinensamen sowie vollfette und Hexan-entölte Lupinenflocken als Rohstoffe eingesetzt. Die Samen wurden vor der Extraktion mit Hilfe einer Messermühle zerkleinert (2-4 x 10 s, 10.000 rpm). Der jeweilige Rohstoff wurde zu 700 g auf 50 °C temperierte 0,5 M NaCl-Lösung gegeben und 1 h gerührt (500 rpm). Der Extrakt wurde über ein Sieb (Maschenweite: 1,2 mm) von den festen Bestandteilen separiert, welche im Sieb nochmals ausgepresst wurden. Danach wurde er zentrifugiert (20 °C, 10 min, 3300 g) und anschließend durch ein Filtervlies (Miracloth) gegeben. Zur Fällung wurde der Extrakt mit seiner doppelten Masse an Wasser versetzt, die Mischung kurz gerührt und über Nacht bei 4 °C sedimentieren gelassen. Es wurde erneut zentrifugiert (20 °C, 10 min, 3300 g), der Überstand dekantiert und das Proteinisolat mit der doppelten Masse an Wasser gewaschen. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt mit gleichen Einstellungen konnte das feuchte Proteinisolat nach Dekantieren des Waschwassers gewonnen werden. Die Ausbeute an feuchtem Proteinisolat wurde nach Formel 3.1 berechnet.

$$Ausbeute [\%] = \frac{m_{\text{feuchtes Proteinisolat}} [g] \cdot 100}{EW_{\text{Rohstoff für Extraktion}} [g]} \quad (3.1)$$

Für alle Versuche zur Saatgutentkeimung (mit dazugehörigen Ausbeuteanalysen) der Versuchsreihe I, die Pasteurisierungsversuche und die UHT-Erhitzung wurden Rohstoffe der *Lupinus angustifolius* Vitabor verwendet. In Versuchsreihe II kamen Hexan- und CO₂-entölte Lupinenflocken von *Lupinus angustifolius* Boregine zum Einsatz. Die sensorischen Untersuchungen sowie die Versuche zur Proteinfunktionalität, den ernährungsphysiologischen Eigenschaften und der Proteincharakterisierung, inklusive den zugehörigen Parametern Proteingehalt und Trockenmasse, fanden, sofern nicht anders angegeben, mit *Lupinus angustifolius* Boregine statt. Diese Versuche wurden, mit Ausnahme der sensorischen Untersuchungen und der Lichtmikroskopie, nach der Gefrier-trocknung und Vermahlung (Kugelmühle) der Proben durchgeführt.

3.2.2 Mikrobiologische Analysen

Für alle Versuche wurden Fertignährmedien der Firma Oxoid eingesetzt. Je 10 g des Untersuchungsmaterials wurden mit 90 ml Kochsalz-Pepton-Lösung vermischt (Stomacher). 1 ml der resultierenden Lösung bzw. je 100 µl 1:10 mit Kochsalz-Pepton verdünnter Lösung wurden auf 3 bzw. 2 Plate-Count-Agarplatten pipettiert und ausgespatelt. Für die Differenzierung der Keimspezies wurden Blutagar-Platten verwendet. Die Platten wurden 72 h bei 30 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien ausgezählt, mit Faktor 10 multipliziert (beim 1-ml-Ansatz) bzw. nach Formel 3.2 berechnet und als KbE/g angegeben. Zur Sterilitätskontrolle wurden je 0,5 g Probe in ein Röhrchen mit 5 ml steriler Nährbouillon gegeben und 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung auf eine Blutagarplatte ausgespatelt und diese erneut unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Waren keine Mikroorganismen auf der bebrüteten Blutagarplatte nachweisbar, wurde die Probe als steril definiert.

$$Keimzahl [KbE/g] = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot 10 \cdot \frac{1}{10^{-n}} \quad (3.2)$$

mit:

- $\sum c$ = Summe der Kolonien aller ausgezählten Platten
- n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n_2 = Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe
- 10^{-n} = niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe

3.2.3 Bestimmung der Trockenmasse

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an ISO 24557 [2009]. Je 3 g gemahlene Lupinensaaten und -flocken bzw. 1 g micellares Proteinpulver wurden in bei 130 °C bzw. 103 °C für 2 h vorgetrocknete Glasschälchen mit Deckel eingewogen. Die Trocknung erfolgte bei 130 °C für die Saaten- und Flockenpulver bzw. bei 103 °C für die Proteinisolate bis

zur Massekonstanz (3-4 h). Formel 3.3 stellt die Berechnung der Trockenmasse TM dar. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle A.1 gelistet.

$$TM [\%] = \frac{m_{GP} - m_G}{EW} \cdot 100 \quad (3.3)$$

mit:

m_{GP} = Masse Glas mit Probe vor Trocknung [g]

m_G = Masse Glas ohne Probe [g]

EW = Probeneinwaage [g]

3.2.4 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mittels der Methode nach Kjeldahl in Anlehnung an das LFGB [2007]. Im stickstofffreien Wägeschiffchen wurde 0,1 g Proteinpulver eingewogen und im Kjeldahl-Kolben mit 2 Kjeltabs, 2 Siedesteinchen und 20 ml Schwefelsäure versetzt. Als Blindwert diente ein Kolben mit leerem Wägeschiffchen, Kjeltabs, Siedesteinchen und Schwefelsäure. Die Proben wurden in einer Block-Aufschlusseinheit auf 240 °C erhitzt. Diese Temperatur wurde 20 min gehalten, dann weiter auf 400 °C erwärmt und gekocht, bis die Proben klar waren.

Nach 30 min Abkühlen wurden sie im Vapodest titriert, die Wiederfindung mit einer Ammonium-Standardlösung überprüft. Der ausgegebene Stickstoffwert wurde für die Lupinenproteine mit dem Faktor 5,7 [Sußmann et al., 2013b] multipliziert, um den Proteingehalt der Proben zu erhalten (Ergebnisse s. Anhang, Tabelle A.1).

Die Proteingehalte der Referenzsubstanzen wurden ebenfalls mit dieser Methode bestimmt, zur Berechnung jedoch der Faktor 6,25 gewählt:

Ermittelte Proteingehalte der Referenzsubstanzen:

Ovalbumin: 78,47 %

Simplex: 51,01 %

Na-Caseinat: 85,43 %

Casein: 86,71 %

3.2.5 Thermische Behandlungsmethoden im Prozess

3.2.5.1 UHT-Erhitzung des Extraktes

Nach der Extraktion wurde der Extrakt (aus Hexan-entölten Flocken von *Lupinus angustifolius* Vitabor, hergestellt in der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg e. V. (MLUA)) kurzzeitig ultrahochoerhitzt, um vegetative Keime und Sporen zu inaktivieren. Anschließend wurde die Fällung durchgeführt. Für die im Folgenden erläuterten Untersuchungen stand eine Pilotanlage der Firma GEA (Abbildung 3.1) in der MLUA zur Verfügung. Der Ablauf der Erhitzungsversuche kann Tabelle 3.7 entnommen werden.

Tabelle 3.7: Temperatur-Zeit-Regime der UHT-Erhitzung

Nr.	Flocken (Ex- traktion)	Durchfluss- menge Extrakt [l/h]	$T_{Vorlauf}$ [°C]	T_{max} bei Erhitzung [°C]	Heiß- haltezeit [s]	$T_{Extrakt}$ nach Kühlung [°C]
Ia	entölt	120	110	140	3	20
Ib	entölt	120	110	135	3	20
Ic	entölt	120	110	130	3	20
IIa	entölt	140	97	129	3	10
IIb	entölt	140	80	120	3	10
IIc	entölt	140	70	110	3	10
IId	entölt	140	63	101	3	10
IIIa	entölt	140	69	100	3	13
IIIb	entölt	140	65	90	3	13
IIIc	vollfett	140	72,5	100	3	13
IIId	vollfett	140	65	90	3	13

**Abbildung 3.1:** UHT-Pilotanlage in der MLUA Oranienburg

3.2.5.2 Pasteurisierung des Isolats

Etwa 2 kg feuchtes Proteinisolat (aus Hexan-entölten Flocken von *Lupinus angustifolius* Vitabor) wurde aus einem Technikumsversuch des Fraunhofer IVV zur Verfügung gestellt. Aliquote zu ca. 50 g wurden im Erlenmeyerkolben, versehen mit einem Holzrührspatel, bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Regimen (Tabelle 3.8) unter Rühren im Wasserbad wärmebehandelt. Die Temperatur wurde mittels Kontaktthermometer überprüft, der Erfolg der Pasteurisierung anschließend durch eine mikrobiologische Untersuchung beurteilt.

Tabelle 3.8: Temperatur-Zeit-Regime der Pasteurisierungsreihe

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Versuchsanzahl
60	10	15
65	5	15
65	30	15
70	5	17
75	2,5	5
75	5	22
80	2,5	12
80	5	12

3.2.6 Saatgutentkeimung

Versuchsreihe I:

Die nachstehend aufgeführten Entkeimungsversuche (20 und 60 min UVC, 110-140 °C/60 min trockene Hitze, Autoklavieren) wurden je mit 100 g ungeschälten und geschälten Lupinensamen, sowie vollfetten und Hexan-entölten Lupinenflocken von *Lupinus angustifolius* Vitabor durchgeführt, die im Folgenden als „Rohstoffe“ bezeichnet werden. Diese Rohstoffe wurden nach der Entkeimung extrahiert und die Proteinisolate nach deren Gefriertrocknung und Vermahlung (Mörser) für die Untersuchung der Maillard-Produkte verwendet.

Versuchsreihe II:

Eine zweite Versuchsreihe (120 min UVC, trockene Hitze bei 130 °C (60 min) und 140 °C (55 min)) mit Hexan- und CO₂-entölten Flocken von *Lupinus angustifolius* Boragine schloss sich, aufbauend auf den Ergebnissen von Versuchsreihe I, an. Mit den daraus extrahierten Proteinisolaten wurden die Untersuchungen zu Sensorik, Proteinfunktionalität, ernährungsphysiologischen Eigenschaften und Proteincharakterisierung durchgeführt.

3.2.6.1 UVC-Bestrahlung

Die UVC-Bestrahlung (2 Entkeimungsstrahler: Osram Puritec HNS 15W G13 OFR; 254 nm; ozonfrei) erfolgte im Becherglas (Schichtdicke ca. 2 cm) unter Rühren (500 rpm) auf einem Magnetrührer (RET basic safety control) für jeweils 20, 60 bzw. 120 min. Der Abstand zwischen Lampe und Probe betrug 20 cm (UV-Bestrahlungsstärke: 5 W/m²). Abbildung 3.2 zeigt den Versuchsaufbau. Die Bestrahlungsdosis errechnet sich aus der

Multiplikation der Bestrahlungsstärke (W/m^2) mit der Bestrahlungsdauer (in Sekunden) und wird in J/m^2 angegeben [Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004]. Für die hier getesteten Bestrahlungszeiten ergeben sich somit Bestrahlungsdosen von 6, 18 bzw. $36 \text{ kJ}/\text{m}^2$. Diese Werte sind eher als hoch einzuschätzen [Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004]. Es handelt sich dabei jedoch um die Abgabeleistung der Lampe selbst. Der Abstand der Lampe vom Bestrahlungsgut sowie die bestrahlte Fläche haben ebenfalls einen Einfluss auf die das Bestrahlungsgut erreichende Dosis [Stevens et al., 1999; Fine & Gervais, 2004; Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004].



Abbildung 3.2: Versuchsaufbau zur UVC-Entkeimung

3.2.6.2 Trockene Erhitzung

Die Rohstoffe wurden auf einem Edelstahl-Tablett (einfache Lage der Saaten bzw. Flocken) in der mittleren Einschubebene des auf die jeweilige Temperatur ($110\text{-}140\text{ }^\circ\text{C}$) vorgeheizten Trockenschrankes platziert und nach Wiedererreichen der eingestellten Temperatur für 60 min erhitzt (Abbildung 3.3).



Abbildung 3.3: Versuchsaufbau zur trockenen Erhitzung

3.2.6.3 Autoklavieren

In leicht geöffneten Schottflaschen wurden die Rohstoffe bei 115 °C für 20 min entkeimt (Nachtrocknungszeit: 10 min, Endtemperatur: 120 °C, Puls: 3, Druck während der Heißhaltephase: ca. 175 kPa).

3.2.7 Sensorische Untersuchungen

Die sensorische Beurteilung der feuchten Proteinisolate erfolgte mittels Dreiecksprüfungen [DIN EN ISO 4120, 2007] sowie Rangordnungsprüfungen [DIN ISO 8587, 2010]. Zur Maskierung farblicher Unterschiede wurden die Isolate mit Lebensmittelfarbstoff eingefärbt und je ca. 1 g Proteinisolat in weiße, verschließbare Kunststoffbecher gegeben. Jedem der fünf Probanden wurden zwei Probenreihen zur sensorischen Beurteilung vorgelegt, um eine Fallzahl von $n = 10$ zu gewährleisten. Der Ablauf sowie die Untersuchungsziele der jeweiligen Prüfung sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Reihenfolge der sensorischen Untersuchungen und Untersuchungsziele

Verkostung Nr.	Art der Prüfung	Ziel
1	Dreiecksprüfung	genereller Unterschied der Isolate CO ₂ -entölter und Hexan-entölter Flocken
2	Rangordnungsprüfung	Rangfolge in Bezug auf Röstaromen, Cremigkeit, Beliebtheit (un-)behandelter Isolate CO ₂ -entölter Flocken
3	Rangordnungsprüfung	Rangfolge in Bezug auf Röstaromen, Cremigkeit, Beliebtheit (un-)behandelter Isolate Hexan-entölter Flocken
4	Dreiecksprüfung	Unterschied in Cremigkeit nach 120 min UVC-Behandlung der Isolate verschieden entölter Flocken
5	Dreiecksprüfung	Unterschied in Cremigkeit nach 130 °C/60 min trockener Hitze der Isolate verschieden entölter Flocken
6	Dreiecksprüfung	Unterschied in Cremigkeit nach 140 °C/55 min trockener Hitze der Isolate verschieden entölter Flocken

Neben der Verkostung der Proteinisolate wurden Farbmessungen dieser sowie der behandelten Lupinenflocken vorgenommen. Diese erfolgten mit Hilfe eines Spektralphotometers (CM-660d) in einer Glasküvette. Jedes Proteinisolat wurde 5 Mal, die Flocken 10 Mal vermessen und der Mittelwert dieser Messungen zur Berechnung der Farbabweichungen herangezogen. Als Referenz dienten jeweils unbehandelte CO₂- bzw. Hexan-entölte Flocken und deren Proteinisolate.

Für die Auswertung der Farbmessung wurden die von der Software berechneten Differenzen der Farbwerte, ΔL , Δa und Δb , sowie die Gesamtfarbabweichung ΔE miteinander verglichen. Dabei wurde für $\Delta E < 1$ ein für das menschliche Auge nicht wahrnehmbarer Farbunterschied zur Referenzprobe angenommen. $\Delta E > 3$ stellt einen für das Auge offensichtlichen Farbunterschied dar [Bodart et al., 2008].

3.2.8 Proteinfunktionalität

3.2.8.1 Ölbindevermögen

Die Bestimmung des Ölbindevermögens erfolgte in Anlehnung an die Methode von Schwenke et al. [1981]. 0,5 g Proteinisolat wurden in einem mit Magnetührstäbchen vorbereiteten 14-ml-Zentrifugenröhrchen mit 2,5 ml Maiskeimöl (Mazola) versetzt. Nach einem zweimaligen Zyklus aus Rühren (1 min, 700 rpm) und Ruhen (5 min) wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 3300 g), das Öl anschließend abgegossen. Das Zentrifugenröhrchen wurde kopfüber auf ein Filterpapier positioniert, um nicht gebundenes Öl abfließen zu lassen, und nach 15 min gewogen. Die Berechnung erfolgte nach Formel 3.4, wobei das Ergebnis auf den Proteingehalt der Probe bezogen wurde.

$$OAC [g/g] = \frac{(b - a) \cdot 100}{EW \cdot c_{Prot}} \quad (3.4)$$

mit:

- a = Masse des Zentrifugenröhrchens mit trockener Probe [g]
- b = Masse des Zentrifugenröhrchens mit nasser Probe [g]
- EW = Einwaage an Proteinisolat [g]
- c_{Prot} = Proteinkonzentration der Probe [%]

3.2.8.2 Wasserbindevermögen

Das Wasserbindevermögen (WAC) wurde ähnlich dem Ölbindevermögen ermittelt, jedoch unter Verwendung von 5 ml Wasser und einer Abtropfzeit von nur 10 min. Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach Formel 3.4.

3.2.8.3 Gelbildungsvermögen

Zur Bestimmung der kleinsten zur Ausbildung eines Gels nötigen Proteinkonzentration (LGC) wurden Proteinlösungen von 2-5 % in 5 ml 0,5 M NaCl-Lösung bzw. demineralisiertem Wasser in konischen 15-ml-Zentrifugenröhrchen hergestellt [Sathe et al., 1982]. Die Proben wurden 1 h im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend 2 min in Eiswasser abgekühlt. Nach weiteren 2 h bei 4 °C wurden die Proben umgedreht und die LGC als diejenige Proteinkonzentration definiert, bei welcher die Masse im Röhrchen auch bei vorsichtigem Schütteln nicht nach unten rutscht.

3.2.8.4 Emulgiereigenschaften

Emulsionsaktivitäts- und -stabilitätsindex wurden mit Hilfe der Turbidimetrie in Anlehnung an die Methode von Pearce & Kinsella [1978] ermittelt. Dazu wurden in einem Becherglas 0,1 g Proteinisolat mit 30 ml Wasser oder 0,5 M NaCl-Lösung versetzt ($c_{Protein} = 0,33\%$). Nach Zugabe von 10 ml Maiskeimöl (Mazola) wurde die Suspension 1 min homogenisiert (Ultra Thurrax, 9500 rpm). Diese Emulsion wurde sofort im Verhältnis 1:100 mit 0,1%iger SDS-Lösung im Messkolben verdünnt ($VF = 100$), in zwei Küvetten überführt und photometrisch gegen 0,1%ige SDS-Lösung vermessen (500 nm). Der Rest der Emulsion wurde stehen gelassen und weiterhin Aliquote entnommen. Der Emulsionsstabilitätsindex ESI entspricht der Zeit [min], nach welcher die Extinktion die

Hälfte des Ausgangswertes erreicht hatte [Lampart-Szczapa et al., 2006]. Dazu wurde die Extinktion über der Zeit aufgetragen und der lineare Bereich zur Erstellung einer Kalibrierfunktion der Form $y = ax + b$ und Ermittlung des ESI genutzt. Der Emulsionsaktivitätsindex EAI wurde nach Formel 3.5 ermittelt und bezeichnet die Größe der Grenzfläche, die durch ein Gramm Protein stabilisiert wird. Die Berechnung der Trübung T erfolgte nach Formel 3.6.

$$EAI [m^2/g] = \frac{2 \cdot T}{E \cdot 1000 \cdot \phi} \quad (3.5)$$

$$T [1/m] = \frac{2,303 \cdot \bar{A} \cdot VF}{l} \quad (3.6)$$

mit:

- T = Trübung [1/m]
- E = tatsächlicher Emulgatoranteil in der Emulsion [mg/ml]
- 1000 = Umrechnungsfaktor (mg in g)
- ϕ = Ölanteil in der Emulsion [ml/ml]
- \bar{A} = Absorption (Mittelwert aus 2 Messungen)
- VF = Verdünnungsfaktor
- l = Länge der Küvette (0,01 m)

3.2.8.5 Schaumbildungsvermögen

Die Bestimmung der Schaumkapazität FC (Formel 3.7) und -stabilität FS (Formel 3.8) erfolgte nach Piornos et al. [2015]. 2 g Proteinisolat (bezogen auf die Trockenmasse) bzw. Standardsubstanz wurden in einem 600-ml-Rührgefäß mit 100 ml Wasser versetzt ($V_1 = 102$ ml) und 1 min bei maximaler Leistung mit Hilfe eines Stabmixers mit Schneebesenaufsatz aufgeschäumt. Der Abstand zwischen Schneebesens und Gefäßboden betrug dabei 0,4 mm. Die Mischung wurde anschließend in einen Standzylinder überführt und das Volumen sofort (V_2) sowie nach einer Standzeit von 2 h (V_3) abgelesen. Die Schaumkapazität FC beschreibt die prozentuale Volumenzunahme.

$$FC [\%] = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \cdot 100 \quad (3.7)$$

$$FS [\%] = \frac{V_3 - V_1}{V_2 - V_1} \cdot 100 \quad (3.8)$$

3.2.8.6 Proteinlöslichkeit

In Anlehnung an King et al. [1985] wurden 50 mg Proteinisolat im 14-ml-Zentrifugenröhrchen (gerade) mit Magnetrührstab mit Pufferlösungen (5 ml) der pH-Werte 2, 4, 6, 8 und 10 (Tabelle 3.5) versetzt und 5 s geschüttelt (Schüttler). Die Suspension wurde 30 min gerührt (750 rpm), nochmals 5 s geschüttelt und erneut 30 min gerührt. Durch Zentrifugation (15 min, 3300 g) wurden die ungelösten Bestandteile abgetrennt. Der

Überstand wurde filtriert (Spritzenvorsatzfilter) und anschließend zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Hierfür wurden 50 μl Probelösung zu 2,5 ml Bradford-Reagenz (verdünnt 1:5, über Nacht in Kühlschrank, dann filtriert) pipettiert und nach Mischen 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Proben mit einer Proteinkonzentration über 1000 $\mu\text{g/ml}$ wurden entsprechend verdünnt. Die Kalibrierung erfolgte mit einer BSA-Standardlösung im Bereich von 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ und ergab eine quadratische Kalibrierfunktion der Form $y = ax^2 + bx + c$. Als Blank wurde eine Lösung aus Bradford-Reagenz und Wasser verwendet. Die Berechnung erfolgte nach Formel 3.9.

$$\text{Proteinlöslichkeit [\%]} = \frac{c_{Brad} \cdot VF \cdot 10 \cdot 5}{EW \cdot c_{Prot}} \quad (3.9)$$

mit:

- c_{Brad} = Proteinkonzentration der Probelösung
ermittelt aus der Kalibrierfunktion [$\mu\text{g/ml}$]
- VF = Verdünnungsfaktor
- 10 = Umrechnungsfaktor
- 5 = Volumen der Probelösung [ml]
- EW = Einwaage an Proteinisolat [mg]
- c_{Prot} = Proteinkonzentration der Probe [%]

3.2.8.7 Oberflächenhydrophobität

Zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobität der Proteinisolate wurden in 15-ml-Zentrifugenröhrchen 0,1%ige Lösungen der gefriergetrockneten Pulver in 10 ml 0,5 M NaCl-Phosphatpuffer hergestellt [Hojilla-Evangelista et al., 2004]. Dazu wurden vorab 29,2214 g NaCl im 1l-Messkolben mit 0,01 M Phosphatpuffer (s. Tabelle 3.5, pH 7,0) aufgefüllt. Dieser Schritt diente der besseren Lösungsvermittlung der Proteinisolate.

In PMMA-Küvetten wurde die 0,1%ige Proteinlösung mit NaCl-Phosphatpuffer im Verhältnis 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100 verdünnt (Gesamtvolumen je 4 ml) und dieser Lösung je 20 μl 8 mM ANS-Lösung (in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0) zugesetzt. Nach dem Durchmischen wurden die Lösungen sofort im Spektralfluorometer vermessen ($\lambda_{Ex} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 470 \text{ nm}$, Slit: 3 nm). Als Blank diente eine Mischung aus 20 μl ANS-Lösung in 4 ml NaCl-Phosphatpuffer.

Aus der so gemessenen Fluoreszenzintensität FI konnte die relative Fluoreszenz nach Formel 3.10 berechnet werden. Die relative Fluoreszenz (y) wurde über der Proteinkonzentration (x) aufgetragen und eine Kalibrierfunktion der Form $y = ax + b$ berechnet. Der Anstieg a der Geraden stellt die Oberflächenhydrophobität SH dar [Chaudhuri et al., 1993].

$$\text{relative Fluoreszenz} = \frac{FI_{Probe} - FI_{Blank}}{FI_{Blank}} \quad (3.10)$$

mit:

- FI_{Probe} = Fluoreszenzintensität der verdünnten Proteinlösung
- FI_{Blank} = Fluoreszenzintensität der ANS-NaCl-Pufferlösung

3.2.9 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

3.2.9.1 *in-vitro*-Verdaubarkeit

Der Einfluss der physikalischen Entkeimungsmethoden auf den Verdau der Proteinisolate sollte ermittelt werden. Dazu wurden, analog zur Methode von Rahma & Rao [1984], 0,5 g Proteinisolat mit 12,5 mg Pepsin (\cong lt. Hersteller 20-62,5 U/ μ g Protein) und 15 ml 0,1 N HCl versetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde mit 7,5 ml 0,2 N NaOH neutralisiert, dann 4 mg Pankreatin sowie 7,5 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 8, s. Tabelle 3.5) zugegeben. Nach erneuter Inkubation (24 h, 37 °C) wurden nicht verdaute Proteine mit 15 ml 10 %iger TCA gefällt, die Lösung zentrifugiert (30 min, 1000 g) und anschließend durch einen stickstofffreien Faltenfilter filtriert. Der Stickstoffgehalt des Filtrates wurde bestimmt (Kjeldahl) und der Proteinverdau nach Formel 3.11 berechnet.

$$\text{Verdaubarkeit [\%]} = \frac{N_{\text{Verd}} \cdot 45 \cdot 100}{EW \cdot N_{\text{Prot}}} \quad (3.11)$$

mit:

- N_{Verd} = Stickstoffgehalt der verdauten Proteinlösung [%]
- 45 = Volumen der gesamten Verdauungslösung [ml]
- 100 = Umrechnungsfaktor zur Angabe in Prozent
- EW = Einwaage an Proteinisolat [g]
- N_{Prot} = Stickstoffgehalt des Proteinisolats [%]

3.2.9.2 Maillard-Produkte

Es wurden gefriergetrocknete Proteinisolate geschälter Lupinensamen sowie entölt und vollfetter Lupinenflocken (Vitabor) analysiert. Um einen Überblick über das Ausmaß der Maillard-Reaktion zu bekommen, wurden die Isolate nach unterschiedlichsten Behandlungen der Saatgutentkeimungs-Versuchsreihen I und II untersucht.

Die Analyse der Lysin- und Furosingehalte erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach Säurehydrolyse [Henle et al., 1991] und wurden vom Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden durchgeführt.

3.2.9.3 Nachweis reduzierender Zucker

Zum Nachweis reduzierender Zucker wurden je 1 ml Fehling I (3,5 g Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat in 50 ml Wasser) und 1 ml Fehling II (17 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat + 5 g Natriumhydroxid in 50 ml Wasser) im Reagenzglas vermischt. Etwa 1 g Proteinpulver bzw. gemahlene Lupinenflocken der Versuchsreihe II der Saatgutentkeimung wurden zugegeben und die Mischung im siedenden Wasserbad erhitzt. Als Positivkontrolle diente Milchpulver, welches eine orange-braune Färbung induzierte.

3.2.9.4 Nachweis von Glykoproteinen

Glykoproteine lassen sich durch eine Säurehydrolyse spalten. Zu diesem Zweck wurden 0,15 g gemahlene Lupinenflocken (CO₂-entölt und Hexan-entölt, jeweils unbehandelt;

Hexan-entölt, trockene Hitze 140 °C/55 min) bzw. 0,5 g Proteinpulver (CO₂-entölt, unbehandelt; Hexan-entölt, trockene Hitze 140 °C/55 min) mit 1 ml 1N HCl versetzt und 1 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Natronlauge neutralisiert, je 1 ml Fehling I und II zugefügt und erneut im siedenden Wasserbad erhitzt. Ein Farbumschlag nach orange-braun wurde als positive Reaktion gewertet.

3.2.9.5 Polyphenolgehalt der Lupinenflocken und Proteinisolate

Die Extraktion der Polyphenole erfolgte nach Wang & Clements [2008], wobei jedoch nur 0,1 g Proteinisolat bzw. gemahlene Lupinenflocken mit 2 ml 80%igem MeOH 20 h unter Schütteln bei 25 °C inkubiert wurden. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (15 min, 1000 g), filtriert (Spritzenvorsatzfilter) und der Polyphenolgehalt im Überstand nach Velioglu et al. [1998] bestimmt. Hierfür wurden 100 µl Extrakt mit 0,75 ml 1:10-verdünntem Folin-Ciocalteus Phenolreagenz versetzt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 0,75 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (60 g/l) zugefügt und die Proben für 90 min inkubiert. Dabei trüb gewordene Lösungen wurden erneut filtriert, die Extinktion anschließend bei 720 nm gegen einen Blindwert (enthält 100 µl Wasser statt Probe) gemessen. Eine Kalibrierfunktion mit Gallussäure (50 mg in 10 ml MeOH, aufgefüllt auf 100 ml mit dest. Wasser) im Bereich von 10 bis 60 µg/ml wurde aufgenommen und die Ergebnisse in mg Gallussäureäquivalente (GAE) pro 100 g Probe angegeben (Formel 3.12).

$$\text{Polyphenolgehalt [mg}_{GAE}/100 \text{ g]} = \frac{c_{Folin} \cdot c_{Prot}}{EW \cdot 100} \quad (3.12)$$

mit:

c_{Folin} = Polyphenolkonzentration der Probelösung
ermittelt aus der Kalibrierfunktion [$\mu\text{g}/\text{ml}$]

c_{Prot} = Proteinkonzentration der Probe [%]

EW = Einwaage an Proteinisolat [g]

100 = Umrechnungsfaktor für Proteinkonzentration in g/g

3.2.10 Proteincharakterisierung

3.2.10.1 Lichtmikroskopie

Die feuchten Proteinisolate wurden direkt nach der Herstellung unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse Ni-U, Objektiv: 100x, Ölimmersion) betrachtet, um die Micellenbildung zu beurteilen. Hierfür wurden die Isolate im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, sehr vorsichtig verrührt, um eine mechanische Schädigung der Proteine zu vermeiden, mit einem Deckglas abgedeckt und sofort untersucht. Um sicherzustellen, dass es sich um Proteine handelt, wurden einige Isolate mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt.

3.2.10.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

In einem 2ml-Reaktionsgefäß wurden zu etwa 150 mg 0,5 M NaCl-Lösung ca. 30 mg gefriergetrocknetes Proteinisolat gegeben. Nach dem vollständigen Lösen des Proteins (Schüttler) wurden ca. 30 mg der Mischung in einen DSC-Tiegel eingewogen, welcher

anschließend sofort verschlossen wurde. Durch die bekannten Proteingehalte der Isolate konnte die genaue Proteineinwaage in den Tiegel berechnet werden. Diese wurde zur Auswertung der jeweiligen Probe vor deren Messung dem Programm übertragen. Die Messung fand im Bereich von 50-120 °C mit einer Aufheizrate von 5 K pro Minute statt. Dabei wurde die Probe für 2 min bei 50 °C temperiert, bevor das Aufheizregime einsetzte. Zur Ermittlung der Denaturierungsenthalpien wurden die Spektren geglättet (Glätten: 2).

3.2.10.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurden die Einwaagen an Proteinisolat so berechnet, dass sich exakt 6 mg/ml Protein in Lösung befanden. Die Proben wurden zu Konservierungszwecken mit 0,1 µmol/ml PMSF versetzt, mit 0,5 M NaCl-Lösung aufgefüllt und im Ultraschallbad gelöst. Die Herstellung des Probenpuffers erfolgte folgendermaßen:

1,25 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8
 2,50 ml Glycerol
 2,00 ml SDS (10%ig)
 0,20 ml Bromphenolblau (0,5%ig)
 3,55 ml NaCl-Lösung (1,338 M)

Der Puffer enthielt somit eine Endkonzentration an NaCl von 0,5 mol/l. Vor Gebrauch wurden zu 950 µl des Probenpuffers 50 µl Mercaptoethanol gegeben. Die Proteinlösungen wurden mindestens im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und anschließend 5 min bei 95 °C erhitzt.

Zur Herstellung des Sammelgelpuffers (0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8) wurden 6 g TRIS in 60 ml dest. Wasser gelöst, mit 6 N HCl auf pH 6,8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Der Trenngelpuffer (1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8) enthielt 27,23 g TRIS in 80 ml dest. Wasser. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 8,8 mit 6 N HCl wurde mit dest. Wasser auf 150 ml aufgefüllt.

Nachfolgend aufgeführt ist die Herstellung der Gele:

Sammelgel (5 %):	Trenngel (14 %):
5,7 ml dest. Wasser	2,7 ml dest. Wasser
1,7 ml Acrylamid	4,7 ml Acrylamid
2,5 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	2,5 ml 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8
0,1 ml SDS (10%ig)	0,1 ml SDS (10%ig)
50 µl APS (10%ig)	50 µl APS (10%ig)
10 µl TEMED	5 µl TEMED

APS wurde täglich frisch hergestellt und zusammen mit TEMED kurz vor dem Gießen der Gele zur jeweiligen Lösung zugegeben. Für große Gele (16x20 cm; Dicke: 1 mm) wurden die Mengen aller Lösungen entsprechend angepasst.

Für kleine Gele (7,3x10,1 cm; Dicke: 0,75 mm) wurden jeweils 30 µl Probenpuffer mit derselben Menge Probenlösung verdünnt, erhitzt und nach dem Abkühlen 10 µl dieser Lösung in je eine Geltasche pipettiert. In eine Tasche eines jeden Gels wurden 5 µl nach der jeweiligen Anleitung aufbereitete Markerlösung pipettiert. Der verwendete

Laufpuffer wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt und der Lauf bei 80 Volt durchgeführt (ca. 2,5 h). Anschließend wurden die Gele 3 Mal mit dest. Wasser gewaschen und mit Färbelösung über Nacht gefärbt. Die Entfärbung mit dest. Wasser wurde ebenfalls über Nacht durchgeführt, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde.

Bei der Verwendung von großen Gelen wurden jeweils 30 μ l einer zuvor erhitzten Mischung aus 45 μ l Probenpuffer und 30 μ l Probenlösung, sowie 10 μ l Marker in je eine Geltasche pipettiert. Während der Elektrophorese wurde die Kammer auf 4 °C gekühlt.

Bei der getrennten Untersuchung der in 0,5 M NaCl-Lösung löslichen und unlöslichen Proteinfractionen wurden vorab 100 μ l der Probenlösung (6 mg/ml Protein in 0,5 M NaCl-Lösung) zentrifugiert (3300 g, 10 min). 30 μ l des Überstandes wurden mit 45 μ l Probenpuffer verdünnt, wie oben beschrieben aufbereitet und auf das Gel aufgetragen. Das Pellet zur Bestimmung der unlöslichen Bestandteile wurde in 50 μ l Probenpuffer gelöst und ebenfalls, wie beschrieben, weiterbearbeitet.

Zur Auswertung der molekularen Massen der Proteinbanden wurden ausschließlich die Banden des ungefärbten Markers II genutzt. Eine Basislinienkorrektur wurde nicht durchgeführt. Der gefärbte Marker diente lediglich der Ermittlung der Laufweite während des elektrophoretischen Trennvorgangs. Jede Probe wurde zwei Mal aufgearbeitet und ausgewertet. Die Software „GelAnalyzer 2010“ diente zur Auswertung. Hierbei wurden die Bandenintensitäten, vom Programm als „Raw Volume“ bezeichnet, verglichen und daraus die Ab- und Zunahmen der einzelnen Banden ermittelt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Thermische Behandlungsmethoden im Prozess

Um vegetative Keime und Sporen im Proteinisolat zu inaktivieren, wurden Entkeimungen während des Extraktionsprozesses durchgeführt. Zur Sporen-Inaktivierung wurde die UHT-Erhitzung des proteinreichen Extraktes vor der Fällung angewandt (Kapitel 4.1.1). Eine zweite Methode, jedoch zur Inaktivierung vegetativer Keime bzw. der im Prozess eingetragenen Begleitflora, stellte die Pasteurisierung dar (Kapitel 4.1.2), welche die Reduktion der Gesamtkeimzahl im feuchten Proteinisolat zum Ziel hatte.

4.1.1 UHT-Erhitzung des Extraktes: Einfluss auf Mikrobiologie und Proteinausbeute

Eine Ultrahocherhitzung wird im Bereich der Milchindustrie bei mindestens 135 °C für wenige Sekunden durchgeführt, um alle vegetativen Mikroorganismen und Sporen zu inaktivieren. In den hier durchgeführten Versuchen wurden Temperaturen zwischen 90 °C und 140 °C getestet. Es wurde jeweils die Reduktion der Gesamtkeimzahl im Vergleich zum entsprechend unbehandelten Extrakt (Nr. I, II oder III, entsprechend drei Versuchstagen) berechnet (Tabelle 4.1). Die hierfür erforderlichen Extrakte wurden an der MLUA Oranienburg an den jeweiligen Versuchstagen frisch hergestellt. Hierfür wurden entölte Lupinenflocken in 0,5 M NaCl-Lösung extrahiert und der Extrakt nach Abtrennung des Raffinats (vgl. Abbildung 2.2) ultrahocherhitzt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse der UHT-Erhitzung - Gesamtkeimzahlen (GKZ) und Ausbeuten an Proteinisolat (Die Gesamtkeimzahlen des unbehandelten Extraktes gelten immer für die jeweiligen Versuchsnummern I, II und IIIa+b bzw. IIIc+d.)

Nr.	GKZ vor Behandlung [KbE/g]	Ausbeute vor Be- handlung [%]	T_{max} bei Er- hitzung [°C]	GKZ nach Be- handlung [KbE/g]	Reduk- tion der GKZ [%]	Ausbeute nach Be- handlung [%]	Verringe- rung der Ausbeute [%]
Ia	$2,3 \cdot 10^3$	6,30	140	$1,0 \cdot 10^0$	99,96	2,5	60,3
Ib			135	$1,0 \cdot 10^0$	99,96	1,7	73,0
Ic			130	$1,0 \cdot 10^0$	99,96	1,9	69,8
IIa	$9,3 \cdot 10^7$	2,48	129	$1,1 \cdot 10^1$	100,00	0,6	76,2
IIb			120	$1,2 \cdot 10^1$	100,00	1,1	54,4
IIc			110	$4,8 \cdot 10^2$	100,00	1,2	51,2
IId			101	$1,1 \cdot 10^3$	100,00	0,9	63,3
IIIa	$1,3 \cdot 10^3$	7,43	100	$5,5 \cdot 10^2$	58,09	1,3	82,5
IIIb			90	$6,4 \cdot 10^2$	51,37	5,5	26,4
IIIc	$2,2 \cdot 10^3$	5,86	100	$1,5 \cdot 10^3$	31,03	0,5	90,8
IIId			90	$2,4 \cdot 10^3$	-12,18	3,9	34,0

Nach der Behandlung nach Tabelle 3.7, wurden die Extrakte im Labor zentrifugiert (10 min, 3300g), um bereits durch die UHT-Behandlung denaturiertes Protein abzutrennen. Die Fällung erfolgte dann analog Abbildung 2.2. Die Ausbeute an Isolat bzw. deren Verringerung errechnete sich aus dem Volumen des zur Fällung eingesetzten Extraktes, indem die Ausbeuten ohne und mit UHT-Erhitzung bei gleichem Einsatz an Extraktvolumen ermittelt und miteinander verglichen wurden.

Die UHT-Erhitzung führte zu einer sehr starken Verringerung der Gesamtkeimzahl. Jedoch betrug die Ausbeute an Proteinisolat maximal 74,6 % derer des unbehandelten Extraktes. Obwohl das erhaltene Proteinisolat texturell und visuell dem Micellenprotein entsprach, konnte eine UHT-Behandlung des Extraktes anhand der in Tabelle 4.1 dargestellten Ergebnisse nicht als geeignete Methode der Entkeimung in Betracht gezogen werden.

4.1.2 Pasteurisierungsversuche: Einfluss auf Mikrobiologie und Proteinqualität

Die Gesamtkeimzahl des vom Kooperationspartner (Fraunhofer IVV) aus dem Technikum zur Verfügung gestellten, unbehandelten Proteinisolats betrug $1,9 \cdot 10^7$ KbE/g (Abbildung 4.1). Eine signifikante Reduktion dieser war bereits durch eine 30-minütige Wärmebehandlung bei 60 °C möglich. Durch Pasteurisieren bei mindestens 75 °C für 5 min konnte die größtmögliche Reduktion auf unter $7,4 \cdot 10^3$ KbE/g erreicht werden.

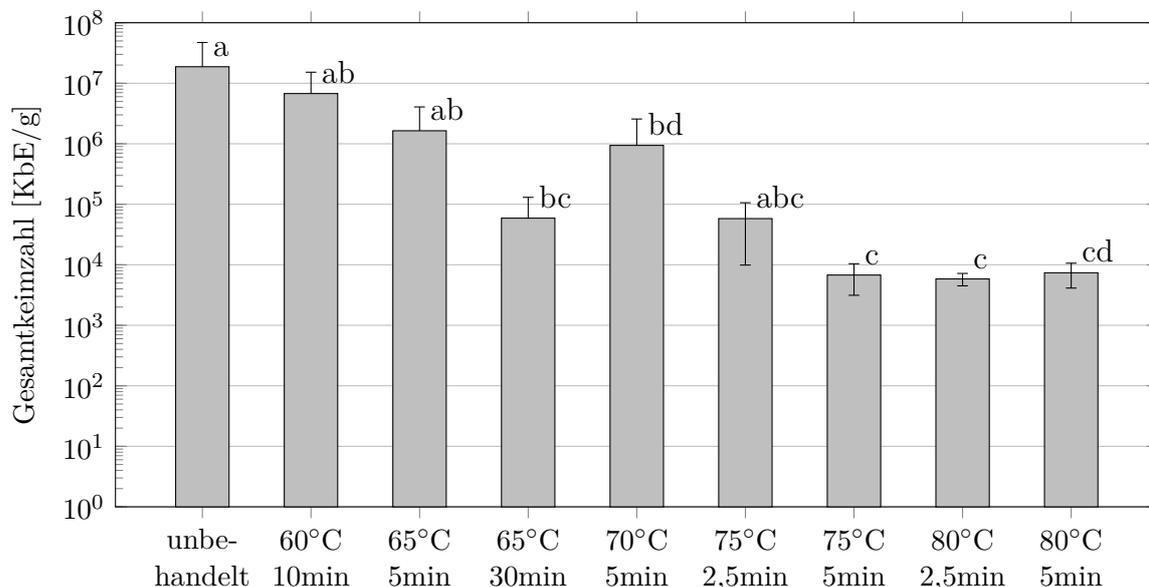


Abbildung 4.1: Gesamtkeimzahl des Proteinisolats vor und nach der Pasteurisierung (unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben), $n \geq 5$

Keimreduktionen wurden auch von Yoshie-Stark et al. [2006] nach einer Wärmebehandlung bei 65 °C für 1000 s berichtet, jedoch gaben die Autoren keinen Hinweis auf die anfänglichen bzw. resultierenden Keimzahlen.

Im untersuchten Temperaturbereich konnten bei Pasteurisierungstemperaturen ab 80 °C visuell wahrnehmbare Veränderungen des Proteinisolats ausgemacht werden. Die

beginnende Klumpigkeit wurde als Zeichen einer ersten Proteindenaturierung gewertet. Laut Literaturangaben [Sirtori et al., 2010] ist bekannt, dass die Denaturierung des β -Conglutin des Lupinenproteins ab ca. 71,5 °C einsetzt, γ -Conglutin denaturiert noch darunter [Bader et al., 2011]. Andererseits beschrieben Sirtori et al. [2010], dass eine Wärmebehandlung bei 100 °C für 5 min keine sichtbaren Effekte auf das DSC-Thermogramm des behandelten Proteinisolats hatte.

Bei den verbliebenen $6,8 \cdot 10^3$ KbE/g der 75°C/5min-Probe handelte es sich zu ca. 30 % ($2,0 \cdot 10^3$ KbE/g) um sporenbildende Bakterien, wie die Differenzierung der Mikroorganismen ergab. Diese Gesamtkeimzahl entsprach etwa der der unbehandelten Lupinensamen und -flocken (s. Abbildung 4.2), deren Keimflora ebenfalls überwiegend aus sporenbildenden Bakterien bestand (95 % in ungeschälter Saat, 83 % in entölte Flocken). Somit wurde ersichtlich, dass eine weitere Keimreduktion durch Pasteurisierung nicht erreicht werden kann, da Sporenbildner durch solch niedrige Temperaturen nicht inaktiviert werden können. Zusätzlich wurde für sporenbildende Bakterien und Bakteriosporen eine maximale Hitzeresistenz bei pH-Werten zwischen 6 und 7 festgestellt [Cerny, 1980]. Der pH-Wert des nativen Micellisolates lag nach eigenen Untersuchungen bei ca. 6,1, wird aber in der Literatur [Muranyi et al., 2013] mit 5,5 angegeben. Im Zusammenhang mit den hier erzielten Ergebnissen, lässt sich schlussfolgern, dass eine Pasteurisierung bei 75 °C für 5 min optimal zur Reduktion während des Extraktionsprozesses eingetragener Bakterien geeignet ist, ohne das Protein zu schädigen.

4.2 Saatgutentkeimung - Mikrobiologie und Proteinausbeute

Die UHT-Erhitzung des Extraktes erwies sich, aufgrund zu starker Proteindenaturierung, als ungeeignete Methode zur Sporenrückbildung im Micellenisolat. Die Pasteurisierung konnte lediglich vegetative Keime inaktivieren. Daher wurden verschiedene Methoden der Saatgutentkeimung untersucht, um bereits am Prozessanfang einen möglichst sauberen Rohstoff zur Verfügung zu stellen und die Vermehrung der Mikroorganismen während des Prozesses auf ein Minimum zu reduzieren. Im Sinne des Verbraucherschutzes sollten folglich auch sporenbildende Mikroorganismen inaktiviert werden, um den Verderb lupinenproteinhaltiger Lebensmittel zu vermeiden. In der ersten Versuchsreihe (Kapitel 4.2.1) wurden dafür die UVC-Bestrahlung, die trockene Erhitzung und das Autoklavieren ganzer und geschälter Lupinensamen sowie vollfetter und entölte Lupinenflocken betrachtet. Die zweite Versuchsreihe (Kapitel 4.2.2) erläutert die Gründe zur Einschränkung der Rohstoffauswahl und Optimierung der Entkeimungsparameter für weitere Untersuchungen und vergleicht verschiedene aktuell industriell angewandte Entölungsmethoden für Lupinenflocken. In beiden Versuchsreihen wurden die gewählten Methoden und Einstellungen in Bezug zur resultierenden Gesamtkeimzahl und Proteinausbeute evaluiert. Die Abnahme letzterer war unerwünscht.

4.2.1 Versuchsreihe I

Ganze und geschälte Lupinensamen sowie vollfette und entölte Lupinenflocken wurden verschieden behandelt: UVC-Bestrahlung (20 und 60 min), trockene Hitze (110-140 °C für 1 h) und feuchte Hitze (Autoklavieren bei 115 °C für 20 min).

Der Ausgangskeimgehalt der ganzen Saat betrug $6,1 \cdot 10^2$ KbE/g (Abbildung 4.2A), mit einem prozentualen Anteil sporenbildender Bakterien von 95 %. Eine signifikante Reduktion der Gesamtkeimzahl konnte durch 60-minütige UVC-Bestrahlung, trockene Erhitzung bei 130 °C und 140 °C sowie durch Autoklavieren erreicht werden, wobei die autoklavierte und die auf 140 °C erhitzte Probe steril waren.

Bezüglich der Ausbeuten an Proteinisolat gab es große Unterschiede: Die 20-minütige UVC-Bestrahlung ließ die Ausbeute unberührt, jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg (bis zu 16,7 %) an extrahierbarem Proteinisolat nach einer 60-minütigen UVC-Bestrahlung bzw. einer trockenen Erhitzung der Lupinenflocken bei 110-120 °C. Der gegenteilige Effekt resultierte nach stärkerer Erhitzung der Flocken (130-140 °C) bzw. beim Autoklavieren. Hier kam es zu einer signifikanten Reduktion an Isolatausbeute von der unbehandelten Probe (12 % Ausbeute) über die autoklavierte (7,5 %) bis zu 3 % nach trockener Erhitzung bei 130 °C. Nach einer Wärmebehandlung von 140 °C konnte kein Protein mehr extrahiert werden. Auch Neto et al. [2001] ermittelten einen starken Ausbeuteverlust bei der Herstellung isoelektrischer Proteinisolate aus autoklavierten Cashew-Nüssen (121 °C, 30 min) im Vergleich zu unbehandelten Nüssen.

Die Entfernung der Schale brachte, im Vergleich zur ungeschälten Saat, bereits eine geringfügige Reduktion der Gesamtkeimzahl mit sich (Abbildung 4.2B). 34 % dieser verbliebenen $2,1 \cdot 10^2$ KbE/g wurden als sporenbildende Mikroorganismen identifiziert. Alle Saatgutbehandlungen führten zu einer starken Reduktion der Gesamtkeimzahl. Eine Sterilität der geschälten Saat konnte jedoch nur durch Autoklavieren und trockene Erhitzung bei 130 °C und 140 °C erreicht werden. Beide UVC-Bestrahlungen reduzierten die Gesamtkeimzahl signifikant (bis zu $2,5 \cdot 10^0$ KbE/g). Die Keimzahl nach der trockenen Erhitzung bei 140 °C war ähnlich gering.

Die Proteinausbeute betrug im Falle der unbehandelten geschälten Saat 19,8 % und nahm signifikant auf bis zu 9,7 % ab, sobald die Behandlungstemperatur 130 °C überstieg bzw. durch Autoklavieren. Eine trockene Erhitzung bei 110-130 °C hatte einen schwachen Anstieg der Proteinausbeute zur Folge (22,6-26,7 %). Die UVC-Bestrahlungen hatten keinen Einfluss auf dieselbe.

Ungeschälte Samen enthielten den größten Schalenanteil (20-25 % [Hove, 1974]) und somit auch den geringsten Anteil extrahierbaren micellaren Proteins. Folglich resultierte die höhere Proteinausbeute der geschälten Saat im Vergleich zur ungeschälten Saat aus dem geringeren Schalenanteil, denn der Proteingehalt der Lupinenschalen war vernachlässigbar klein (2-3 %) [Hove, 1974].

Die mikrobielle Belastung, Zusammensetzung (Anteil sporenbildender Mikroorganismen) und die Ergebnisse der Dekontaminationsversuche der vollfetten Lupinenflocken kamen denen der geschälten Saat nahe, denn der Schalenanteil war ähnlich gering. Eine 60-minütige UVC-Bestrahlung, trockene Erhitzungen bei 130 °C und 140 °C sowie das Autoklavieren führten zur Sterilität der vollfetten Lupinenflocken (Abbildung 4.2C).

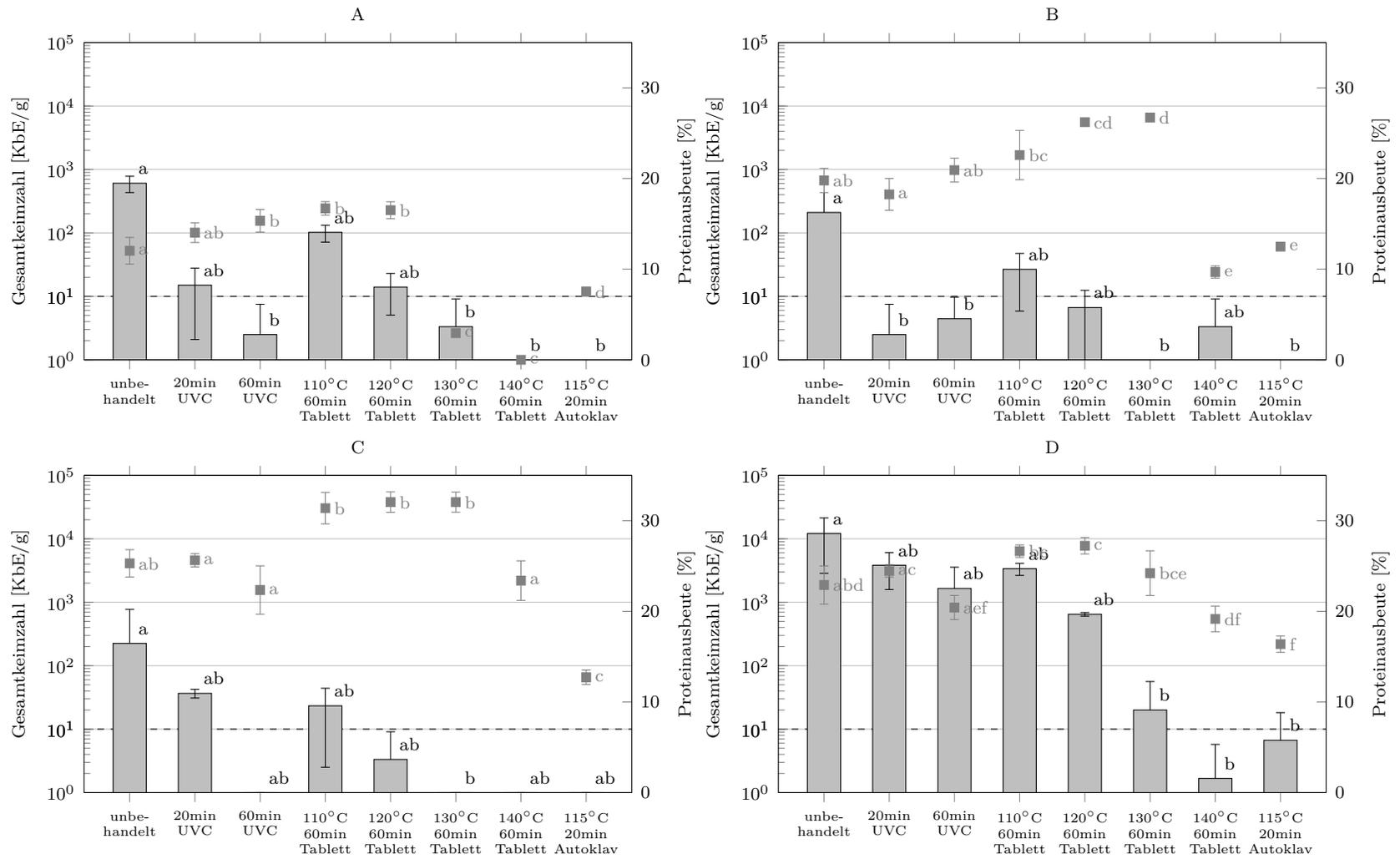


Abbildung 4.2: Gesamtkeimzahl (Balken) und Proteinausbeute nach der Extraktion von unbehandelten und unterschiedlich behandelten A) ungeschälten und B) geschälten Lupinensamen sowie C) vollfetten und D) Hexan-entölten Lupinensamen (unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben; ---Nachweisgrenze), $n \geq 3$

Hinsichtlich der Proteinausbeute waren die Extraktionsmengen aus den vollfetten Flocken, im Vergleich zu allen anderen Rohstoffen, am größten, wobei 25,3% micellares Proteinisolat aus den unbehandelten Flocken extrahiert werden konnte. Dieser Wert stimmte mit den Untersuchungsergebnissen von Sußmann et al. [2013a] überein. Einzig das Autoklavieren resultierte in einer signifikant geringeren Proteinausbeute von 12,7%. Eine trockene Erhitzung unterhalb von 140 °C führte zu einem signifikanten Anstieg der Proteinausbeute (bis zu 32,1% im Falle der Isolate aus bei 120 °C und 130 °C erhitzten Flocken). Keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute an micellarem Proteinisolat hatten die UVC-Bestrahlungen sowie die trockene Erhitzung bei 140 °C.

Die Proteinausbeuten der entölten Lupinenflocken ähnelten stark denen der vollfetten Flocken, wobei die Gesamtkeimzahl ($1,2 \cdot 10^4$ KBE/g, davon 83% sporenbildende Bakterien) deutlich höher war. Bei Betrachtung der Saatgutaufbereitung (Schälen, Flockieren, Entölen) als einzelne Prozessschritte, lässt sich schlussfolgern, dass es zu einer Kontamination der Lupinenflocken oder einem Mikroorganismenwachstum während der Entölung gekommen sein kann. Durch den hohen initialen Keimgehalt der entölten Flocken konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtkeimzahl lediglich durch trockene Erhitzungen oberhalb von 120 °C oder durch Autoklavieren erreicht werden.

Tabelle 4.2 beinhaltet die Abweichung der Ausbeute an micellarem Proteinisolat der entkeimten Rohstoffe von der Ausbeute an micellarem Proteinisolat der unbehandelten Rohstoffe.

Tabelle 4.2: Abweichungen in den Proteinausbeuten nach Extraktion verschieden entkeimter Lupinenflocken und -saaten in Bezug auf den jeweils unbehandelten Rohstoff, $n \geq 3$

Behandlung	Änderung der Proteinausbeute [%] ^a			
	Saat _{ungeschält}	Saat _{geschält}	Flocken _{vollfett}	Flocken _{entölt}
UVC 20 min	16,6 ± 9,1	-7,8 ± 8,8	1,3 ± 2,9	6,7 ± 3,0
UVC 60 min	27,5 ± 10,3	5,8 ± 6,7	-11,7 ± 10,6	-10,9 ± 5,8
Trockene Hitze 110 °C/60 min	38,9 ± 6,1	14,1 ± 13,8	24,0 ± 6,9	16,3 ± 3,0
Trockene Hitze 120 °C/60 min	37,3 ± 7,7	32,5 ± 2,0	26,7 ± 4,5	18,9 ± 3,9
Trockene Hitze 130 °C/60 min	-75,4 ± 2,2	35,1 ± 1,9	26,7 ± 4,4	5,7 ± 10,8
Trockene Hitze 140 °C/60 min	-100,0 ± 0,0	-51,1 ± 3,4	-7,5 ± 8,6	-16,4 ± 6,2
Autoklavieren 115 °C/20 min	-37,4 ± 4,0	-36,9 ± 1,4	-49,7 ± 3,2	-28,5 ± 4,0

^a Anteil an nach der Saatgutbehandlung extrahiertem Proteinisolat bezogen auf den Anteil an Proteinisolat aus unbehandelten Rohstoffen; negative Werte kennzeichnen eine Abnahme, positive einen Anstieg der Proteinausbeute durch die jeweilige Behandlung, $n = 3-8$.

Die größte Empfindlichkeit gegenüber trockener Hitze bei 130 °C und 140 °C war für die ungeschälte Saat nachweisbar (75,4% bzw. 100% Verlust an Proteinausbeute). Generell war der prozentuale Einfluss aller Behandlungen bei der ungeschälten Saat am größten (maximale Werte der Änderung der Proteinausbeute) und im Falle der entölten Flocken am geringsten. Der höchste Ausbeuteverlust durch Autoklavieren (49,7%) konnte bei den vollfetten Flocken beobachtet werden.

Für alle getesteten Rohstoffe war ein Anstieg der Proteinausbeute von 14,1% bis 38,9% nach der Behandlung mit trockener Hitze bei 110 °C und 120 °C zu beobachten. Nach einer Behandlung bei 130 °C wurde dies ebenfalls für die geschälte Saat

(35,1 % mehr Proteinausbeute) sowie die Flocken (5,7-26,7 % mehr Proteinausbeute) festgestellt.

Generell schädigten die trockene Erhitzung bei 140 °C sowie das Autoklavieren die Proteine in den Rohstoffen am meisten und führten zu den höchsten Ausbeuteverlusten. Eine deutliche Reduktion (etwa 50 %) der Globulinfraction von Samen des Afrikanischen Brotfruchtbaumes nach einer trockenen Erhitzung bei 160 °C (10-20 min) wurde bereits von Giami et al. [2001] beschrieben. Im Gegensatz zur gesteigerten Proteinausbeute nach trockener Erhitzung bei 110 °C und 120 °C, lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass die Empfindlichkeit von Lupinenproteinen gegenüber feuchter Hitze deutlich höher war als gegenüber trockener Hitze. Diese Schlussfolgerung zogen auch Yu & Samadi [2011] und Peng et al. [2014] für Sojabohnen und Leindottersaat nach einstündiger Behandlung mit trockener Hitze. Die Autoren verglichen die Ergebnisse mit denen der bei 120 °C autoklavierten Proben hinsichtlich der Proteinstruktur und des Nährwertprofils.

Aufgrund der Tatsache, dass die Schalen der Lupinensamen wasserundurchlässig sind [Karaguzel et al., 2004], könnte die Sensibilität gegenüber feuchter Hitze ebenfalls eine Ursache des Ausbeuteverlustes nach trockener Erhitzung bei 130 °C bzw. 140 °C sein: Gibt es einen verzögerten Eintritt des Wassers durch die Schale in die Samen, könnte das Gleiche beim Austritt des Wassers aus den Samen durch die Schale der Fall sein. Somit würde sich die Feuchtigkeit kurzzeitig unter der Schale sammeln und der Prozess in diesem Moment einer Behandlung mit feuchter Hitze gleichkommen, die wiederum zu stärkeren Proteinverlusten führt.

Sousa et al. [1995] untersuchten Lupinenglobuline mittels DSC. Ihre Ergebnisse ließen eine erhöhte thermische Stabilität der Globuline mit sinkendem Feuchtigkeitsgehalt schlussfolgern. Dieser Fakt kann eine Erklärung für die höhere Stabilität des nach der Behandlung bei 110 °C bis z. T. 130 °C extrahierbaren micellaren Proteinisolats sein, erklärt jedoch nicht die in diesen Fällen höhere Ausbeute.

Beim Vergleich der Proteinausbeuten aus trocken erhitzten vollfetten und entölten Lupinenflocken, fiel auf, dass die Proteine der vollfetten Flocken hitzestabiler zu sein schienen als die der entölten Flocken. Es ist möglich, dass die Lipide der vollfetten Flocken eine Art protektiven Effekt auf die Lupinenglobuline ausübten. Dies ist für das Molkenprotein β -Lactoglobulin nach Zusatz hydrophober Verbindungen, wie Lecithin oder Fettsäuren, bekannt [Wijayanti et al., 2014].

In Anbetracht der guten Reduktion der Gesamtkeimzahl bei nur geringen Änderungen in der micellaren Proteinausbeute, kann die UVC-Bestrahlung als potentielle Methode zur Entkeimung angesehen werden. Dies bestätigt auch eine Stellungnahme des NACMCF [1999]. Die Reduktion der Gesamtkeimzahl durch die UVC-Bestrahlung erreichte nach 20 min 68-99 % und nach 60 min 86-100 %, wobei die geringeren Werte jeweils zu den entölten Flocken gehörten. Bereits der höhere initiale Keimgehalt ließ erwarten, dass die Entkeimung der entölten Lupinenflocken schwieriger sein wird als die der anderen Rohstoffe. Zusätzlich könnte die Saatgutaufbereitung (Schälen, Flockieren, Entölen) einen Einfluss auf die Oberflächenstruktur der Rohstoffe, und somit auf den Erfolg einer UVC-Bestrahlung, gehabt haben, da die Wirksamkeit dieser von der Oberflächenbeschaffenheit des zu behandelnden Materials abhängig sein kann [Koutchma, 2008]. Andererseits konnte im Falle der vollfetten Flocken eine Reduktion der Gesamt-

keimzahl von 86 % bzw. 100 % nach 20 min bzw. 60 min Bestrahlungsdauer erreicht werden. Folglich spielt neben der Oberfläche auch der Ausgangskeimgehalt eine bedeutende Rolle für den Entkeimungserfolg durch UVC-Strahlung.

Hidaka & Kubota [2006] erreichten für Weizen eine Entkeimungsrate von 90 % (Gesamtkeimzahl) durch 6,3-stündige UVC-Bestrahlung (Bestrahlungsstärke: 97 W/m²). Erdoğan & Ekiz [2011] beschrieben die UVC-Bestrahlung von Kreuzkümmelsaat mit Ausgangskeimgehalten von 10^{4,6}-10^{5,6} KbE/g. Die Reduktion der Gesamtkeimzahl um 0,6 Logstufen wurde durch eine 60-minütige UVC-Behandlung (105 W/m²) erreicht. Eine längere Bestrahlungsdauer von 2 h führte lediglich zu einer vollständigen Inaktivierung der coliformen und fäkalcoliformen Mikroorganismen. Auch Griego & Spence [1978] berichteten von der Möglichkeit Bakteriensporen (*Bacillus thuringiensis*) mittels UV-Licht zu inaktivieren.

Prinzipiell waren alle untersuchten Rohstoffe geeignet, um micellares Lupinenprotein zu extrahieren. Trotz allem ergaben sich gewisse Vor- und Nachteile: Um die Proteinausbeute zu erhöhen, sollten ungeschälte Samen vor der Flockierung geschält werden. Aus mikrobiologischer Sicht sind diese zwei Schritte als potentielle Kontaminationsmöglichkeiten einzustufen. Somit sollte abgewogen werden, ob eine Entkeimung der Flocken anstelle der (un-)geschälten Saat sinnvoller ist, auch, wenn die Reduktion der Gesamtkeimzahl im Falle der ungeschälten bzw. geschälten Saat in einigen Fällen leichter war, vor allem verglichen mit den entölten Flocken. Im Falle der Flocken könnten die entölten den vollfetten Flocken vorzuziehen sein, da das typische leguminosenartige Aroma durch den Entölungsprozess reduziert werden kann [Bader et al., 2011].

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Proteinausbeute der Extraktion vor allem von denaturierenden Effekten der jeweiligen Entkeimungsmethode abhing. Werden Entkeimungsrate und die Ausbeute an micellarem Proteinisolat gemeinsam betrachtet, können folgende Entkeimungen als Methode der Wahl festgelegt werden: 60-minütige UVC-Bestrahlung für ungeschälte Saat, für geschälte Saat und vollfette Flocken zusätzlich die trockene Erhitzung bei 130 °C (60 min) und für entölte Flocken nur der letztgenannte Prozess bzw. eine längere Bestrahlungsdauer bei der UVC-Behandlung. Da das Autoklavieren die Proteinausbeute um bis zu 50 % reduzierte, kann diese Methode als ungeeignet eingestuft werden. Gleiches gilt für die trockene Erhitzung bei 140 °C, im Falle einer 60-minütigen Behandlungszeit. Hier waren Ausbeuteverluste bis zu 51 % bei geschälter Saat und sogar der komplette Proteinverlust (ungeschälte Saat) zu verzeichnen. Auch Carbonaro et al. [2008] und Carbonaro et al. [2012] stellten nach dem Autoklavieren von Leguminosensaat stärkere strukturelle Veränderungen der Proteine fest als nach trockener Erhitzung (120 °C, 30 min bis 48 h).

4.2.2 Versuchsreihe II

Um eine mögliche Rekontamination der Rohstoffe vor der Extraktion zu vermeiden, wurde es als sinnvoll erachtet, die entölten Lupinenflocken zur Saatgutentkeimung zu verwenden, um Kontaminationen durch Schälen, Sichten, Flockieren und Entölen auszuschließen.

Für die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse kamen deshalb entölte Lupinenflocken zum Einsatz. Die entstandenen Proteinisolate wurden für sensorische Untersuchungen, zur Ermittlung der technofunktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften

(außer Maillard-Produkte) sowie zur Proteincharakterisierung eingesetzt. Um zusätzlich den Einfluss der Entölungsmethode auf die genannten Eigenschaften zu ermitteln, fanden sämtliche Versuche sowohl mit Hexan- als auch mit CO₂-entöhlten Lupinenflocken und deren micellaren Proteinisolaten statt.

Aufgrund der Ergebnisse in Versuchsreihe I (Kapitel 4.2.1) wurden die Varianten der Saatgutentkeimung reduziert und an die Ausgangskeimgehalte der entöhlten Lupinenflocken angepasst. Da die trockene Erhitzung bei 130 °C (60 min) zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, wurde diese Entkeimungsvariante beibehalten. Zusätzlich wurde eine trockene Erhitzung bei 140 °C durchgeführt, jedoch mit geringerer Dauer (55 min), um die Reduktion der Proteinausbeute in Grenzen zu halten. Da die UVC-Bestrahlung in Versuchsreihe I bei entöhlten Lupinenflocken wenig erfolgreich war, die Proteinausbeute jedoch durch diese Art der Entkeimung keiner Beeinflussung unterlag, wurde die Dauer der UVC-Bestrahlung in Versuchsreihe II auf 120 min angehoben.

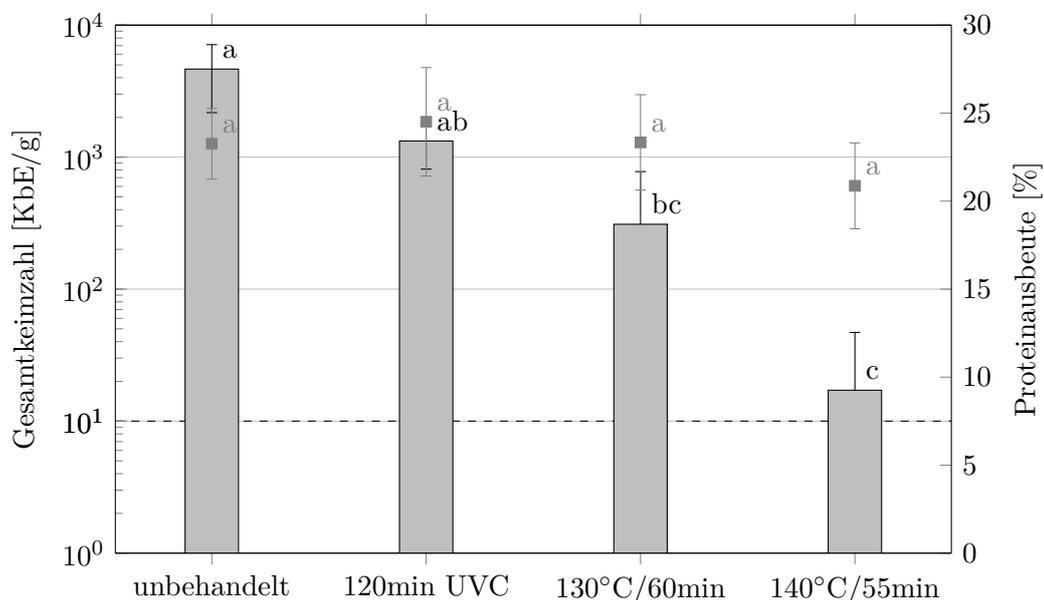


Abbildung 4.3: Gesamtkeimzahl (Balken) und Proteinausbeute nach der Extraktion von unbehandelten und unterschiedlich behandelten Hexan-entöhlten Lupinenflocken (unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben; ---Nachweisgrenze), $n \geq 5$

Wie bereits bei Versuchsreihe I konnten signifikante Reduktionen der Gesamtkeimzahl erst durch die Behandlung mit trockener Hitze erzielt werden (Abbildung 4.3). Die Verlängerung der UVC-Bestrahlungsdauer von 60 min auf 120 min ließ die Gesamtkeimzahl nicht weiter sinken. Die Reduktion der Gesamtkeimzahl durch 120-minütige UVC-Bestrahlung erreichte bei den Hexan-entöhlten Lupinenflocken 71 %, bei den CO₂-entöhlten 70 % und durch die trockene Erhitzung bei 130 °C (60 min) 93 % bzw. 84 % (Abbildungen 4.3 und 4.4). Durch die 55-minütige trockene Erhitzung bei 140 °C konnte die Gesamtkeimzahl der Hexan-entöhlten Flocken zu nahezu 100 %, die der CO₂-entöhlten um 96 % reduziert werden. Auffällig war die jeweils geringere Reduktionsrate bei den CO₂-entöhlten Flocken im Vergleich zu den Hexan-entöhlten der jeweils gleichen Behandlung, trotz des höheren Ausgangskeimgehaltes letzterer.

Auch die Empfindlichkeit der Globuline schien von der Entölungsart abhängig zu sein. Während der Ausbeuteverlust der bei 140 °C erhitzten CO₂-entölten Lupinenflocken 18,6 % betrug und somit signifikant geringer als bei allen anderen Behandlungen in Versuchsreihe II war, wurden aus den Hexan-entölten Flocken nach gleicher Erhitzung nur 10,3% weniger Protein isoliert (keine signifikante Reduktion).

Aus den durchgeführten Entkeimungen und Extraktionen in Versuchsreihe II lässt sich schlussfolgern, dass Hexan-entölte Lupinenflocken mit den getesteten Verfahren einfacher zu entkeimen sind sowie, dass die Globulinfraktion nach der Hexan-Entölung hitzestabiler zu sein scheint.

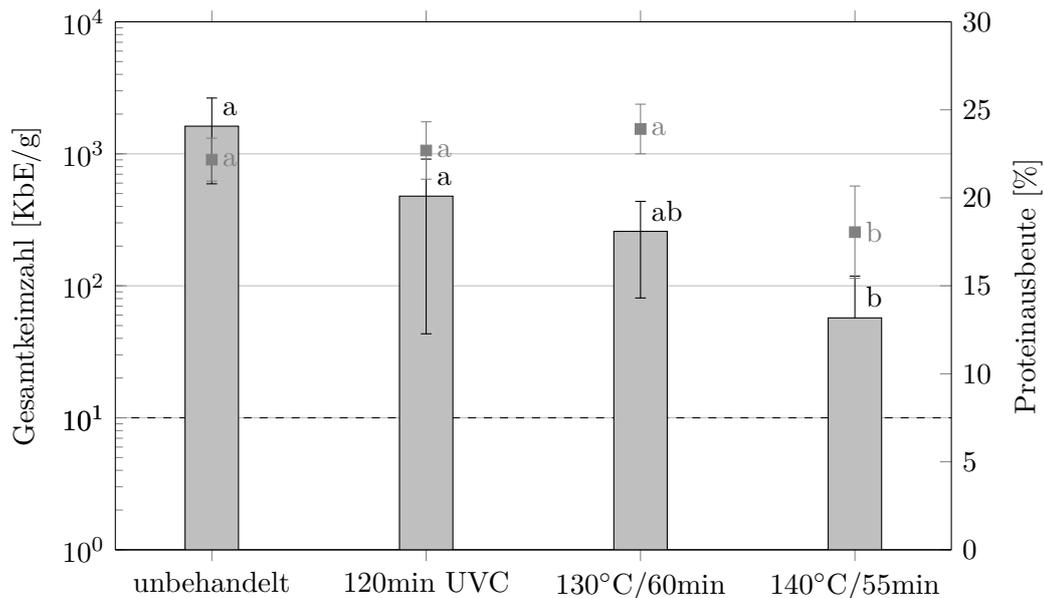


Abbildung 4.4: Gesamtkeimzahl (Balken) und Proteinausbeute nach der Extraktion von unbehandelten und unterschiedlich behandelten CO₂-entölten Lupinenflocken (unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben; ---Nachweisgrenze), $n \geq 5$

4.3 Sensorische Untersuchungen

Das micellare Lupinenproteinisolat stellt als neuer Fettaustauschstoff eine Zutat dar. Ein Einsatz in sensorisch relevanten Mengen im Lebensmittel ist somit absehbar. Durch die Saatgutentkeimung (s. Kapitel 4.2.2) wurden farbliche Veränderungen der resultierenden Proteinisolate festgestellt. Diese sollten nun spektralphotometrisch erfasst werden (Kapitel 4.3.2).

Weiterhin sollten innerhalb von Verkostungen (Kapitel 4.3.1) die wichtigsten Parameter in Bezug auf den Einsatz als Fettaustauschstoff ermittelt werden. Hier wurden die Cremigkeit, Röstaromen (als mögliche Ursache der Farbveränderungen) sowie die Beliebtheit der Proteinisolate in Abhängigkeit von den in Kapitel 4.2.2 optimierten Entkeimungsparametern (trockene Erhitzung: 130 °C / 60 min bzw. 140 °C / 55 min; 120 min UVC) sowie der Einfluss der Entölung (CO₂, Hexan) der Lupinenflocken analysiert. Es kamen Dreieckstests sowie Rangordnungsprüfungen zum Einsatz.

4.3.1 Verkostungen

Zur besseren Verständlichkeit werden die Proteinisolate aus CO₂-entölten Flocken im nachfolgenden Abschnitt als EC-Isolate und jene der Hexan-entölten Flocken als EH-Isolate bezeichnet. Die Auswertung der Tests brachte, geordnet nach der Nummer der Verkostung (s. Tabelle 3.9, Seite 46), folgende Ergebnisse. Tabelle 4.3 gibt einen zusammenfassenden Überblick der Einzelergebnisse.

Nr. 1: Dreiecksprüfung - sensorischer Unterschied aufgrund der Entölung

Es gab statistisch signifikante Unterschiede ($\alpha=0,05$) zwischen den unbehandelten Proteinisolaten EC und EH (s. auch Tabelle 4.3, Zeile 3, Spalten 2/3). Die Prüfer konnten die unbehandelten Isolate durch Verkostung deutlich voneinander unterscheiden. Hierbei wurden keine speziellen Untersuchungskriterien festgelegt.

Nr. 2 und 3: Rangordnungsprüfung - Rangfolge der EC- und EH-Isolate (Röstaromen, Beliebtheit)

Es gab keine statistischen Unterschiede aller Proben in Bezug auf Röstaromen, egal, welche Behandlung mit den Lupinenflocken vorgenommen wurde (s. auch Tabelle 4.3, Spalten 6/7).

Weiterhin gab es keine statistischen Unterschiede aller Proben in Bezug auf die Beliebtheit, jedoch den Trend, dass eine stärkere Wärmebehandlung der Lupinenflocken zu einer geringeren Beliebtheit der jeweiligen Proteinisolate führte. Dies war für die EC-Isolate deutlicher als für die EH-Isolate (s. auch Tabelle 4.3, Spalten 8/9).

Nr. 2: Rangordnungsprüfung - Rangfolge der EC-Isolate (Cremigkeit)

Die unbehandelten und behandelten EC-Isolate waren in Bezug auf ein cremiges/fettiges Mundgefühl hochsignifikant ($\alpha=0,01$) voneinander verschieden, wobei die Cremigkeit mit intensiverer Wärmebehandlung abnahm und das Proteinisolat der am stärksten wärmebehandelten Flocken die geringste Cremigkeit aufwies (140 °C/55 min). Das Isolat der UVC-bestrahlten Flocken wurde am cremigsten eingeschätzt (s. auch Tabelle 4.3, Spalte 4).

Nr. 3: Rangordnungsprüfung - Rangfolge der EH-Isolate (Cremigkeit)

Die unbehandelten und behandelten EH-Isolate waren in Bezug auf ein cremiges/fettiges Mundgefühl signifikant ($\alpha=0,05$) voneinander verschieden, wobei die Cremigkeit mit intensiverer Wärmebehandlung abnahm und das Proteinisolat der am stärksten wärmebehandelten Flocken die geringste Cremigkeit aufwies (140 °C/55 min) (s. auch Tabelle 4.3, Spalte 5).

Nr. 4: Dreiecksprüfung - Unterschied in Cremigkeit und Beliebtheit zwischen EC- und EH-120-UVC

Beim Vergleich der 120 min UVC-bestrahlten EC- und EH-Isolate in Bezug auf die Cremigkeit ergaben sich hoch signifikante ($\alpha=0,01$) Unterschiede zwischen den EC- und EH-Isolaten. Die EH-Isolate waren cremiger ($\alpha=0,05$) und bevorzugt. Letztere Aussage spiegelte jedoch nur einen Trend wider (s. auch Tabelle 4.3, Zeile 4, Spalten 2/3).

Nr. 5: Dreiecksprüfung - Unterschied in Cremigkeit und Beliebtheit zwischen EC- und EH-130 °C/60 min

Der Vergleich der 130°C/60min heißluftbehandelten EC- und EH-Isolate in Bezug auf die Cremigkeit ergab keinen Unterschied beider Isolate sowie keine Bevorzugung (s. auch Tabelle 4.3, Zeile 5, Spalten 2/3).

Nr. 6: Dreiecksprüfung - Unterschied in Cremigkeit und Beliebtheit zwischen EC- und EH-140 °C/55 min

Ein Vergleich der 140°C/55min heißluftbehandelten EC- und EH-Isolate in Bezug auf die Cremigkeit zeigte signifikante ($\alpha=0,05$) Unterschiede zwischen den EC- und EH-Isolaten auf. Die EH-Isolate wurden als cremiger ($\alpha=0,01$) empfunden und bevorzugt ($\alpha=0,01$) (s. auch Tabelle 4.3, Zeile 6, Spalten 2/3).

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Verkostungen der Proteinisolate, n = 10

Behandlung	Einfluss Entölung		Cremigkeit		Röstaromen		Beliebtheit	
	EC	EH	EC	EH	EC	EH	EC	EH
Unbehandelt	unterscheidbar		3 ^a	4	1	2	4	4
120 min UVC	cremiger, bevorzugt		4	3	2	3	3	2
130°C/60min	keine Bevorzugung, gleich cremig		2	2	3	3	2	3
140°C/55min	cremiger, bevorzugt		1	1	1	1	1	1

^a Mittlere Rangplätze; Die höchste Zahl stellt jeweils die am intensivsten bewertete Probe dar.

Alle Probanden hatten in einem separaten Feld für Bemerkungen die Möglichkeit geschmackliche Auffälligkeiten zu dokumentieren. Hier wurden keine besonderen Eintragungen vorgenommen.

Auch Bader et al. [2011] untersuchten die sensorischen Eigenschaften von Lupinenproteinisolate in Abhängigkeit von der Entölung und stellten einen Einfluss auf das leguminosenähnliche Aroma fest. Dieses nahm, im Vergleich zu vollfetten Lupinenflocken, durch die Entölung mit Ethanol und 2-Propanol signifikant ab, während n-Hexan, 2-Methylpentan oder Diethylether nur zu einer geringfügigen Reduktion dieses Aromas führten. Das Mundgefühl der Isolate im Hinblick auf die Cremigkeit wurde jedoch nicht berücksichtigt.

4.3.2 Farbmessung der Proteinisolate und Flocken

Aus der Behandlung der Lupinenflocken mit trockener Hitze bzw. UVC-Strahlung resultierten starke Farbveränderungen der Proteinisolate, wie in Abbildung 4.5 ersichtlich. Die Farbunterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen schienen bei den Proteinisolaten der Hexan-entölten Flocken deutlicher zu sein als bei denen der CO₂-entölten.

Auch in diesem Abschnitt werden die Proteinisolate aus CO₂-entölten Flocken zur besseren Verständlichkeit als EC-Isolate und jene der Hexan-entölten Flocken als EH-Isolate bezeichnet. Die Farbwerte des Micellenlupinenproteinisolats der behandelten Flocken wurden durch spektralphotometrische Messungen mit denen der unbehandelten verglichen.

Es gilt folgende Definition der Farbwerte:

L: Helligkeit 0 = schwarz 100 = weiß
 a: rot-grün-Bereich +a = rot -a = grün
 b: gelb-blau-Bereich +b = gelb -b = blau

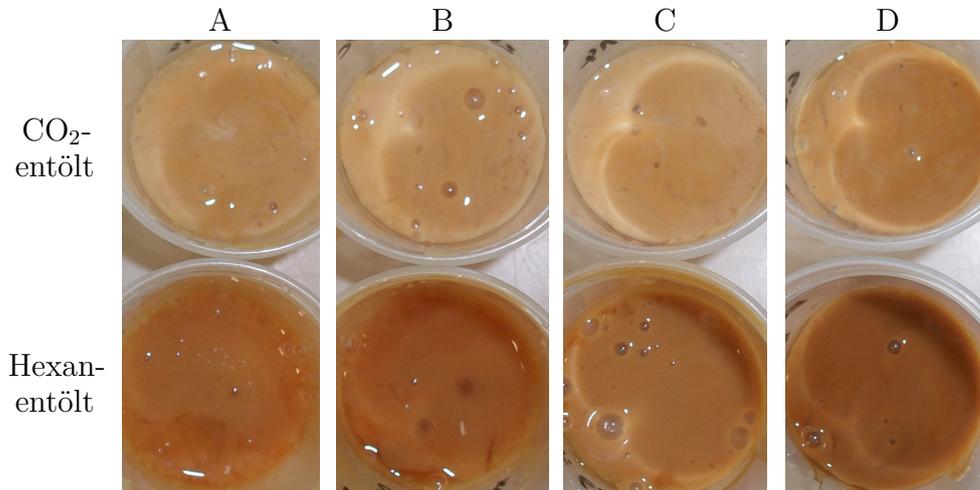


Abbildung 4.5: Farbänderungen der Proteinisolate durch 120 min UVC-Bestrahlung (B) sowie trockene Erhitzung bei 130 °C (C) und 140 °C (D) CO₂- (obere Zeile) und Hexan- (untere Zeile) -entölter Lupinenflocken im Vergleich zur jeweils unbehandelten Probe (A)

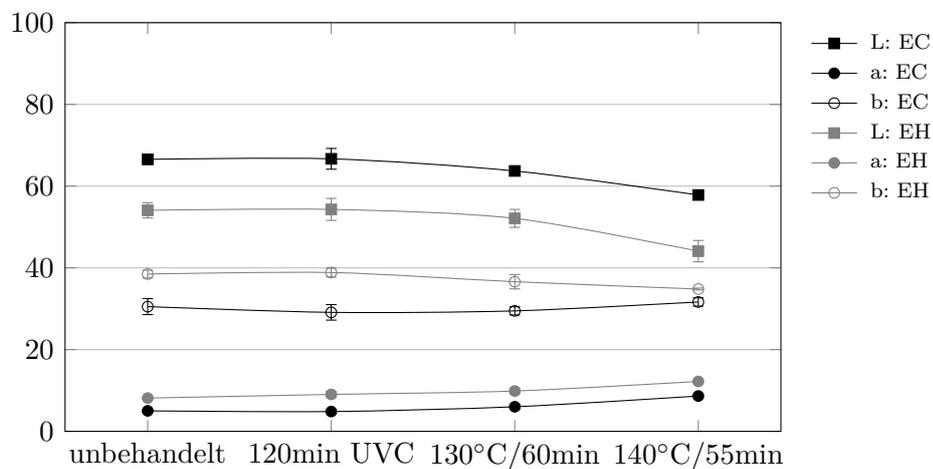


Abbildung 4.6: Lab-Farbwerte der Proteinisolate verschieden behandelter Hexan- und CO₂-entölter Lupinenflocken, n ≥ 3

Abbildung 4.6 zeigt, dass die Proteinisolate eher hell, gelblich und sehr wenig rot waren, wobei die Isolate der Hexan-entölten Flocken dunkler, gelber und rötlicher waren als die der CO₂-entölten. Die UVC-Bestrahlung der Flocken änderte die Farbwerte der Proteinisolate kaum, jedoch resultierte aus der trockenen Erhitzung ein Dunklerwerden der Proteinisolate sowie ein höherer a-Wert (mehr rot).

Die CO₂-entölten Flocken unterschieden sich in ihren Lab-Farbwerten kaum von den Hexan-entölten, sowohl vor als auch nach der Behandlung mit UVC-Strahlung oder

trockener Hitze (Abbildung 4.7). Die Flocken waren insgesamt heller als die Proteinsolate, weniger gelb (mehr blau) und weniger rot (mehr grün). Auch hier nahm der Rotanteil durch die trockene Erhitzung leicht zu und die Helligkeit leicht ab. Der b-Wert wurde durch trockene Hitze nicht verändert, UVC-Strahlung führte jedoch zu geringeren b-Werten (mehr blau).

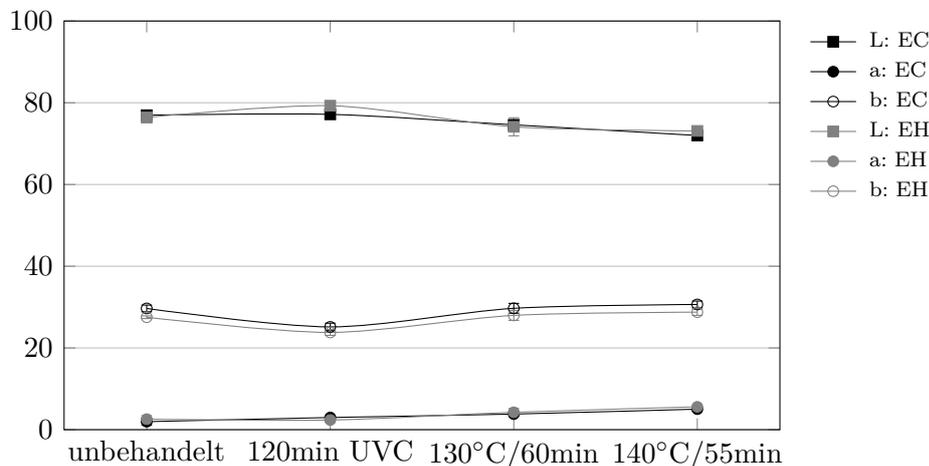


Abbildung 4.7: Lab-Farbwerte verschieden behandelter Hexan- und CO₂-entölter Lupinenflocken, n ≥ 2

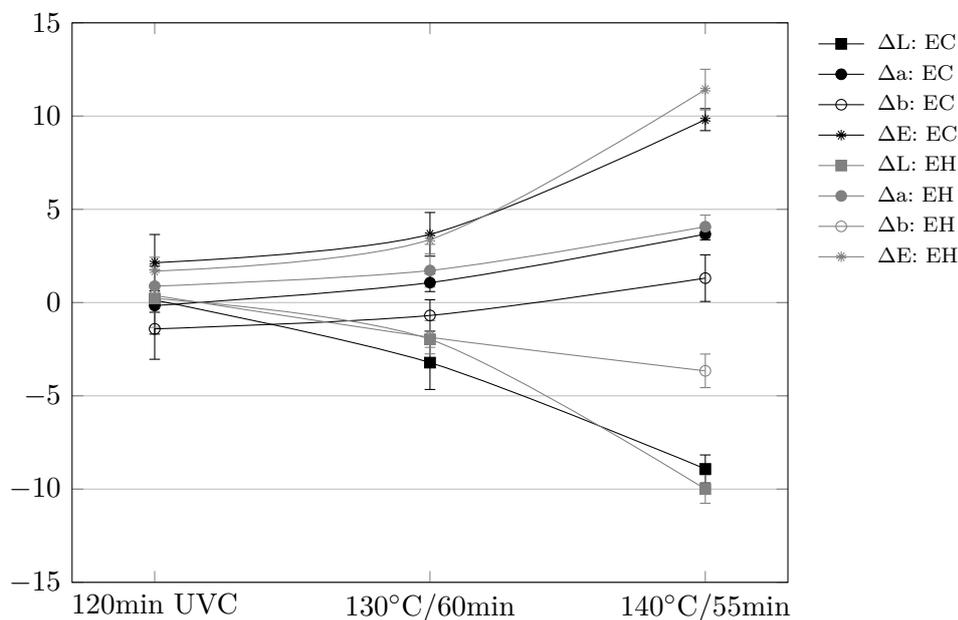


Abbildung 4.8: Änderungen der Farbwerte ΔL , Δa und Δb und Farbabstand ΔE der Proteinsolate durch unterschiedliche Behandlungen Hexan- und CO₂-entölter Lupinenflocken, n ≥ 3

In Abbildung 4.8 sind die Abweichungen der einzelnen Werte der Isolate von der unbehandelten Probe aufgetragen, sowie der Farbabstand ΔE , der sich aus den einzelnen Farbwerten a, b und L berechnen lässt. Ist dieser Wert größer als 3, unterscheiden sich die Proben deutlich voneinander [Bodart et al., 2008; Rodríguez-García et al., 2012].

Der Farbabstand der UVC-bestrahlten zur unbehandelten Probe war kaum wahrnehmbar. Durch die Erhitzung der Lupinenflocken stieg der Farbabstand, die Proteinproben wurden dunkler und röter, die Isolate der CO₂-entölten Flocken gelber, die der Hexan-entölten weniger gelb, dafür blauer. Ein Unterschied zur Referenzprobe war sowohl für die Isolate der Hexan-entölten ($\Delta E = 3,4$) als auch für die Isolate der CO₂-entölten Flocken ($\Delta E = 3,7$) erkennbar. Eine Erhitzung von 140 °C für 55 min führte zu einer deutlichen Farbänderung, wobei diese für die Proteinisolate der CO₂-entölten Flocken schwächer ausgeprägt war als für die Isolate der Hexan-entölten. Das bestätigt auch die visuell wahrnehmbaren Farbänderungen (Abbildung 4.5).

Raymundo et al. [1998b] untersuchten wärmebehandelte Lupinenproteinisolate hinsichtlich ihrer Farbgebung und stellten im Vergleich zu unbehandelten Isolaten eine Zunahme des a-Wertes, eine Abnahme des b-Wertes sowie keine Beeinflussung der Helligkeit fest. Die Behandlungstemperaturen wurden jedoch deutlich niedriger gewählt (50-90 °C, 10-40 min). Die Farbgebung pflanzlicher Proteinisolate wird v. a. mit dem Vorhandensein von Protein-Polyphenol-Verbindungen in Zusammenhang gebracht [Cordero-de-los-Santos et al., 2005].

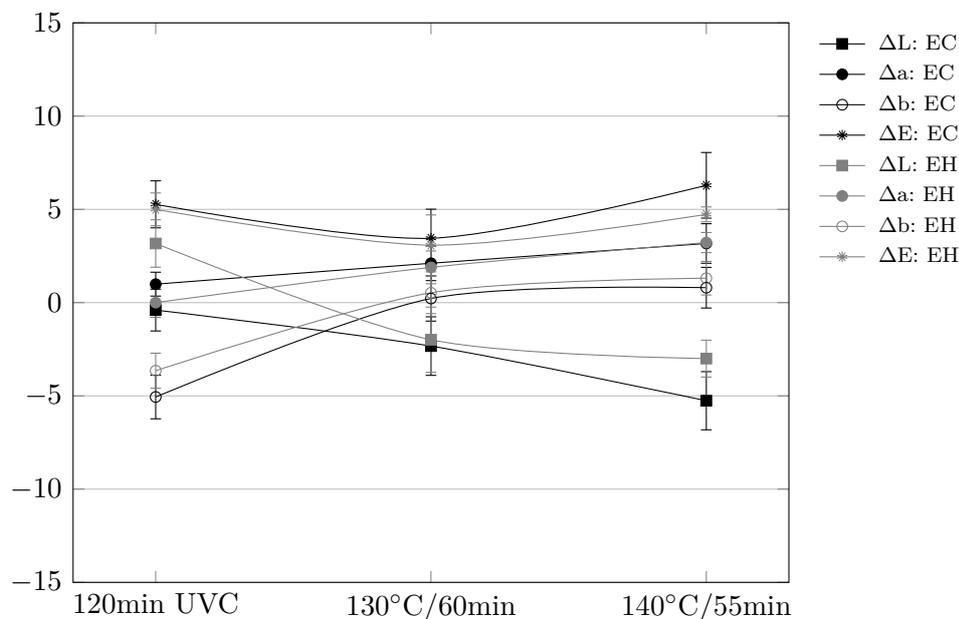


Abbildung 4.9: Änderungen der Farbwerte ΔL , Δa und Δb und Farbabstand ΔE Hexan- und CO₂-entölter Lupinenflocken durch unterschiedliche Behandlungen, $n \geq 2$

Ein etwas anderes Bild zeigte sich bei der Farbmessung der behandelten Lupinenflocken im Vergleich zu den unbehandelten (Abbildung 4.9). Auch hier nahm die Helligkeit mit zunehmender Wärmebehandlung der Flocken ab, bei den CO₂-entölten Flocken stärker als bei den Hexan-entölten. Die UVC-Bestrahlung führte bei letztgenannten zu einem Hellerwerden, während sie auf die Helligkeit CO₂-entölter Flocken keinen Einfluss hatte. Wie die Proteinisolate wurden auch die Flocken etwas röter, stärker ausgeprägt mit zunehmender Hitzebehandlung. Während die UVC-Bestrahlung die Proben blauer werden ließ, kam es durch die Behandlungen mit trockener Hitze zu einer leicht intensiveren Gelbfärbung. Alle Änderungen der Farbwerte L, a und b sowie der Farbabstand bei den bei 130 °C behandelten Flocken und deren Isolaten sind fast identisch, jedoch

sind sie bei den UVC-bestrahlten Flocken stärker und bei den bei 140 °C erhitzten Flocken wesentlich geringer ausgeprägt als bei deren Isolaten. Folglich ist der Farbabstand ΔE nach der UVC-Bestrahlung der Flocken größer und nach der Wärmebehandlung der Flocken bei 140 °C geringer als bei den entsprechenden Isolaten.

Insgesamt war die Farbänderung bei den Proteinisolaten stärker ausgeprägt als bei Flocken. Das Dunklerwerden der Proteinisolate nach der Erhitzung der Lupinenflocken könnte auf eine Polymerisation und Oxidation der phenolischen Verbindungen zurückzuführen sein, die zur Entstehung von Makromolekülen mit brauner Färbung führte [Davidov-Pardo et al., 2011].

4.4 Proteinfunktionalität

Die Funktionalität von Proteinisolaten ist für die Entwicklung verschiedener lupinenproteinhaltiger Lebensmittel essentiell [Lucas et al., 2015] und wird durch die Prozessierung des zur Proteinisolation vorliegenden Rohstoffes maßgeblich beeinflusst [Morr & Ha, 1993]. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit den funktionellen Eigenschaften unterschiedlich behandelten Saatguts oder anderer Ausgangsmaterialien auf die daraus isolierten Proteine beschäftigen [Neto et al., 2001; Khan et al., 2011]. Folglich beinhaltet der nachfolgende Abschnitt ausgewählte funktionelle Eigenschaften der micellaren Lupinenproteinisolate.

Der Proteingehalt sowie die Trockenmasse der gefriergetrockneten Proteinisolate lagen im Durchschnitt bei 95 %, ersterer somit deutlich höher als in der Literatur für micellare Proteinisolate angegeben (*Lupinus albus*: 88,75 %; N \times 6,25 [El-Adawy et al., 2001]). Die genauen Werte sind in Tabelle A.1 im Anhang angegeben und dienen als Berechnungsgrundlage für die in den nachfolgenden Kapiteln ermittelten Parameter.

4.4.1 Wasser- und Ölbindevermögen

Die Menge an Wasser und Öl, welche pro Gramm trockenen Proteinisolats gebunden werden kann, wurde ermittelt. Während das Wasserbindevermögen Textur und Mundgefühl eines Lebensmittels beeinflusst [Moure et al., 2006; Piornos et al., 2015], spielt das Ölbindevermögen neben dem Mundgefühl in der Aroma- und Geschmackserhaltung eine wesentliche Rolle [Khan et al., 2011].

Proteinisolate aus unbehandelten CO₂- und Hexan-entölten Lupinenflocken konnten etwa 0,9 g Wasser pro Gramm Protein binden (s. Abbildung 4.10). Das ist weniger als die Hälfte der von El-Adawy et al. [2001] berichteten Menge (2,3 g/g Isolat), jedoch nur etwas geringer als die von Rodríguez-Ambriz et al. [2005] ermittelte (1,3 ml/g) bei micellaren Lupinenproteinisolaten. Auch Piornos et al. [2015] (0,9-3,0 g/g je nach pH-Wert und Ionenstärke) und King et al. [1985] (ca. 1,8-6 ml/g abhängig von den Fällungsbedingungen sowie der Wärmebehandlung) erhielten höhere Werte für isoelektrisch gefällte Isolate aus *Lupinus luteus* und *Lupinus albus*.

Während die UVC-Behandlung der CO₂-entölten Lupinenflocken keinen Einfluss auf das resultierende Wasserbindevermögen der Proteinisolate hatte, konnte durch eine Behandlung mit trockener Hitze sowohl bei 130 °C als auch bei 140 °C ein signifikant höheres Wasserbindevermögen (bis zu 1,1 g je Gramm Protein bei 140 °C/60 min) im Vergleich zu den Proteinisolaten unbehandelter und UVC-bestrahlter Flocken festge-

stellt werden. Dies berichteten auch Neto et al. [2001] nach dem Autoklavieren von Cashew-Kernen für daraus isolierte Proteine sowie Schwenke et al. [1981] und King et al. [1985].

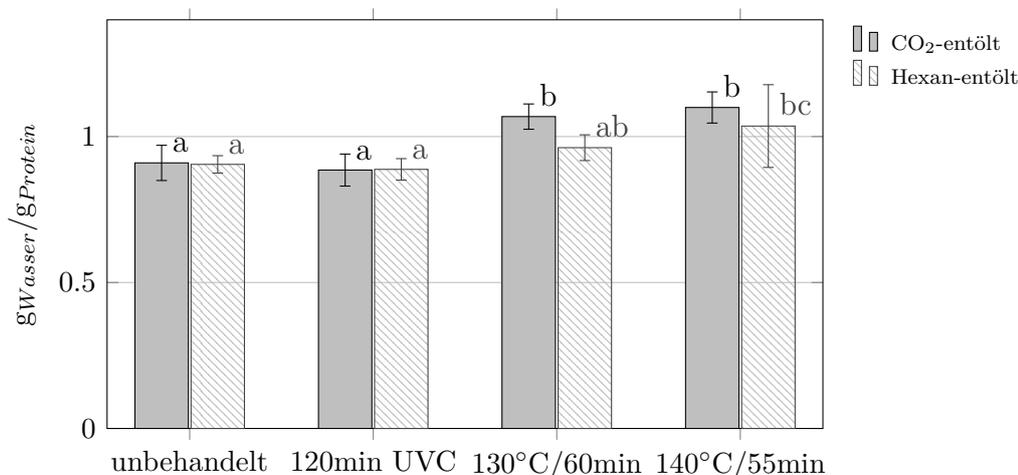


Abbildung 4.10: Wasserbindevermögen der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Für die Proteinisolate aus Hexan-entölte Lupinenflocken zeigte sich ebenfalls ein Trend zu höherem Wasserbindevermögen mit zunehmender Wärmebehandlung. Jedoch ergab sich ein signifikanter Unterschied lediglich zwischen den bei 140 °C erhitzten Proben und der unbehandelten bzw. UVC-bestrahlten Charge. Beim Vergleich der beiden Entölungsmethoden schien die CO₂-Entölung in Proteinisolaten im leicht erhöhten Wasserbindevermögen zu resultieren. Ein hohes Wasserbindevermögen wäre beispielsweise bei der Brühwurstherstellung von Vorteil. Das relativ schlechte Wasserbindevermögen der Lupinenproteine wird mit dem Vorhandensein unpolarer Aminosäuren begründet, welche schlechter mit Wasser wechselwirken als polare, hydrophile Aminosäuren [Kuntz, 1971; Sathe et al., 1982]. Der Anteil unpolarer Aminosäuren im micellaren Proteinisolat ist deutlich geringer als jener der polaren (s. Tabelle 2.3) [Muranyi et al., 2016], jedoch können hydrophobe Aminosäuren aufgrund der micellaren Struktur nach außen gerichtet sein und für eine geringere Wasserabsorption sorgen [Kuntz, 1971].

Das Ölbindevermögen (s. Abbildung 4.11) aller Proteinisolate war mit etwa 1,1 g pro Gramm Protein geringfügig höher als das Wasserbindevermögen. El-Adawy et al. [2001] und Rodríguez-Ambriz et al. [2005] ermittelten Wert von 2,9 g/g bzw. 2,2 ml/g für micellares und Piornos et al. [2015] 1,43 g/g für isoelektrisch gefälltes Isolat.

Auch hier konnte ein Trend zu höherem Ölbindevermögen der Proteinisolate mit stärkerer Wärmebehandlung der Lupinenflocken ermittelt werden, jedoch unterschieden sich die Werte nicht signifikant. Auch dies deckte sich mit den Aussagen von Schwenke et al. [1981] und Neto et al. [2001]. Im Vergleich zum Wasserbindevermögen war die Ölbindung der Proteinisolate Hexan-entölte Flocken etwas höher als die der Isolate aus den CO₂-entölte Flocken. Auch Khan et al. [2011] erzielten ein besseres Ölbindevermögen für ein Proteinisolat aus trocken erhitzter (120 °C, 10 min) Reiskleie. Die Autoren begründen dies mit dem vermehrten Auftreten unpolarer Seitenketten an der Protein-Öl-Grenzfläche, welche an die Kohlenwasserstoffketten der Lipide binden

können. Durch Dissoziationsvorgänge beim Erhitzen kann es zur geänderten Exposition hydrophiler und lipophiler Seitenketten der Proteine an der Oberfläche und einer damit verbundenen Änderung des Wasser- und Ölbindevermöges kommen [Neto et al., 2001].

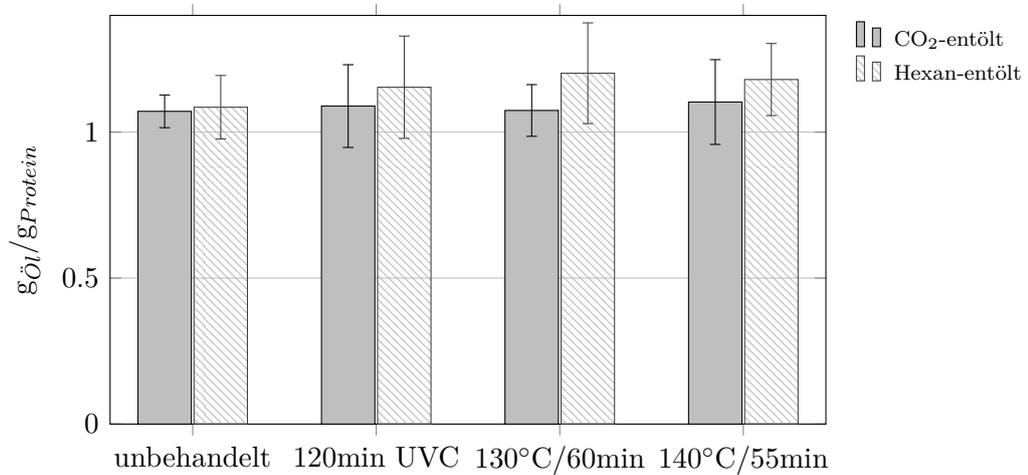


Abbildung 4.11: Ölbindevermögen der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken, $n \geq 5$

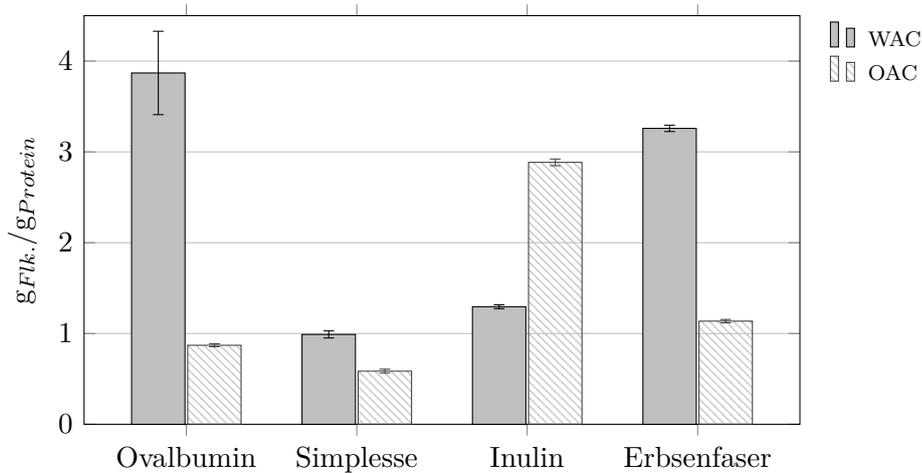


Abbildung 4.12: Wasser- (Water Absorption Capacity) und Ölbindevermögen (Oil Absorption Capacity) der Standardsubstanzen, $n = 3$

Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, lag das Wasserbindevermögen der untersuchten micellaren Lupinenproteinisolate im Bereich des Fettaustauschstoffes Simplesse und etwas unter dem von Inulin. Das Ölbindevermögen war gleichzusetzen mit dem von Erbsenfaser und etwas höher als jenes von Simplesse und Ovalbumin. Auch Neto et al. [2001] erzielten ein ähnliches Ergebnis der Ölbindung für Ovalbumin (0,8 ml/g).

Im Vergleich mit anderen Lupinenproteinisolaten, verhält sich das Micellenprotein ähnlich dem isoelektrisch gefällten Isolat Typ E von D'Agostina et al. [2006]. Die Autoren werten ein Wasser- und Ölbindevermögen von 1-2 ml/g als nicht zufriedenstellend. Für Reiskleie sind Werte von 2,4-3,8 ml/g bekannt [Khan et al., 2011]. Natives

Sojaproteinisolat besitzt ein Wasserbindevermögen von ca. 4 ml/g, welches durch Erhitzen zunimmt [Sorgentini et al., 1995], hitzebehandeltes Sojaprotein ca. 7,5 ml/g [King et al., 1985]. Das Ölbindevermögen für Sojaprotein beträgt, je nach Isolat, 1,5-2,5 ml/g [Rodríguez-Ambriz et al., 2005]. Isoelektrisch gefällte Ackerbohnenproteine bzw. micellare Sonnenblumenproteine zeigen Wasser- und Ölbindevermögen von 1,67 ml/g und 1,40 ml/g bzw. 1,24 g/g und 1,22 g/g [Schwenke et al., 1981].

4.4.2 Gelbildungsvermögen

Hierbei wurde die geringste zur Gelbildung notwendige Proteinkonzentration ermittelt. Vor allem bei einem möglichen Einsatz des micellaren Lupinenproteins in Wurstwaren ist die Gelbildung von Bedeutung.

Zur Herstellung der Gele wurden Proteinlösungen (2-5 %) in 5 ml 0,5 M NaCl-Lösung bzw. demineralisiertem Wasser in konischen Zentrifugenröhrchen hergestellt [Sathe et al., 1982]. Die Proben wurden 1 h erhitzt (100 °C) und anschließend in Eiswasser abgekühlt.

Vorversuche ergaben, dass die hergestellten Proteinisolate in demineralisiertem Wasser (pH 5,5) im Konzentrationsbereich von 2 % bis 20 % mit der genutzten Methode keine Gele ausbilden. Ursache könnte die schlechte Löslichkeit der Proteine in leicht saurem Wasser sein (s. Kapitel 4.4.5). Die folgenden Ergebnisse beziehen sich deshalb auf die Gelbildung in 0,5 M NaCl-Lösung. Es war zu beobachten, dass die Gele nach der einstündigen Erhitzung im Wasserbad noch nicht sehr fest waren. Die Verfestigung geschah erst während der Kühlphase. Für native Sojaproteine wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet, wobei das noch heiße, dickflüssige Gel als sog. „Progel“ bezeichnet wird [Hermansson, 1978].

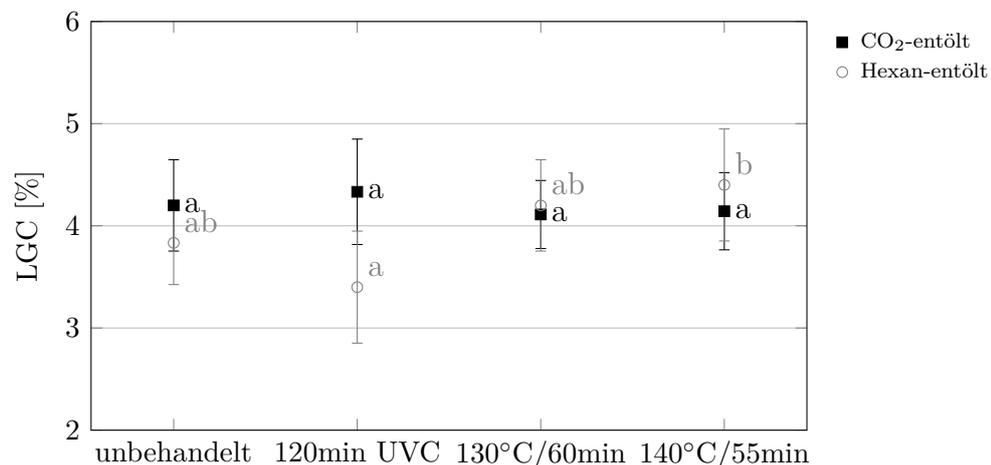


Abbildung 4.13: LGC der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Abbildung 4.13 stellt das Gelbildungsverhalten der Proteinisolate in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Lupinenflocken dar. Hierbei wurde die „Least Gelation Concentration“, (LGC), ermittelt, also jene Konzentration an Protein, die notwendig ist, um ein Gel zu bilden, dass beim Umdrehen nicht aus dem Röhrchen rutscht. Für die getesteten

Proteinisolate der CO₂-entölten Flocken lag diese bei ca. 4,2 % in 0,5 M NaCl-Lösung. Hierbei wurde kein Einfluss der Flockenvorbehandlung auf die LGC festgestellt.

Die Isolate der Hexan-entölten Flocken wiesen LGCs zwischen 3,4 % und 4,4 % auf, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen der LGC der Isolate aus UVC-bestrahlten Flocken und jener aus 140 °C behandelten Flocken ermittelt werden konnte. Folglich war für die Isolate aus stark erhitzten Hexan-entölten Lupinenflocken ein geringfügig höherer Einsatz an Proteinisolat nötig, um ein Gel zu bilden, als für Isolate aus unbehandelten Flocken. Dieses Ergebnis stimmt mit der in Kapitel 4.6.2 beobachteten geringen Denaturierung der Proteinisolate aus stark erhitzten Lupinenflocken überein.

Khan et al. [2011] kamen zu einer entgegengesetzten Schlussfolgerung für Proteinisolate aus stabilisierter Reiskleie, d. h. eine Wärmebehandlung führte zu einer Reduktion der LGC. Diese Isolate wiesen jedoch LGCs zwischen 14 % und 18 % auf. Auch King et al. [1985] ermittelten für ein stark wärmebehandeltes (100 °C) Lupinenproteinisolat eine geringere LGC als für unbehandeltes. Es wurde jedoch direkt das Proteinisolat erhitzt. Obwohl die initiale Denaturierung und Dissoziation im Vorfeld der Aggregation bei der Gelbildung eine wichtige Rolle spielen (vgl. Kapitel 2.5.2.6), können Gele auch aus vollständig denaturierten Proteinen hergestellt werden [Hermansson, 1979]. Sorgentini et al. [1995] und Rodríguez-Ambriz et al. [2005] ermittelten für ein Sojaproteinisolat 9 % und 8 %, Piornos et al. [2015] für ein isoelektrisch gefälltes Isolat aus Gelben Lupinen 14-20 %, in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke. Rodríguez-Ambriz et al. [2005] stellten bei pH 4 in Wasser eine Gelbildung bei 8 % bzw. 6 % für das micellare bzw. isoelektrische Lupinenproteinisolat fest.

Auch andere Autoren [Sathe et al., 1982; King et al., 1985; Berghout et al., 2015a] benötigten höhere Konzentrationen zur Gelbildung (8-18 %), nutzten jedoch andere Isolationstechniken für die Proteine. Lediglich bei einem durch Dialyse hergestellten Lupinenproteinisolat [Kiosseoglou et al., 1999] resultierte eine LGC von nur 4 % in Wasser. Sun & Arntfield [2010] ermittelten für ein salzextrahiertes Erbsenproteinisolat eine mit dem hier untersuchten Lupinenproteinisolat vergleichbar geringe LGC von 5,5 %.

Im Gegensatz zu isoelektrisch gefällten Isolaten wies das micellare Lupinenprotein drei Peaks im DSC-Diagramm auf (s. Kapitel 4.6.2), was auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Proteinfraktion hindeutet, die eventuell für die Gelbildung verantwortlich ist. NaCl wurde von Kiosseoglou et al. [1999] bis zu einer Konzentration von 0,5 mol/l als stabilisierend für intermolekulare Verknüpfungen ermittelt. Bora et al. [1994] beschrieben das Gegenteil bei der Gelbildung von Erbsenglobulinen.

Generell wird die Gelbildung von Lupinen- und Sojaproteinen als fundamental verschieden beschrieben [Berghout et al., 2015a]. So bilden Lupinenproteine weiche, verformbare (unelastische) und, wie Sojaproteine, aus Partikeln bestehende Gele, wobei die Gele des Sojaproteins stärker quellen. Dies entspricht auch dem geringen Wasserbindevermögen des Lupinenproteins. Berghout et al. [2015a] vermuten, dass, aufgrund der Hitze-stabilität von Lupinenproteingelen, eher eine intramolekulare Vernetzung der Proteine anstelle intermolekularer Disulfidbrücken vorliegt. Die Konzentration des schwefelreichen δ -Conglutins im Proteinisolat wird von den Autoren als zu gering angenommen, um ein festes Lupinenproteingel zu bilden. Auch Sousa et al. [1996] machen die erhöhte Hitzestabilität im Vergleich zum Sojaprotein für die minderwertigen verdickenden und Gelbildungseigenschaften des Lupinenproteins verantwortlich. Zusätzlich ist bei

Lupinenproteinen eine größere Menge an Wasser zur vollständigen Hydratisierung der Proteinoberfläche notwendig [Sousa et al., 1995]. Im Gegensatz dazu beschreibt die Studie von Kiosseoglou et al. [1999], anhand von Untersuchungen zur Löslichkeit der Gele, dass bei 80 °C hergestellte Gele aus dem Protein von *Lupinus albus* überwiegend durch nicht-kovalente-Wechselwirkungen zusammengehalten werden, während bei 90 °C die Ausbildung von Disulfidbrücken zu festeren Gelen führt. Folglich wird Lupinenprotein von Berghout et al. [2015a] für proteinreiche Lebensmittel mit geringer Viskosität und guter Dispergierbarkeit nach der Wärmebehandlung empfohlen.

Im Vergleich zu Erbse und Ackerbohne sind Gele aus Lupinenprotein härter [Makri et al., 2005]. Die Gelfestigkeit und -elastizität ist vergleichbar mit der eines Erbsenproteinisolats, jedoch deutlich höher als für Ackerbohne. Eine Steigerung der Elastizität durch den Zusatz von geringen Konzentrationen NaCl (0,25 M) ist möglich.

Die hier hergestellten Gele waren alle opaker, nicht-transparenter Natur. Dies wurde auch von Rodríguez-Ambriz et al. [2005] für Lupinen- und Sojaproteingele beschrieben. Die Autoren schildern den prozentual hohen Anteil unpolarer Aminosäuren als ursächlich. So bilden Proteine, die vor allem aus polaren Aminosäuren bestehen, überwiegend transparente Gele.

Für die Ausbildung einer Gelstruktur sind Wechselwirkungen zwischen Proteinen und damit die Ausbildung neuer Bindungen notwendig. Ist ein Proteinisolat bereits denaturiert, sind diese Wechselwirkungen nicht mehr möglich und eine Gelbildung kann nicht stattfinden [Sorgentini et al., 1995; Sun & Arntfield, 2010]. Das von Berghout et al. [2015a] verwendete Lupinenproteinisolat ist teilweise denaturiert, was die höhere Menge an Protein zur Gelbildung erklären könnte. Das Micellenprotein ist im Gegensatz dazu nativ (s. Kapitel 4.6.2).

Im Vergleich mit den Referenzsubstanzen betrug die LGC für Simplese 17 % ($n = 3$). Die micellaren Lupinenproteinisolate weisen somit eine wesentlich geringere LGC auf als die des Fettaustauschstoffes Simplese. Für den Einsatz im Lebensmittel ist dies vorteilhaft, da weniger Rohstoff benötigt wird. Im Gegensatz dazu gelieren handelsübliche Molkenproteinkonzentrate ab Proteinkonzentrationen zwischen 3 und 8 % [Morr & Ha, 1993].

4.4.3 Emulgiereigenschaften

Mittels Trübungsmessung wurden die Emulsionsaktivitätsindizes der micellaren Proteinisolate photometrisch bestimmt. Die Zeit, nach welcher die Hälfte der Ausgangsemulsionsaktivität erreicht wurde, wurde als Emulsionsstabilitätsindex bezeichnet. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Möglichkeit der Anwendung des Lupinenproteinisolats in emulsionsbasierten Lebensmitteln (bspw. Mayonnaise) geben.

Alle untersuchten Lupinenproteinisolate wiesen sehr geringe Emulsionsaktivitäts- und -stabilitätsindizes in 0,5 molarer NaCl-Lösung auf (Abbildungen 4.14 und 4.15: ca. 16,8 m²/g bzw. 0,5 min für unbehandelte Proben).

Durch die Wärmebehandlung der Lupinenflocken bei 140 °C war ein signifikanter Anstieg der Emulsionsaktivität der Proteinisolate in 0,5 molarer NaCl-Lösung erkennbar. Dieser war für CO₂-entölte Flocken größer als für Hexan-entölte (30,9 bzw. 24,7 m²/g).

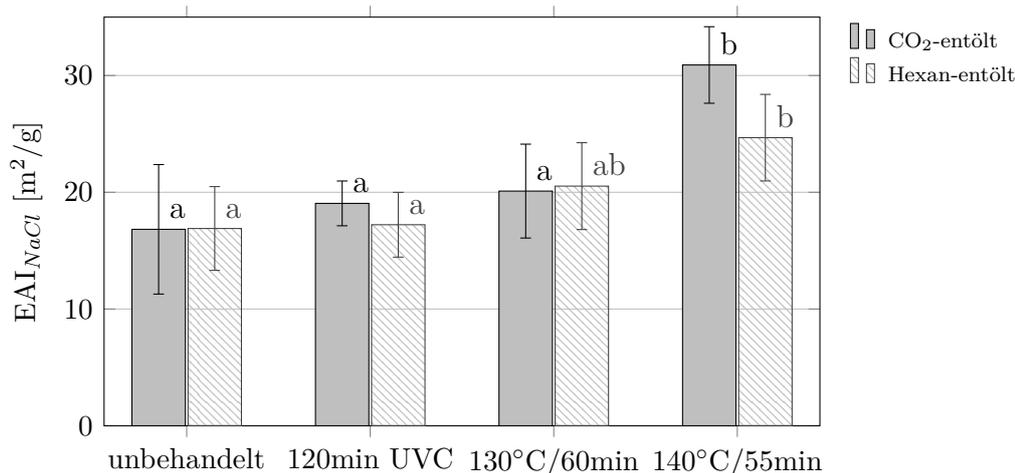


Abbildung 4.14: Emulsionsaktivitätsindex der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken in 0,5molarer NaCl-Lösung; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Der Emulsionsstabilitätsindex in NaCl fiel bereits durch eine Wärmebehandlung von 130 °C signifikant ab und wurde nach 55 min bei 140 °C noch geringer (0,3-0,2 min). Auch Piornos et al. [2015] und Makri et al. [2005] dokumentierten eine Reduktion der Emulsionsstabilität in 0,5 molarer NaCl-Lösung im Vergleich zu Wasser. Dies wurde mit dem Aussalzeffekt durch die höhere Ionenstärke erklärt [Piornos et al., 2015]. Die Ionen binden an die Proteine und schwächen somit die intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen. Hydrophobe Wechselwirkungen werden dadurch unterbunden und die filmbildenden Eigenschaften beeinträchtigt [Morr & Ha, 1993].

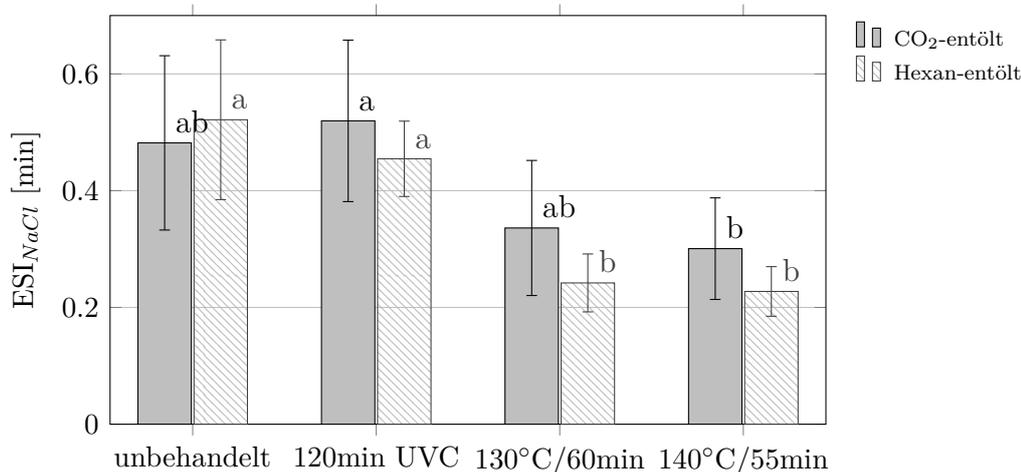


Abbildung 4.15: Emulsionsstabilitätsindex der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken in 0,5molarer NaCl-Lösung; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Ein Anstieg der Emulsionsaktivität wurde auch von Khan et al. [2011] für Reiskleiproteine nach der Erhitzung des Rohstoffes ermittelt, jedoch berichteten die Autoren ebenfalls von einem Anstieg der Emulsionsstabilität. Beide Parameter wurden jedoch mit anderen Methoden erfasst, was eine Vergleichbarkeit erschwert. Eine erhöhte Emul-

sionsaktivität zeugt von einer partiellen Auffaltung der Proteine, wobei hydrophobe Seitenketten freigelegt werden und eine Interaktion mit anderen unpolaren Verbindungen und Lösungsmitteln erleichtert wird [Khan et al., 2011]. Für Ackerbohnen- und Sonnenblumenproteinisolate wurde jedoch eine Reduktion der Emulsionskapazität nach milder Säuredenaturierung beschrieben [Schwenke et al., 1981].

Im Gegensatz dazu gab es kaum signifikante Unterschiede in den Emulsionsaktivitäts- und -stabilitätsindizes der Proteinisolate bei Bildung der Emulsionen mit Wasser (Abbildungen 4.16 und 4.17). Lediglich die trockene Erhitzung (130 °C und 140 °C) verursachte einen signifikanten Anstieg des Emulsionsaktivitätsindex der Proteinisolate der CO₂-entölte Lupinenflocken. Die verbesserten Emulgiereigenschaften von Lupinenprotein nach einer Wärmebehandlung wurden von Benjamin et al. [2014] u. a. durch eine Verringerung der Partikelgröße der mit erhitztem Lupinenprotein bereiteten Emulsionen erklärt.

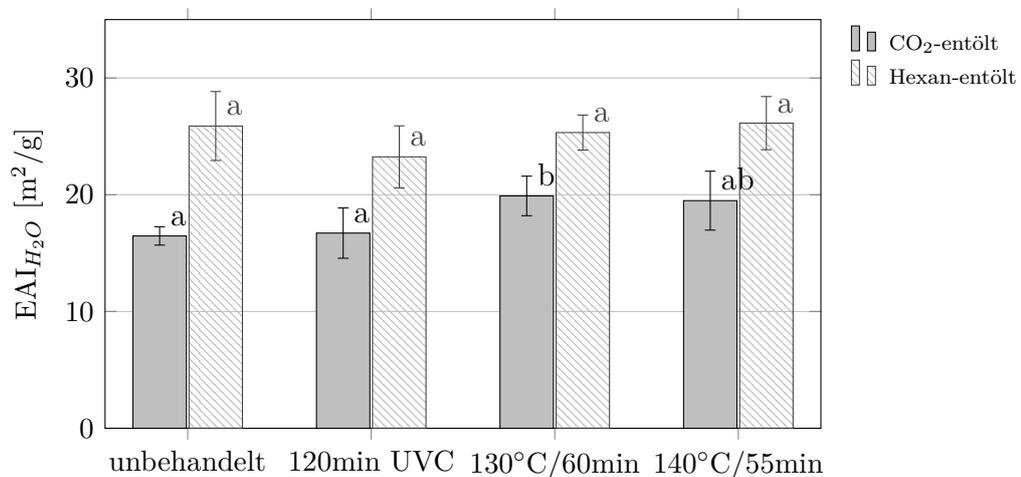


Abbildung 4.16: Emulsionsaktivitätsindex der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

In den Emulsionsstabilitätsindizes gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch lässt die grafische Darstellung den Schluss zu einem Trend der Abnahme der Emulsionsstabilität der Proteinisolate CO₂-entölte Lupinenflocken mit zunehmender Wärmebehandlung der Flocken zu.

Hojilla-Evangelista et al. [2004] erhielten EAI-Werte von 45-72 m²/g für Lupinenproteinextrakte sowie 56-99 m²/g für Sojaproteine. 102 m²/g gaben Wu et al. [1998] für isoelektrisch gefälltes Sojaproteinisolat an. Diese Werte sind deutlich höher als die der hier untersuchten Proteinisolate. Andererseits erhielten Onsaard et al. [2010] ca. 6 m²/g für ein Sojaproteinisolat und 49,7 m²/g bei einem salzgelösten und isoelektrisch gefällten Sesam-Proteinkonzentrat. In der Studie von Makri et al. [2005] wird beschrieben, dass Globuline in isoelektrisch gefällten Proteinisolaten Öl-in-Wasser-Emulsionen stabilisieren. Die Emulsionsstabilität der von Hojilla-Evangelista et al. [2004] untersuchten Proben betrug jedoch nur ca. 25 min bzw. 15 min für Lupinen- bzw. Sojaproteine. Diese Stabilitäten wurden von den Autoren als gering erachtet. Für das 7S-Globulin aus Erbsen wurde ein Emulsionsaktivitätsindex von 85 m²/g berichtet [Pedrosa et al., 1997].

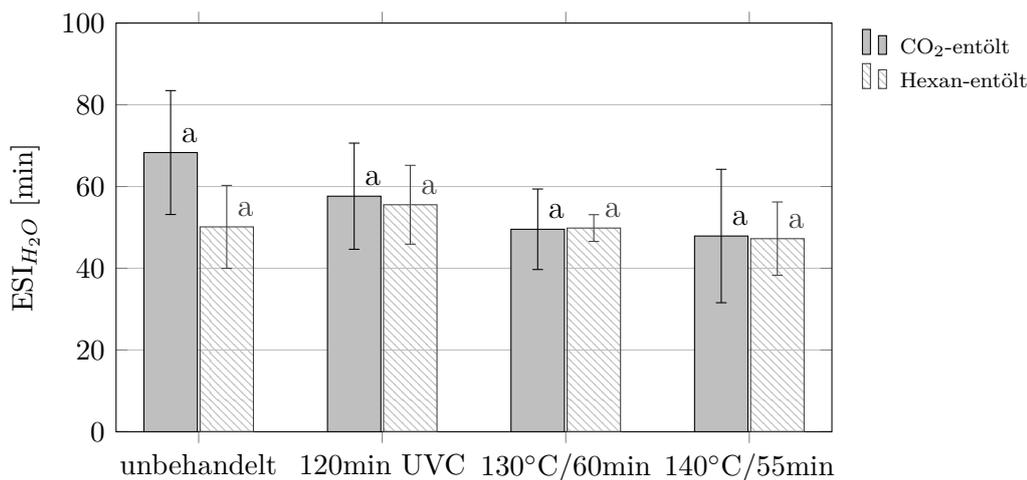


Abbildung 4.17: Emulsionsstabilitätsindex der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken in Wasser; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Lampart-Szczapa et al. [2006] ermittelten für Mehl von *Lupinus angustifolius* Baron einen EAI von $12,16 \text{ m}^2/\text{g}$ und einen ESI von $7,44 \text{ min}$. Beide Werte sind deutlich geringer als die der hier untersuchten Lupinenproteine. Im Bereich von 2-10% Lupinenprotein in der Emulsion wurde von Sathe et al. [1982] ein invers proportionales Verhalten zur Emulsionskapazität festgestellt. Des Weiteren beschrieben die Autoren eine pH-Abhängigkeit der Emulsionskapazität, wobei Lupinenprotein im sauren pH-Bereich deutlich besser emulgiert als im Basischen. Im neutralen pH-Bereich war die Emulgierbarkeit am geringsten. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde der pH-Wert nicht manipuliert, wodurch im nativen pH-Bereich des Proteins in Verbindung mit dest. Wasser folglich bei ca. pH 6 gemessen wurde. Dies würde die relativ geringe Emulgierbarkeit der Proteinisolate erklären.

Der starke Unterschied in der Emulsionsstabilität der mit Wasser bzw. NaCl-Lösung hergestellten Emulsionen ist bedeutend für die Übertragbarkeit der Anwendung auf Lebensmittel. Im hier dargestellten Fall kann von einer geringeren Emulsionsstabilität in salzhaltigen Lebensmitteln (z. B. Wurstwaren) ausgegangen werden. Es ist jedoch zu erwarten, dass andere Lebensmittelbestandteile die Emulsionsstabilität ebenfalls beeinflussen, sodass beispielsweise bessere Emulgierergebnisse in sauren Lebensmitteln zu erwarten sind.

EAI und ESI der micellaren Lupinenproteine waren vergleichbar mit den jeweiligen Werten für Simplex (Abbildungen 4.18 und 4.19: $26,4 \text{ m}^2/\text{g}$ bzw. $30,3 \text{ m}^2/\text{g}$ und $0,7 \text{ min}$ bzw. $1,0 \text{ min}$ jeweils für NaCl bzw. Wasser). Im Gegensatz zu den Lupinenproteinisolaten war der Emulsionsstabilitätsindex für Na-Caseinat in Wasser etwas geringer als in NaCl-Lösung. Diese Beobachtung machten bereits Pearce & Kinsella [1978]. Wie zu erwarten, waren die besten Emulgiereigenschaften für Lecithin zu beobachten, welches einen gängigen Emulgator darstellt. Die untersuchten Lupinenproteine zeigten in Wasser etwa ein Drittel der Emulsionsaktivität von Lecithin, während die Emulsionsstabilität nur geringfügig kleiner war.

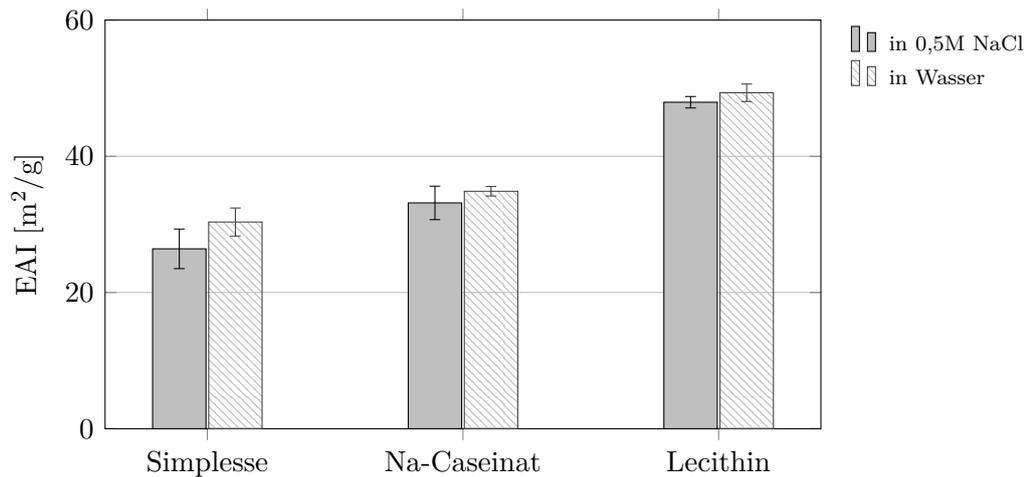


Abbildung 4.18: Emulsionsaktivitätsindex der Standardsubstanzen, n = 3

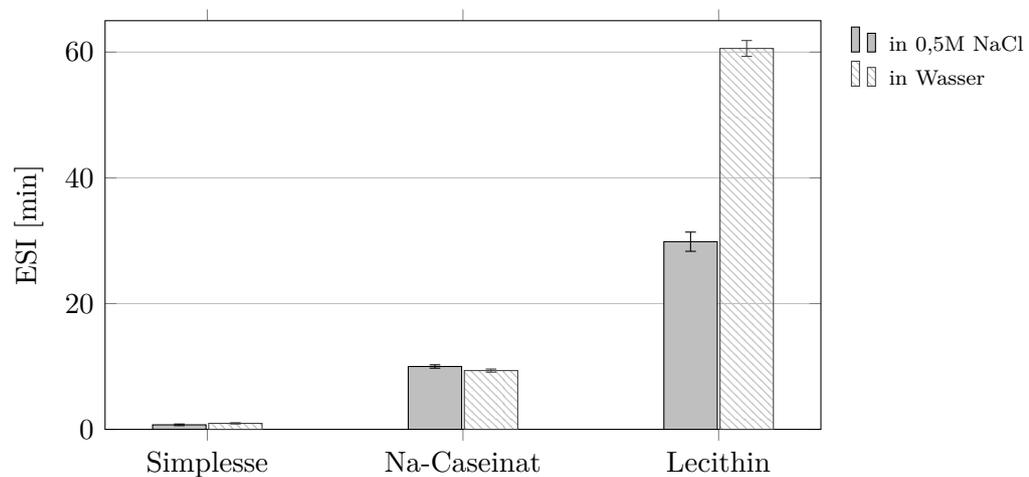


Abbildung 4.19: Emulsionsstabilitätsindex der Standardsubstanzen, n = 3

4.4.4 Schaumbildungsvermögen

Durch Aufschäumen der micellaren Proteinisolate in Wasser konnte das Schaumvolumen ermittelt und daraus Schaumkapazität (prozentuale Volumenzunahme durch das Aufschäumen) und -stabilität (prozentuales Schaumvolumen nach 2 h) berechnet werden. Das Schaumbildungsvermögen lässt den Einsatz in bspw. Desserts und anderen aufgeschlagenen Speisen abschätzen.

Die Schaumkapazität der Proteinisolate aus 60 min bei 130 °C erhitzten CO₂-entölten Lupinenflocken (Abbildung 4.20) war signifikant geringer als die der unbehandelten Probe (36,5 % gegenüber 51,2 %). Gleiches galt für die Proteinisolate aus Hexan-entölten Lupinenflocken (27,0 % gegenüber 37,4 %). Auch hier war ein Trend zur Abnahme der Schaumkapazität der Proteinisolate mit zunehmender Wärmebehandlung der jeweiligen Flocken erkennbar, während die Schaumstabilitäten (Abbildung 4.21) keine signifikanten Schwankungen in Abhängigkeit der Behandlung aufzeigten.

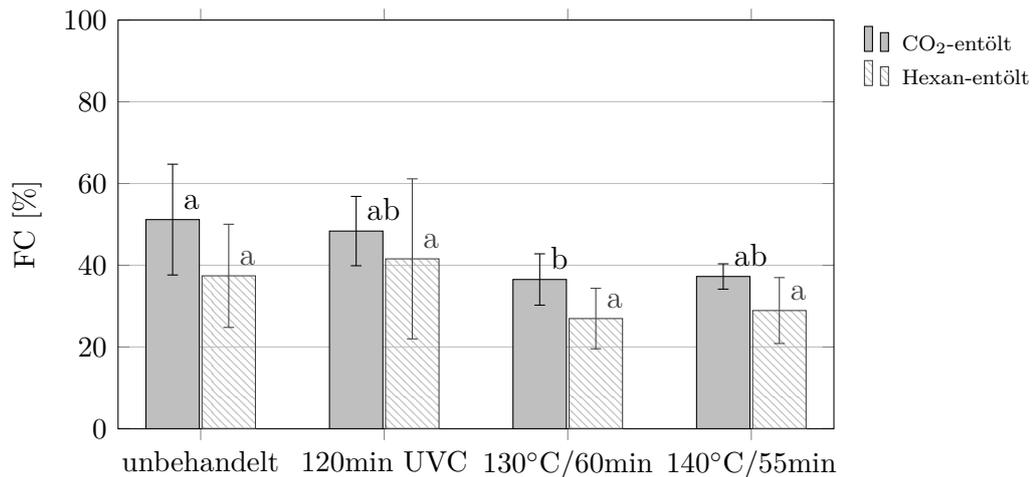


Abbildung 4.20: Schaumkapazität der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken in Wasser; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 4$

Auch Raymundo et al. [1998a] ermittelten eine Abnahme des Schaumvermögens bei starker Denaturierung der Lupinenproteine durch eine Wärmebehandlung über 60 °C. Weiterhin beschrieben die Autoren Lupinenproteinschaum als hitzestabil, wobei die Struktur von gekochtem Lupinenproteinschaum jener von ungekochtem Eiklarschaum entspricht.

Die Schaumstabilität entsprach etwa der für andere Lupinenproteinisolate berichteten [D'Agostina et al., 2006]. Schaumkapazitäten von 146 % und 220 % wurden von El-Adawy et al. [2001] und Rodríguez-Ambriz et al. [2005] für micellare Lupinenproteinisolate bestimmt. Die Schaumkapazität der hier untersuchten Isolate entsprach der von Sathe et al. [1982] gemessenen für entölte Lupinenproteinkonzentrate, während die Schaumstabilität etwa doppelt so hoch war wie die der Autoren. D'Agostina et al. [2006] ermittelten für ihre Isolate Schaumkapazitäten von 1000-2000 %. Die Autoren nutzten jedoch eine 5%ige Proteinlösung und eine andere Ausrüstung. Ihre Proteinisolate waren zusätzlich sehr gut in Wasser löslich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Schaumbildungseigenschaften stark von der Menge an Protein in der zu schäumenden Lösung, den Arbeitsgeräten und den Eigenschaften der Proteine (z. B. Löslichkeit) abhängig ist. Die Ergebnisse von Piornos et al. [2015] bestätigen genau das, da sie ähnliche Werte der Schaumkapazität im neutralen pH-Bereich ermittelten, diese jedoch mit zunehmender Löslichkeit der Proteine (pH-abhängig) stieg. Danach können lösliche Proteine die Oberflächenspannung an den Grenzflächen der Bläschen reduzieren. Die Schaumstabilitäten der hier untersuchten Isolate waren dennoch höher als die von Piornos et al. [2015].

Die Schaumstabilität unterlag einem geringen, nicht signifikanten Trend zur Abnahme mit zunehmender Wärmebehandlung (Abbildung 4.21). Khan et al. [2011] stellten dies auch bei Proteinisolaten aus trocken erhitzter Reiskleie fest. Mit dieser Wärmebehandlung ist eine Denaturierung der Proteine verbunden (s. Kapitel 4.6.2). Andere Autoren machen eine stärkere Denaturierung von Proteinen für eine Verbesserung der Schaumstabilität verantwortlich [Cordero-de-los-Santos et al., 2005]. Dadurch könnten die intermolekularen Wechselwirkungen reduziert werden und der für die Schaumstabilität wichtige viskoelastische Film ist nicht stark genug [Hettiarachchy et al., 1996].

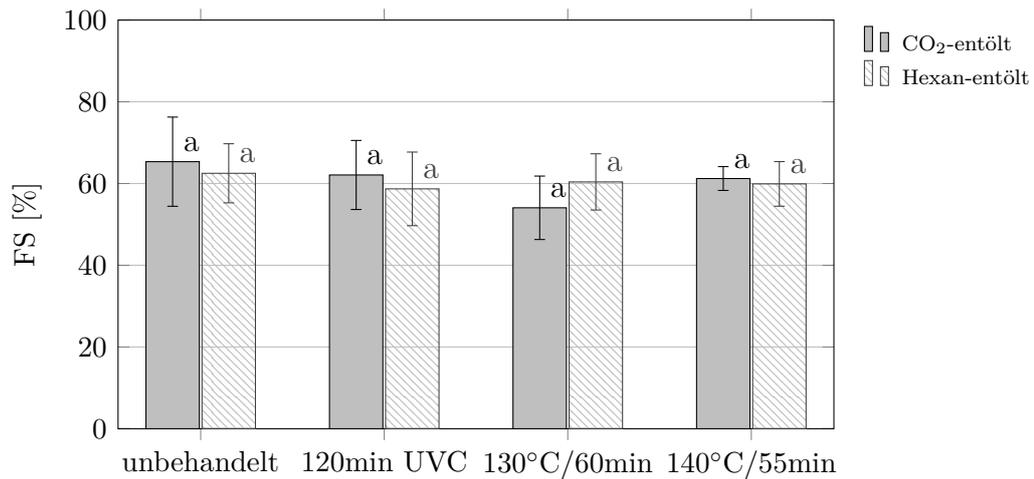


Abbildung 4.21: Schaumstabilität der Proteinisolate verschieden behandelter Lupinenflocken in Wasser; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 4$

Im Vergleich zu anderen Leguminosen wurden von Makri et al. [2005] deutlich bessere Schaumbildungseigenschaften für Erbsen- gefolgt von Ackerbohnenproteinisolaten ermittelt als für Lupinenproteine. Ursächlich war hierfür vermutlich die abweichende Zusammensetzung der jeweils extrahierten Proteinfractionen. Die Schaumbildung war jeweils in der Nähe des isoelektrischen Punktes (pH 5,5) besser als weiter entfernt davon (pH 7). Auch Sathe et al. [1982] ermittelten eine pH-Abhängigkeit der Schaumkapazität, wobei diese bei pH 2 am höchsten und im Bereich des isoelektrischen Punktes am geringsten war, was die Abhängigkeit der Schaumbildung von der Löslichkeit der Proteine bestätigt. Am isoelektrischen Punkt beobachteten die Autoren jedoch die höchste Schaumstabilität.

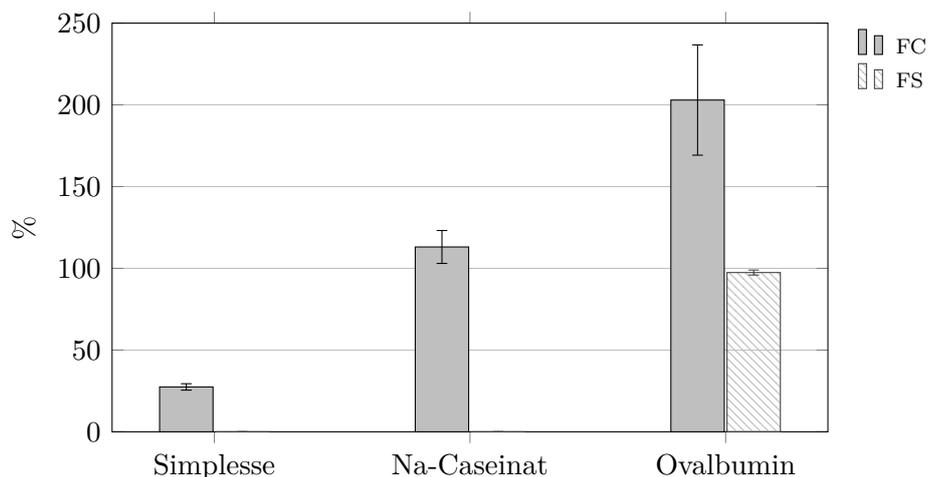


Abbildung 4.22: Schaumbildungseigenschaften der Standardsubstanzen, $n = 3$

Die hier durchgeführten Untersuchungen fanden in demineralisiertem Wasser (pH ca. 5,5) statt. Die Löslichkeit der getesteten Proteinisolate war in diesem pH-Bereich relativ schlecht (vgl. Kapitel 4.4.5) und nahm mit zunehmender Wärmebehandlung weiter ab. Folglich bestätigen auch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse einen

Zusammenhang zwischen Schaumaktivität und Löslichkeit, da eine hohe Löslichkeit von Proteinen für eine gute Schaumbildung wichtig ist [Kinsella, 1979].

Unter den Referenzsubstanzen zeigte Ovalbumin die beste Schaumkapazität, gefolgt von Na-Caseinat und Simplese. Die untersuchten Proteinisolate waren im Bereich zwischen Simplese und Na-Caseinat einzuordnen. Die Schaumstabilität der Lupinenproteine übertraf die von Simplese und Na-Caseinat stark, wobei bei Simplese bereits nach 5 min kein Schaum mehr sichtbar war. Bei Na-Caseinat lag das Schaumvolumen nach 30 min nur noch bei 20 ml, nach 120 min konnte kein Schaum mehr registriert werden. Eine Berechnung der Schaumstabilität war deshalb nicht möglich.

4.4.5 Proteinlöslichkeit

Die Proteinlöslichkeit der micellaren Proteinisolate wurde in Pufferlösungen der pH-Werte 2, 4, 6, 8 und 10 getestet. Im Bezug auf den Einsatz des Isolats in der Nahrung ist sie vor allem bei flüssigen Lebensmitteln von Bedeutung. Eine Abschätzung über die mögliche Ausflockung des Proteins wird durch die pH-abhängige Betrachtung möglich. Weiterhin lassen sich Korrelationen zu anderen funktionellen Eigenschaften herstellen.

In den folgenden Darstellungen sind die Löslichkeiten der Proteinisolate verschieden behandelte CO₂- und Hexan-entölter Lupinenflocken in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Alle Isolate zeigten die geringste Proteinlöslichkeit von 8-18 % bei pH 4 (Bereich des isoelektrischen Punktes [Piornos et al., 2015]), sowie eine Zunahme der Löslichkeit jeweils hin zum sauren und basischen pH-Bereich. Einen ähnlichen Kurvenverlauf erhielten King et al. [1985], El-Adawy et al. [2001] und Rodríguez-Ambriz et al. [2005] für die Proteinlöslichkeit in isoelektrischen Lupinenproteinisolaten, Hexan-entöltem Lupinenmehl und micellarem Lupinenproteinisolat sowie Neto et al. [2001] für Proteinisolate aus Cashew-Kernen und Lqari et al. [2005] für Lupinenhydrolysate. Auch Yoshie-Stark et al. [2004] ermittelten den pH-Bereich um pH 5 als jenen der schlechtesten Proteinlöslichkeit (12-15 %) für ein überwiegend aus α - und β -Conglutin bestehendes Lupinenproteinisolat Typ E. Das Löslichkeitsprofil der hier untersuchten micellaren Proteinisolate entspricht etwa jenem des Isolats Typ E. Da dieses Profil dem von Eiklarproteinen ähnelt, wird davon ausgegangen, dass es als Ersatz von Eiklar in Lebensmitteln eingesetzt werden kann [Yoshie-Stark et al., 2004].

Die Löslichkeit der Proteinisolate CO₂-entölter Flocken (Abbildung 4.23) war insgesamt etwas besser als die der Hexan-entölten (Abbildung 4.24). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Untersuchungen von Yoshie-Stark et al. [2004], die eine geringfügig höhere Löslichkeit für Isolate aus Hexan-entölten Lupinenflocken ermittelten.

Während sich bei pH 4 und 6 eine Abnahme der Proteinlöslichkeit mit stärkerer Erhitzung der Lupinenflocken zeigte (CO₂-entölt: signifikant ($p < 0,01$) geringere Löslichkeit der 140 °C/55 min-Probe im Vergleich zur unbehandelten und UVC-bestrahlten bei pH 4; Hexan-entölt: signifikant geringere Löslichkeit der 140 °C/55 min-Probe im Vergleich zur UVC-bestrahlten bei pH 6) konnte bei pH 2, 8 und 10 eher der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Dies war bei den Isolaten der CO₂-entölten Flocken deutlicher als bei denen der Hexan-entölten. Alle untersuchten Proteinisolate waren bei pH 10 am besten löslich (80,6 % beim Isolat der UVC-bestrahlten CO₂-entölter Lupinenflocken). Piornos et al. [2015] erreichten eine Löslichkeit von 89 % in diesem pH-

Bereich, Rodríguez-Ambriz et al. [2005] sogar 98 %. Für die UVC-Behandlung konnte kein negativer Effekt auf die Löslichkeit der Proteinisolate festgestellt werden.

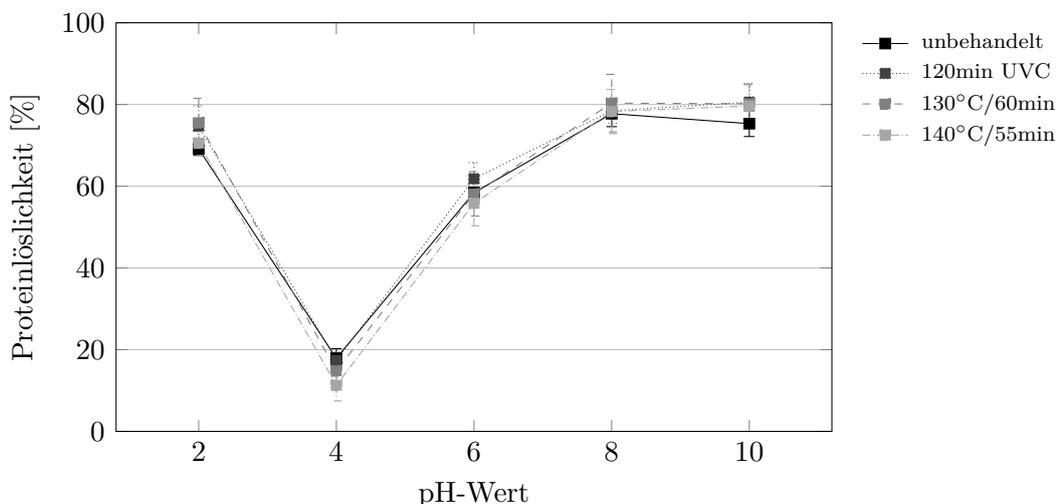


Abbildung 4.23: Proteinlöslichkeit der Proteinisolate verschieden behandelter CO₂-entölter Lupinenflocken, $n \geq 5$

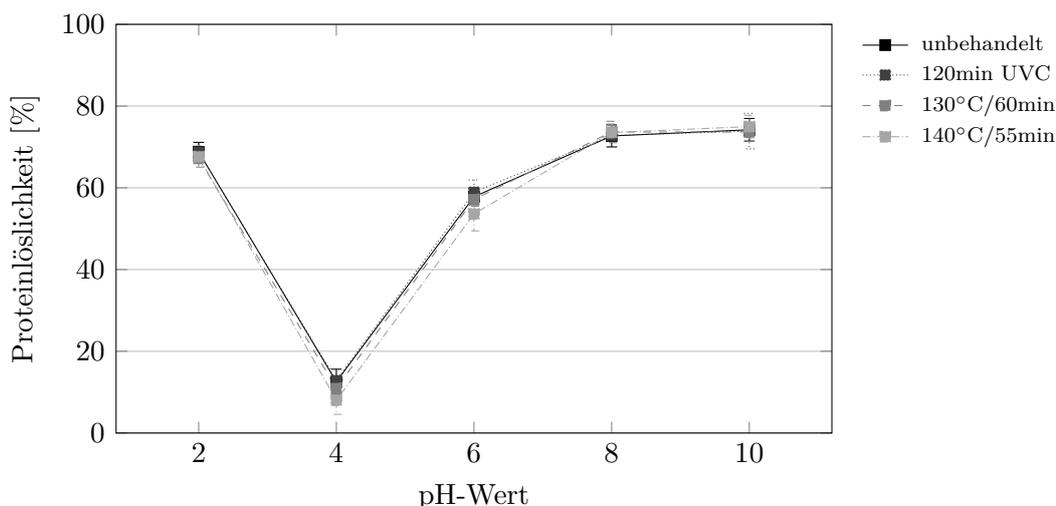


Abbildung 4.24: Proteinlöslichkeit der Proteinisolate verschieden behandelter Hexan-entölter Lupinenflocken, $n \geq 5$

Khan et al. [2011] ermittelten eine verminderte Löslichkeit für Proteine aus wärmebehandelter Reiskleie und erklärten dies mit einer möglichen Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine bis hin zur Aggregation und Quervernetzung. Die Löslichkeit von Leguminosenproteinen soll allgemein durch den Kochvorgang verschlechtert werden [Carbonaro et al., 2000]. Auch für andere Proteine wurde eine geringere Löslichkeit nach einer vorausgehenden Wärmebehandlung beschrieben [Neto et al., 2001]. Eine Wärmebehandlung kann, je nach Temperatur, zur Denaturierung der Proteine führen. Eine geringfügige Denaturierung ist für die hier untersuchten Proteinisolate in Kapitel 4.6.2 nachgewiesen worden, was den von o. g. Autoren beschriebenen Zusammenhang zwischen Wärmebehandlung und verminderter Löslichkeit unterstreicht.

Denaturierung und Löslichkeit korrelieren jedoch nicht immer miteinander, was bei Sojaproteinen gezeigt wurde [Hermansson, 1979].

In Anbetracht des Löslichkeitsprofils der micellaren Lupinenproteinisolate scheint eine Anwendung in neutralen und sauren Lebensmitteln von Vorteil. Bei schwach sauren Lebensmitteln könnte sich das Protein absetzen. Dies ist jedoch auch vom Salzgehalt des jeweiligen Produktes abhängig.

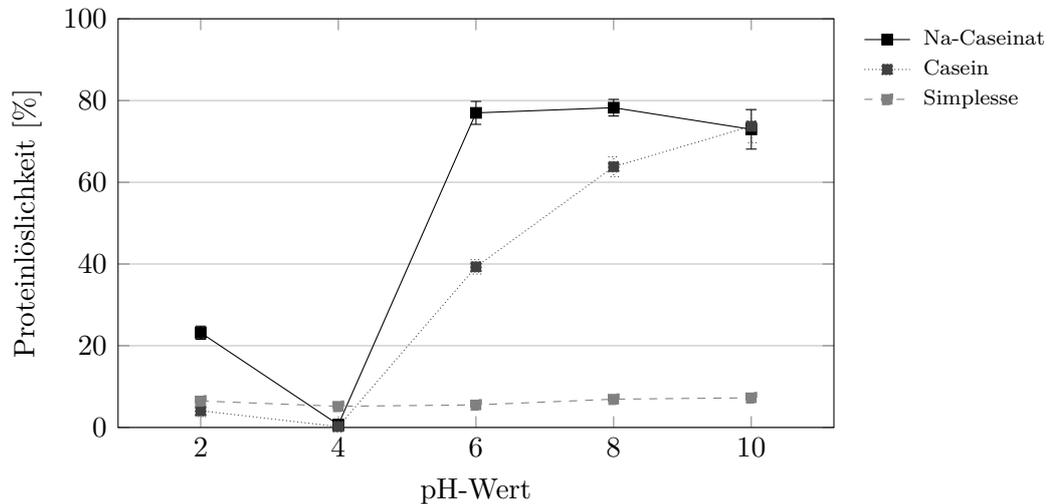


Abbildung 4.25: Proteinlöslichkeit der Standardsubstanzen (Na-Caseinat, Casein: n = 3; Simplesse: n = 1)

Zum Vergleich stellt Abbildung 4.25 die Proteinlöslichkeit von Na-Caseinat, Casein und Simplesse ebenfalls zwischen pH 2 und 10 dar. Während das Löslichkeitsverhalten von Na-Caseinat dem der micellaren Lupinenproteinisolate stark ähnelte, wies das Protein des Fettaustauschstoffes Simplesse eine eher schlechte Löslichkeit von etwa 6,3 % auf, welche kaum pH-Wert-abhängig war. Wahrscheinlich wurde dieses Produkt während der Herstellung denaturiert.

Laut Rodríguez-Ambriz et al. [2005] steht die Löslichkeit von Proteinen in engem Zusammenhang zu deren Oberflächenhydrophobität. Sind die Proteine der Oberfläche sehr hydrophil, können sie auch am isoelektrischen Punkt in Lösung gehen. Ist die Oberflächenhydrophobität sehr groß, sind elektrostatische Abstoßung sowie Hydratisierung der Ionen minimal und das Protein fällt aus.

4.4.6 Oberflächenhydrophobität

Die Oberflächenhydrophobität bezeichnet die Menge an hydrophoben Gruppen an der Oberfläche eines Proteinmoleküls [Jiang et al., 2014], die mit anderen Lebensmittelbestandteilen wechselwirken können. Mittels eines Spektralfluorometers wurde die Fluoreszenzintensität der Proteinisolate durch Fluoreszenzmarkierung der Proteinen über die Bindung von ANS ermittelt und daraus die Oberflächenhydrophobität berechnet (s. Kapitel 3.2.8.7). Mit Hilfe der Oberflächenhydrophobität können Aussagen über den Denaturierungsgrad getroffen [Hojilla-Evangelista et al., 2004] und Korrelationen zu verschiedenen anderen funktionellen Eigenschaften hergestellt werden [Morr & Ha, 1993; Schwenke, 2001].

Im Vergleich zu den untersuchten Standardsubstanzen (Abbildung 4.26) wiesen die Proteinisolate aus verschiedenen behandelten Lupinenflocken eher geringe Werte für die Oberflächenhydrophobität auf (Abbildung 4.27). Sie waren in etwa vergleichbar mit denen von Ovalbumin (SH = 804), lagen aber noch 20 % darunter. Benjamin et al. [2014] bewerten einen geringen Anteil unpolarer Aminosäuren generell als ursächlich für eine geringe Oberflächenhydrophobität. Dieser liegt laut Muranyi et al. [2016] bei etwa 36,5 % (s. auch Tabelle 2.3).

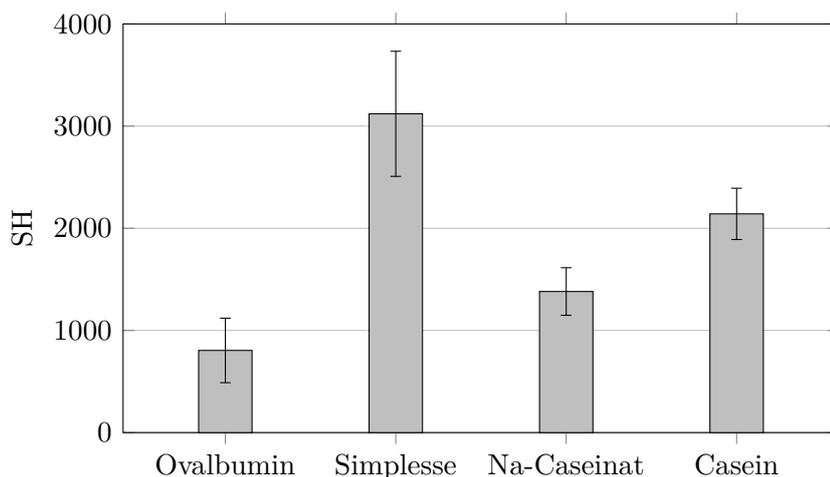


Abbildung 4.26: Oberflächenhydrophobität der Standardsubstanzen, n = 3

Signifikante Unterschiede konnten lediglich zwischen den Isolaten aus UVC-bestrahlten bzw. bei 130 °C wärmebehandelten und den bei 140 °C trocken erhitzten CO₂-entölte Lupinenflocken festgestellt werden, wobei die Oberflächenhydrophobität bei der am stärksten erhitzten Probe am größten war. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Khan et al. [2011] für Proteine aus trocken erhitzter Reiskleie sowie Raymundo et al. [1998b] für wärmebehandelte Lupinenproteinisolate.

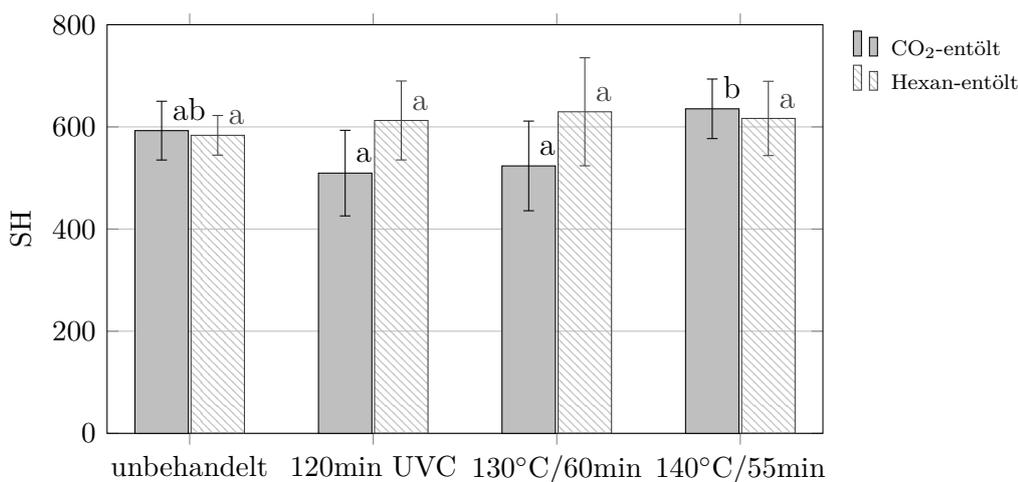


Abbildung 4.27: Oberflächenhydrophobität der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken; unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n \geq 5$

Das bedeutet, dass die Hitzebehandlung evtl. eine Auffaltung der Proteine und ein Freilegen hydrophober Gruppen verursacht hat. Somit können die Proteine besser mit Komponenten wechselwirken, die weniger polar sind als Wasser [Khan et al., 2011], was auch ihre höhere Emulsionsaktivität erklärt. Die Feststellung einer positiven Korrelation zwischen Oberflächenhydrophobität und dem EAI gelang bereits Kato & Nakai [1980]. Diese Ergebnisse passen auch zu denen der Löslichkeit (s. Kapitel 4.4.5) und DSC-Analysen (s. Kapitel 4.6.2), wobei die Proteinisolate der am stärksten erhitzten Proben die geringste Löslichkeit und eine gewisse Denaturierung aufwiesen. Eine positive Korrelation zwischen der sog. „aromatischen“ Hydrophobität (ANS bindet an aromatische Aminosäuren) sowie der Unlöslichkeit von Proteinen wiesen Hayakawa & Nakai [1985] nach. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte nur eine sehr schwache Korrelation der Parameter SH und Unlöslichkeit bei pH 4 bzw. dem EAI in NaCl festgestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson -0,419 bzw. 0,324). Dies bestätigt jedoch bereits, dass die Auswirkungen einer starken Wärmebehandlung der Lupinenflocken auf die Proteine nicht sehr groß waren.

Im Gegensatz dazu zeugt eine geringere Oberflächenhydrophobität von einer Aggregation der Proteine [Hojilla-Evangelista et al., 2004; Mohamed et al., 2005; Jiang et al., 2014], wobei die hydrophoben Regionen an der Oberfläche durch Denaturierungserscheinungen (Protein-Protein-Vernetzungen) nicht mehr zugänglich sind. Mohamed et al. [2005] ermittelten eine abnehmende Oberflächenhydrophobität mit zunehmender Wärmebehandlung von Lupinenproteinisolaten. Im Gegensatz zu den hier untersuchten Proben wurde von Mohamed et al. [2005] aber in Pufferlösungen suspendiertes Lupinenmehl direkt erhitzt und analysiert. Wie den Ergebnissen aus Kapitel 4.2 zu entnehmen ist, sind Proteine gegenüber feuchter Erhitzung empfindlicher als gegenüber trockener.

Im Bezug auf den Einfluss der Denaturierung auf die Funktionalität der Proteine kann die Studie von Raymundo et al. [1998a] ergänzt werden. Die Autoren erklären eine geringe Auffaltung der Proteine als förderlich für eine bessere Schaumbildung von Lupinenproteinisolaten, eine stärkere Denaturierung jedoch als ursächlich für den Abfall des Schaumvermögens.

Ismond et al. [1986b] korrelierten die Oberflächenhydrophobität mit dem mikroskopischen Erscheinungsbild der Proteinmicellen von Ackerbohnen und stellten einen Zusammenhang zwischen geringer Hydrophobität und kleineren Micellen her. Unter Beachtung dieser Tatsache bzw. der geringen Micellen-Stufe für die 140 °C-Proben (s. Kapitel 4.6.1) wäre eine Reduktion der Oberflächenhydrophobität mit zunehmender Wärmebehandlung zu erwarten gewesen.

Lampart-Szczapa et al. [2006] ermittelten für Proteine von *Lupinus angustifolius* Baron SH-Werte von ca. 813. Diese sind etwas höher als die des Micellenproteins. Die Autoren vermuten einen Einfluss der Protein-Lipid-Wechselwirkungen auf die Oberflächenhydrophobität. Das von ihnen untersuchte Lupinenmehl war ölhaltig, das Pulver des Micellenproteins jedoch entölt, was die geringeren SH-Werte erklären kann. Die Autoren postulieren weiterhin ebenfalls eine stärkere Oberflächenhydrophobität bei weniger denaturierten Proben und eine Korrelation mit den Emulgiereigenschaften. Auch für die hier untersuchten Micellenproteine konnte eine höhere Oberflächenhydrophobität bei den Proben mit höheren EAIs festgestellt werden.

Ein Vergleich mit anderen Leguminosen ergab eine geringere Oberflächenhydrophobität für Schwarze Bohnen ($SH = 170-270$) [Jiang et al., 2014], isoelektrisch gefällte Sojaproteinisolat (SH ≈ 200) [Sorgentini et al., 1995] und Linsenproteine (SH = 392, isoelektrische Fällung) [Joshi et al., 2012]. Hojilla-Evangelista et al. [2004] ermittelten für säuregefällte und durch Ultra-/Diafiltration gewonnene Sojaproteine Hydrophobitätswerte von 530 bzw. 844, sowie 302 bzw. 429 für die entsprechenden Lupinenproteinextrakte.

Zusammenfassend hatte die Entölung kaum einen Einfluss auf die technofunktionellen Eigenschaften der Proteinisolat, was bereits von Yoshie-Stark et al. [2004] und Bader et al. [2011] beschrieben wurde. Auch Stahl et al. [1984] ermittelten keinen signifikanten Einfluss der CO₂-Entölung im Vergleich zur Hexan-Entölung von Saaten auf deren Proteine und die Aminosäurezusammensetzung.

4.5 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Für Lupinenproteine sind diverse positive ernährungsphysiologische Eigenschaften beschrieben [Sirtori et al., 2004; Duranti et al., 2008; Bähr et al., 2013; Khan et al., 2015]. Die Saatgutbehandlung kann diese Eigenschaften potentiell negativ beeinflussen und somit ein ernährungsphysiologisch weniger wertvolles Protein hervorbringen. Ausgewählte ernährungsphysiologische Eigenschaften wurden deshalb untersucht.

4.5.1 Maillard-Produkte

Um nicht-enzymatische Bräunungsreaktionen als Ursache für die Farbänderung (s. Kapitel 4.3.2) der micellaren Proteinisolat auszuschließen, wurden ausgewählte Maillard-Produkte mittels Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach Säurehydrolyse bestimmt.

Tabelle 4.4: Furosin- und Lysingehalt sowie Lysinblockierung verschiedener Proteinisolat unterschiedlich behandelter Rohstoffe, n = 2

Ursprung des Isolats	Behandlung	$c_{Furosin}$ [mg/100g]	c_{Lysin} [g/100g]	Lysinblockierung [% Gesamtlysin]
geschälte Saat	unbehandelt	39 ± 5	3,19 ± 0,62	2
	20 min UVC	36 ± 5	2,83 ± 0,24	2
	60 min UVC	36 ± 4	2,86 ± 0,37	2
	Autoklavieren	40 ± 6	2,66 ± 0,34	2
vollfette Flocken	unbehandelt	28 ± 1	2,34 ± 0,22	2
	60 min UVC	34 ± 2	2,47 ± 0,23	2
	Autoklavieren	65 ± 3	2,46 ± 0,29	4
Hexan-entölte Flocken	unbehandelt	39 ± 1	2,45 ± 0,19	2
	60 min UVC	41 ± 1	2,49 ± 0,18	3
	120 min UVC	34 ± 4	2,45 ± 0,22	2
	Autoklavieren	56 ± 1	2,41 ± 0,23	4
	trockene Hitze (140 °C/55 min)	26 ± 1	2,38 ± 0,22	2

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinisolate aus unterschiedlich behandelten Rohstoffen dargestellt. Die ermittelten Furosin-Gehalte lagen im Bereich der von D'Agostina et al. [2006] analysierten. Die Autoren untersuchten isoelektrisch und durch Ultrafiltration hergestellte Proteinisolate. Die Lysin-Gehalte waren nur knapp halb so hoch wie in den Proteinisolaten von D'Agostina et al. [2006]. Die Autoren untersuchten ebenfalls die Lysinblockierung ihrer Isolate und berechneten einen Lysinverlust von nur 0,6-1,0 %.

Es ist ersichtlich, dass der Furosin Gehalt durch das Autoklavieren leicht anstieg. Dementsprechend größer war auch die jeweilige Lysinblockierung. Lupinenflocken schienen in Bezug auf die Bildung von Maillard-Produkten nach der Behandlung mit feuchter Hitze (Autoklavieren) empfindlicher zu sein als die geschälte Saat. Ursächlich war hier wahrscheinlich die durch die Flockierung vergrößerte Oberfläche der Flocken. Hier kann jedoch nur von einem Trend gesprochen werden.

Der Lysingehalt wurde durch die gewählten Behandlungen nicht beeinflusst. Die trockene Erhitzung schien keinen Einfluss auf Lysin- und Furosin Gehalt sowie auf die Lysinblockierung der entölte Lupinenflocken zu haben. Dies wurde für Lysin auch von Kadam et al. [1987] bei der trockenen Erhitzung (100 °C, 60 min) von Goabohnen festgestellt, wohingegen Yáñez et al. [1986] eine starke Reduktion des Lysingehaltes mit zunehmender Dauer (10-40 min) der Erhitzung (80-90 °C) von Lupinensaat registrierten. Beide Gruppen untersuchten jedoch hitzebehandeltes Mehl und kein Proteinisolat. D'Agostina et al. [2006] ermittelten den Furosin und Hydroxymethylfurfural-Gehalt von sprühgetrockneten Lupinenproteinisolaten. Dabei wurden bei Eintrittstemperaturen von 160 °C keine erhöhten Gehalte an Furosin festgestellt. Die Autoren stellten bereits in Lupinensamen und -flocken geringe Mengen an Furosin (9-12 mg/100 g Protein) und zwischen 44 mg/100 g und 70 mg/100 g Hydroxymethylfurfural fest. Als Ursache hierfür wird der relative hohe Gehalt an reduzierenden Zuckern im Lupinensamen vermutet. Folglich sind die in der Behandlung mit trockener Hitze genutzten Temperaturen evtl. nicht hoch genug, um nachweisbare Mengen an Maillard-Produkten zu induzieren.

4.5.2 Nachweis reduzierender Zucker

Sämtliche unbehandelte und behandelte Lupinenflocken (CO₂- und Hexan-entölt) sowie deren Proteinisolate (n = 1) wurden auf das Vorhandensein reduzierender Zucker (Fehling-Reaktion) getestet, um den Zusammenhang zur Maillard-Reaktion herzustellen. Alle Reaktionen verliefen negativ (blau-violette Färbung). Somit waren in den Flocken und Isolaten mit der angewandten Methode keine reduzierenden Zucker nachweisbar. Wie aus der Literatur [Duranti et al., 2008] zu entnehmen ist, liegt der Großteil der Zucker in Lupinensamen proteingebunden vor. Das hier erzielte Ergebnis bestätigt diese Tatsache auch für die hier untersuchte Lupinenspezies.

4.5.3 Nachweis von Glykoproteinen

Der Nachweis reduzierender Zucker mittels Fehling-Reaktion, und damit des Vorhandenseins von Glykoproteinen, gelang nach dem Abbau der Kohlenhydrate durch Säurehydrolyse. Die Reaktion verlief im Falle der Lupinenflocken positiv. Die Proteinisolate induzierten keinen Farbumschlag, die Reaktion war also negativ (n = 1), obwohl etwa die dreifache Menge an Proteinisolat im Vergleich zu den Flocken eingesetzt wurde.

Die drei letztgenannten Untersuchungen sollten eine Hilfe bei der Aufklärung der Ursache für die starke Braunfärbung der Proteinisolate aus trocken erhitzten Lupinenflocken sein. Die Abwesenheit von reduzierenden Zuckern bzw. deren Anwesenheit in nur sehr geringen Konzentrationen in den Proteinisolaten unterstreicht die Ergebnisse aus Kapitel 4.5.1. Sehr wahrscheinlich fand während der Wärmebehandlung der Flocken eine Maillard-Reaktion statt, jedoch werden die dabei entstehenden Produkte evtl. nicht mit extrahiert.

Die Farbgebung der Proteinisolate kann folglich eher auf Reaktionen der Polyphenole zurückzuführen sein, wobei die durch Polymerisation und Oxidation entstehenden Makromoleküle [Davidov-Pardo et al., 2011] durch die Extraktion herausgelöst und im Proteinisolat angereichert worden sein können.

4.5.4 Verdaubarkeit

Es ist bekannt, dass die Verarbeitung von Lebensmitteln die Verdaubarkeit von Proteinen beeinflussen kann [Takagi et al., 2003]. Beispielsweise wurde eine bessere Verdaubarkeit von Lupinenmehl nach der Wärmebehandlung [Rahma & Rao, 1984] sowie von Leguminosen nach verschiedenen Kochvorgängen [Rehman & Shah, 2005] festgestellt. Jedoch scheint die Veränderung der Verdaubarkeit von Leguminosenproteinen durch Wärmebehandlung (z. B. Kochen) zwischen den einzelnen Leguminosen zu differieren [Carbonaro et al., 2000].

Zur Ermittlung der Proteinverdaubarkeit der Proben wurden diese mit Pepsin und Pankreatin verdaut. Nach der Fällung unverdauten Proteins mit TCA wurde im Überstand der Proteingehalt bestimmt und auf die Menge in die Verdaulösung eingewogenen Proteins bezogen.

Der Proteinverdau lag durchschnittlich bei 97,6 %, wobei kein Einfluss der Entölungsmethode oder der Flockenvorbehandlung auf die Verdaubarkeit ermittelt werden konnte. Dieser Wert entspricht dem von Hudson [1979] angegebenen (ca. 95 %) beim *in-vitro*-Verdau von Lupinenprotein mit Pepsin und Trypsin, liegt jedoch etwa 10 % über dem von El-Adawy et al. [2001] ermittelten. Hsu et al. [1977] ermittelten für ein Sojaproteinisolat eine Verdaubarkeit von nur 88 %.

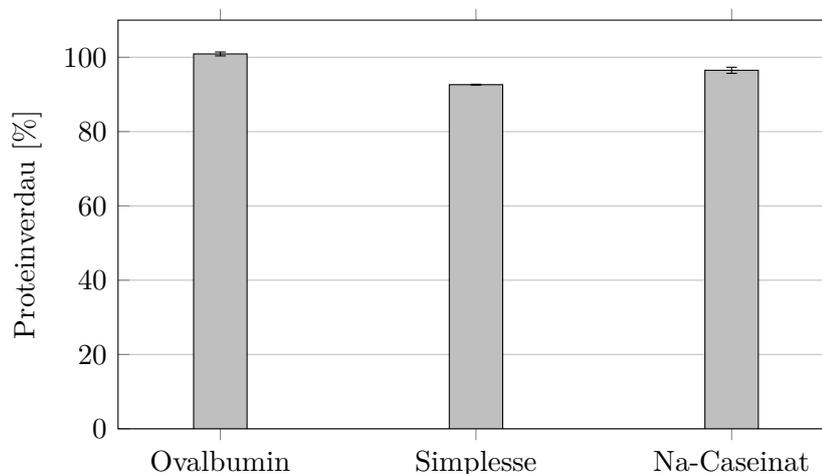


Abbildung 4.28: Verdaubarkeit der Standardsubstanzen, n = 3

Die getesteten Lupinenproteinisolate erwiesen sich mit den gewählten Versuchsbedingungen als ähnlich gut verdaubar wie Na-Caseinat und um 5% besser verdaubar als das Protein des Fettaustauschstoffes Simplese (Abbildung 4.28). Beim Verzehr durch den Menschen sollte jedoch von einer geringeren Verdaubarkeit ausgegangen werden, da für kommerzielle Enzyme (Pepsin und Pankreatin aus dem Schwein) *in-vitro* ein besserer Protein-Verdau nachgewiesen wurde als bei gleichen Enzymaktivitäten *in-vitro* für humane Verdauungssäfte [Eriksen et al., 2010].

Die durch die Wärmebehandlung der Lupinensamen unveränderte Verdaubarkeit ihrer Proteinisolate bestätigt zusätzlich das in Kapitel 4.5.1 beschriebene Nicht-Vorhandensein von Maillard-Produkten, da diesen eine Minderung der Verdaubarkeit nachgesagt wird [Hsu et al., 1977]. Wie bereits in Kapitel 2.1.4 beschrieben, lässt sich über die Bestimmung der *in-vitro*-Verdaubarkeit keine Aussage zur Allergenität der untersuchten Proteine treffen. Der Vergleich der Verdaubarkeit selbst ist nur mit Proteinen, deren Verdaubarkeit unter annähernd den gleichen Konditionen bestimmt wurde, möglich, da z. B. das Verhältnis von Verdauungsenzym zu untersuchtem Protein einen großen Einfluss auf das Ergebnis hat [Astwood et al., 1996; Fu et al., 2002].

4.5.5 Polyphenolgehalte

Phenolische Verbindungen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe zählen sowohl zu den antinutritiven Inhaltsstoffen als auch zu den natürlichen Antioxidantien und können somit gesundheitsfördernd wirken. In Lupinensamen auftretende Flavonoide sind Apigenin-Glykoside [Czubinski et al., 2014].

Die Gehalte an Polyphenolen, ausgedrückt als mg Gallussäureäquivalente pro 100 g Trockenmasse, wurden nach der Extraktion mit MeOH sowohl für die Proteinisolate als auch für die unbehandelten und entkeimten, verschieden entölten Lupinenflocken photometrisch (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz) ermittelt.

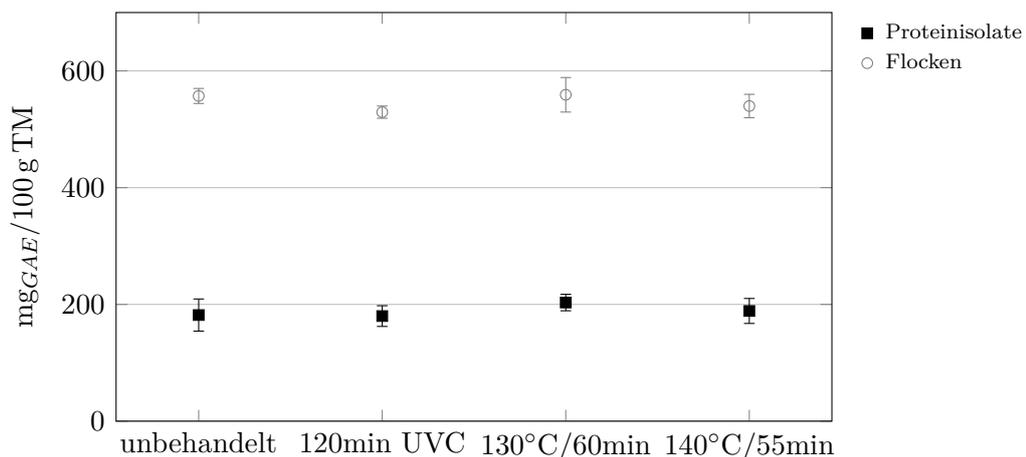


Abbildung 4.29: Polyphenolgehalte verschieden behandelter CO₂-entölter Lupinenflocken ($n \geq 3$) und derer Proteinisolate ($n \geq 5$)

Sowohl für die CO₂-entölten (Abbildung 4.29) als auch für die Hexan-entölten (Abbildung 4.30) Proben konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Giami et al. [2001] ermittelten nach der trockenen Erhitzung und dem Kochen

von Samen des Afrikanischen Brotfruchtbaumes eine deutliche Reduktion des Polyphenolgehaltes. Jedoch untersuchten die Autoren nicht die Proteinisolate der behandelten Samen.

Die Isolate aus CO₂-entölte Flocken enthielten im Durchschnitt 188 mg GAE/100 g TM und damit etwa 20 mg GAE weniger Polyphenole als die Isolate der Hexan-entölte Flocken. Da diese Beobachtung auf den Gehalt an Polyphenolen in den Flocken (ca. 546 mg GAE/100 g für CO₂-entölte Flocken; 541 mg GAE/100 g für Hexan-entölte Flocken) jedoch nicht zutrifft, kann hier von einer Schwankung innerhalb der Standardabweichung ausgegangen werden.

Für micellare Proteinisolate aus Soja, Raps, Erbse und Ackerbohne wurden 0,31 %, 0,81 %, 0,13 % und 0,23 % Polyphenole berichtet [Murray et al., 1985]. Für die jeweiligen isoelektrischen Isolate wurden geringfügig höhere Gehalte ermittelt.

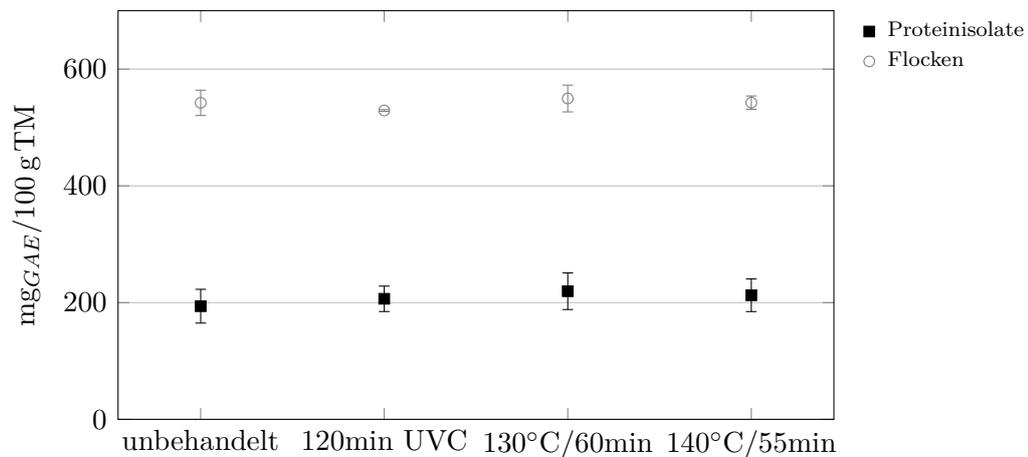


Abbildung 4.30: Polyphenolgehalte verschieden behandelter Hexan-entölte Lupinenflocken ($n \geq 2$) und derer Proteinisolate ($n \geq 5$)

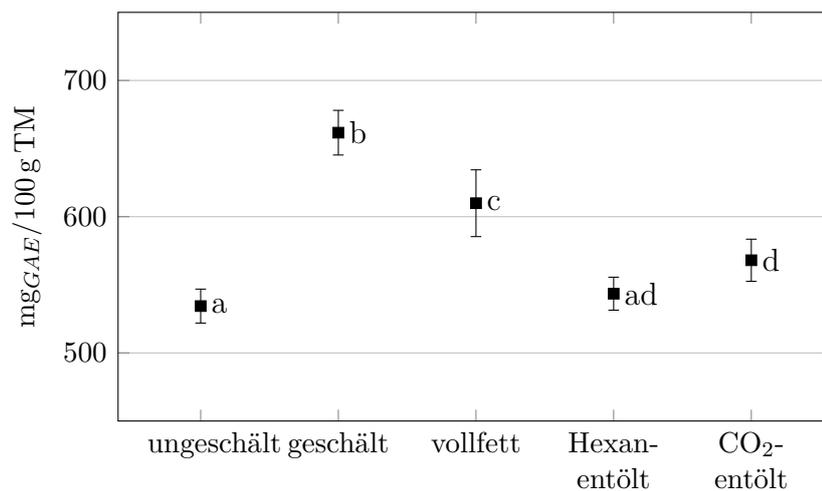


Abbildung 4.31: Polyphenolgehalte der Rohstoffe, *Lupinus angustifolius* Vitabor (ungeschält, geschält, vollfett, Hexan-entölt) und Boregine (CO₂-entölt); unterschiedliche Buchstaben gleicher Farbe bedeuten signifikant ($p < 0,05$) verschiedene Proben, $n = 5$

Ein anderes Bild ergab sich für die Rohstoffe, wie in Abbildung 4.31 dargestellt. Nach Abtrennung der Schale war ein signifikanter Anstieg an Polyphenolen in Bezug auf

die Trockenmasse zu verzeichnen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Großteil der Polyphenole in den Kotyledonen lokalisiert ist, was auch der Literatur [Lampart-Szczapa et al., 2003] zu entnehmen ist. Das Flockieren und anschließende Entölen führte zu einer deutlichen Reduktion des Polyphenolgehaltes. Eine Ursache dafür kann die Vergrößerung der Oberfläche der Lupinensamen und eine dadurch bedingte erleichterte Extraktion der Polyphenole sein.

Auch Siger et al. [2012] und Lampart-Szczapa et al. [2003] berichteten sehr geringe Werte für entöltes Lupinenmehl (Vitabor, ganze Saat: ca. 260 mg GAE/100g TM bzw. Wersal, geschält: ca. 33,6 mg/100 g). Lampart-Szczapa et al. [2003] nutzten jedoch den ethanolischen Extrakt und führten die Messung abweichend aus.

Mit $534,4 \text{ mg}_{GAE}/100 \text{ g TM}$ entsprach der Gehalt an Polyphenolen dem von Wang & Clements [2008] für ungeschälte Samen von *Lupinus angustifolius* ermittelten. Nach Feststellung der Autoren variiert der Polyphenolgehalt in Lupinensamen stark zwischen den verschiedenen Spezies und bei einigen Spezies sogar zwischen den Varietäten. Für die untersuchten Varietäten von *Lupinus angustifolius* wurde diese Divergenz nicht festgestellt [Wang & Clements, 2008], was die hier durchgeführten Untersuchungen von *Lupinus angustifolius* Vitabor und Boregine bekräftigen.

Mit dem ermittelten Polyphenolgehalt liegt *Lupinus angustifolius* im unteren Bereich im Vergleich zu anderen Lupinenspezies, jedoch ist eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Polyphenolen und der antioxidativen Wirkung der jeweiligen Pflanze nicht möglich [Wang & Clements, 2008]. Schlesier et al. [2002] beschreiben jedoch genau einen solchen Zusammenhang für Ascorbinsäure in Getränken, was die Aussage von Wang & Clements [2008] unterstreicht, die postulieren, dass die antioxidative Aktivität einer phenolischen Verbindung vom Mechanismus der antioxidativen Wirkung dieser, von der Molekülstruktur und von synergistischen Effekten mit anderen Verbindungen abhängt.

4.6 Proteincharakterisierung

Um die Auswirkungen der Saatgutbehandlung auf die Proteinzusammensetzung und die Micellenbildung zu ermitteln, wurden die Proteine lichtmikroskopisch sowie mittels DSC und SDS-PAGE analysiert.

4.6.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Micellen erfolgte in Doppelbestimmung, ausgehend von der Entkeimung der Lupinenflocken. Mit Hilfe des mikroskopischen Bildes sollten bspw. die sensorischen Ergebnisse erklärt werden können. Es wurden stets die frisch hergestellten, feuchten Proteinisolate untersucht, welche sehr vorsichtig 1:10 mit Wasser vermischt wurden, um jegliche mechanische Schädigung zu vermeiden. Somit wurden alle Proben exakt gleich behandelt und der Einfluss der Probenvorbereitung auf das mikroskopische Bild konnte ausgeschlossen bzw. konstant gehalten werden.

In den lichtmikroskopischen Bildern konnten deutliche Unterschiede in der Art der Proteinzusammenschlüsse bzw. der Micellenbildung festgestellt werden. Dass es sich bei den im Mikroskop erkennbaren kugelförmigen Gebilden tatsächlich um Proteine handelt, bestätigte eine Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (Abbildung 4.32).

Micellare Proteine wurden bereits von Ismond et al. [1991] bei der Proteinisolation aus Ackerbohnen, Hafer und Raps beschrieben. Für Proteinmicellen aus Ackerbohnen legten Ismond et al. [1986b] eine Art Rangordnung, die „Micellen-Reaktion“, fest, welche das mikroskopische Erscheinungsbild in verschiedene Kategorien teilt.

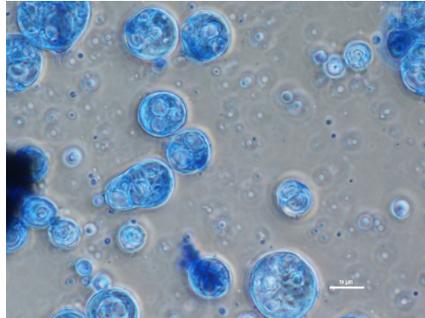


Abbildung 4.32: Lichtmikroskopische Darstellung des feuchten Proteinisolats unbehandelter Hexan-entölter Lupinenflocken, 1:10 suspendiert in Wasser, gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau

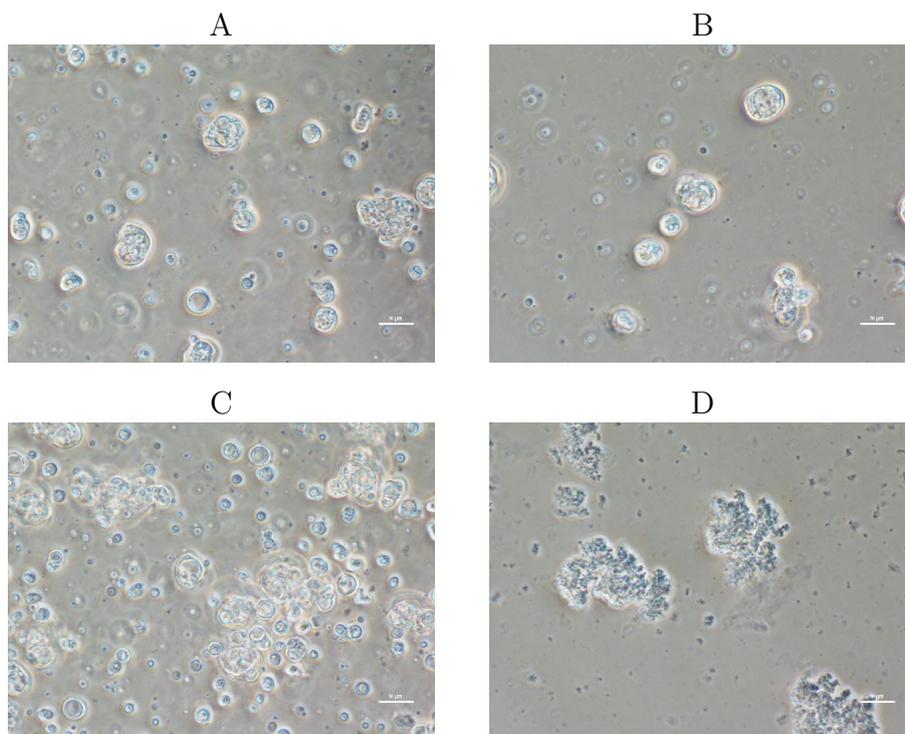


Abbildung 4.33: Lichtmikroskopische Darstellung der feuchten Proteinisolate unbehandelter (A), 120 min UVC-bestrahlter (B), 130°C/60min trocken erhitzter (C) und 140°C/55min trocken erhitzter (D) CO₂-entölter Lupinenflocken, 1:10 suspendiert in Wasser

Abbildung 4.33 zeigt die Aufnahmen der Proteinisolate aus verschiedenen behandelten CO₂-entölten Lupinenflocken. Es war deutlich erkennbar, dass die mikroskopische Struktur der unbehandelten und 120 min UVC-bestrahlten Proben nicht differierte, während mit zunehmender Wärmebehandlung eine Abnahme der Größe der Protein-

micellen zu verzeichnen war. Die Isolate aus bei 140 °C für 60 min mit trockener Hitze behandelten Lupinenflocken wiesen eher eine partikuläre Struktur auf.

Oft konnten auch große Agglomerate der Proteinmicellen erkannt werden (Abbildung 4.34), vor allem in den Proteinisolaten unbehandelter und UVC-bestrahlter Lupinenflocken (s. Abbildungen 4.33 A und B sowie 4.35 A und B). Die Bildung solcher Zusammenschlüsse konnte auch von Muranyi et al. [2013] beobachtet werden. Die Autoren beschreiben eine Micellengröße von 0,3-1,5 µm als die dominierende und energetisch bevorzugte Form. Die hier gezeigten Abbildungen lassen den Schluss zu größeren Micellen zu, jedoch unterscheiden sich die Vorgehensweise bei den mikroskopischen Aufnahmen, sowie die verwendeten Rohstoffe (vollfette bzw. entölte Lupinenflocken).

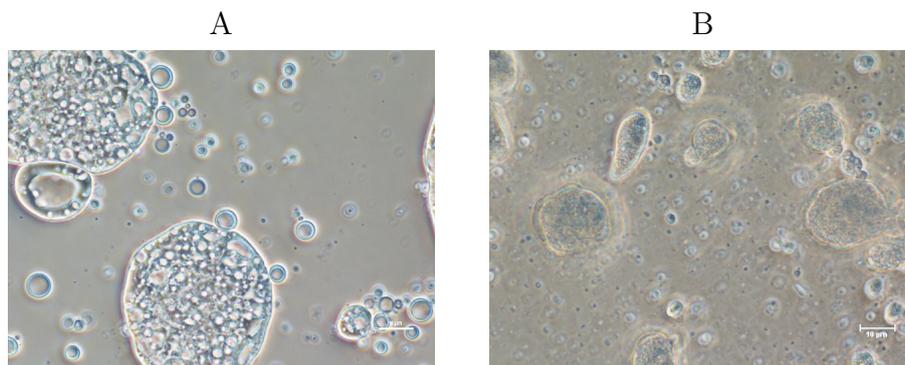


Abbildung 4.34: Lichtmikroskopische Darstellung großer Agglomerate der feuchten Proteinisolate unbehandelter (A) und trocken erhitzter (140°C/55min) (B) Hexan-entölte Lupinenflocken, 1:10 suspendiert in Wasser

Auch Ismond et al. [1991] wiesen größere dreidimensionale Strukturen nach. Die Ursache dafür wurde von den Autoren mit der größeren Komplexität der Proteinmicellen im Vergleich zu Detergenzien-Micellen erklärt. Erstere sind aufgrund ihrer Struktur nicht in der Lage die hydrophilen und hydrophoben Reste vollständig nach innen bzw. außen zu kehren, wodurch es zu Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinmicellen kommt.

Die resultierende Micellengröße sowie das Ausmaß der Zusammenschlüsse kann nach Ismond et al. [1991] durch die Konditionen während der Proteinextraktion bestimmt werden. Beispielsweise führt ein pH-Wert ab 7,0 und höher zur Ausbildung eines an der Oberfläche negativ geladenen Proteins und vermehrter elektrostatischer Abstoßung, wodurch die hydrophoben Wechselwirkungen unterdrückt und die Bildung von Micellen verhindert wird [Ismond et al., 1990]. Die hier vorliegenden Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Vorbehandlung des zur Extraktion genutzten Rohstoffes ebenso eine Rolle für die Micellengröße und das Ausmaß der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Micellen spielt.

Muranyi et al. [2013] stellen die Anwesenheit der Micellen als das wichtigste Kriterium für den fettähnlichen Charakter des Proteinisolats heraus. Diese Aussage kann in Bezug auf die Abbildungen 4.33 D und 4.35 D noch weiter präzisiert werden. Bei den Proteinisolaten aus auf 140 °C erhitzten Lupinenflocken waren optisch keine sphärischen Partikel mehr erkennbar, jedoch verhielt sich das Isolat auf den ersten Blick, widersprüchlich zur Aussage von Muranyi et al. [2013], noch immer fettähnlich. Ein Vergleich

zum Referenzisolat aus unbehandelten Lupinenflocken ergab jedoch eine deutliche Verminderung des cremigen bzw. fettartigen Mundgefühls (s. Kapitel 4.3.1), was die Rolle der sphärischen Proteine zur Ausbildung eines fettartigen Charakters bekräftigt.

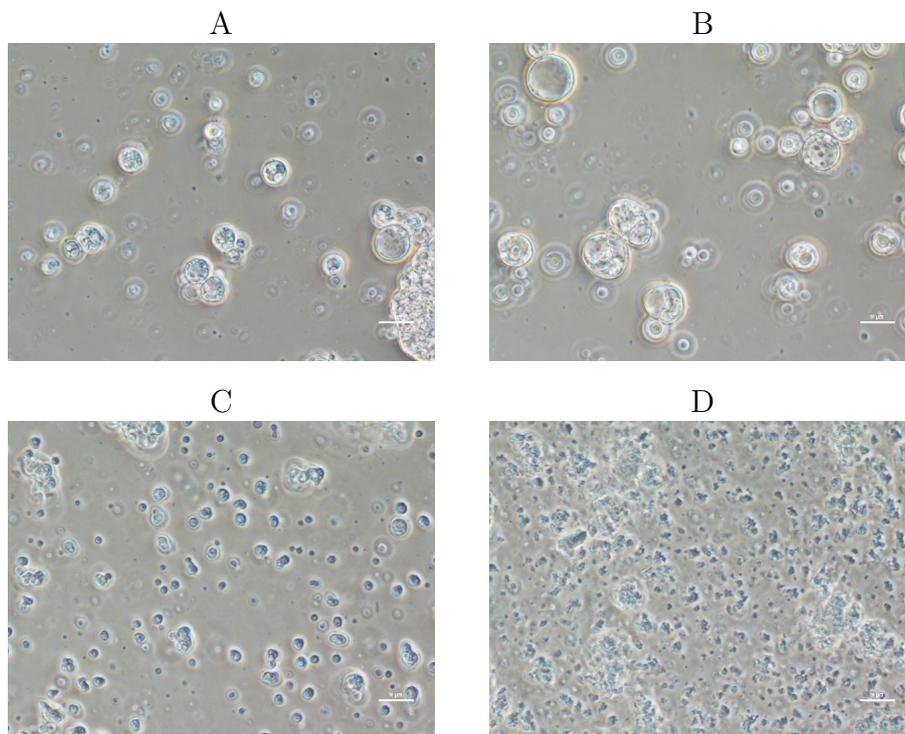


Abbildung 4.35: Lichtmikroskopische Darstellung der feuchten Proteinisolate unbehandelte (A), 120 min UVC-bestrahlter (B), 130°C/60min trocken erhitzter (C) und 140°C/55min trocken erhitzter (D) Hexan-entölter Lupinenflocken, 1:10 suspendiert in Wasser

Werden diese Bilder in das Micellen-Ranking von Ismond et al. [1986b] eingestuft (unterteilt in Stufe 1 bis 5), so entsprechen die Proteinisolate der unbehandelten und UVC-bestrahlten Lupinenflocken der von Ismond et al. [1986b] definierten Stufe 3. Diese entspricht kleinen, mittelgroßen und großen separaten Micellen (ca. 2 µm, 10 µm bzw. 20 µm im Durchmesser), wobei die größeren Micellen durch Koaleszenz der kleineren entstehen. Eine Wärmebehandlung der Lupinenflocken bei 130 °C für 60 min führte eher zu Micellen der Stufe 1 (kleine Micellen, ca. 2 µm im Durchmesser). Jedoch war auch hier, v. a. bei den Isolaten der CO₂-entölten Flocken, begrenzt koaleszentes Verhalten zu beobachten.

Die Aggregatbildung im Falle der unbehandelten Isolate (Abbildung 4.34A) wurde in Stufe 4 eingestuft (Micellen aller Größen, homogene Koaleszenz). Für die Isolate der bei 140 °C erhitzten Flocken kamen lediglich Stufe 1 (einzelne kleine Micellen < 2 µm im Durchmesser) bzw. keine Micellenbildung und für die Aggregate daraus (Abbildung 4.34B) Stufe 2 (kleine Micellen in Aggregaten, evtl. granuläre Netzwerke) in Frage.

Micellen werden meist nicht als statische Endpunkte betrachtet, sondern eher als miteinander wechselwirkende Strukturen, die untereinander assoziieren und damit Netzwerke und amorphe Gebilde formen [Ismond et al., 1986b]. Zur Assoziation waren die Micellen der 140 °C-Proben jedoch scheinbar weniger in der Lage. Es bleibt anzumer-

ken, dass Ismond et al. [1986b] die Fällung der Micellen direkt auf dem Objektträger unter mikroskopischer Beobachtung der Ausbildung der Micellen initiiert haben.

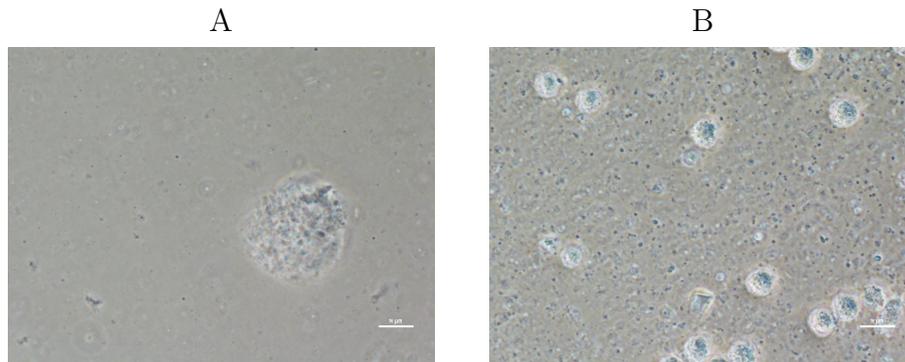


Abbildung 4.36: Lichtmikroskopische Darstellung von Casein- (A) und Simplesse-Pulver (B) 1:10 suspendiert in Wasser

Im Vergleich zu obigen Darstellungen zeigt Abbildung 4.36 lichtmikroskopische Aufnahmen von Casein sowie des Fettaustauschstoffes Simplesse. Auch hier waren sphärische Strukturen erkennbar. Simplesse, bestehend aus mikropartikulierten Molkenproteinen, wird aufgrund der Größe seiner Kügelchen ($< 10 \mu\text{m}$) als konventioneller Fettaustauschstoff eingesetzt. Die Micellen der untersuchten Lupinenproteinisolate waren ebenfalls nur wenige Mikrometer groß, was sie in die Lage versetzte an den Papillen der Zunge den Eindruck von Fett hervorzurufen. Technologisch ist zur Herstellung der micellaren Lupinenproteine jedoch keine Mikropartikulierung notwendig, worin ein bedeutender Vorteil gegenüber Simplesse zu sehen ist.

4.6.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

Durch die DSC-Analyse der Proteinisolate können Proteindenaturierungen oder andere strukturelle Veränderungen (bspw. Änderung der Zusammensetzung der Conglutine) durch die vor der Extraktion stattfindende Behandlung der Lupinenflocken sichtbar gemacht werden. Diese Modifikationen können mögliche Abweichungen der sensorischen, ernährungsphysiologischen und technofunktionellen Eigenschaften der micellaren Lupinenproteinisolate erklären.

Für die meisten Isolate konnten drei Peaks bei ca. 76°C , 92°C und 106°C ermittelt werden (s. Thermogramm in Abbildung 4.37). Laut Bader et al. [2011] entsprechen diese der Denaturierung der verschiedenen Proteinfractionen des micellaren Lupinenproteins: γ -Conglutin (ca. 69°C bei Lupinenflocken), β -Conglutin (ca. $80\text{--}85^\circ\text{C}$ bei isoelektrisch gefällten Proteinisolaten) und α -Conglutin (ca. $94\text{--}98^\circ\text{C}$ bei isoelektrisch gefällten Proteinisolaten).

Im Vergleich waren die hier ermittelten Denaturierungstemperaturen um $7\text{--}12^\circ\text{C}$ höher als bei den von Bader et al. [2011] vermessenen isoelektrischen Proteinisolaten und um $4\text{--}7^\circ\text{C}$ höher als von Bader et al. [2011] für die Lupinenflocken gemessen. Eine Ursache hierfür kann der NaCl-Gehalt der Messlösungen sein, der zu einer Stabilisierung der Quartärstruktur der Proteinmoleküle während der DSC-Messung führte [Hermansson, 1978; Kinsella, 1979; Ismond et al., 1986a; Sun & Arntfield, 2010]. Demnach können geladene Aminosäureseitenketten durch Chlorid-Ionen neutralisiert werden, wodurch sich

die Ketten weniger abstoßen (inter- und intramolekular) und elektrostatische Wechselwirkungen geschwächt werden [Kinsella, 1979; Sun & Arntfield, 2010]. Salz begünstigt die Protein-Protein-Wechselwirkungen und verzögert damit die zur Aggregation und Denaturierung notwendige Dissoziation der Moleküle [Hermansson, 1978]. Zusätzlich kann die Trennung der Peaks durch die Messung in Salzlösungen verbessert werden [Arntfield et al., 1986], was die Autoren mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der in der genannten Studie untersuchten Proteine Legumin und Vicilin auf die durch den NaCl-Zusatz reduzierte verfügbare Wassermenge zurückführen.

Da in der vorliegenden Arbeit alle Proben in der gleichen NaCl-Lösung hergestellt wurden, war die Vergleichbarkeit der Ergebnisse hier trotzdem gegeben.

Die Ursache für die höheren Denaturierungstemperaturen der isoelektrischen Lupinenproteinisolate von Bader et al. [2011] kann, laut Aussagen der Autoren, in einer geringeren Denaturierung der Proteine während der micellaren Extraktion im Vergleich zur isoelektrischen Methode begründet sein.

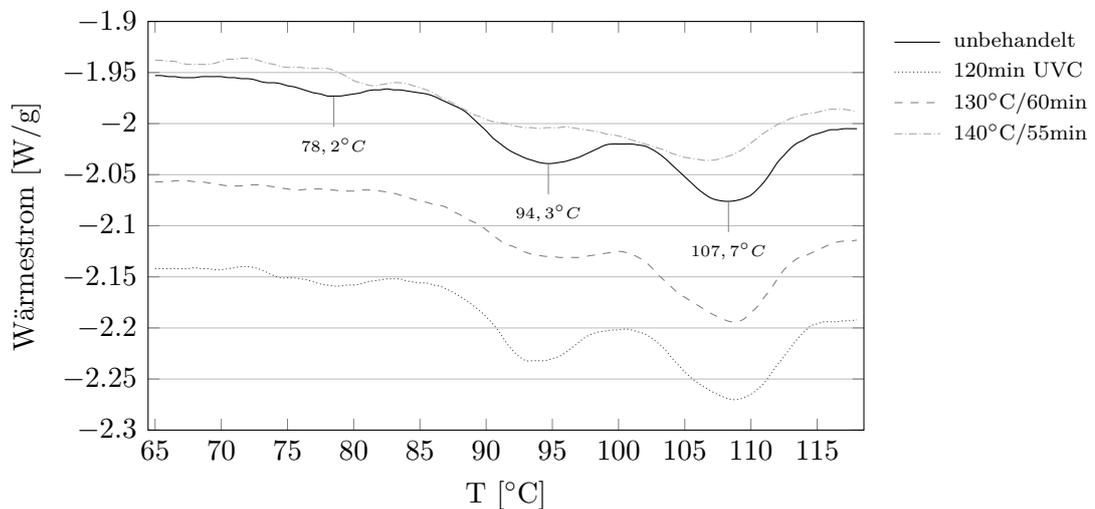


Abbildung 4.37: DSC-Thermogramme der Proteinisolate verschieden behandelte CO₂-entölte Lupinenflocken, beispielhafte Darstellung einer Einzelmessung

Tabelle 4.5: Denaturierungstemperaturen T_d der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken, $n = 1-2$

Flocken	Behandlung	T_{d1} [°C]	T_{d2} [°C]	T_{d3} [°C]
CO ₂ -entölt	unbehandelt	75,9 ± 3,3	91,8 ± 3,6	105,6 ± 3,0
	120 min UVC	78,3 ± 0,5	92,0 ± 1,7	106,1 ± 3,0
	130 °C / 60 min	74,9	92,1 ± 2,6	106,2 ± 3,3
	140 °C / 55 min	-	90,7 ± 4,1	103,3 ± 3,7
Hexan-entölt	unbehandelt	73,1	90,5	103,3
	120 min UVC	78,0	95,8	107,9
	130 °C / 60 min	77,1	96,5	108,1
	140 °C / 55 min	-	90,2	101,7

Die höhere thermische Stabilität des α -Conglutins gegenüber dem β -Conglutin wurde in der Literatur auch von andern Autoren bereits beschrieben [Sirtori et al., 2010], und

lässt sich durch die Tertiärstruktur der jeweiligen Proteine begründen: Die Untereinheiten des α -Conglutins sind über stabile kovalente Bindungen (v. a. SH-Brücken) miteinander verknüpft. Im Gegensatz dazu sind die Verknüpfungen im β -Conglutin schwache nicht-kovalente-Bindungen (Wasserstoff-Brücken-Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Anziehungskräfte). Um diese Bindungen zu brechen, genügt ein geringerer Energieeintrag.

Es ist deutlich zu erkennen (s. auch Tabelle 4.6), dass die Peakfläche (Denaturierungsenthalpie ΔH) des γ -Conglutins mit erhöhter Wärmebehandlung der Probe geringer wurde. Bei einer Wärmebehandlung der Lupinenflocken bei 140 °C (55 min) konnte im DSC-Thermogramm kein γ -Conglutin mehr nachgewiesen werden. Auch die β - und α -Conglutin-Fractionen unterlagen einer Denaturierung (Abnahme der Denaturierungstemperaturen und -enthalpien), die jedoch im Gegensatz zum γ -Conglutin nicht zu einer vollständigen Entfernung der Proteinfraction führte. Die UVC-Bestrahlung führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Denaturierungstemperaturen und -enthalpien, vor allem des γ -Conglutins. Eventuell kann es hier zu einer Renaturierung durch die Entölung reversibel denaturierter Proteine gekommen sein.

Während das α -Conglutin selbst bei einer Erhitzung der Flocken auf 130 °C (60 min) kaum verändert wurde, war nach einer 55-minütigen Behandlung bei 140 °C eine offensichtliche Denaturierung zu verzeichnen. Bei den stärker denaturierten Proben waren deutlich breitere Peaks zu erkennen. Cordero-de-los-Santos et al. [2005] beschrieben Thermogramme für Proteinisolate aus Amaranth und stellten mit zunehmender Denaturierung ebenfalls weniger klar definierte, breitere und unsymmetrischere Peaks fest.

Tabelle 4.6: Denaturierungsenthalpien ΔH der Proteinisolate verschieden behandelte Lupinenflocken, n = 1-2

Flocken	Behandlung	$\Delta H1$ [J/g]	$\Delta H2$ [J/g]	$\Delta H3$ [J/g]
CO ₂ -entölt	unbehandelt	0,49 ± 0,02	6,62 ± 0,87	7,64 ± 1,60
	120 min UVC	0,26 ± 0,16	6,92 ± 0,02	8,90 ± 0,31
	130 °C / 60 min	0,06	6,89 ± 0,47	10,15 ± 0,42
	140 °C / 55 min	-	4,23 ± 0,40	5,86 ± 3,53
Hexan-entölt	unbehandelt	0,25	6,05	10,31
	120 min UVC	0,41	6,20	10,25
	130 °C / 60 min	0,33	5,21	9,29
	140 °C / 55 min	-	5,53	8,13

Unterschiede zwischen den Denaturierungstemperaturen T_d (Tabelle 4.5) und -enthalpien ΔH (Tabelle 4.6) der Proteinisolate aus CO₂- und Hexan-entölte Flocken konnten im hier durchgeführten Untersuchungsausmaß kaum festgestellt werden. Lediglich die γ -Conglutin-Fraction der Proteinisolate aus CO₂-entölte Lupinenflocken wies bereits nach einer Behandlung von 130 °C (60 min) eine fast vollständige Denaturierung auf. Das in Abbildung 4.37 dargestellte Thermogramm ist eine beispielhafte Darstellung für Einzelmessungen. Aus Tabelle 4.5 können die Mittelwerte und Standardabweichungen der Doppelbestimmungen am Beispiel der Proteinisolate CO₂-entölte Flocken entnommen werden, woraufhin die Geringfügigkeit der Unterschiede zwischen den Entölungen offensichtlich wird. Bader et al. [2011] erhielten Standardabweichungen in ähnlichen Größen für die Denaturierungstemperaturen ihrer Proteinisolate.

4.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen konnten die einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt und saatgutbehandlungsinduzierte Veränderungen in der Proteinzusammensetzung sichtbar gemacht werden. Diese Abweichungen zur jeweiligen unbehandelten Probe wurden als Erklärungen für Veränderungen der funktionellen oder sensorischen Eigenschaften herangezogen.

Abbildung 4.38 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Proteinisolate unbehandelter und behandelter CO₂- und Hexan-entölter Lupinenflocken mittels kleiner SDS-Gele. Insgesamt konnten Banden mit Molekulargewichten zwischen 14 kDa und 108 kDa ermittelt werden. Sathe et al. [1982] untersuchten Proteine von Samen aus *Lupinus mutabilis* gelelektrophoretisch und erhielten Banden zwischen 20 kDa und 150 kDa.

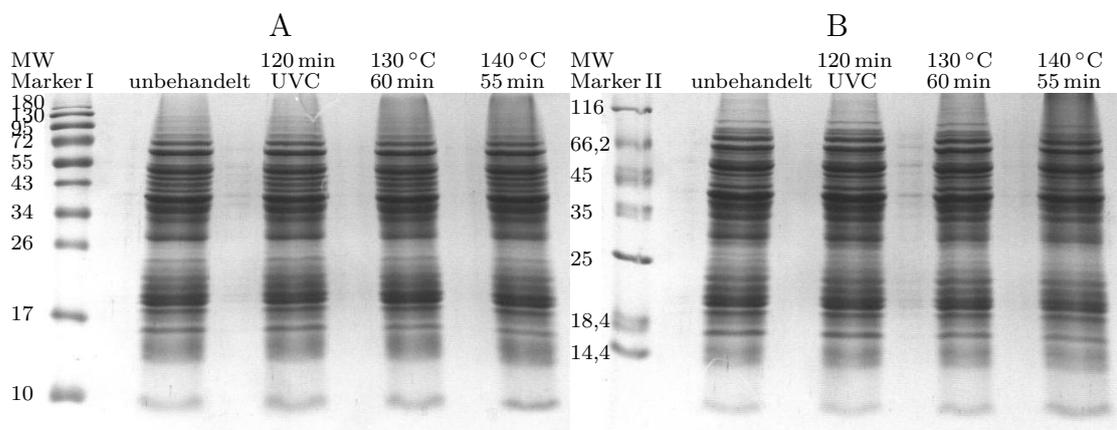


Abbildung 4.38: Bandenmuster nach SDS-PAGE (kleine Gele, Reduktion mit 2-Mercaptoethanol) der Proteinisolate verschieden behandelter Hexan- (A) und CO₂-entölte (B) Lupinenflocken

Aufgrund der unterschiedlichen Grade posttranslationaler Modifizierungen, v. a. Glykosylierungen, der Lupinenglobuline erschienen die Proteinbanden z. T. breit und unscharf. In der 2D-Darstellung wurden oft ganze Reihen und Cluster statt einzelner Spots beschrieben [Sirtori et al., 2010; Muranyi et al., 2016], welche Komponenten mit gleichem Molekulargewicht, jedoch unterschiedlichem isoelektrischen Punkt darstellten. Sirtori et al. [2010] bezeichneten sie als verschiedene Isoformen desselben Proteins mit unterschiedlichem Grad posttranslationaler Phosphorylierung und Glykosylierung.

Generell schien die Art der Entölung einen, wenn auch nur geringen, Einfluss auf die Proteinzusammensetzung und folglich auf das Bandenmuster der SDS-Gele zu haben. Bei den Proteinisolaten CO₂-entölte Flocken war bei etwa 95 kDa die erste stärkere Bande zu erkennen (s. auch Abbildung 4.39), gefolgt von zwei ähnlich starken bei etwa 83 kDa und 80 kDa (β -Conglutin). Im Falle der Proteinisolate Hexan-entölte Lupinenflocken erschienen hier sechs sehr schwache Banden im Bereich von ca. 107 kDa bis 83 kDa (β -Conglutin). Im Gegensatz dazu war die Bande bei ca. 42 kDa bei den Isolaten der Hexan-entölte Flocken stärker ausgeprägt. Das könnte auf eine quantitativ größere Menge an α - oder β -Conglutin im Isolat Hexan-entölte Flocken hindeuten.

Im Bereich großer molekularer Massen war bei den Isolaten beider Entölvungsvarianten nach der Behandlung mit trockener Hitze ein „Verschmieren“ bzw. eine allgemein dunklere Färbung dieses Bereichs zu erkennen. Bei den bei 140 °C behandelten Proben

war dies deutlicher als bei den bei 130 °C behandelten. Ebenso war die Färbung bei den Isolaten CO₂-entölter Flocken intensiver als bei denen der Hexan-entölten. Diese Beobachtung spricht für eine Polymerisierung der Proteine und Aggregatbildung durch eine Denaturierung infolge der Hitzebehandlung [Hojilla-Evangelista et al., 2004; Mohamed et al., 2005]. Dies sind vor allem Aggregate der β -Strukturen [Carbonaro et al., 2012]. Eine elektrophoretische Auftrennung dieser war durch die somit entstandene Molekülgröße nicht mehr möglich. Zwischen den Banden der Isolate unbehandelte und UVC-bestrahlte Flocken war kein Unterschied feststellbar.

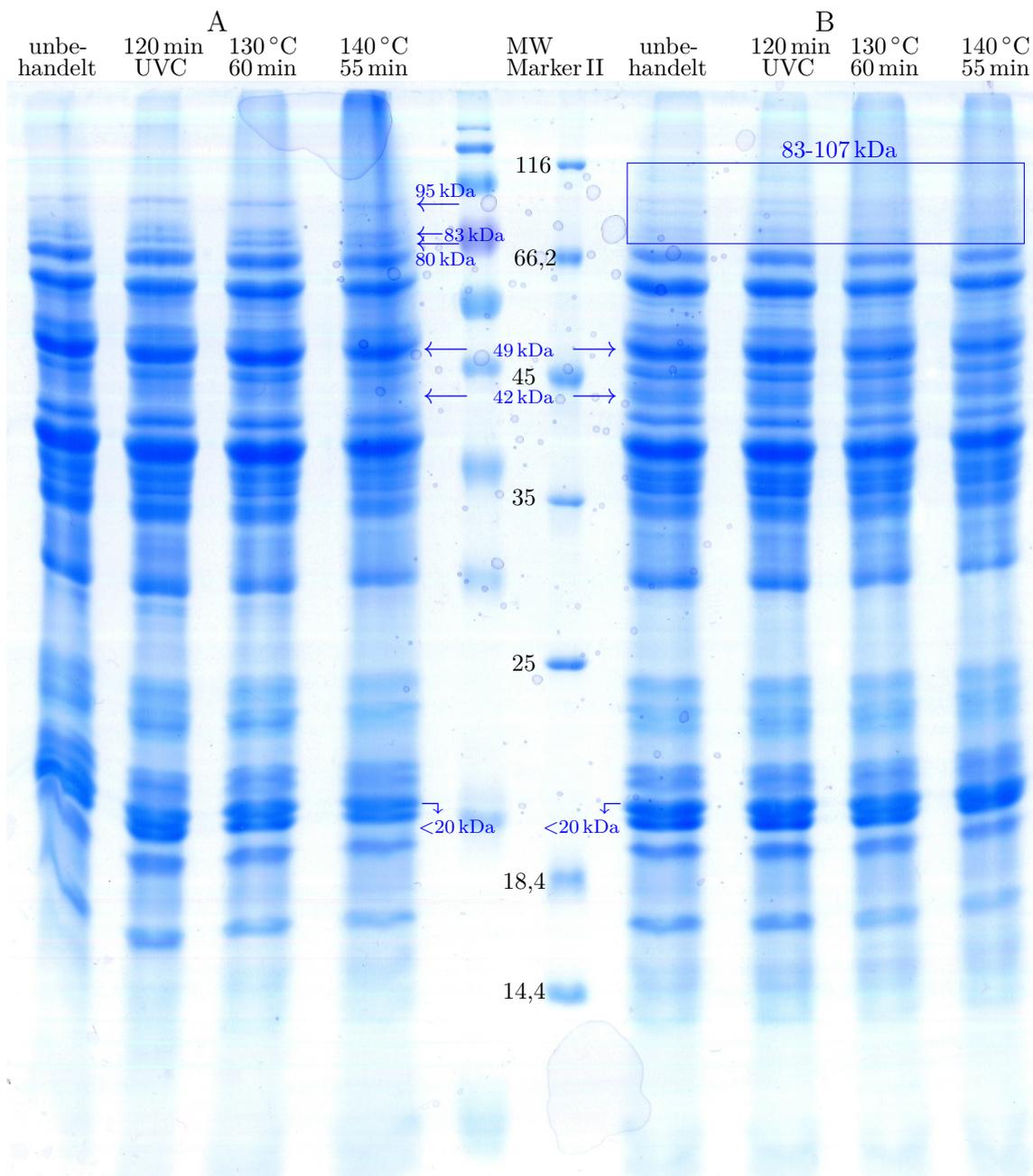


Abbildung 4.39: Bandenmuster nach SDS-PAGE (großes Gel, Reduktion mit 2-Mercaptoethanol) der Proteinisolate verschieden behandelte CO₂- (A) und Hexan-entölter (B) Lupinenflocken

Da die Banden sehr dicht aufeinander folgten, wurde eine bessere Auftrennung durch die Nutzung großer Gele als notwendig erachtet. Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb mittels 16x20 cm-Gele durchgeführt. Abbildung 4.39 zeigt deutlich besser aufgetrennte Banden. Es waren die gleichen Unterschiede zwischen beiden Entölungsvarianten, wie für Abbildung 4.38 beschrieben, feststellbar.

Das Bandenmuster der unbehandelten Proben stimmt mit den Ergebnisse von Tai & Bush [1997] für *Lupinus angustifolius* überein. Nach dieser Studie stellen die Banden unterhalb von 25 kDa überwiegend β -Conglutin dar. Lediglich im Bereich von ca. 24 kDa sind die Banden des Albumins (auch als δ -Conglutin bezeichnet) zu erkennen. Oberhalb von 25 kDa mischen sich α - (2 Hauptbereiche bei ca. 35 kDa und 50 kDa) und β -Conglutin, wobei der Anteil an β -Conglutin deutlich überwiegt, v. a. im höhermolekularen Bereich (> 35 kDa). Aktuellere Studien [Sirtori et al., 2010; Piornos et al., 2015; Muranyi et al., 2016] legen jedoch eine teilweise abweichende Verteilung der Conglutine dar: α -Conglutin ca. 17-70 kDa, β -Conglutin ca. 13-90 kDa. Die mengenmäßige Verteilung entspricht jedoch den Aussagen von Tai & Bush [1997].

Da γ -Conglutin in Wasser und Salzlösungen löslich ist [Duranti et al., 2008], kann davon ausgegangen werden, dass es bei der Isolation des Micellenproteins innerhalb des Waschschrittes zu einem gewissen Anteil aus dem Proteinisolat entfernt worden war und somit nur in geringem Maße im Endprodukt enthalten war. Es wurde jedoch von Muranyi et al. [2016] für das Micellenisolat nachgewiesen. Im Gegensatz dazu fanden die Autoren kaum γ -Conglutin im isoelektrisch gefällten Lupinenproteinisolat, da es bei der alkalischen Extraktion ungelöst in den Lupinenflocken verbleibt. Die Banden des γ -Conglutins waren bei ca. 45 kDa (schwache Banden des Monomers) sowie etwa 17 kDa und 28 kDa (starke Banden der Untereinheiten durch reduzierende SDS-PAGE) zu erwarten, überdeckten sich jedoch mit den anderen Conglutinen.

Die Monomere des β -Conglutins sind nicht kovalent über Disulfidbrücken verbunden, da von Duranti et al. [2008] keine Unterschiede in unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen hergestellten SDS-Gele festgestellt werden konnten. Von einer starken proteolytischen Spaltung bereits im trockenen Lupinensamen, die die vielen dem β -Conglutin zugehörigen Banden erklärt, kann jedoch ausgegangen werden [Duranti et al., 2008].

δ -Conglutin sollte sich im niedermolekularen Bereich (< 15 kDa) der SDS-Plots finden [Islam et al., 2012]. Muranyi et al. [2016] wiesen jedoch eine, aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit dieses Proteins, nur sehr geringe Konzentration im Micellenisolat nach.

Die genauere Betrachtung der einzelnen Bandenintensitäten ergab folgendes: Im Vergleich zur unbehandelten Probe wies die UVC-bestrahlte Probe der Hexan-entölte Lupinenflocken kaum Änderungen auf. Für die bei 130 °C behandelte Probe war eine mittlere Abnahme des „Raw Volume“ (ermittelt durch die Software anhand der Bandenintensitäten und -größen) um ca. 6 % zu verzeichnen, bei der 140 °C-Probe um ca. 18 %.

Den größten Einfluss auf diese mittlere Volumenabnahme (Abnahme > 30 %) hatten dabei die Bande bei ca. 49 kDa (Abnahme um 37 % bei 140 °C; vermutlich eher β -Conglutin, aufgrund der geringeren Thermostabilität als α -Conglutin) sowie die Banden

unterhalb von 20 kDa (Abnahmen zwischen 30 % und 51 % bei 140 °C bzw. 0,8 % und 37 % bei 130 °C; evtl. δ -Conglutin) (Abbildung 4.39). Die einzigen nicht einer Abnahme bei 140 °C unterliegenden Banden waren im Bereich von ca. 94-83 kDa (β -Conglutin), 56 kDa (α - und β -Conglutin) sowie 21-20 kDa (vermutlich basische Untereinheiten des α -Conglutins [Sirtori et al., 2010]) zu verzeichnen. Im Vergleich zu den DSC-Ergebnissen (s. Kapitel 4.6.2 und Tabelle 4.6) handelte es sich bei den hier mittels SDS-PAGE nachgewiesenen nicht-denaturierten Proteinen wahrscheinlich um die gleichen Fraktionen, v. a. α - und z. T. β -Conglutin.

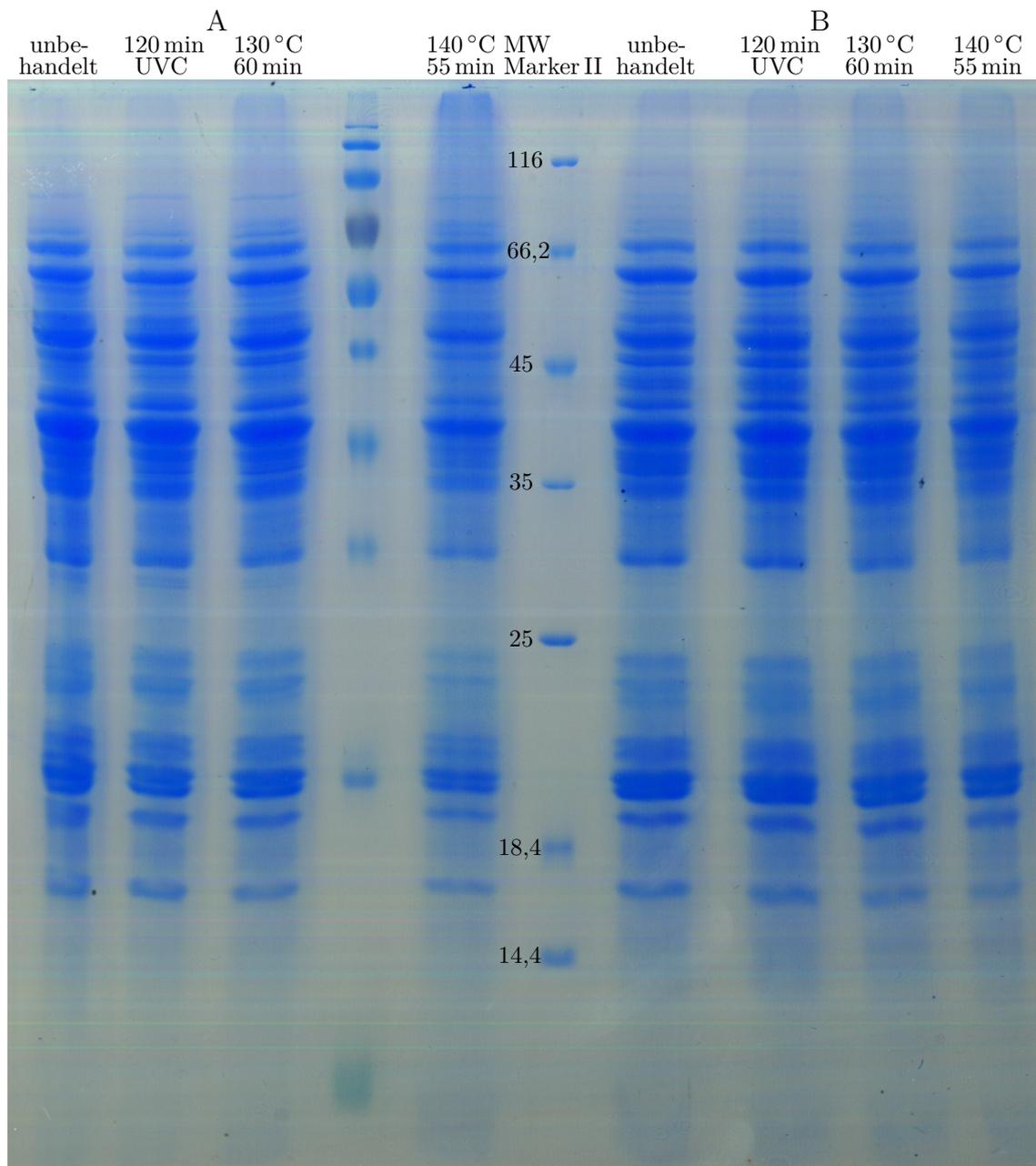


Abbildung 4.40: Bandenmuster nach SDS-PAGE der in 0,5molarer NaCl-Lösung löslichen Anteile der Proteinisolate verschieden behandelte CO₂- (A) und Hexan-entölter (B) Lupinenflocken

Die einer Abnahme unterliegenden Banden bei 49 kDa und <20 kDa könnten für die veränderten funktionellen Eigenschaften der wärmebehandelten im Vergleich zu den unbehandelten und UVC-bestrahlten Proben verantwortlich sein. Da es sich hier wahrscheinlich nur um kleinere Untereinheiten des β -Conglutins bzw. Minorbestandteile (δ -Conglutin) handelte, erklärt dies den nur geringen Einfluss der Wärmebehandlung der Lupinenflocken auf die Proteinfunktionalität. Diese Untereinheiten waren jedoch scheinbar verantwortlich für bspw. das bessere Gelbildungsvermögen und die bessere Löslichkeit der unbehandelten Proben, während aus ihrer Abwesenheit die erhöhte Emulgieraktivität sowie das verbesserte Wasserbindevermögen der unbehandelten Proben resultierte.

Die Proteinisolate der CO₂-entölte Flocken wiesen keine Volumenabnahme der Bandenintensität auf. Dies lässt sich eventuell durch die stärkere Hintergrundfärbung der Banden der wärmebehandelten Proben (CO₂-entölt) erklären.

In Abbildung 4.40 ist die Auftrennung der in 0,5M NaCl löslichen Proteinfractionen dargestellt. Es wurde deutlich, dass die Bandenintensitäten der bei 140 °C behandelten Proben geringer waren als die der anderen Proben. D. h., der Anteil löslicher Proteine sank durch die Erhitzung, was die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen (Kapitel 4.4.5) bestätigt.

Auch hier zeigte der Vergleich des „Raw Volume“ der einzelnen Banden der Isolate Hexan-entölte Flocken eine mittlere Abnahme der 140 °C-Probe von 24 % im Vergleich zur unbehandelten Probe. Ein Unterschied zwischen der unbehandelten und der UVC-bestrahlten bzw. der 130 °C-Probe wurde nicht festgestellt.

Anschließend wurden die in 0,5M NaCl-Lösung unlöslichen Bestandteile der Proteinisolate im Gel aufgetrennt. Abbildung 4.41 zeigt nun, wie erwartet, das Gegenteil von Abbildung 4.40, also eine Zunahme der Bandenintensität der wärmebehandelten Proben CO₂-entölte Lupinenflocken. Die mittlere Zunahme betrug bei der 130 °C-Probe 25 % und bei der 140 °C-Probe 34 % im Vergleich zur UVC-bestrahlten. Da die unbehandelte Probe am Rand des Geles etwas verzerrt wurde, musste die in den bisherigen Untersuchungen von der unbehandelten Probe nicht abweichende UVC-bestrahlte Probe an dieser Stelle als Referenz herangezogen werden. Die wärmebehandelten Proben der Hexan-entölte Lupinenflocken wiesen eine mittlere Abnahme der Bandenintensität von ca. 10 % im Vergleich zur unbehandelten auf.

Weiterhin ist deutlich erkennbar, dass der Bandenhintergrund wesentlich weniger gefärbt war als bei den bisher analysierten Proben, jedoch bei den wärmebehandelten Proben intensiver als bei den unbehandelten und UVC-bestrahlten. Der Anteil unlöslicher Proteine war in diesen Proben also höher. Auch in den Geltaschen befand sich noch ungelöstes, hochmolekulares Protein, vor allem bei den wärmebehandelten Proben. Diese Beobachtungen wurden auch von Mohamed et al. [2005] und Avanza & Añón [2007] gemacht.

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass die Behandlung mit UVC-Strahlung keinen und die trockene Erhitzung der Lupinenflocken mit steigender Temperatur einen geringen Effekt auf die Proteine im Samen ausübte. Auch Carbonaro et al. [2012] stellten für die trockene Erhitzung (120 °C, 30 min bis 48 h) nur geringfügige strukturelle Änderungen der Sekundärstruktur von Leguminosenproteinen fest. Die durch die Wärmebehandlung denaturierten Proteinfractionen sind wahrscheinlich hauptsächlich dem

β -Conglutin zuzuordnen, da es eine geringere Hitzestabilität als α - und δ -Conglutin besitzt [Sirtori et al., 2010].

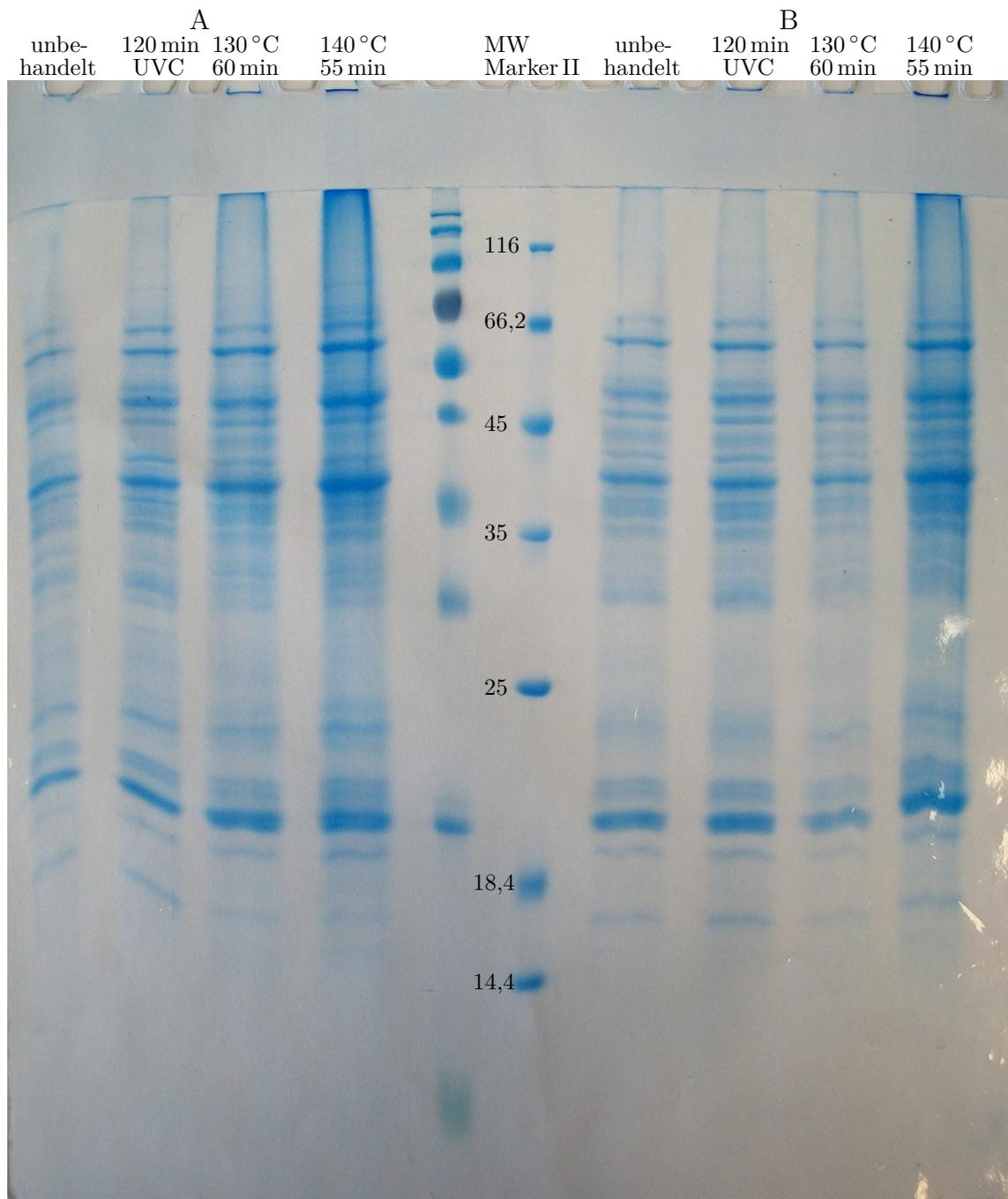


Abbildung 4.41: Bandenmuster nach SDS-PAGE der in 0,5molarer NaCl-Lösung unlöslichen Anteile der Proteinisolate verschieden behandelte CO₂- (A) und Hexan-entölter (B) Lupinenflocken

Álvarez-Álvarez et al. [2005] stellten durch die Behandlung ganzer Samen von *Lupinus albus* mittels Mikrowelle, Kochen in Wasser und Kochextrusion einen nur minimalen Einfluss auf die daraus extrahierten Proteine bzw. Allergene fest. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die allergenen Eigenschaften der Proteinisolate durch die hier

untersuchten Behandlungen nicht herabgesetzt wurden [Álvarez-Álvarez et al., 2005; Sirtori et al., 2010]. Die Bildung von sogenannten Neoallergenen durch Temperatur- und Druckbehandlungen wurde ebenfalls berichtet [Álvarez-Álvarez et al., 2005].

Guillamón et al. [2008] beschrieben die Hauptallergene der Lupine bei 20 kDa und 34,5 kDa. Die Autoren postulieren die Notwendigkeit sensorischer Analysen für Produkte aus verarbeiteten Proteinen, da eine sehr starke Behandlung (z. B. hohe Temperatur) notwendig ist, um die Allergene zu inaktivieren. Auffällige Reduktionen der Bandenintensität der hier behandelten Proben in diesen Bereichen konnten nicht festgestellt werden. Sensorische Veränderungen wurden aber bereits beschrieben (s. Kapitel 4.3), was die Aussagen von Guillamón et al. [2008] bestätigt.

5 Zusammenfassung

Im Kooperationsprojekt „Pflanzliche Fettaustauschstoffe aus sphärischen Proteinmizellen“ zwischen dem Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig und dem Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung in Freising wurde ein Lupinenproteinisolat entwickelt, welches sich aufgrund seiner fettähnlichen Eigenschaften als neuer proteinbasierter Fettaustauschstoff in Lebensmitteln eignet und sensorisch und ernährungsphysiologisch deutliche Vorteile gegenüber bisherigen Fettaustauschstoffen besitzt. Dies macht es vor allem für die Lebensmittelindustrie besonders interessant. Projektergebnisse wiesen jedoch auf eine geringe mikrobiologische Stabilität und eine hohe Belastung mit sporenbildenden Bakterien, z. T. *Bacillus cereus*, hin. Mit der vorliegenden Arbeit sollten geeignete Erhitzungsregime (UHT-Erhitzung des Extraktes, Pasteurisierung des Proteinisolats, Saatgutbehandlung zur Inaktivierung der Sporenbildner vor der Extraktion) für das micellare Proteinisolat ermittelt werden. Diese sollten die Lebensmittelsicherheit des Proteinisolats ohne eine Minderung der sensorischen und ernährungsphysiologischen Qualität sowie der Proteinausbeute und unter Erhalt oder Verbesserung lebensmitteltechnologischer relevanter Eigenschaften gewährleisten. Somit leistet diese Arbeit ebenfalls einen Beitrag auf dem Gebiet der Funktionalität micellarer Lupinenproteine, welches bisher noch wenig erforscht ist.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Untersuchungen zur Mikrobiologie und Ausbeute des Proteinisolats führten zur Festlegung geeigneter Stabilisierungsmethoden. Die UHT-Erhitzung des Extraktes vor der Proteinfällung erwies sich aufgrund der Denaturierung der Proteine als ungeeignet. Eine Pasteurisierung konnte bei 75 °C/5 min ohne Verlust der Cremigkeit durchgeführt werden und reduzierte die Ausgangskeimzahl des unbehandelten Proteinisolats von $1,9 \cdot 10^7$ KbE/g auf $6,8 \cdot 10^3$ KbE/g. Dies entsprach über 99 % der Mikroorganismen, jedoch verblieben im Proteinisolat $2,0 \cdot 10^3$ KbE/g sporenbildende Bakterien, die im Lebensmittel ein potentielles Risiko darstellen können.

Zur Inaktivierung der Sporenbildner wurden Methoden der Saatgutentkeimung getestet. Die Entkeimung entölter Lupinenflocken erwies sich aufgrund der nicht gegebenen Rekontaminationsmöglichkeit als zweckmäßiger als die Entkeimung ganzer bzw. geschälter Saat oder vollfetter Flocken. Zwei Entölungsvarianten (CO₂, Hexan) wurden verglichen. Die feuchte Erhitzung (Autoklavieren) führte zur bestmöglichen Entkeimung, denaturierte das Protein jedoch so weit, dass keine micellare Proteinextraktion mehr möglich war. Gleiches galt für die 60-minütige trockene Erhitzung bei 140 °C. Aus mehreren Versuchsreihen haben sich die UVC-Bestrahlung (120 min) sowie die trockene Erhitzung bei 140 °C (55 min) und 130 °C (60 min) als bevorzugte Varianten herausgestellt. Letztere reduzierte die Gesamtkeimzahl CO₂-entölter Lupinenflocken, unter Erhalt der Proteinausbeute, um 84 % und die der Hexan-entölten um 93 %. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten fast ausschließlich mit diesen drei Entkeimungsmethoden.

2) Die sensorischen Eigenschaften (Geschmack/Röstaroma, Mundgefühl/Cremigkeit, Beliebtheit, Farbe) der resultierenden Proteinisolate wurden betrachtet, um den Einsatz als Fettaustauschstoff zu beurteilen. Hierzu wurden die Isolate mittels Dreieckstests und Rangordnungsprüfungen von fünf Probanden verkostet ($n = 10$). Die Farbmessung erfolgte spektralphotometrisch. Die Wärmebehandlung führte nicht zur Ausbildung eines Röstaromas. Weniger erhitze Proben wurden als cremiger bewertet und meist bevorzugt, ebenso die Proteinisolate der Hexan- gegenüber der CO_2 -Entölung. Die Behandlung mit trockener Hitze führte mit steigender Temperatur zu einer deutlichen Braunfärbung der Proteinisolate, die bei den Isolaten der Hexan-entölten Proben stärker ausgeprägt war als bei denen der CO_2 -entölten. Ein eindeutig wahrnehmbarer Farbunterschied resultierte jedoch erst aus einer Behandlung bei 140°C . Für die UVC-Bestrahlung wurden kaum Veränderungen beobachtet.

3) Um das Ausmaß der Saatgutbehandlungen auf das Endprodukt „Proteinisolat“, welches letztendlich im Lebensmittel Anwendung finden soll, festzustellen, wurden die wichtigsten technofunktionellen Eigenschaften der micellaren Lupinenproteine untersucht und mit Referenzsubstanzen und Literaturangaben verglichen.

Das Wasserbindevermögen stieg mit zunehmender Wärmebehandlung signifikant, für Proteinisolate CO_2 -entölter Lupinenflocken stärker (0,9 g/g auf 1,1 g/g) als für die der Hexan-entölten (0,9 g/g auf 1,0 g/g). Die Ölbindung der Isolate Hexan-entölter Flocken war unwesentlich höher als die der CO_2 -entölten (1,1 g/g). Wasser- und Ölbindevermögen sind im Vergleich zu anderen Proteinen als gering einzustufen. Der marktgängige Fettaustauschstoff Simplese wies jedoch ähnlich niedrige Werte auf (1,0 g/g bzw. 0,6 g/g).

Die „Least Gelation Concentration“ (LGC) der micellaren Lupinenproteine belief sich auf 4%, was die Proteine zu sehr guten Gelbildnern macht. Eine geringe Zunahme der zur Gelbildung notwendigen Proteinkonzentration um 0,5% nach der Wärmebehandlung wurde für Proteinisolate Hexan-entölter Flocken ermittelt. Im Vergleich betrug die LGC für den kommerziellen Fettaustauschstoff Simplese 17%. Lupinenproteinisolate bilden weiche, elastische und opake Gele, welche sich für den Einsatz in proteinreichen Lebensmitteln mit geringer Viskosität und guter Dispergierbarkeit nach der Wärmebehandlung eignen.

Das Emulgiervermögen, ermittelt durch Trübungsmessung, wurde als gering eingeschätzt. Der Emulsionsaktivitätsindex von 16-31 m^2/g (signifikanter Anstieg nach 140°C -Behandlung) war vergleichbar mit dem von Simplese (26 m^2/g), erreichte aber nur etwa ein Drittel des Wertes für Lecithin (48 m^2/g). Proteinemulsionen spielen z. B. bei der Herstellung von Feinkostprodukten (Mayonnaise, Dressings) und Wurstwaren eine Rolle. In seiner geplanten Anwendung als Fettaustauschstoff stellen diese Produkte auch mögliche Einsatzgebiete dar. Hier ist evtl. die Zugabe einer besser emulgierenden Substanz notwendig.

Die Proteinlöslichkeit der Isolate wurde photometrisch (Bradford) bei pH 2-10 bestimmt. Die für die micellaren Proteine ermittelten Löslichkeitsprofile deckten sich mit den für Leguminosen und andere Pflanzenproteine typischen pH-Wert-abhängigen Verläufen. Die geringste Löslichkeit (ca. 10%) konnte bei pH 4 festgestellt werden (Bereich des isoelektrischen Punktes). Die Isolate CO_2 -entölter Lupinenflocken waren geringfügig besser löslich als die der Hexan-entölten. Mit zunehmender Wärmebehandlung der Flocken resultierte eine Abnahme der Löslichkeit der Isolate bei pH 4 und 6. Bei der

Anwendung in sauren Lebensmitteln (ca. pH 4) ist somit mit einem Ausflocken der Proteinisolate zu rechnen.

Die Schaumkapazität, ermittelt durch Messung des Schaumvolumens nach dem Aufschäumen, unterlag einer signifikanten Abnahme mit zunehmender Wärmebehandlung und war mit ca. 30 % typisch für Lupinenproteine und vergleichbar mit Simplese (27 %), im Vergleich zu anderen Proteinen (Na-Caseinat: 113 %, Ovalbumin: 202 %) jedoch sehr gering. Andererseits konnte die Schaumstabilität mit 54-65 % als sehr gut bewertet werden (vgl. Ovalbumin: 97 %), was bereits für Anwendungen in aufzuschäumenden Lebensmitteln (z. B. Mousse au Chocolat) von Vorteil war. Die Schaumkapazität der Isolate CO₂-entölter Lupinenflocken war etwa 10 % höher (37-51 %) als die der Hexan-entölten (29-37 %).

Die Oberflächenhydrophobität (SH) wird oft herangezogen, um andere funktionelle Eigenschaften besser einzuschätzen. Die Bestimmung erfolgte durch die Messung der Fluoreszenzintensität nach der Bindung von 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure an aromatische Aminosäuren. Im Vergleich zu Na-Caseinat (SH ca. 1400), Casein (SH ca. 2100) und Simplese (SH ca. 3100) war die SH der untersuchten Lupinenproteine sehr gering (SH: 500-600). Eine signifikant höhere SH wurde für die Isolate aus bei 140 °C behandelten CO₂-entölten Flocken ermittelt (SH = 635). Im Vergleich zum Fettaustauschstoff Simplese (SH = 3120) war dieser Anstieg jedoch nicht relevant.

4) Auch ernährungsphysiologische Aspekte spielen eine Rolle bei der Beurteilung von Pflanzenproteinen. Diese können ebenfalls durch Bestrahlung oder Hitze verändert werden. Die *in-vitro*-Verdaubarkeit (Pepsin/Pankreatin) konnte mit ca. 97,6 % als sehr hoch eingeschätzt werden und war ähnlich der von Na-Caseinat (97 %), jedoch um ca. 5 % besser als die des Fettaustauschstoffes Simplese.

Polyphenole zeigen in Lebensmitteln sowohl positive (potentielle Antioxidantien) als auch negative Auswirkungen (Adstringenz, Farbabweichungen). Keine der untersuchten Saatgutentkeimungen hatte einen Einfluss auf den Polyphenolgehalt der Proteinisolate (mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz photometrisch bestimmt nach Extraktion). Die Isolate der CO₂-entölten Flocken enthielten ca. 20 mg_{GAE}/100g TM weniger Polyphenole als die der Hexan-entölten (ca. 208 mg_{GAE}/100g TM). Verglichen mit den Rohstoffen war der Polyphenolgehalt der Isolate sehr gering. Der höchste Polyphenolgehalt wurde in der geschälten Saat nachgewiesen (662 mg_{GAE}/100g TM), etwa 130 mg_{GAE}/100g TM mehr als in der ungeschälten Saat. Die Polyphenole von *Lupinus angustifolius* befinden sich somit überwiegend in den Kotyledonen. Das Flockieren und Entölen reduzierte den Gehalt der Polyphenole um jeweils ca. 50 mg_{GAE}/100g TM.

Die beschriebene Bräunung der Proteinisolate konnte nicht auf die Maillard-Reaktion zurückgeführt werden, da der Furosin- und Lysingehalt (Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach Säurehydrolyse) keiner Veränderung unterlag und auch keine reduzierenden Zucker in den Proteinisolaten nachweisbar waren. Vielmehr könnte die Farbgebung auf Oxidationen und Polymerisationsreaktionen der Polyphenole zurückgeführt werden.

5) Analysen zur Charakterisierung der Proteine sowie zur Ermittlung des Ausmaßes einer evtl. stattgefundenen Denaturierung wurden angeschlossen, um die Veränderungen der funktionellen und sensorischen Eigenschaften zu erklären.

Durch mikroskopische Aufnahmen konnte das Vorliegen von Proteinmicellen bestätigt werden. Es handelte sich um kugelförmige Gebilde, die durch Koaleszenz grö-

ßere Aggregate bilden können. Eine zunehmende Wärmebehandlung verminderte die Ausbildung dieser Aggregate und der Micellengröße (ca. $2\ \mu\text{m}$ statt vorher $\geq 20\ \mu\text{m}$). Die reduzierte Micellengröße und das eher partikuläre Erscheinungsbild können Erklärungen für die in der sensorischen Beurteilung festgestellte geringere Cremigkeit der Proteinisolate stark erhitzter Lupinenflocken sein. Die Analyse der Proteine mittels Gelelektrophorese zeigte ebenfalls nur geringe Veränderungen der Proteinbanden v. a. bei den $140\ \text{°C}$ -Proben. Eine erhöhte Tendenz zur Polymerisation der Proteine nach starker Wärmebehandlung wurde beobachtet. Weiterhin wurde die vollständige Denaturierung des γ -Conglutins (T_d ca. $75\ \text{°C}$) in den $140\ \text{°C}$ -Proben mittels DSC-Analyse festgestellt. Verminderte Denaturierungsenthalpien des α - (T_d ca. $106\ \text{°C}$) und β -Conglutins (T_d ca. $92\ \text{°C}$) wurden ebenfalls ermittelt. Diese Modifikationen in der Proteinzusammensetzung können ausschlaggebend für die o. g. sensorischen, technofunktionellen und mikroskopischen Veränderungen sein.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die hier durchgeführten Saatgutentkeimungsmethoden nur geringe Effekte auf die Proteinisolate ausübten. Die analysierten ernährungsphysiologischen Eigenschaften unterlagen keiner durch die Entkeimung induzierten Modifikation. Im Hinblick auf die technofunktionellen Eigenschaften sowie den Entkeimungserfolg ist die Behandlung bei $130\ \text{°C}$ für 60 min allen anderen Methoden vorzuziehen. Die UVC-Bestrahlung führte zwar kaum zu Abweichungen vom unbehandelten Proteinisolat, jedoch konnte die Keimzahl nach der Behandlung nicht toleriert werden. Neben der Betrachtung der mikrobiologischen Sicherheit können somit die erwünschte Funktionalität des Proteinisolats bzw. dessen ernährungsphysiologische Eigenschaften richtungsweisend für die Wahl der Saatgutentkeimungsmethode sein. Die Entölung hatte kaum einen Einfluss auf die technofunktionellen Eigenschaften der Proteinisolate. Vermutlich wird das micellare Lupinenprotein jedoch nicht universell einsetzbar sein, da es nicht in jeder Hinsicht optimal reagiert (Mundgefühl gegenüber Technofunktionalität).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine physikalische Methode der Saatgutentkeimung etabliert werden ($130\ \text{°C}/60\ \text{min}$), welche die mikrobielle Stabilisierung des lupinenproteinbasierten Fettaustauschstoffes sicherstellt. Im Rahmen der durchgeführten Analysen wurde die sensorische Qualität nur minimal, die ernährungsphysiologische jedoch nicht beeinflusst. Starke Veränderungen der technofunktionellen Eigenschaften konnten sowohl im positiven als auch im negativen Sinne nicht beschrieben werden. Die Anwendung als Fettaustauschstoff in Lebensmitteln würde somit nicht beeinträchtigt. Der Einfluss der Saatgutbehandlung auf das Protein war wesentlich geringer als eine direkte thermische Behandlung des Proteinisolats. Im Hinblick auf den Gesamtprozess sollte eine Pasteurisierung der feuchten Proteinisolate im nicht-proteinschädigenden Temperaturbereich ($75\ \text{°C}/5\ \text{min}$) dennoch durchgeführt werden, um während des Prozesses eingetragene Mikroorganismen zu inaktivieren.

Anhang

Tabelle A.1: Trockenmassen und Proteingehalte der verschiedenen Proteinisolate unterschiedlich behandelter CO₂- („EC“) und Hexan- („EH“) -entölter Lupinenflocken

EC-Isolate	TM [%]	PG [%]	EH-Isolate	TM [%]	PG [%]
unbehandelt I	96,28	96,04	unbehandelt I	95,18	94,72
unbehandelt II	94,06	92,76	unbehandelt II	92,75	92,92
unbehandelt III	96,85	95,42	unbehandelt III	96,40	97,60
unbehandelt IV	96,48	96,26	unbehandelt IV	96,08	95,79
unbehandelt V	96,88	95,70	unbehandelt V	95,96	96,10
			unbehandelt VI	93,42	96,51
120 min UVC I	92,45	91,55	120 min UVC I	92,56	91,56
120 min UVC II	90,86	89,88	120 min UVC II	91,61	91,71
120 min UVC III	97,55	96,47	120 min UVC III	96,43	96,02
120 min UVC IV	97,10	95,97	120 min UVC IV	97,20	97,06
120 min UVC V	96,97	95,90	120 min UVC V	96,50	95,91
120 min UVC VI	95,65	95,19			
130 °C / 60 min I	93,98	92,47	130 °C / 60 min I	90,08	90,17
130 °C / 60 min II	94,78	92,70	130 °C / 60 min II	92,28	91,80
130 °C / 60 min III	97,69	97,04	130 °C / 60 min III	96,50	96,14
130 °C / 60 min IV	98,00	96,71	130 °C / 60 min IV	96,27	96,11
130 °C / 60 min V	97,29	95,63	130 °C / 60 min V	95,18	95,92
130 °C / 60 min VI	96,60	95,08			
130 °C / 60 min VII	97,09	96,62			
130 °C / 60 min VIII	96,98	95,10			
130 °C / 60 min IX	96,67	94,57			
140 °C / 55 min I	88,77	88,55	140 °C / 55 min I	92,03	91,73
140 °C / 55 min II	92,00	88,38	140 °C / 55 min II	92,06	91,19
140 °C / 55 min III	95,85	94,97	140 °C / 55 min III	95,19	95,33
140 °C / 55 min IV	95,92	95,34	140 °C / 55 min IV	96,12	95,55
140 °C / 55 min V	96,31	96,35	140 °C / 55 min V	95,81	95,68
140 °C / 55 min VI	96,06	94,97			
140 °C / 55 min VII	95,66	95,17			

Literaturverzeichnis

- Akoh, C. C.: Fat Replacers. *Food Technology*, 52, 47–53, 1998.
- Álvarez-Álvarez, J., Guillamón, E., Crespo, J. F., Cuadrado, C., Burbano, C., Rodríguez, J., Fernández, C. & Muzquiz, M.: Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1294–1298, 2005.
- Arntfield, S. D., Ismond, M. A. H. & Murray, E. D.: The fate of antinutritional factors during the preparation of a fababean protein isolate using a micellization technique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18, 137–143, 1985.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D. & Ismond, M. A. H.: Effect of salt on the thermal stability of storage proteins from fababean (*Vicia faba*). *Journal of Food Science*, 51, 371–377, 1986.
- Astwood, J. D., Leach, J. N. & Fuchs, R. L.: Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 14, 1269–1273, 1996.
- Avanza, M. & Añón, M. C.: Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 616–623, 2007.
- Bader, S., Oviedo, J. P., Pickardt, C. & Eisner, P.: Influence of different organic solvents on the functional and sensory properties of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1396–1404, 2011.
- Bähr, M., Fechner, A., Hasenkopf, K., Mittermaier, S. & Jahreis, G.: Chemical composition of dehulled seeds of selected lupin cultivars in comparison to pea and soya bean. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 587–590, 2014.
- Bähr, M., Fechner, A., Kiehntopf, M. & Jahreis, G.: Consuming a mixed diet enriched with lupin protein beneficially affects plasma lipids in hypercholesterolemic subjects: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 34, 7–14, 2015.
- Bähr, M., Fechner, A., Krämer, J., Kiehntopf, M. & Jahreis, G.: Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL cholesterol ratio in hypercholesterolemic adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossover study. *Nutrition Journal*, 12, 1–10, 2013.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, 6. Auflage, 2008.
- Benjamin, O., Silcock, P., Beauchamp, J., Buettner, A. & Everett, D. W.: Emulsifying properties of legume proteins compared to β -lactoglobulin and tween 20 and the volatile release from oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science*, 79, E2014–E2022, 2014.

- Berghout, J. A. M., Boom, R. M. & van der Goot, A. J.: Understanding the differences in gelling properties between lupin protein isolate and soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*, *43*, 465–472, 2015a.
- Berghout, J. A. M., Pelgrom, P. J. M., Schutyser, M. A. I., Boom, R. M. & van der Goot, A. J.: Sustainability assessment of oilseed fractionation processes: A case study on lupin seeds. *Journal of Food Engineering*, *150*, 117–124, 2015b.
- Beyer, H., Schmalenberg, A. K., Jansen, G., Jürgens, H. U., Uptmoor, R., Broer, I., Huckauf, J., Dietrich, R., Michel, V., Zenk, A. & Ordon, F.: Evaluation of variability, heritability and environmental stability of seed quality and yield parameters of *L. angustifolius*. *Field Crops Research*, *174*, 40–47, 2015.
- BFR: Allergie durch Lupineneiweiß in Lebensmitteln. 2005. Gesundheitliche Bewertung Nr. 006/2006.
- Bigelow, C. C.: On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *Journal of Theoretical Biology*, *16*, 187–211, 1967.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Robinson, R. K.: Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 637–645, 2000.
- BMELV: Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 1. Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen, Max-Rubner-Institut Karlsruhe, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, 2008.
- Bodart, M., de Peñaranda, R., Deneyer, A. & Flamant, G.: Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, *43*, 2046–2058, 2008.
- Bora, P. S., Brekke, C. J. & Powers, J. R.: Heat induced gelation of pea (*Pisum sativum*) mixed globulins, vicilin and legumin. *Journal of Food Science*, *59*, 594–596, 1994.
- Carbonaro, M., Grant, G., Cappelloni, M. & Pusztai, A.: Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 742–749, 2000.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P. & Nucara, A.: Application of fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, *108*, 361–368, 2008.
- Carbonaro, M., Maselli, P. & Nucara, A.: Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, *43*, 911–921, 2012.
- Cerny, G.: Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen vom pH-Wert der Medien - II. Bakterien und Bakteriensporen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *170*, 180–186, 1980.

- Chaudhuri, T. K., Das, K. P. & Sinha, N. K.: Surface hydrophobicity of a low molecular weight basic trypsin subtilisin inhibitor from marine turtle eggwhite. *Journal of Biochemistry*, 113, 729–733, 1993.
- Cordero-de-los-Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A. & Paredes-López, O.: Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*, 11, 269–280, 2005.
- Czubinski, J., Barciszewski, J., Gilski, M., Szpotkowski, K., Debski, J., Lampart-Szczapa, E. & Jaskolski, M.: Structure of γ -conglutin: insight into the quaternary structure of 7S basic globulins from legumes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 224–238, 2015.
- Czubinski, J., Dwiecki, K., Siger, A., Neunert, G. & Lampart-Szczapa, E.: Characterisation of different digestion susceptibility of lupin seed globulins. *Food Chemistry*, 143, 418–426, 2014.
- D'Agostina, A., Antonioni, C., Resta, D., Arnoldi, A., Bez, J., Knauf, U. & Wäsche, A.: Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 92–98, 2006.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. & Marín-Arroyo, M. R.: Stability of polyphenolic extracts from grape seeds after thermal treatments. *European Food Research and Technology*, 232, 211–220, 2011.
- Dehne, L. I., Pfister, M. & Bögl, K. W.: Neuere physikalische Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln - Prinzip und Anwendungen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 43, 33–40, 2000.
- Dench, J. E., Rivas, R. & Caygill, J. C.: Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 557–564, 1981.
- DGE: *Ernährungsbericht 2012*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., erste Auflage, 2012. ISBN 978-3-88749-232-8.
- DIN EN ISO 4120: Sensorische Analyse - Prüfverfahren - Dreiecksprüfung (ISO 4120:2004); Deutsche Fassung EN ISO 4120:2007. 2007.
- DIN ISO 8587: Sensorische Analyse - Prüfverfahren - Rangordnungsprüfung (ISO 8587:2006). 2010.
- Doxastakis, G.: Lupin seed proteins. Doxastakis, G. & Kiosseoglou, V. (Hg.) *Developments in Food Science*, Elsevier, 41, 7–38. 2000.
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F. & Scarafoni, A.: The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 624–633, 2008.

- Duranti, M. & Gius, C.: Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53, 31–45, 1997.
- Duranti, M., Restani, P., Poniatowska, M. & Cerletti, P.: The seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, 20, 2071–2075, 1981.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J. & Hurst, R. M.: Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 197–219, 1995.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A. & Gafar, A. F.: Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, 74, 455–462, 2001.
- Erdoğdu, S. B. & Ekiz, H. İ.: Effect of ultraviolet and far infrared radiation on microbial decontamination and quality of cumin seeds. *Journal of Food Science*, 76, M284–M292, 2011.
- Eriksen, E. K., Holm, H., Jensen, E., Aaboe, R., Devold, T. G., Jacobsen, M. & Ve-garud, G. E.: Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, 104, 374–381, 2010.
- FAO: <http://faostat3.fao.org/download/q/qc/e>. 29.03.2016.
- Fine, F. & Gervais, P.: Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67, 787–792, 2004.
- Franke, K.: Neue Konservierungsmethoden. Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt, Oldenburg, 2000.
- Fu, T.-J., Abbott, U. R. & Hatzos, C.: Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid - A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7154–7160, 2002.
- Gefrom, A., Ott, E. M., Hoedtke, S. & Zeyner, A.: Silierung rückbefeuchteter Leguminosenkörner und der Einfluss der Silierung auf den Gehalt an Alkaloiden, Oligosacchariden, Phytat-Phosphor und Tanninen. *Züchtungskunde*, 85, 154–168, 2013.
- G.F.L.: *Lupinen - Verwertung und Anbau*. Gesellschaft zur Förderung der Lupine e. V., 2007.
- Giami, S. Y., Adindu, M. N., Hart, A. D. & Denenu, E. O.: Effect of heat processing on *in vitro* protein digestibility and some chemical properties of African breadfruit (*Treculia africana* Decne) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56, 117–126, 2001.
- Griego, V. M. & Spence, K. D.: Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 906–910, 1978.
- Gueguen, J.: Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. *Plant Foods for Human Nutrition*, 32, 267–303, 1983.

- Guerrero-Beltrán, J. A. & Barbosa-Cánovas, G. V.: Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International*, 10, 137–147, 2004.
- Guillamón, E., Burbano, C., Cuadrado, C., Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Sánchez, M., Cabanillas, B., Crespo, J. F., Rodriguez, J., Haddad, J. & Allaf, K.: Effect of an instantaneous controlled pressure drop on *in vitro* allergenicity to lupins (*Lupinus albus* var multolupa). *International Archives of Allergy and Immunology*, 145, 9–14, 2008.
- Hall, R. S., Johnson, S. K., Baxter, A. L. & Ball, M. J.: Lupin kernel fibre-enriched foods beneficially modify serum lipids in men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59, 325–333, 2005.
- Hayakawa, S. & Nakai, S.: Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *Journal of Food Science*, 50, 486–491, 1985.
- Henle, T., Walter, H., Krause, I. & Klostermeyer, H.: Efficient determination of individual maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *International Dairy Journal*, 1, 125–135, 1991.
- Hermansson, A. M.: Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *Journal of Texture Studies*, 9, 33–58, 1978.
- Hermansson, A. M.: Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 272–279, 1979.
- Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K. & Gnanasambandam, R.: Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. *Cereal Chemistry*, 73, 364–367, 1996.
- Hidaka, Y. & Kubota, K.: Study on the sterilization of grain surface using UV radiation. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40, 157–161, 2006.
- Hojilla-Evangelista, M., Sessa, D. & Mohamed, A.: Functional properties of soybean and lupin protein concentrates produced by ultrafiltration-diafiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 12, 1153–1157, 2004.
- Holden, L., Sletten, G. B. G., Lindvik, C. K., H. and Fæste & Dooper, M. M. B. W.: Characterization of IgE binding to lupin, peanut and almond with sera from lupin-allergic patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, 146, 267–276, 2008.
- Hove, E. L.: Composition and protein quality of sweet lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 851–859, 1974.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D. & Miller, G. A.: A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42, 1269–1273, 1977.
- Hübner, R.: Fettersatz- und Fettaustauschstoffe - Es geht auch ohne... *DLG-Lebensmittel*, 3, 32–33, 2013.

- Hudson, J. F.: The nutritional quality of lupinseed. *Qualitas Plantarum - Plant Foods for Human Nutrition*, 29, 245–251, 1979.
- Islam, S., Yan, G., Appels, R. & Ma, W.: Comparative proteome analysis of seed storage and allergenic proteins among four narrow-leaved lupin cultivars. *Food Chemistry*, 135, 1230–1238, 2012.
- Ismond, M. A. H., Arntfield, S. D. & Murray, E. D.: Formation and interaction of plant protein micelles in food systems. Parris, N. & Barford, R. (Hg.) *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*. 1991, Interactions of Food Proteins, 91–103.
- Ismond, M. A. H., Georgiou, C., Arntfield, S. D. & Murray, E. D.: Role of noncovalent forces in micellization using legumin from *Vicia faba* as a study system. *Journal of Food Science*, 55, 1638–1642, 1990.
- Ismond, M. A. H., Murray, E. D. & 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. *Food Chemistry*, 21, 27–46, 1986a.
- Ismond, M. A. H., Murray, E. D. & Arntfield, S. D.: The rôle of non-covalent forces in micelle formation by vicilin from *Vicia faba*. The effect of pH variations on protein interactions. *Food Chemistry*, 20, 305–318, 1986b.
- ISO 24557: Pulses - Determination of moisture content - Air-oven method. 2009.
- Jappe, U. & Vieths, S.: Allergie auf Lupinenmehl: ein neues oder ein verstecktes Allergen? *Allergologie*, 31, 314–325, 2008.
- Jensen-Jarolim, E. & Untersmayr, E.: *In-vitro*-Tests zur Bestimmung der allergenen Potenz von „Novel Foods“ und genetisch veränderten Organismen: Relevanz *in vivo*? *Wiener klinische Wochenschrift*, 117, 437–439, 2005.
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B. & Zhang, M.: Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595–601, 2014.
- Jimenez-Lopez, J. C., Lima-Cabello, E., Melser, S., Foley, R. C., Singh, K. B. & Alché, J. D.: Lupin allergy: Uncovering structural features and epitopes of β -conglutin proteins in *Lupinus angustifolius* L. with a focus on cross-allergenic reactivity to peanut and other legumes. Ortuño, F. & Rojas, I. (Hg.) *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Springer, LNCS 9043, 96–107. Dritte Auflage, 2015.
- Johnson, S. K., Chua, V., Hall, R. S. & Baxter, A. L.: Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. *British Journal of Nutrition*, 95, 372–378, 2006.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S. & Barrow, C. J.: Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134, 1343–1353, 2012.

- Kadam, S. S., Smithard, R. R., Eyre, M. D. & Armstrong, D. G.: Effects of heat treatments of antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39, 267–275, 1987.
- Karaguzel, O., Cakmakci, S., Ortacesme, V. & Aydinoglu, B.: Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. *Pakistan Journal of Botany*, 36, 65–74, 2004.
- Kato, A. & Nakai, S.: Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 624, 13–20, 1980.
- Khan, M. K., Karnpanit, W., Nasar-Abbas, S. M., Huma, Z. & Jayasena, V.: Phytochemical composition and bioactivities of lupin: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 2004–2012, 2015.
- Khan, S. H., Butt, M. S., Sharif, M. K., Sameen, A., Mumtaz, S. & Sultan, M. T.: Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2416–2420, 2011.
- King, J., Aguirre, C. & De Pablo, S.: Functional properties of lupin protein isolates (*Lupinus albus* cv Multolupa). *Journal of Food Science*, 50, 82–87, 1985.
- Kinsella, J. E.: Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 242–258, 1979.
- Kiosseoglou, A., Doxastakis, G., Alevsopoulos, S. & Kasapis, S.: Physical characterization of thermally induced networks of lupin protein isolates prepared by isoelectric precipitation and dialysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 34, 253–263, 1999.
- Koutchma, T.: UV light for processing foods. *Ozone: Science and Engineering*, 30, 93–98, 2008.
- Kroll, J., Krause, J.-P. & Rawel, H. M.: Rapssamenproteine - Struktur, Eigenschaften, Gewinnung und Modifizierung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103, 109–118, 2007.
- Kuntz, I. D.: Hydration of macromolecules. III. Hydration of polypeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 514–516, 1971.
- Kylen, A. M. & McCready, R. M.: Nutrients in seeds and sprouts of alfalfa, lentils, mung beans and soybeans. *Journal of Food Science*, 40, 1008–1009, 1975.
- Lampart-Szczapa, E., Konieczny, P., Nogala-Kalucka, M., Walczak, S., Kossowska, I. & Malinowska, M.: Some functional properties of lupin proteins modified by lactic fermentation and extrusion. *Food Chemistry*, 96, 290–296, 2006.
- Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Trojanowska, K., Nogala-Kalucka, M., Malecka, M. & Pacholek, B.: Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. *Nahrung/Food*, 47, 286–290, 2003.

- Layman, D. K.: Dietary Guidelines should reflect new understandings about adult protein needs. *Nutrition & Metabolism*, 6, 1, 2009.
- LFGB: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 (L 15.00-3). Bestimmung des Stickstoffgehaltes und Berechnung des Rohproteingehaltes von Getreide und Hülsenfrüchten. 2007.
- Li, X. & Farid, M.: A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182, 33–45, 2016.
- Lqari, H., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J. & Millán, F.: Production of *Lupinus angustifolius* protein hydrolysates with improved functional properties. *Grasas y Aceites*, 56, 135–140, 2005.
- Lucas, M. M., Stoddard, F. L., Annicchiarico, P., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C., Sussmann, D., Duranti, M., Seger, A., Zander, P. M. & Pueyo, J. J.: The future of lupin as a protein crop in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–6, 2015.
- Makri, E., Papalamprou, E. & Doxastakis, G.: Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 19, 583–594, 2005.
- Mine, Y.: Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 225–232, 1995.
- Miraglio, A. M.: Nutrient substitutes and their energy values in fat substitutes and replacers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1175S–1179S, 1995.
- Mohamed, A., Peterson, S. C., Hojilla-Evangelista, M. P., Sessa, D. J., Rayas-Duarte, P. & Biresaw, G.: Effect of heat treatment and pH on the thermal, surface, and rheological properties of *Lupinus albus* protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 135–140, 2005.
- Morr, C. V. & Ha, E. Y. W.: Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 431–476, 1993.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H. & Parajó, J. C.: Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945–963, 2006.
- Muranyi, I. S., Otto, C., Pickardt, C., Koehler, P. & Schweiggert-Weisz, U.: Microscopic characterisation and composition of proteins from lupin seed (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation procedure. *Food Research International*, 54, 1419–1429, 2013.
- Muranyi, I. S., Volke, D., Hoffmann, R., Eisner, P., Herfellner, T., Brunnbauer, M., Koehler, P. & Schweiggert-Weisz, U.: Protein distribution in lupin protein isolates from *Lupinus angustifolius* L. prepared by various isolation techniques. *Food Chemistry*, 207, 6–15, 2016.

- Murray, E. D., Arntfield, S. D. & Ismond, M. A. H.: The influence of processing parameters on food protein functionality II. Factors affecting thermal properties as analyzed by differential scanning calorimetry. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18, 158–162, 1985.
- Murray, E. D., Myers, C. D. & Barker, L. D.: Protein product and process for preparing same. 1979. US Patent 4,169,090.
- NACMCF: Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 123–153, 1999.
- Neto, V. Q., Narain, N., Silva, J. B. & Bora, P. S.: Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale*, L.) kernel protein isolates. *Food/Nahrung*, 45, 258–262, 2001.
- Olaimat, A. N. & Holley, R. A.: Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32, 1–19, 2012.
- Onsaard, E., Pomsamud, P. & Audtum, P.: Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3, 420–431, 2010.
- Pearce, K. N. & Kinsella, J. E.: Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716–723, 1978.
- Pedrosa, C., Trisciuzzi, C. & Ferreira, S. T.: Effects of glycosylation on functional properties of vicilin, the 7S storage globulin from pea (*Pisum sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2025–2030, 1997.
- Pelgrom, P. J. M., Berghout, J. A. M., van der Goot, A. J., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. I.: Preparation of functional lupine protein fractions by dry separation. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 680–688, 2014.
- Pelgrom, P. J. M., Wang, J., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. I.: Pre- and post-treatment enhance the protein enrichment from milling and air classification of legumes. *Journal of Food Engineering*, 155, 53–61, 2015.
- Peng, Q., Khan, N. A., Wang, Z. & Yu, P.: Moist and dry heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfractions, and nutrient profiles in camelina seeds. *Journal of Dairy Science*, 97, 446–457, 2014.
- Piornos, J. A., Burgos-Díaz, C., Ogura, T., Morales, E., Rubilar, M., Maureira-Butler, I. & Salvo-Garrido, H.: Functional and physicochemical properties of a protein isolate from aluprot-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*). *Food Research International*, 76, 719–724, 2015.
- Radtke, J., Schutkowski, A., Brandsch, C., Hirche, F., Hasenkopf, K. & Stangl, G. I.: Isolated conglutin γ from lupin, but not phytate, lowers serum cholesterol without influencing vascular lesion development in the ApoE-deficient mouse model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 113–118, 2015.

- Rahma, E. H. & Rao, M. S. Narasinga: Effect of debittering treatment on the composition and protein components of lupine seed (*Lupinus termis*) flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 1026–1030, 1984.
- Raymundo, A., Empis, J. & Sousa, I.: White lupin protein isolate as a foaming agent. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207, 91–96, 1998a.
- Raymundo, A., Franco, J., Gallegos, C., Empis, J. & Sousa, L.: Effect of thermal denaturation of lupin protein on its emulsifying properties. *Food/Nahrung*, 42, 220–224, 1998b.
- Rehman, Z. & Shah, W. H.: Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91, 327–331, 2005.
- Reinecke, K., Weber, G., Ehlbeck, J. & Schlüter, O.: Kaltplasma: Schonende Dekontamination von Gewürzen. *DLG-Lebensmittel*, 3, 20–21, 2013.
- Rodríguez-Ambriz, S. L., Martínez-Ayala, A. L., Millán, F. & Dávila-Ortíz, G.: Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 99–107, 2005.
- Rodríguez-García, J., Puig, A., Salvador, A. & Hernando, I.: Optimization of a sponge cake formulation with inulin as fat replacer: structure, physicochemical, and sensory properties. *Journal of Food Science*, 77, C189–C197, 2012.
- Sachs, L. & Hedderich, J.: *Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R*. Springer Verlag, 12. Auflage, 2006.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P. & Raso, J.: Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. Gould, G. W. (Hg.) *New Methods of Food Preservation*, Springer, 176–204. Erste Auflage, 1995.
- Sastry, S. K., Datta, A. K. & Worobo, R. W.: Ultraviolet light. *Journal of Food Science*, 65, 90–92, 2000.
- Sathe, S. K.: Dry bean protein functionality. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 175–223, 2002.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S. & Salunkhe, D. K.: Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science*, 47, 491–497, 1982.
- Schirle-Keller, J. P., Reineccius, G. A. & Hatchwell, L. C.: Flavor interactions with fat replacers: effect of oil level. *Journal of Food Science*, 59, 813–815, 1994.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V. & Bitsch, R.: Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, 36, 177–187, 2002.
- Schwenke, K. D.: Reflections about the functional potential of legume proteins a review. *Food/Nahrung*, 45, 377–381, 2001.

- Schwenke, K. D., Prahl, L., Rauschal, E., Gwiazda, S., Dabrowski, K. & Rutkowski, A.: Functional properties of plant proteins. Part 2. Selected physicochemical properties of native and denatured protein isolates from faba beans, soybeans, and sunflower seed. *Food/Nahrung*, 25, 59–69, 1981.
- Sengbusch, R.: Bitterstoffarme Lupinen II. *Der Züchter*, 3, 93–109, 1931. ISSN 1432-2242.
- Siger, A., Czubinski, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E. & Nogala-Kalucka, M.: Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 190–197, 2012.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Castiglioni, S., Duranti, M., Magni, C., Morandi, S., D'Agostina, A. & Arnoldi, A.: Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *The Journal of Nutrition*, 134, 18–23, 2004.
- Sirtori, C. R., Triolo, M., Bosisio, R., Bondioli, A., Calabresi, L., De Vergori, V., Gomasaschi, M., Mombelli, G., Pazzucconi, F., Zacherl, C. & Arnoldi, A.: Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. *British Journal of Nutrition*, 107, 1176–1183, 2012.
- Sirtori, E., Resta, D., Brambilla, F., Zacherl, C. & Arnoldi, A.: The effects of various processing conditions on a protein isolate from *Lupinus angustifolius*. *Food Chemistry*, 120, 496–504, 2010.
- Sorgentini, D. A., Wagner, J. R. & Anon, M. C.: Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2471–2479, 1995.
- Sousa, I. M. N., Mitchell, J. R., Ledward, D. A., Hill, S. E. & da Costa, M. L. B.: Differential scanning calorimetry of lupin and soy proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 201, 566–569, 1995.
- Sousa, I. M. N., Morgan, P. J., Mitchell, J. R., Harding, S. E. & Hill, S. E.: Hydrodynamic characterization of lupin proteins: Solubility, intrinsic viscosity, and molar mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3018–3021, 1996.
- Stahl, E., Quirin, K. W. & Blagrove, R. J.: Extraction of seed oils with supercritical carbon dioxide: effect on residual proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 938–940, 1984.
- Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Chalutz, E., Droby, S., Kabwe, M. K., Haung, Z., Adeyeye, O., Pusey, L. P. & Tang, A. Y. A.: Induced resistance of sweetpotato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. *Crop Protection*, 18, 463–470, 1999.
- Subirade, M., Gueguen, J. & Pérolet, M.: Conformational changes upon dissociation of a globular protein from pea: a Fourier transform infrared spectroscopy study.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205, 239–247, 1994.
- Sun, X. D. & Arntfield, S. D.: Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Research International*, 43, 509–515, 2010.
- Sußmann, D., Halter, T., Pickardt, C., Schweiggert-Weisz, U. & Eisner, P.: An optimization approach for the production of fatlike protein isolates from different leguminous seeds using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 715–730, 2013a.
- Sußmann, D., Melde, D., König, K., Braun, P. & Pickardt, C.: *Pflanzliche Fettaus-tauschstoffe aus sphärischen Proteinmizellen: gemeinsamer Abschlussbericht ; Berichtszeitraum: 01.07.2008 bis 31.12.2011*. Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (Freising), Institut für Lebensmittelhygiene (Leipzig), 2012.
- Sußmann, D., Pickardt, C., Schweiggert, U. & Eisner, P.: Influence of different processing parameters on the isolation of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) protein isolates: A preliminary study. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 18–28, 2013b.
- Tai, H. H. & Bush, R. S.: Analysis of lupin seed protein digestibility using gel electrophoresis and immunoblots. *Journal of Animal Science*, 75, 1934–1940, 1997.
- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H. & Sawada, J.: Comparative study of *in vitro* digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 969–973, 2003.
- Terruzzi, I., Senesi, P., Magni, C., Montesano, A., Scarafoni, A., Luzi, L. & Duranti, M.: Insulin-mimetic action of conglutin- γ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 197–205, 2011.
- Thambiraj, S. R., Phillips, M., Koyyalamudi, S. R. & Reddy, N.: Antioxidant activities and characterisation of polysaccharides isolated from the seeds of *Lupinus angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, 74, 950–956, 2015.
- Vargas-Guerrero, B., García-López, P. M., Martínez-Ayala, A. L., Domínguez-Rosales, J. A. & Gurrola-Díaz, C. M.: Administration of *lupinus albus* gamma conglutin (C γ) to n5 STZ rats augmented *Ins-1* gene expression and pancreatic insulin content. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 241–247, 2014.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. D.: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117, 1998.
- Villarino, C. B. J., Jayasena, V., Coorey, R., Chakrabarti-Bell, S., Foley, R., Fanning, K. & Johnson, S. K.: The effects of lupin (*Lupinus angustifolius*) addition to wheat bread on its nutritional, phytochemical and bioactive composition and protein quality. *Food Research International*, 76, 58–65, 2015.

- Wang, S. & Clements, J.: Antioxidant activities of lupin seeds. Palta, J. A. & Berger, J. D. (Hg.) *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 14-18 September 2008*. International Lupin Association, 2008, 546–552.
- Wäsche, A., Müller, K. & Knauf, U.: New processing of lupin protein isolates and functional properties. *Food/Nahrung*, 45, 393–395, 2001.
- Weber, P. D. H.: *Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 1: Grundlagen*. Mikrobiologie der Lebensmittel. Behr's Verlag, erste Auflage, 2010. ISBN 978-3-89947-447-3.
- Wijayanti, H. B., Bansal, N. & Deeth, H. C.: Stability of whey proteins during thermal processing: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 1235–1251, 2014.
- Wilbois, K.-P., Vogt-Kaute, W., Spieß, H., Jahn, M. & Koch, E.: Leitfaden Saatgutgesundheit im ökologischen Landbau - Ackerkulturen. FiBL - Forschungsinstitut für biologischen Landbau e. V., 2007.
- Wu, W. U., Hettiarachchy, N. S. & Qi, M.: Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 845–850, 1998.
- Yáñez, E., Lobos, P., Diaz, G. & Ballester, D.: Effect of roasting on the chemical composition and protein quality of lupin seeds (*Lupinus albus* cv multolupa). *Journal of Food Science*, 51, 1235–1238, 1986.
- Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y. & Wäsche, A.: Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7681–7689, 2004.
- Yoshie-Stark, Y., Bez, J. & Wäsche, A.: Effect of different pasteurization conditions on bioactivities of *Lupinus albus* protein isolates. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 118–123, 2006.
- Yu, P. & Samadi: Dry and moist heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfraction, and nutrient profiles in soybeans. *Journal of Dairy Science*, 94, 6092–6102, 2011.
- Zunft, H.-J. F. & Ragotzky, K.: Strategien zur Fettsubstitution in Lebensmitteln. *Fett/Lipid*, 99, 204–213, 1997.

Liste der Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge

Melde, D., Wiacek, C. & Braun, P. G.: Physical decontamination of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein isolates, seeds and flakes: Effects on microbial status and micellar protein yield. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 651-656, 2016.

Vorträge

Melde, D., Dittrich, A. J. & Braun, P. G.: Protein- und Ballaststoffpräparate aus der Lupine - Technologie, Lebensmittelsicherheit und Produktentwicklung. *nutriCARD - Winter School „From farm to healthy foods“*, Leipzig, 23.-27.01.2017

Melde, D., Dittrich, A. J. & Braun, P. G.: Innovative Lebensmittel mit pflanzlichem Protein und mikrobiologische Sicherheit. *24. Ernährungsfachtagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. „Renaissance des pflanzlichen Proteins“*, Jena, 10.11.2016

Melde, D., Dittrich, A. J., Wiacek, C., Bez, J. & Braun, P. G.: Proteine und Ballaststoffe aus der Lupine - Mikrobiologische Stabilisierung und Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelherstellung. *56. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG*, Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2015; Abstract: *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*, ISSN 0945-3296, 60, 2015.

Melde, D., Braun, P. G. & Knobloch, S.: Pflanzenproteine als Fettaustauscher in Lebensmitteln - mikrobiologische Charakterisierung. *5. Leipziger Tierärztekongress*, Leipzig, 21.-23.01.2010; Abstract: *Leipziger Blaue Hefte: Proceedings*, 11, ISBN 978-3-86583-442-3, 363-365, 2010.

Poster

Melde, D., Braun, P. G. & Henle, T.: Micellar lupin protein isolate - digestibility, solubility and sensory evaluation as a function of physical treatment of defatted lupin flakes. *XIV. International Lupin Conference*, Mailand (Italien), 21.-26.06.2015.

Dittrich, A. J., Melde, D. & Braun, P. G.: Potentielle Saatgutentkeimungsverfahren bei der Gewinnung von Lupinenproteinisolationen. *55. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG*, Garmisch-Partenkirchen, 23.-26.09.2014; Ab-

stract: *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*, ISSN 0945-3296, 205, 2014. (Posterpreis)

Melde, D., Dittrich, A. J., Braun, P. G. & Henle, T.: Entkeimung von Lupinensaat und Einfluss auf die Eigenschaften daraus gewonnener Proteinisolate. *43. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Gießen, 22.-24.09.2014; Abstract: *Lebensmittelchemie*, 69, 118-135, 2015.

Melde, D., König, K., Braun, P. G., Sußmann, D. & Pickardt, C.: Methoden der mikrobiologischen Stabilisierung pflanzlicher Fettaustauschstoffe. *52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG*, Garmisch-Partenkirchen, 27.-30.09.2011; Abstract: *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*, ISSN 0945-3296, 177, 2011.

Braun, P. G., Melde, D., Knobloch, S., Pickardt, C., Sußmann, D. & Eisner, P.: Innonet-Projekt: Fettaustauschsystem auf Pflanzenproteinbasis in Lebensmitteln. *50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG*, Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009; Abstract: *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*, ISSN 0945-3296, 205, 2009.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst meinem Doktorvater, Herrn Professor Thomas Henle (Institut für Lebensmittelchemie, TU Dresden), für die fachliche Betreuung und zahlreiche konstruktive Diskussionen, ebenso wie Frau Professorin Peggy G. Braun (Institut für Lebensmittelhygiene, Uni Leipzig) für die Möglichkeit die Arbeit an Ihrem Lehrstuhl anfertigen zu können und für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz und Frau Carla Schlosser (Institut für Lebensmittelchemie, TU Dresden) für die Aminosäureanalyse, Herrn Professor Herbert Fuhrmann (Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Uni Leipzig) für die Möglichkeit Räume und Geräte zu nutzen und insbesondere seinen Mitarbeitern Frau Gabriele Dobeleit und Herrn Gerald Vallentin für die Gefriertrocknung unzähliger Proteinisolate sowie Herrn Axel Schöniger für die Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen, ebenso wie den Mitarbeiterinnen des Instituts für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik (Uni Leipzig) für die Möglichkeit der Nutzung der Kugelmühle.

Ich danke Herrn Professor Harald Rohm (Professur für Lebensmitteltechnik, TU Dresden), die DSC-Messungen in den Räumen des Instituts für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik durchführen zu können und seinen Mitarbeitern Nazir Kizzie-Hayford und Clemens Otto für die Unterstützung bei den Analysen.

Allen Mitarbeitern, Kollegen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Lebensmittelhygiene danke ich für euer offenes Ohr bei all meinen Problemen, für die tatkräftige Unterstützung im Labor, sowie die vielen schönen Momente fernab der Dissertation.

Und natürlich vielen Dank an meine Probanden - Ich weiß, die Verkostung war nicht immer sehr schmackhaft.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi; Förderkennzeichen: 16IN0642) sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF; Förderkennzeichen: 03V0451) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der InnoNet- und VIP-Fördermaßnahmen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die immerwährende Unterstützung, die optimistischen Worte und den nötigen Ansporn.

Danke

Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Thomas Henle angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011, zuletzt geändert durch Beschlüsse des Fakultätsrates vom 15.06.2011 und 18.06.2014, an. Weiterhin versichere ich, dass bisher keine früheren erfolglosen Promotionsverfahren stattgefunden haben.

Ort, Datum

Unterschrift