

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

## **Schlussbericht zum Thema**

# **“Erhöhung der ernährungsphysiologischen Qualität von Ackerbohnenmehlen und -konzentraten durch Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe“**

**FKZ: 2815EPS011**

**Projektnehmer:**

**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen der BMEL Eiweißpflanzenstrategie.

## Abschlussbericht

ZE:  Fraunhofer IVV	Förderkennzeichen:  2815EPS011
Vorhabensbezeichnung:  Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung – QualiFabaBean: Erhöhung der ernährungsphysiologischen Qualität von Ackerbohnenmehlen und –konzentraten durch Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe	
Laufzeit des Vorhabens:  01.06.2017 bis 30.11.2020	
Berichtszeitraum:  01.06.2017 bis 30.11.2020	

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Freising, März 2021

## Kurzfassung

**Titel:** QualiFabaBean: Erhöhung der ernährungsphysiologischen Qualität von Ackerbohnenmehlen und –konzentraten durch Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe

**Autoren/ Kontaktinformation:** maike.foeste@ivv.fraunhofer.de

Die Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe aus Ackerbohnen war mittels der ausgewählten Strategien (Schälen, hydrothermische Behandlung, wässrige Extraktion und Aufkonzentrierung mittels Fällung bzw. Ultrafiltration) größtenteils umsetzbar. Kondensierte Tannine ließen sich durch den Schälschritt abtrennen, endogene Enzyme (LOX, POD) wurden durch die Hitze-Dampf sowie Druck-Dampf Behandlung reduziert. Die Reduktion der Trypsininhibitor-Aktivität war mit dem Druck-Dampf Verfahren deutlich effizienter (bis zu 85 %) als nach der Hitze-Dampf Behandlung (bis zu 53 %). Des Weiteren beeinträchtigte die hydrothermische Behandlung die Funktionalität der Ackerbohnenmehle (Reduktion der Proteinlöslichkeit/ Emulgierkapazität) und veränderte die sensorischen Eigenschaften. Der bohnlige und grasige Geruch wurde reduziert, allerdings bildete sich ein deutlich wahrnehmbares nussiges Aroma in den thermisch behandelten Mehlen. Die dafür ursächlichen Mechanismen konnten im Rahmen von QualiFabaBean nicht aufgeklärt werden, so dass hier weiterführende Arbeiten nötig sind, um die sensorische Eigenschaften weiter zu optimieren.

Das mittels wässrig alkalischer Extraktion mit anschließender IEP gewonnene Proteinkonzentrat wies im Vergleich zum Ausgangsmehl (1,2 % TM) einen hohen Phytinsäuregehalt von 2,7 % TM auf. Der Vicingehalt in diesem Konzentrat lag bei 0,5 mg/ g Probe und war somit im Vergleich zum Ausgangsmehl um 52 % rel. reduziert. Durch die saure Vorextraktion bei pH 5,5 mit anschließender IEP gelang die Abreicherung der Phytinsäure bis zu 43 % rel. bzw. bis zu 48 % nach der UF. Die Restaktivität der Trypsininhibitoren betrug für das mittels IEP gewonnene Isolat 35,5 % rel.; die endogenen Enzyme (LOX und POD) waren nahezu vollständig inaktiviert. Die Gewinnung von Proteinkonzentraten mittels IEP bzw. UF hatte eine verringerte Proteinlöslichkeit und leicht verbesserte Emulgiereigenschaften zur Folge. In Abhängigkeit des verwendeten Mehls zur Proteingewinnung ergab die sensorische Evaluierung einen bohnligen, grasigen Geruch und einen leicht bitteren Geschmack. Die Übertragbarkeit in den industriellen Maßstab wurde gezeigt und erste Modellrezepturen für die Herstellung von Backwaren, Burger-Patties und Dessertprodukte entwickelt. Vor allem in Rührkuchen ließ sich das hydrothermisch behandelte Mehl, trotz seines nussigen Aromas, sehr gut einsetzen und wurde im Rahmen einer sensorischen Evaluierung von den Probanden mit einer höheren Beliebtheit im Vergleich zur Referenz eingestuft.

## **Abstract**

**Title:** QualiFabaBean: Increase of the nutritional quality in fava bean flour and concentrate by reduction of antinutritives

**Author/ contact:** maike.foeste@ivv.fraunhofer.de

In fava beans, reduction of antinutritives could be achieved to a high extend by the selected strategies (peeling, hydrothermal treatment, aqueous extraction and concentration by means of isoelectric precipitation or ultrafiltration). Tannins were reduced by peeling, endogenous enzymes (LOX, POD) were inactivated by hydrothermal treatment, either using heat-steam or steam-pressure conditions, in the fava bean flour. Reduction of trypsin inhibitor activity was more efficient by using steam-pressure procedure (85 %) than using heat-steam treatment (up to 53 %). In addition, hydrothermal treatment impaired functional properties of fava bean flour, resulting in decreased protein solubility and emulsifying capacity. Regarding the sensory characteristics, the beany and grassy odor decreased by heat-steam treatment, which caused a nutty flavor of the heat treated flour. Mechanisms and key substances that are responsible for these aroma profiles could not be identified within the project QualiFabaBean. Therefore, a following research project would be needed to identify and to clarify the formation of these molecular volatile and non-volatile compounds in order to develop targeted strategies for their reduction.

Independent of the concentration procedure (IEP, UF), protein concentrates obtained by means of aqueous extraction, showed elevated phytic acid contents (2.7 % db) in comparison to fava bean flour (1.2 % db). The vicin content of the concentrate was decreased by 52 % rel. in comparison the initial flour (0.5 mg/ g sample). By means of acidic pre-extraction at pH 5.5, reduction in phytic acid content up to 43 % rel. after IEP and up to 48 % after UF could be realized. Residual activity of trypsin inhibitor remained 35 % after solvent extraction; however, LOX and POD were completely inactivated. Independent of the concentration procedure (IEP; UF), concentrates showed slightly decreased protein solubility and improved emulsifying capacity in comparison to their native flours. Depending on the selection of fava bean flour for aqueous extraction, sensory evaluation of concentrates revealed a beany, grassy odor and a slight bitter taste. Up-scaling of the extraction process was successful. Model recipes for baking products, vegan burger patties or vegan desserts were developed and the processing of final products and determination of quality characteristics was performed. Despite of the nutty odor, especially, heat-steam treated flour performed well in pound cake and was rated with high acceptability by panelists.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	X

<b>1. Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Gegenstand des Vorhabens .....	1
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes .....	1
1.3 Planung und Ablauf des Projektes.....	2
<b>2. Stand des Wissens und der Technik.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>6</b>
3.1 Material.....	6
3.2 Methoden .....	7
3.2.1 Vermahlung der Ackerbohnsensaat.....	7
3.2.2 Hydrothermische Behandlung von Ackerbohnenmehlen .....	8
3.2.3 Extraktion von Ackerbohnenproteinen .....	8
3.2.4 Bestimmung der analytischen Zusammensetzung.....	10
3.2.5 Bestimmung antinutritiver Inhaltsstoffe .....	11
3.2.6 Bestimmung der endogenen Enzymaktivität.....	16
3.2.7 Analyse der funktionellen Eigenschaften .....	23
3.2.8 Sensorische Analyse - Ackerbohnenmehle/ -Konzentrate und Modelllebensmittel....	24
3.2.9 Farbmessungen .....	24
3.2.10 Herstellung von Modelllebensmitteln.....	25
<b>4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1 Analytische Zusammensetzung .....	29
4.2 Antinutritive Inhaltstoffe .....	31
4.3 Trypsininhibitor-Aktivität und endogene Enzymaktivitäten.....	35

4.4	Enzymaktivitäten nach hydrothermische Behandlung .....	37
4.5	Einfluss der Vermahlung und Siebung auf die Zusammensetzung des Ackerbohnenmehls.....	40
4.6	Gewinnung von Proteinkonzentraten unter Berücksichtigung der Bilanzierungsdaten .....	43
4.7	Funktionelle Eigenschaften von Mehlen und Konzentraten.....	46
4.8	Sensorik von Mehlen und Konzentraten .....	49
4.9	Scale-Up und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung.....	50
4.10	Herstellung von Modelllebensmitteln.....	54
<b>5.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse - praxisrelevante Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Gegenüberstellung ursprünglich geplante zu den tatsächlich erreichten Zielen.....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt .....</b>	<b>76</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1 Überblick der verwendeten Ackerbohnen genotypen.....</b>	<b>6</b>
<b>Tabelle 2 Überblick der Erträge ausgewählter Ackerbohnen relativ zur Bezugsbasis für den Standort Frankenhausen. ....</b>	<b>7</b>
<b>Tabelle 3: Standardreihe mit entsprechender Catechin-Konzentration.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibriergerade für die Tanninbestimmung.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 5: Pipettierschema zur Tanninbestimmung. ....</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 6: Pipettierschema zur Bestimmung der Lipoxygenase-Aktivität.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 7: Pipettierschema zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität.....</b>	<b>20</b>
<b>Tabelle 8: Rezeptur zur Herstellung von Rührkuchen. ....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 9: Rezeptur zur Herstellung von Weizenbrot. ....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 10: Rezeptur zur Herstellung von glutenfreien Broten.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 11: Rezeptur zur Herstellung von Schokoladen-Desserts. ....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 12: Grundzusammensetzung von ganzen Ackerbohnen Samen und trockentechnisch gewonnenen Fraktionen.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabelle 13: Gegenüberstellung der Gehalte an Saccharose und Oligosacchariden in Ackerbohnenfraktionen.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 14: Phytinsäuregehalte in ausgewählten Ackerbohnen Sorten. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 15: Übersicht der Massenbilanz zu den Tanningehalten in Saat, Kerne und Schale.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 16: Trypsininhibitor-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 17: Lipoxygenase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 18: Peroxidase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle 19: Ausbeuten der Separation der Ackerbohnen in Kern- und Schalenfraktion mittels Schälung und Sichtung.....</b>	<b>41</b>

<b>Tabelle 20: Analytische Zusammensetzung von Ackerbohnenkernmehlen der Sorten Tiffany und Fanfare in Abhängigkeit der Partikelgröße.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabelle 21 Übersicht der Bilanzierungsdaten für die gewonnenen Proteinkonzentrate. ....</b>	<b>43</b>
<b>Tabelle 22 Überblick zum Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe in Ackerbohnenproteinkonzentraten.....</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 23: Restaktivitäten der Trypsininhibitor-Aktivität, Lipoxygenase-Aktivität sowie Peroxidase-Aktivität im Isolat im Vergleich zum Rohstoff.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 24 Übersicht der funktionellen Eigenschaften von Ackerbohnenmehlen und –konzentraten.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 25 Überblick zum Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe im Scale-Up Konzentrat.</b>	<b>51</b>
<b>Tabelle 26 Übersicht der funktionellen Eigenschaften des Scale-Up Konzentrats.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 27: Farbgebung der Krume von Rührkuchen mit Ackerbohnenmehl. ....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 28 Qualitätsmerkmale von Weizenbrotten mit Ackerbohnenmehl. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 29 Qualitätsmerkmale von glutenfreien Brotten mit Ackerbohnenmehl.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabelle 30 Qualitätsmerkmale von Burger-Patties mit Ackerbohnenisolat.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 31: Aussehen von Dessertprodukten mit Ackerbohnenmehl und Konzentrat.</b>	<b>61</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prozessschritte und (Neben-)produkte der wässrigen Extraktion mit anschließender isoelektrischer Fällung.....	8
Abbildung 2 Prozessschritte bei der wässrigen Extraktion mit anschließender Ultrafiltration.....	9
Abbildung 3 Prozessschritte bei der sauren Vorextraktion mit anschließender Extraktion und isoelektrischer Fällung.....	10
Abbildung 4: Reaktion des Vanillin-HCl-Assays.....	12
Abbildung 5: Reaktionsschema zum Nachweis des Phytinsäure.....	15
Abbildung 6: Kalibriergerade zur Quantifizierung von Vicin in Ackerbohnenmehlen und -konzentraten. ....	16
Abbildung 7: Reaktionsschema zum Nachweis der Trypsininhibitor-Aktivität.....	17
Abbildung 8: Mechanismus der Lipoxygenase.....	18
Abbildung 9: Reaktionsgleichung der Peroxidase-Aktivität. ....	20
Abbildung 10: Bradford-Kalibrierreihe mit Bestimmtheitsmaß und Geradengleichung. ....	22
Abbildung 11: Bildliche Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung von veganen Burger-Patties.....	27
Abbildung 12: Tanningehalt als Catechin-Äquivalente in den verschiedenen Ackerbohnen-Fraktionen. ....	33
Abbildung 13: Vicin und Convicin Gehalte in ausgewählten Ackerbohnenmehlen.....	34
Abbildung 14: Trypsininhibitor-Aktivität vergleichend für die Kern-, Schalenfraktion und Saat der Sorte Tiffany 2 (a) und in ausgewählten Kernfraktionen von Ackerbohnen (b). ....	35
Abbildung 15 Gegenüberstellung der Peroxidase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl und der Saat von Tiffany 4.....	39
Abbildung 16: Vicin und Convicin Gehalte in hydrothermisch behandelten Ackerbohnenkernmehlen und -Saaten.....	40
Abbildung 17: Prozentuale Partikelgrößenverteilung für die Kernmehle der Ackerbohnen Sorten Tiffany 4 und Fanfare 1. ....	42

<b>Abbildung 18: Proteinlöslichkeitsprofil unterschiedlicher Ackerbohnsorten in Abhängigkeit des pH-Werts.....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 19: Einfluss der Salzkonzentration auf die Proteinlöslichkeit von Ackerbohnenkernmehlen für die pH-Werte 2 und 7.....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 20: Sensorische Evaluierung von Proteinkonzentraten aus Ackerbohnen.</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 21: Übersicht des Scale-Up Prozesses, der Massenströme und Trockenmassegehalte.....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 22: Sensorisches Bewertungsprofil für das Proteinisolat aus dem Scale-Up Versuch.....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 23: Einfluss von Ackerbohnenmehl auf das Geschmacksprofil von Rührkuchen. ....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 24: Aussehen der Burger-Patties nach dem Anbraten.....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 25: Einfluss von Ackerbohnenmehl auf das Geschmacksprofil von Dessertproben. ....</b>	<b>60</b>

## Abkürzungsverzeichnis

HD	Behandlung im Konvektomat
DD	Behandlung im Druckdampfgarer
IEP	Isoelektrische Fällung
UF	Ultrafiltration
LOX	Lipoxygenase
POD	Peroxidase
TI	Trypsin-Inhibitoren
TIA	Trypsin-Inhibitoraktivität
TIU	Trypsin Inhibitor Units
E	Extrakt
Ü	Überstand
SVE	Saure Vorextraktion
TM	Trockenmasse
TMA	Trockensubstanzausbeute
PGA	Proteingesamtausbeute
PG	Proteingehalt
sL	Solid to Liquid ratio

# **1. Einführung**

## **1.1 Gegenstand des Vorhabens**

Das Ziel von QualiFabaBean war die Entwicklung eines kombinierten Verfahrens zur Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe, wie z.B. Tannine, Phytinsäure, Vicin/Convicin und Trypsininhibitoren und zur Inaktivierung endogener Enzyme. Dadurch sollen ernährungsphysiologisch hochwertige und sensorisch attraktive Ackerbohlenmehlen und – Konzentrate gewonnen werden, die in ein breites Anwendungsfeld in der Lebensmittelindustrie aufweisen. Die Ergebnisse sollten als Grundlage für eine intensive Kommunikation mit dem Modell- und Demonstrationsnetzwerk Erbse und Ackerbohne sowie Industriepartnern und Verbänden dienen und das Aufzeigen neuer Absatzwege für Landwirte unterstützen. Auf diese Weise sollten sowohl Anbauempfehlungen als auch Entscheidungshilfen für Landwirte zur Verfügung gestellt werden und darüber hinaus ein Beitrag zur Erhaltung der Diversität und der Versorgung der deutschen sowie der europäischen Bevölkerung mit einheimischen Eiweiß sichergestellt werden.

## **1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes**

Die zunehmenden Importe von eiweißhaltigen Rohstoffe, wie Soja, sowie der stagnierende Anbau von Leguminosen in Deutschland haben vor einigen Jahren zur Etablierung der BMEL-Eiweißpflanzenstrategie (EPS) geführt. Insbesondere der Anbau von Ackerbohnen konkurriert mit leistungsstarken Feldfrüchten um die knappen inländischen Ackerflächen, resultierend in negativen Deckungsbeiträgen. Um den Anbau von Ackerbohnen für Landwirte attraktiver zu gestalten, ist die Implementierung aktueller Forschungsergebnisse in der Züchtung und bei der Beratung von Landwirten unabdingbar. Das Ziel der EPS ist, den rückläufigen Leguminosen-Anbau in Deutschland zu fördern und die Anbauflächen von Hülsenfrüchten mittel- bis langfristig auszudehnen. Dabei sollen sowohl das Angebot als auch die Nachfrage nach heimisch erzeugten Leguminosen gestärkt werden. Folgende Ziele werden im Rahmen der EPS verfolgt:

- Verbesserung von Ökosystemleistungen und Ressourcenschutz
- Stärkung regionaler Wertschöpfungsketten
- Steigerung der Eiweißversorgung aus heimischer Produktion und Berücksichtigung der Verbesserung von Erträgen auch durch Züchtungsmaßnahmen (nicht gentechnische Modifizierung)

Das Projekt QualiFabaBean hatte zum Ziel, ein Verfahren für die Herstellung ernährungsphysiologisch hochwertiger, sensorisch attraktiver Mehle und Proteinkonzentrate

aus Ackerbohnen zu entwickeln und deren Nutzung als funktionelle Lebensmittelzutat aufzuzeigen. Im Rahmen des Projektes sollte ein Verfahren zur hydrothermischen Vorbehandlung der Ackerbohnen entwickelt werden, welches die Inaktivierung von Proteaseinhibitoren sowie endogenen Enzyme ermöglicht. Zudem sollten verschiedene Verfahren (Schälung, wässrige Extraktion) mit Blick auf die Abreicherung von antinutritiven Inhaltsstoffen untersucht werden. Das Vorhaben gliederte sich zu diesem Zweck in folgende Arbeitspakete (AP):

- AP1: Sortenscreening
- AP2: Charakterisierung der Enzym-/Inhibitoraktivitäten und thermische Inaktivierung
- AP3: Verarbeitung von Ackerbohnen zu Mehlen und Konzentraten unter Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe
- AP4: Prozessbegleitende Analytik
- AP5: Entwicklung von Modellrezepturen

### **1.3 Planung und Ablauf des Projektes**

Im ersten Projektjahr wurde zunächst das Sortenscreening von 12 Ackerbohnen genotypen am Fraunhofer IVV durchgeführt. Hierzu wurden die Zusammensetzung sowie die funktionellen Eigenschaften (Proteinlöslichkeit, Wasserbindevermögen) der Proben charakterisiert (AP1). Aufgrund der Zielgrößen (u.a. hoher Proteingehalt, hohe Proteinlöslichkeit) wurden zur Charakterisierung der endogenen Enzymaktivität zunächst die Sorten Tiffany 2 und Fanfare 1 ausgewählt. Zudem wurde mit den Analysen der antinutritiven Inhaltsstoffe (ANF), im Speziellen dem Phytinsäure- und dem Oligosaccharidgehalt sowie mit der Charakterisierung der Peroxidaseaktivität begonnen (AP2).

Im zweiten Projektjahr wurde aufgrund der Verfügbarkeit an Ackerbohnen zusätzlich die Sorte Tiffany 4 mit aufgenommen. Darüber hinaus wurden die Analysen zum Phytinsäure- und Oligosaccharidgehalten abgeschlossen (AP1), so dass die Auswahl von 3 Ackerbohnen sorten für die weiteren Untersuchungen (Meilenstein 1) mit einer zeitlichen Verzögerung abgeschlossen wurde. Die ausgewählten Ackerbohnen sorten wurde anschließend hinsichtlich der Aktivität endogener Enzyme untersucht (AP2). So wurden pH- und Temperaturkinetiken für die Lipoxygenase und die Peroxidase charakterisiert und die Trypsininhibitoraktivität analysiert. Anschließend wurde im Rahmen der Entwicklung eines hydrothermischen Verfahrens und unter Berücksichtigung variierender Prozessstufen die Effizienz auf die Inaktivierung der Peroxidase geprüft (AP2). Meilenstein 2 wurde damit in Projektjahr 2, wie ursprünglich geplant, erreicht. Des Weiteren wurde untersucht, ob durch Siebung in kleinere Partikelgrößen der Phytinsäuregehalt reduziert werden konnte (AP3).

Basierend auf der Analyse zum Löslichkeitsprofils über den pH-Wert Bereich 2-9 (AP4) wurden anschließend wässrige Extraktionen bei pH 7,5 durchgeführt (AP3). Zunächst wurde im Rahmen des Extraktionsprozesses folgende Prozessparameter variiert (s:L Verhältnis, Temperatur). Anschließend wurde im Rahmen der Konzentrierung mittels isoelektrischer Fällung (IEP) unter Variation des pH-Wert Bereichs untersucht, inwieweit sich die Proteine aufkonzentrieren ließen.

In Projektjahr drei wurde die Proteingewinnung von Konzentraten mittels Ultrafiltration (UF) durchgeführt (AP3) und die Analysen zu den funktionellen Eigenschaften und der Sensorik (AP4) ergänzt. Ebenso erfolgte der Scale-up des vielversprechendsten Verfahrens zur Übertragbarkeit des Prozesses in den großtechnischen Maßstab (AP3). Zudem wurden weitere ANF, wie der Gehalt an kondensierten Tanninen und der Vicingehalt für ausgewählte Kernmehle, hydrothermisch behandelte Mehle sowie Proteinkonzentrate quantifiziert (AP1, AP4). Modellrezepturen für den Einsatz von nativem, hydrothermisch behandeltem Ackerbohnenmehl sowie Konzentraten zur Herstellung von Rührkuchen, veganen Burger-Patties und Desserts wurden entwickelt und der sensorische Einfluss auf Geruch und Geschmack bewertet (AP5).

## **2. Stand des Wissens und der Technik**

Ackerbohnen weisen verschiedene antinutritive Inhaltsstoffe auf, die einerseits die Absorption von Mineralstoffen (Phytinsäuren), die Verdaubarkeit von Proteinen (kondensierte Tannine, Trypsininhibitoren) behindern oder gar eine hämolytische Anämie (Favismus – durch Vicin) auslösen können. Zudem geht aus der Literatur hervor, dass endogene Enzyme zu einem bitteren und grasigen Aromaprofil beitragen, das auf Konsumentenseite vorrangig für die Ablehnung pflanzlicher Zutaten und Lebensmittel verantwortlich ist. Vor diesem Hintergrund sind für die Anwendung von Ackerbohnenmehlen und –Konzentraten prozesstechnische Maßnahmen notwendig, die eine Abreicherung von ANF ermöglichen und/ oder darüber hinaus endogene Enzyme und Trypsininhibitoren eliminieren und so zu einer Verbesserung sensorischer Eigenschaften beitragen. Dennoch sollen die vielversprechenden funktionellen Eigenschaften der Ackerbohnenproteine weitestgehend erhalten werden, um in Lebensmitteln als neue funktionelle und ernährungsphysiologisch wertvolle Proteinzutat eingesetzt werden zu können.

## Strategien zur Reduktion des Anteils an Antinutritive Faktoren (ANFs)

Wie im vorherigen Abschnitt genannt, enthält die Ackerbohne eine Vielzahl antinutritiver Faktoren (ANFs). Technologische Ansätze wie Schälen, Einweichen, Keimen, Garen oder Fermentieren zur Reduktion von ANFs sind in der Literatur zahlreich beschrieben. Die Reduktion von Tanninen durch Einweichen in Wasser, Schälung oder Erhitzung wurde von Mutra et al. 2016 beschrieben. Ebenso ließen sich Vicin/ Convicin durch Einweichen in Wasser reduzieren (Mulatory et al., 2015). Zudem wurde der Phytinsäuregehalt durch Schälen, Einweichen in Wasser, Erhitzen oder Keimen um bis zu 70 % gesenkt (Mulatory et al., 2015). Bei Proteaseinhibitoren waren ein alkalisches Milieu und/oder Hitze für die Inaktivierung notwendig (Muschiolik & Schmandke, 2000). Hohe Temperaturen gehen allerdings immer mit dem Verlust der funktionellen Eigenschaften einher. Im Rahmen von QualiFabaBean sollte daher die Anwendbarkeit kombinierter Verfahren (Schälung, Erhitzung, wässrige Extraktion, Filtration) und deren Eignung auf die Reduktion des ANF Gehalts untersucht werden. Dabei sollten primär die funktionellen Eigenschaften erhalten bleiben und die sensorische Attraktivität gesteigert werden.

## Endogene Enzyme in Ackerbohnen

Endogene Enzyme wie Lipoxygenase (LOX) beeinflussen die Qualität von Mehlen, indem sie durch die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Entstehung von grünen und bohnenigen sowie anderen Leguminosen-typischen Aromen beitragen (Rackis, Sessa, & Honig, 1979). Neben LOX werden auch Peroxidasen (POD) und Lipasen hinsichtlich ihres negativen Einflusses auf die sensorischen Eigenschaften diskutiert. Es wurden bereits einige thermische und nicht thermische Verfahren zur Inaktivierung der Enzyme sowie zur Reduktion von Trypsininhibitor-Aktivitäten untersucht (HENDERSON, BLANK, & SUSTACKOVA, 1991; Ludikhuyze, Van Loey, Denys, & Hendrickx, 2001; Stephany, Eckert, Bader-Mittermaier, Schweiggert-Weisz, & Carle, 2016). Der Einfluss einer hydrothermischen Saatenkonditionierung wurde bislang nicht analysiert, so dass im Rahmen von QualiFabaBean die erforderlichen Inaktivierungsbedingungen für die endogenen Enzyme (Zeit-Temperatur-Einstellungen) ermittelt wurden.

## Herstellung von Ackerbohnenproteinkonzentraten unter Abreicherung von ANFs

Die Gewinnung von Proteinen lässt sich in einen Konzentratprozess sowie einen Isolatprozess gliedern. So erfolgt im Konzentratprozess über eine trockentechnische Fraktionierung, die Extraktion am isoelektrischen Punkt, über wässrig-alkoholische Extraktion oder die hydrothermische Behandlung kombiniert mit wässriger Extraktion die Abtrennung löslicher Nicht-Proteinbestandteile (Boye, Zare, & Pletch, 2010; Menner, Müller, Pickardt, & Eisner,

2009. Das anschließend stabilisierte und getrocknete Proteinkonzentrat setzt sich somit aus Proteinen und Ballaststoffen zusammen. Im Gegensatz dazu wird im Isolatprozess die lösliche Fraktion, bestehend aus Proteinen, Zucker, sekundären Pflanzenstoffen, durch isoelektrische Fällung (IEP) oder Ultrafiltration (UF) aufkonzentriert. Nach entsprechender Stabilisierung, Trocknung und ggf. Modifikation erhält man auf diese Weise ein Proteinisolat. Als Extraktionsmedium kommen Wasser, saure oder wässrig-alkoholische Lösungen zum Einsatz. Vor allem der pH-Wert kann dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe haben. Aus der Literatur geht hervor, dass die Löslichkeit der Phytinsäure in einem pH-Wert Bereich von 4-5 deutlich geringer (< 50 %) im Vergleich zu einem neutralen bis alkalischen pH-Wert ist. Ein Verfahren bei dem die Ackerbohnenprotein zunächst alkalisch extrahiert und anschließend isoelektrisch gefällt wurden, ist von (Sosulski & McCurdy, 1987) beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde der Einfluss einer sauren Vorextraktion auch unter Berücksichtigung der Reduktion des Phytinsäuregehalts in Ackerbohnen bislang nicht untersucht und soll im Rahmen von QFB analysiert und evaluiert werden. Dazu wurde im Rahmen von QualiFabaBean eine Kombination aus Verfahrensschritten der Konzentrat- und Isolatgewinnung zur Herstellung der Konzentrate verwendet.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Zur Charakterisierung der Ackerbohnen wurden 12 Genotypen aus den Erntejahren (2016/2017), unterschiedlicher Standorte (u.a. Frankenhausen, Zeitlofs, Kranzberg) ausgewählt (siehe Tabelle 1). Laut Angaben der Lieferanten war die Sorte Taifun tanninfrei und die Sorten Tiffany 2, Tiffany 3 und Melodie vicin- und convicinarm sind. Um auf eine ausreichende Menge an Probenmaterial zuzugreifen, wurde die Sorte Tiffany 4 ergänzt und zwei kommerziell verfügbare Mehle (ABM1, ABM2) mit aufgenommen. Für den Versuch im Technikumsmaßstab wurde ein in großen Mengen industriell verfügbares Ackerbohnenmehl ABM2 eingesetzt.

**Tabelle 1 Überblick der verwendeten Ackerbohnen genotypen.**

Genotyp	Erntejahr	Lieferant
Vicia 1	2016	
Vicia 2	2016	
Tiffany 1	2016	
Tiffany 2	2017	Kranzberg
Divine	2016	n.b.
Fanfare 1	2016	n.b.
Taifun	2017	Frankenhausen
Fanfare 2	2017	Frankenhausen
Tiffany 3	2017	Frankenhausen
Fuego	2017	Frankenhausen
Det Pop	2017	Zeitlofs
Melodie	2017	Frankenhausen
Tiffany 4	2018	NPZ
ABM1	2018	
ABM2	2020	

Abk. n.b. : nicht bekannt.

In Abhängigkeit der Ackerbohnen Genotypen und der Anwesenheit von antinutritiven Inhaltsstoffen werden zudem auch die Ernteerträge beeinflusst. Tabelle 2 gibt einen umfassenden Überblick der Erträge von im Projekt untersuchten Ackerbohnen (\*markiert) sowie für weitere Genotypen. Die Daten wurden an dieser Stelle von Herrn Quendt, Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen (LLH) und Koordinator des Demonetzwerks Erbse/Bohne, zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2 Überblick der Erträge ausgewählter Ackerbohnen relativ zur Bezugsbasis für den Standort Frankenhausen.**

Frankenhausen				
	2017		2016	Mittel 2016-2017
Genotyp	rel. Zur BB		rel. Zur BB	rel. Zur BB
Albus TA	93		90	91
Bilbo TH	101		92	97
Isabell TH	99		95	97
*Fuego TH	101		105	103
*Fanfare TH	100		110	105
*Taifun TF	93		90	91
*Tiffany TH, V-CVA	103		105	104
Mittel BB dt/ha	52,1		45,8	91

Dargestellt sind die Erträge für die Jahre 2016/2017. Abkürzungen: BB: Fuego, IsabellTH: Tanninhaltig; TF: Tanninfrei; TA: Tanninarm; V-/CVA: Vicin-/Convicinarm; V-/CVF: Vicin-/Convicinfrei, \*: im Projekt untersuchte Ackerbohnen Genotypen

Im direkten Vergleich langjährig geprüfter Ackerbohnen Sorten, zählen die Sorten Fuego, Isabell und Fanfare zu den Genotypen mit der höchsten Ertragssicherheit. Insbesondere wurde beobachtet, dass die Züchtung auf tanninarme bzw. tanninfreie Sorten, wie Albus oder Taifun mit Ertragseinbußen einhergeht. Die Daten zeigen zudem, dass die neuere Sorte Tiffany die höchsten Erträge in den Erntejahren 2016/ 2017 lieferte und darüber hinaus laut Züchterangaben vicinarm ist. Auf Basis dieser Daten wurden die in QualiFabaBean untersuchten Sorten in Rücksprache mit Herrn Quendt und Frau Jacob ausgewählt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Vermahlung der Ackerbohnen saaten

Die 12 Ackerbohnen-Genotypen wurden für das Sortenscreening auf den Anlagen des IVV vorbereitet. Dazu wurde die Rohfrucht mittels Unterläufer-Schälgang und Zick-Zack-Sichtung in eine Kern- und eine Schalenfraktion getrennt. Für die nachfolgende analytische Grundcharakterisierung wurden die Trockenfraktionen (Saat, Kerne, Schalen) mittels Ultrazentrifugalmühle und einem Sieb der Maschenweite 0.5 mm unter vorheriger Zugabe von flüssigem Stickstoff zur Vermeidung von Oxidation und zur Verringerung der Temperaturbelastung vermahlen. Die Mehle wurden bei konstanter Temperatur bis zur Analyse gelagert.

### 3.2.2 Hydrothermische Behandlung von Ackerbohnenmehlen

Zur Inaktivierung der endogenen Enzyme, welche die sensorischen Attribute maßgeblich mit beeinflussen, wurde eine hydrothermische Behandlung mittels Hitze-Dampf Verfahren (HD) im Konvektomat sowie in einem Druck-Dampf Garer (DD) durchgeführt. Die Bestimmung der Trypsininhibitor-Aktivität, der Peroxidase- und Lipoxygenase-Aktivität erfolgte mit den im Kapitel 3.2.6 beschriebenen Methoden.

### 3.2.3 Extraktion von Ackerbohnenproteinen

#### Wässrige Extraktion und isoelektrische Fällung

Für die Extraktionen im Labormaßstab wurden die Ackerbohnenmehle der Sorte (Tiffany 4 und Fanfare 1) eingesetzt. Leitungswasser wurde in einem 4 L Reaktor (Normschliff Gerätebau, Werthem) vorgelegt, das Ackerbohnenmehl in dem entsprechenden Verhältnis hinzugefügt und bei 200 U/min (Eurostar 50-2000, IGA-Werke, Staufen) mit einem Ankerrührer eingerührt. Nach Einstellung des Feststoff-zu-Lösemittel-Verhältnisses (1:5; 1:10) wurde der pH-Wert mit 3 M NaOH oder 3 M HCl eingestellt und der Extraktionsansatz temperiert. Die Ackerbohnenproteine wurden für eine Stunde unter Rühren (200 U/min) extrahiert und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 4000 zentrifugiert (Zentrifuge 8 K, SIGMA, Osterode am Harz). Die Proteine im Extrakt wurden durch pH-Wert Absenkung mit einer 3 M HCl ausgefällt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei gleichen Einstellungen (4000 g für 20 min). Das gewonnene Isolat wurde neutralisiert und gefriergetrocknet. Die Prozessschritte während der Proteinextraktion sind in Abbildung 1 dargestellt.

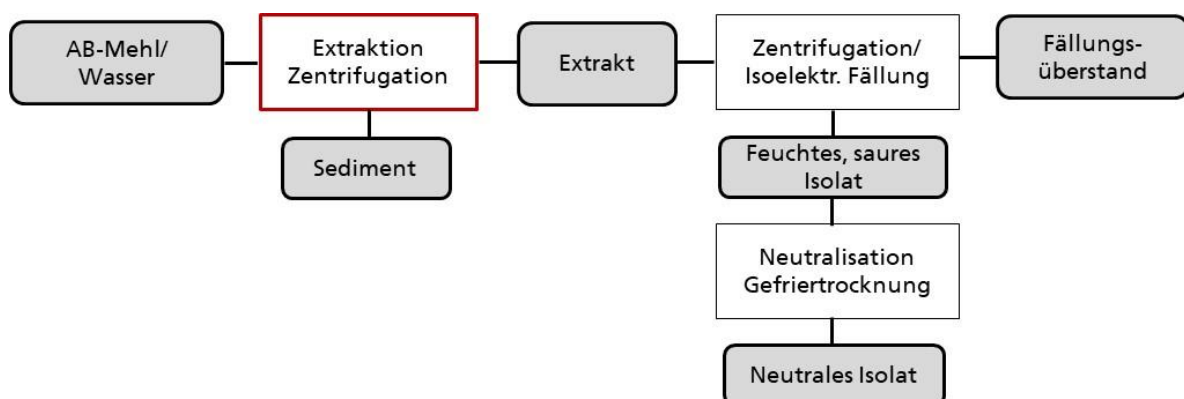
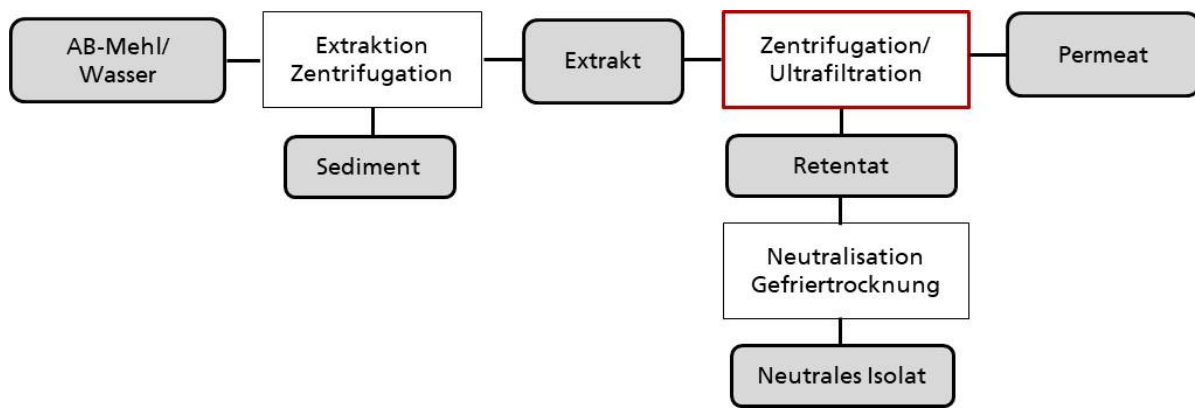


Abbildung 1 Prozessschritte und (Neben-)produkte der wässrigen Extraktion mit anschließender isoelektrischer Fällung.

Das gewonnene Isolat wurde anschließend auf eine Konzentration von 13 % mit Leitungswasser verdünnt und verrührt. Danach wurde das Isolat auf einen pH-Wert von 7,0 mit 3 M NaOH und bei geringer Isolatmenge mit 1 M NaOH eingestellt und in 500 ml Aluschalen gefüllt. Diese wurden bei -50 °C eingefroren und anschließend, je nach Probenmenge für 48 bis 72 Stunden, gefriergetrocknet. Mit einem Mörser wurden die getrockneten Isolat pulverisiert und bis zur Analyse in geschlossenen Behältern bei 14 °C gelagert.

### Wässrige Extraktion mit Ultrafiltration

Ergänzend zur IEP wurde der Einfluss einer Ultrafiltration (UF) untersucht. Hierzu wurde der unter Standardbedingungen (pH 7,5, 30°C, 60 min) hergestellte Extrakt mit 3 M HCL auf pH 6,8 eingestellt und mittels einer 10 kDa Membran bei 30°C ultrafiltriert. Die Prozessschritte während der Proteinextraktion sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2 Prozessschritte bei der wässrigen Extraktion mit anschließender Ultrafiltration.**

### Saure Vorextraktion

Zur Abtrennung von Phytinsäure wurde zudem der Einfluss einer sauren Vorextraktion (SVE) auf die Gewinnung der Proteinkonzentrate analysiert. Dazu wurde das Ackerbohnenmehl und Wasser in einem Verhältnis von 1:16 in einem 4L Reaktor unter Rühren (200 U/min) 105 Minuten extrahiert (siehe Abb. 3). Der pH-Wert wurde mit 3 M HCl auf 4,5 bzw. 5,5 eingestellt, die Temperatur betrug 30 °C. Durch Zentrifugation (20 °C, 4000\*g, 20 min) wurde der saure Extrakt vom Sediment abgetrennt. Das Sediment wurde als Feuchtmasse 1:10 mit Wasser gemischt und wie oben beschrieben extrahiert und die Proteine durch isoelektrische Fällung gewonnen.

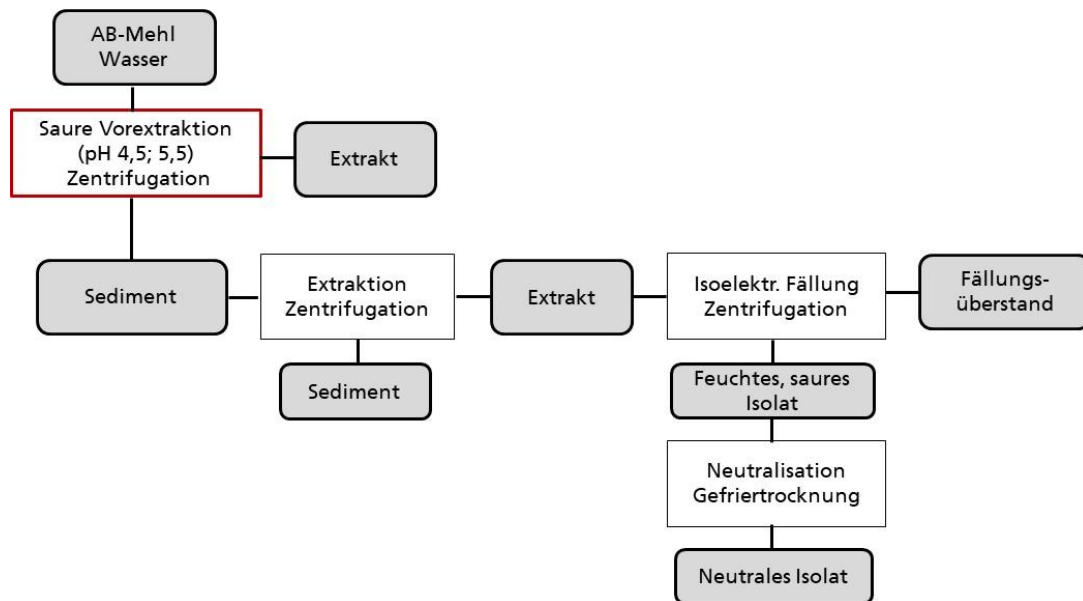


Abbildung 3 Prozessschritte bei der sauren Vorextraktion mit anschließender Extraktion und isoelektrischer Fällung.

### Zielgrößen zur Bilanzierung

Die Bewertung des Einflusses von Prozessparametern und Prozessschritten während der Gewinnung von Proteinkonzentraten aus der Ackerbohne erfolgte anhand folgender Zielgrößen: Trockensubstanzausbeute (TMA) und Proteingesamtausbeute (PGA), die sich mittels der Gleichungen 1 und 2) berechnen lassen:

$$\text{TMA [\%]} = \frac{m_x \times TS_x}{m_x \times TS_x} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{PGA [\%]} = \frac{m_x \times TS_x \times \text{Protein}_x}{m_M \times TS_M \times \text{Protein}_M} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.4 Bestimmung der analytischen Zusammensetzung

#### Trockensubstanzgehalt

Zur Bestimmung des Trockensubstanzgehalts wurden die festen und flüssigen Proben in einem Keramiktiegel im Ofen (TGA 601 Leco Instrumente, Mönchengladbach) auf  $105 \pm 2$  °C erhitzt, um das enthaltene Wasser zu verdampfen. Der Trockensubstanzgehalt wurde dann gravimetrisch bestimmt und durch die Software des Geräts berechnet (IVV, 2014 a).

#### Proteingehalt

Der Proteingehalt wurde anhand des Stickstoffgehalts nach der Methode von DUMAS bestimmt. Dazu wurde eine feste oder flüssige Probe in einen Keramiktiegel abgewogen und in dem Verbrennungsrohr seiner atmosphärischen Gase entzogen. Danach wurde der Tiegel in den Brennraum des Ofens geschoben und komplett verbrannt. Die Verbrennungsgase werden in einem Sammelbehälter gefüllt unter ständiger Beobachtung von Druck und Temperatur. Der  $\text{NO}_x$ -Anteil der homogenisierten Gase wurde dann im Reduktionsofen in  $\text{N}_2$  umgewandelt. Zur Berechnung des Rohproteingehaltes wurde das Resultat mit einem Verhältnisfaktor von 6,25 multipliziert (IVV, 2012).

#### Aschegehalt

Zur Bestimmung des Aschegehalts wurden die festen und flüssigen Proben in einem Keramiktiegel im Ofen (TGA 601 Leco Instrumente, Mönchengladbach) bei 550 °C verascht und danach geglüht. Somit blieben die anorganischen Inhaltsstoffe der Probe als sogenannte Asche (Glührückstand) zurück. Der Aschegehalt wurde dann gravimetrisch durch Differenzwägung bestimmt und durch die Software des Geräts berechnet (IVV, 2014 b).

#### Fettgehalt

Der Bestimmung des Fettgehalts wurde nach der Methode von Soxhlet bestimmt. Dazu wurden 1 g Probenmaterial in eine Extraktionshülse eingewogen. Die Extraktion erfolgte mittels der Büchi Apparatur B811, wobei als Lösungsmittel n-Hexan zum Einsatz kam. Die Extraktionsdauer betrug 6 Stunden und umfasste somit mindestens 30 Extraktionszyklen.

#### Stärkegehalt

Die Bestimmung des Stärkegehalts erfolgte enzymatisch mittels Stärke Testkit der Fa. r-biopharm. Um die Stärke in eine lösliche Form zu überführen, wurden die Proben mit Dimethylsulfoxid DMSO und Salzsäure inkubiert. Nach Anpassen des pH-Werts (pH 4-5), wurden die Proben auf ein konstantes Volumen aufgefüllt und filtriert. Diese Ansätze wurden zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt. Durch Spaltung der Stärke mittels Amyloglucosidase entsteht D-Glucose, die nach Phosphorylierung durch Hexokinase durch NADP oxidiert wird. Das dabei entstandene NADPH wurde photometrisch bei 365 nm bestimmt. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten D-Glucose-Menge proportional.

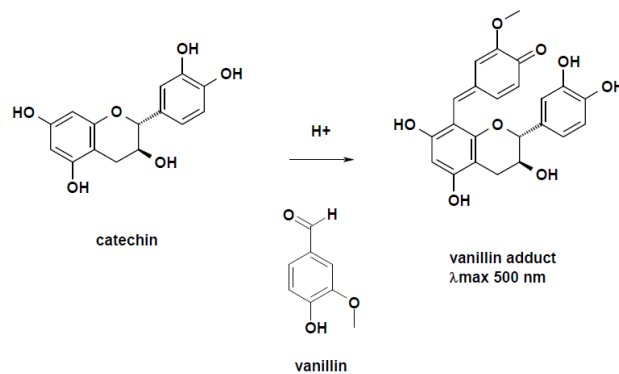
### **3.2.5 Bestimmung antinutritiver Inhaltsstoffe**

#### Bestimmung der Oligosaccharidgehalte

Die Bestimmung der Oligosaccharide erfolgte mittels High Performance Anion Exchange Chromatography unter Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). Die Auftrennung der Oligosaccharide fand in einer CarboPac PA10 Säule und CarboPac PA10 Vorsäule (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) statt. Die Probenextraktion und Aufbereitung sowie die Bedingungen der Fließmittel wurden in Anlehnung an Fritsch, Vogel & Toelstede (2015) durchgeführt.

### Bestimmung kondensierter Tannine

Die Bestimmung von kondensierten Tanninen unterliegt dem in Abbildung 4 dargestellten Reaktionsprinzip und wurde in Anlehnung an einen modifizierten Vanillin-HCl Assay nach Hagermann (2002) durchgeführt. Dabei reagiert das aromatische Aldehyd Vanillin mit dem metasubstituierten Ring des Flavonols, unter Ausbildung einer bei 500 nm photometrisch messbaren, rötlichen Färbung.



**Abbildung 4: Reaktion des Vanillin-HCl-Assays.**

Quelle: Hagermann, 2002.

Für die Extraktion wurden jeweils 0,2 g der Probe in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 10 mL der Methanol-Lösung mit 1% Salzsäure versetzt und auf einem Vortexer gemischt. Anschließend wurden die Proben in einem Ultraschallbad bei 30 °C extrahiert. Nach 20 Minuten erfolgte eine Zentrifugation bei 3.000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein Zentrifugenröhrchen bis zur Analyse auf Eis gelagert. Zur Herstellung des Catechin-Standards wurden 3,0 mg (+)-Catechin in einen 10 mL Messkolben eingewogen und in ca. 5 mL absolutem Methanol gelöst. Die Lösung wurde anschließend auf ein Volumen von 10 mL mit absolutem Methanol aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte in einer dunklen Flasche bei 4 °C für drei Tage. Der Catechin-Standard (Konzentration von 0,3 [mg · (mL)<sup>-1</sup>]) wurde für die Standardlösungen verdünnt. Für die Standardreihe wurde die Stammlösung in folgenden Konzentrationen mit absolutem Methanol in Reagenzgläsern verdünnt (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Standardreihe mit entsprechender Catechin-Konzentration.**

Standard	Konzentration Catechin [mg · (mL) <sup>-1</sup> ]
0	0
1	0,06
2	0,12
3	0,18
4	0,24
5	0,3

Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte nach dem Pipettierschema (vgl. Tabelle 4). Dabei wurde einer Standardreihe die Methanol-Lösung (4% HCl) hinzugegeben und der zweiten Standardreihe das Vanillin-Reagenz. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte im 2 Minuten-Abstand.

**Tabelle 4: Pipettierschema zur Erstellung der Kalibriergerade für die Tanninbestimmung.**

	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
Catechin-STD [mL]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Abs. Methanol [ml]	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Inkubation im Wasserbad bei 30 °C						
Vanillin- Reagenz bzw. 4% HCl-in Methanol [ml]	5	5	5	5	5	5
Inkubation für 20 min bei 30 °C						

Für die Auftragung und anschließende Quantifizierung wurde die Absorption der Standardreihe mit der 4% HCl in Methanol-Lösung (Blank) von der Absorption der Standardreihe mit dem Vanillin-Reagenz abgezogen. Diese Absorption wurde anschließend gegen die Catechin-Konzentration [mg/ (mL)] aufgetragen, wobei eine Kalibriergerade entsteht.

Das Pipettierschema zur Bestimmung der Tannin-Gehalte ist Tabelle 5 zu entnehmen. Dabei entspricht der Sample Blank (SB) der Absorption, die durch die Probe während eines Testvorgangs verursacht wird.



**Tabelle 5: Pipettierschema zur Tanninbestimmung.**

	<b>Probe</b>	<b>SB</b>
Probenextrakt [mL]	1	1
Inkubieren im Wasserbad bei 30 °C		
Vanillin-Reagenz [mL]	5	0
4% HCl in Methanol [mL]	0	5
Exakt 20 Minuten bei 30°C inkubieren		

Nach genau 20 Minuten wurde die Probe bei 500 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten Kalibriergerade. Mittels der Geradengleichung wurde der Tannin-Gehalt als Catechin-Äquivalent in der Ackerbohne berechnet. Dafür wird die erhaltene Geradengleichung aus den Standards nach x umgestellt, wobei x der Catechin-Konzentration [ $\text{mg} \cdot (\text{mL})^{-1}$ ] und y der Absorption entspricht. Aufgrund der Einwaage von 0,2 g Probe pro 10 mL Methanol-Lösung, das einer Probenmenge von 0,02 g pro mL entspricht, kann mit Hilfe von Gleichung 3 der Tanningehalt ( $\beta$ ) als Catechin-Äquivalente [ $\text{g} \cdot (100)^{-1}$ ] berechnet werden.

$$\beta [\text{g} \cdot (100)^{-1}] = x \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] \cdot 5 \quad (3)$$

- x [ $\text{mg} \cdot (\text{mL})^{-1}$ ]      Aus Geradengleichung ermittelter Catechin-Gehalt pro mL Extrakt (1 mL Extrakt = entspricht dem Gehalt in 0,02 g Probe)
- 5                              Umrechnungsfaktor von [ $\text{mg} \cdot (0,02 \text{ g})^{-1}$ ] zu [ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ ]

### Bestimmung des Phytinsäuregehalts

Die Bestimmung des Phytinsäuregehalts erfolgte mittels „Phytic Acid Assay Kit“ der Fa. Megazyme. Dazu fand zunächst ein enzymatischer Probenaufschluss mittels Phytase und alkalischer Phosphatase statt. Durch Zugabe von Ammoniummolybdat und  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Ascorbinsäure wird ein Farbstoff gebildet, der photometrisch bestimmt werden kann (siehe Abbildung 5). Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der Formel 4.

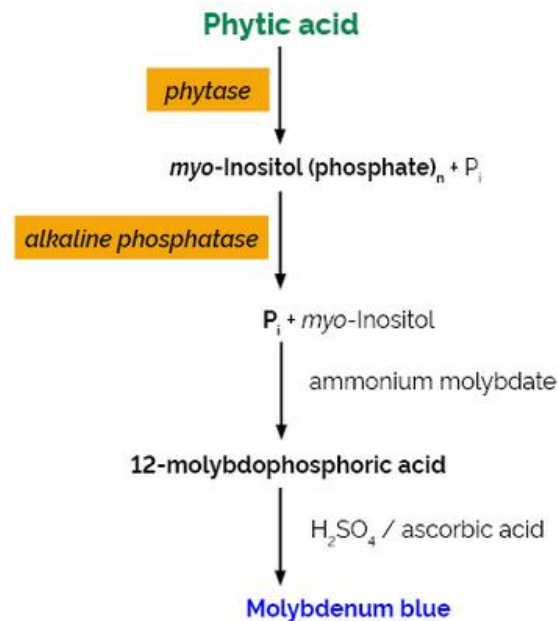


Abbildung 5: Reaktionsschema zum Nachweis des Phytinsäure.

$$C = \frac{M \cdot 20 \cdot F}{10.000 \cdot E \cdot v} \cdot \Delta A_{Phosphor} \quad (4)$$

Mit	M	mittlere Gehalt des Phosphor-Standards [ $\mu\text{g}/\Delta A_{\text{Phosphor}}$ ]
	20	Extrakt-Volumen
	F	Verdünnungsfaktor
	$\Delta A$	Absorptionswechsel der Probe
	10.000	Umrechnung von $\mu\text{g/g}$ in $\text{g}/100\text{g}$
	E	Einwaage Probe [g]
	v	Proben-Volumen

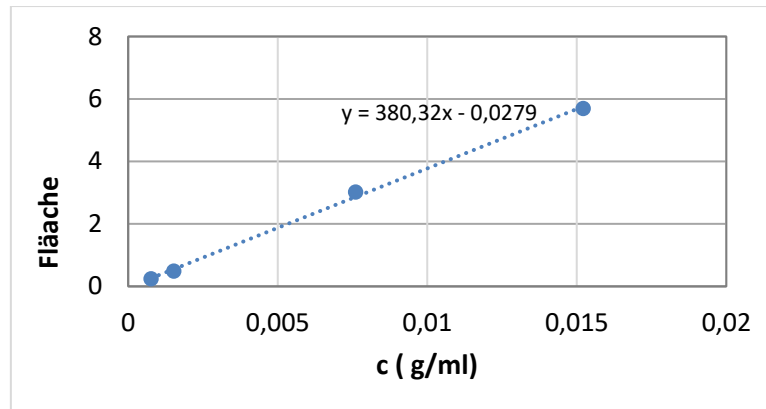
### Bestimmung des Vicin und Convicin Gehalts

Zur Bestimmung der Vicin und Convicin Gehalte wurden die Ackerbohnenkernmehle zunächst in Anlehnung an die Methode von (Purves, Khazaei, & Vandenberg, 2018) extrahiert. Dazu wurden ca. 30 mg Probenmaterial mit 500  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser vermischt, 5-10 Sekunden gevortext und für 30 Minuten bei 1,400 rpm in einem Eppendorf Thermo Mixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand von 400  $\mu\text{L}$  in ein Eppendorf-Tube überführt. In einem zweiten Extraktionsschritt wurde dem Rückstand erneut 500  $\mu\text{L}$  HPLC-Wasser zugegeben und das Vortexen, Inkubieren und Zentrifugieren wiederholt. Erneut wurden 400  $\mu\text{L}$  des Überstand mit dem bereits vorhandenen 1. Überstand zu insgesamt 800

$\mu\text{L}$  Rohextrakt kombiniert und gemischt. Ein Aliquot von  $20 \mu\text{L}$  wurde entnommen und in ein HPLC Vial mit  $980 \mu\text{L}$  (90:10 Acetonitril: Wasser) für die Analyse überführt.

Die Quantifizierung des Vicin Gehalts erfolgte mittels High Performance Liquid Chromatography (Ultimate Q300 HPLC) unter Anwendung eines LC-UV Detektors.

Die Kalibriergerade zur Berechnung der Vicin Gehalte ist Abbildung 6 zu entnehmen.



**Abbildung 6:** Kalibriergerade zur Quantifizierung von Vicin in Ackerbohnenmehlen und -konzentraten.

Die Berechnung der Convicin Gehalte erfolgte in Anlehnung an das Lambert Beersche Gesetz (siehe Gleichungen 5 und 6).

$$\text{Vicin: } E_V = \varepsilon_V \times c \times d \quad (5)$$

$$\text{Convicin: } E_C = \varepsilon_C \times c \times d = \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_V} \times \varepsilon_V \times c \times d \quad (6)$$

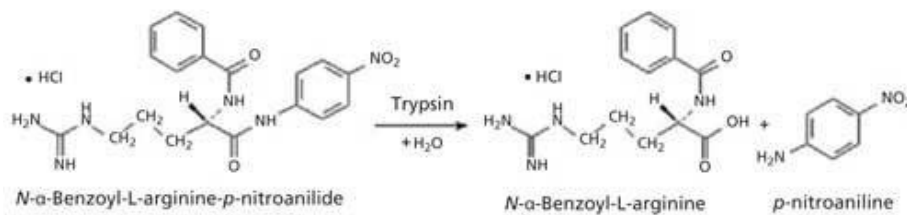
Der Korrekturfaktor für Convicin wurde berechnet aus den molarem Extinktionskoeffizienten; diese sind für Vicin:  $\varepsilon = 16,400 \text{ mol/cm}$  und für Convicin:  $\varepsilon = 17.400 \text{ mol/cm}$ , woraus sich der Korrekturfaktor von 1,06 ergab.

### 3.2.6 Bestimmung der endogenen Enzymaktivität

#### Bestimmung der Trypsininhibitor-Aktivität

Die Bestimmung der Trypsininhibitor-Aktivität (TIA) erfolgte mit der am Fraunhofer IVV etablierten Standardmethode. Dazu wurde das Substrat Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilidehydrochloride (BAPA) verwendet (Hamerstrand, Black, & Glover, 1981). Die Extraktion der Trypsininhibitoren (TI) aus den Ackerbohnenproben erfolgte in einer  $0,1 \text{ M NaOH}$  Lösung (pH-Wert 9,9) für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem definierten Pipettierschema (siehe

Tabelle 8) wurde dem Enzymrohextrakt sowohl Trypsin als auch das Substrat BAPA hinzugegeben. Dabei kann Trypsin das Substrat BAPA spalten und es entsteht ein farbiges Chromophor *p*-Nitroanilin (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Reaktionsschema zum Nachweis der Trypsininhibitor-Aktivität.**

Die gemessene Extinktion ist dabei proportional zur Trypsin-Aktivität. Durch die Anwesenheit von TI im Enzymrohextrakt wird die *p*-Nitroanilin-Freisetzung reduziert, da die Aktivität des Trypsins gehemmt wird (Panta, 2017). Der Sample Blank (SB) ist identisch zur Probe und enthält den Enzymrohextrakt, wohingegen der Reagenzien Blank (RB) nur die Reagenzien und anstelle des Extraktes Wasser enthält. Durch Differenz dieser Werte kann die TIA ermittelt werden (Hamerstrand et al., 1981).

Für die Auswertung ist eine Trypsin Unit (TU) definiert, als der Absorptionsanstieg von 0,01 pro 10 mL Reaktionslösung. Zuerst werden dabei mit Hilfe des Sample Blanks die Absorptionen korrigiert (siehe Formel 7). Anschließend wird die Trypsin-Aktivität in Trypsin-Units (TU) mittels Formel 8 bestimmt. Daraus kann mit Hilfe der Formel 9 die Trypsininhibitor-Aktivität (TIA) (bzw. Trypsininhibitor-Units (TIU)) berechnet werden.

$$Abs_{korr} = Abs_{Probe} - Abs_{SB} \cdot (V_{Extrakt} \text{ 2 mL}) \quad (7)$$

$Abs_{korr}$  mit Sample Blank korrigierte Absorption [nm]

$Abs_{Probe}$  Absorption der Probe [nm]

$Abs_{SB}$  Absorption des Sample Blanks [nm]

$V_{Extrakt}$  Extraktvolumen [mL]

$$\text{Aktivität [TU10 min]} = Abs_{korr} \cdot 100 \quad (8)$$

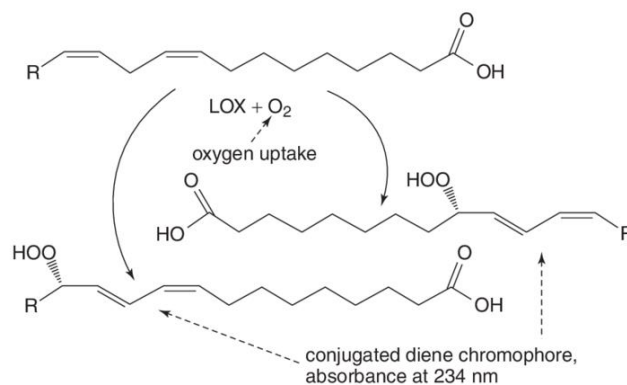
$$\text{TI-Aktivität [TIUmL Probelösung]} = (Abs_{0 \text{ mL Probe}} - Abs_{x \text{ mL Probe}}) \cdot 100 \quad (9)$$

$Abs_{0 \text{ mL Probe}}$  mit Sample Blank korrigierte Absorption bei 0 mL Probe [nm]

$Abs_{2 \text{ mL Probe}}$  mit Sample Blank korrigierte Absorption bei x mL Probe [nm]

## Bestimmung der Lipoxygenase-Aktivität

Die von der Lipoxygenase (LOX) katalysierte Reaktion ist vor allem die Dioxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in konjugierte Hydroperoxide (Bińczak, Samotyja, & Małeczka, 2016). Wichtig für den Ablauf der Reaktion ist das Vorhandensein einer *cis-cis*-1,4-Pentadien-Struktur in der Fettsäure sowie die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und einem Substrat (Schweigert, Schieber, & Carle, 2005). Zu den geeigneten Substraten zählen vor allem freie Fettsäuren, die eine Methylgruppe zwischen zwei Doppelbindungen aufweisen, wie beispielsweise die Linol- und Linolensäure. Die Reaktion der LOX mit geeigneten Substraten gliedert sich in drei Schritte. So wird zuerst der Wasserstoff aus der Methylgruppe, die sich zwischen zwei Doppelbindungen befindet, entfernt, wodurch ein Radikal entsteht. Anschließend wird das Radikal in konjugierte Diene umgewandelt und zuletzt erfolgt eine stereospezifische Einbringung von Sauerstoff in das Substratmolekül, wodurch ein Hydroperoxid gebildet wird. Die primären Reaktionsprodukte, die aus der Linolensäure gebildet werden, sind 9- und 13-Hydroperoxide (siehe Abbildung 8) (Bińczak et al., 2016).



**Abbildung 8: Mechanismus der Lipoxygenase.**

Quelle: Bińczak et al., 2016.

Für die Extraktion wurden jeweils 0,1 g der Probe in ein Becherglas eingewogen und die löslichen Proteine und Enzyme mit 20 mL Phosphat-Puffer (pH 6,5) für 15 Minuten bei 4 °C extrahiert. Der Enzymrohextrakt wird nach dem Pipettierschema (siehe Tabelle 7) mit den benötigten Reagenzien versetzt, SB steht hierbei für „Sample Blank“ mit inaktiviertem Enzym und RB meint den „Reagenzien Blank“.

**Tabelle 6: Pipettierschema zur Bestimmung der Lipoxygenase-Aktivität.**

	Probe	SB	RB
Phosphat Puffer pH x [μL]	1.100	1.100	1.200
Enzymrohextrakt [μL]	100	0	2

Inaktiviertes Enzym [ $\mu\text{L}$ ]	0	100	0
Substrat mit Linolsäure [ $\mu\text{l}$ ]	120	120	120

Für die Bestimmung der Enzymkinetik erfolgte eine photometrische Messung für insgesamt 10 Minuten in 30 Sekunden Intervallen bei 234 nm. Alle Messungen für die pH-Wert Kinetik wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, für die Temperaturkinetik erfolgten die Messungen bei angepasster Temperatur (20 °C bis 90 °C).

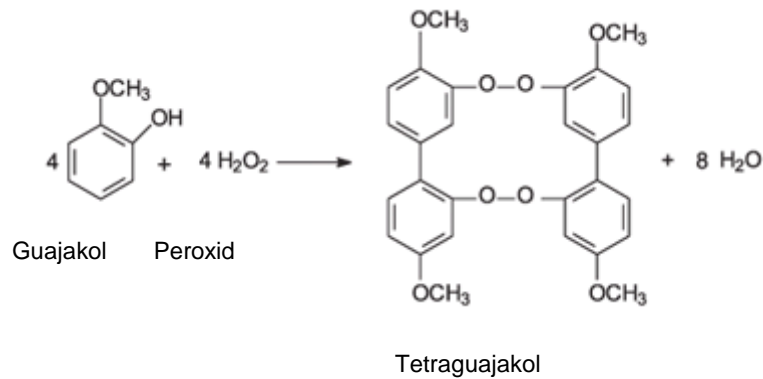
Mittels Formel 10 wurde anschließend die Enzymaktivität [ $\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE}^{-1})$ ] berechnet. Die Probe und der Sample Blank (inaktiviertes Enzym) wurden um den Reagenzien Blank (RB) korrigiert. Anschließend wurde ein Zeitfenster von 60 Sekunden mit einem linearen Absorptionsanstieg gewählt und der Absorptionsanstieg  $\Delta A$  pro Minute evaluiert. Die Enzymaktivität wurde definiert als eine Erhöhung der Absorption von 0,001 pro Minute bei 234 nm unter Testbedingungen (THEERAKULKAIT & BARRETT, 1995). Zuletzt wurde die Enzymaktivität auf den Proteingehalt in der Probe, welcher mittels Bradford Assay quantifiziert wurde, bezogen.

$$E_A[\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE})^{-1}] = \Delta A \cdot \frac{V[\mu\text{L}]}{v[\mu\text{L}]} \cdot \frac{1}{\varepsilon[\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}]} \cdot \frac{1}{d[\text{cm}]} \cdot \frac{1}{\Delta t[\text{sec}]} \cdot F \quad (10)$$

$\Delta A$	Steigung pro Minute
$V [\mu\text{L}]$	Gesamtvolumen in Küvette [ $\mu\text{L}$ ]
$v [\mu\text{L}]$	Volumen Enzymextrakt in Küvette [ $\mu\text{L}$ ]
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient: 25.000 [ $\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$ ]
$d$	Küvettdicke [ $\text{cm}$ ]
$\Delta t$	Zeitintervall [ $\text{s}$ ]
$F$	Verdünnungsfaktor

### Bestimmung der Peroxidase-Aktivität

Die Bestimmung der Peroxidase (POD)-Aktivität erfolgte in Anlehnung an eine modifizierte Methode nach (Ghamsari, Keyhani, & Golkhoo, 2007). Dabei oxidiert die in dem Enzymrohextrakt vorliegende POD in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Guajakol (o-Methoxyphenol) zu Tetraguajakol. Die dabei auftretende orangene Färbung, die der Enzymaktivität proportional ist, kann photometrisch bei 470 nm bestimmt werden (Ghamsari et al., 2007). Der Mechanismus der Reaktion ist in der Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Reaktionsgleichung der Peroxidase-Aktivität.**

Quelle: (Zeraik, Souza, Fatibello-Filho, & Leite, 2008).

Für die Extraktion wurden jeweils 0,2 g der Probe in ein Becherglas eingewogen und mit 15 mL Citrat-Phosphat-Puffer (pH 7) für 30 Minuten bei 4 °C extrahiert. Der Enzymrohextrakt wurde nach dem Pipettierschema (siehe Tabelle 8) mit den benötigten Reagenzien versetzt. Die Test-(SB) bzw. Blank-(RB) Lösung wurde für die pH-Wert Kinetik (pH 3 bis pH 7) zuvor eingestellt und anschließend mit 15 mM Guajakol versetzt.

**Tabelle 7: Pipettierschema zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität.**

	Probe	SB	RB
Enzymrohextrakt [ $\mu\text{L}$ ]	90	90	0
Wasser [ $\mu\text{L}$ ]	0	0	90
Test-Lösung mit 15 mM Guajakol [ $\mu\text{L}$ ]	2.900	2.900	2.900
Wasserstoffperoxid [ $\mu\text{l}$ ]	10	0	0
Wasser [ $\mu\text{L}$ ]	0	10	10

Die Enzymaktivität wird durch photometrische Messung der Adsorption für insgesamt 10 Minuten in 30 Sekunden Intervallen bei 470 nm gemessen. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, für die Temperaturkinetik erfolgten die Messungen bei angepasster Temperatur (20 °C bis 90 °C).

Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgt analog zur LOX-Aktivität [ $\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE}^{-1})$ ] mit Hilfe von Formel 11. Die Probe und der Sample Blank wurden um den Reagenzien Blank korrigiert. Anschließend wurde ein Zeitfenster von 60 Sekunden mit einem linearen Absorptionsanstieg gewählt und die Steigung pro Minute  $\Delta A$  evaluiert. Die Enzymaktivität wird ebenfalls auf den Proteingehalt in der Probe, quantifiziert mittels Bradford Assay, bezogen.

$$E_A[\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE})^{-1}] = \Delta A \cdot \frac{V[\mu\text{L}]}{v[\mu\text{L}]} \cdot \frac{1}{\varepsilon[L \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}]} \cdot \frac{1}{d[\text{cm}]} \cdot \frac{1}{\Delta t[\text{sec}]} \cdot F \quad (11)$$

$\Delta A$	Steigung pro Minute
$V$ [ $\mu\text{L}$ ]	Gesamtvolumen in Küvette [ $\mu\text{L}$ ]
$v$ [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Enzymextrakt in Küvette [ $\mu\text{L}$ ]
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient: $26.600 \text{ [L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}]$
$d$	Küvettdicke [cm]
$\Delta t$	Zeitintervall [s]
$F$	Verdünnungsfaktor

### Bestimmung der Proteingehalte mittels Bradford Assay

Für die Berechnung der endgültigen Enzymaktivität wurde der Proteingehalt der Enzymrohextrakte bestimmt. Die Analyse des Proteingehalts erfolgte mittels Bradford-Assay mit der am Fraunhofer IVV etablierten Methode. Bei dieser Methode bilden sich mit Hilfe des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Diese Komplexbildung mit Proteinen stabilisiert den Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm. Im Vergleich hierzu liegt das Absorptionsmaximum der roten, ungebundenen, kationischen Form des Farbstoffes bei 470 nm. Mittels externer Kalibrierung mit Rinderserum-Albumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 5–30 mg/mL erfolgte die Quantifizierung der Proteingehalte.

### Herstellung geeigneter Probenverdünnungen

Die Enzymrohextrakte wurden mit demineralisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Aus dieser hergestellten Verdünnung wurden die weiteren Verdünnungen 1:50, 1:100 sowie 1:200 hergestellt.

### Herstellung der Standardlösungen

Für die Standardlösungen wird die Stammlösung, die eine Konzentration von 1,45 mg/mL besitzt verdünnt. Die Standardlösungen sind für die Kalibriergerade (siehe Abbildung 10) notwendig, um die Proteingehalte der Enzymextrakte zu bestimmen.



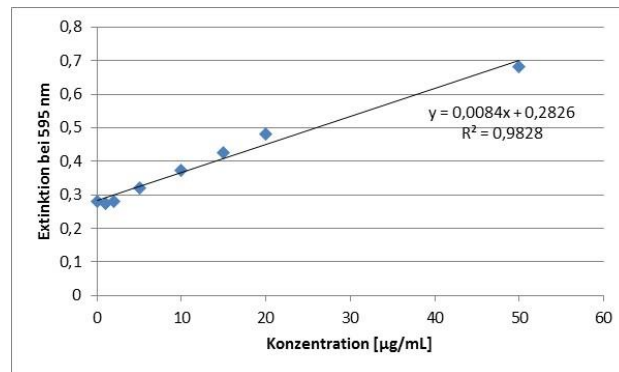


Abbildung 10: Bradford-Kalibrierreihe mit Bestimmtheitsmaß und Geradengleichung.

Die Lipxygenase- und Peroxidase-Aktivität kann anschließend mit dem ermittelten Proteingehalt [ $\text{nkat} \cdot (\text{mg}_{\text{Protein}}^{-1})$ ] sowie Formel 13 berechnet werden.

$$E_A = \frac{E_A[\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE})^{-1}] \cdot 1000}{c_{\text{Protein}}[\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot (\text{L}_{EE})^{-1}]} \quad (12)$$

$E_A$  Enzymaktivität [ $\text{nkat} \cdot (\text{mL}_{EE})^{-1}$ ]  
 $c_{\text{Protein}}$  Proteingehalt [ $\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot (\text{L}_{EE})^{-1}$ ]

### **3.2.7 Analyse der funktionellen Eigenschaften**

#### Proteinlöslichkeit

Zur Bestimmung der Proteinlöslichkeit wurde ein standardisiertes Untersuchungsverfahren in Anlehnung an die Proteinlöslichkeitsbestimmung nach C.V. Morr und die Bestimmung des NSI-Wertes nach der offiziellen AOCS Methode (Ba 11.65; 1993) bzw. AACC (46-23; 1990) durchgeführt. 1,5 g Probe wurde in 50 ml einer 0,1 M Natriumchloridlösung bei einem bestimmten eingestellten pH-Wert mit Zugabe weniger Tropfen Entschäumer (Struktol SB2010, Schill und Seilacher) verrührt. Nach einer Stunde Rühren wird der Ansatz in einen 50 ml Messkolben überführt und das Probenbecherglas mit 0,1 M Natriumchlorid-Lösung nachgespült. Anschließend wird auf das definierte Volumen aufgefüllt und durch Schütteln die Lösung vermischt. Der nicht gelöste Anteil durch Zentrifugation (15 min, 20.000 g, 15 °C) entfernt. Das gelöste Protein wird aus dem Überstand gefiltert (Whatman No.1 Filter, Healthcare Europe GmbH, Freiburg) und durch Stickstoffanalyse nach Dumas ermittelt. Aus dem ermittelten Stickstoffwert wird der Proteingehalt durch Multiplikation des spezifischen Proteinfaktors (5,7) berechnet. Der Anteil an gelöstem Protein wird mit dem Gesamtproteinanteil in Relation gesetzt, womit man eine Angabe des gelösten Proteinanteils in Prozent erhält (IVV, 2016 b).

#### Wasserbindevermögen

Zur Bestimmung des Wasserbindevermögens werden 2 g der Probe in ein Zentrifugenglas eingewogen und demineralisiertes Wasser im Überschuss 1:20 zugegeben. Danach wird die Dispersion eine Minute mit einem Reagenzglasschüttler vermischt und anschließend 10 min stehen gelassen, wobei die Dispersion nach 5 min und nach 10 min 30 Sekunden lang geschüttelt wird. Die Zentrifugation erfolgt bei 1000 RZB, 20 °C für 15 min und anschließend wird der Überstand vorsichtig dekantiert. Der im Zentrifugenglas befindliche mit Wasser gesättigte Rückstand, wird ermittelt und mit der eingewogenen Menge an Probe verrechnet. Dadurch erhält man das pro Gramm Probe gebundene Wasser (IVV, 2014 d).

#### Emulgierkapazität

Die Emulgierkapazität wurde bei dem Proben-pH-Wert, der bei allen Proben im neutralen Bereich lag, sowie bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) bestimmt. Dabei wurden eine 1 %ige homogene Probenlösung mit 1 g Probe und 99 g Leitungswasser hergestellt. Diese wurde in das IKA-Reaktorsystem überführt. Nach kontinuierlicher Zugabe von Öl (Maiskeimöl, Mazerola, Peter Kölln KGaA) bei eingeschaltetem Ultraturrax (T25, IKA-Werke, Staufen) mit 11000 U/min wurde die Leitfähigkeit des Systems bis zur Phaseninversion bestimmt

(Leitfähigkeitsmessgerät, LF 521, WTW Weilheim), die durch ein abruptes Absinken auf  $< 10 \mu\text{S}$  der elektrischen Leitfähigkeit detektiert wird. Die Emulgierkapazität wurde in ml Öl/g Proteinisolat angegeben (IVV, 2014 f).

#### Minimale Gelbildungskonzentration

Die zu untersuchenden Proben wurden in geeigneten Konzentrationen von 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% und 20% (w/v) in 0,1 mol/L Natriumphosphatpufferlösung bei pH 6,8 suspendiert und anschließend bei 95 °C für eine Stunde im Wasserbad erhitzt. Daraufhin wurden die Proben zügig abgekühlt, und zwei Stunden bei 4 °C bis zur Analyse gelagert. Die minimale Gelbildekonzentration ist die Konzentration, bei der das Gel eine hohe Viskosität und ein Gel bildet.

### **3.2.8 Sensorische Analyse - Ackerbohnenmehle/ -Konzentrate und Modelllebensmittel**

Die Sensorische Prüfung im Rahmen von AP4 erfolgte nach dem Prinzip der Einzelprüfung mit Intensitätsangabe, bei welcher die Teilnehmer den Geruch (ortho- und retronasal), den Geschmack (bitter) und die Beliebtheit der Suspensionen auf einer Skala von 0-10 bewerten sollten. Die Verkostung wurde mit Probanden des Fraunhofer IVV durchgeführt. Ausgewählte Ackerbohnenmehle und –Konzentrate wurden sensorisch evaluiert. Zur Bewertung der reinen Mehle und Konzentrate erfolgte die Herstellung von 3 %igen [w/v] Suspensionen. Diese wurden anschließend hinsichtlich ihrer Farbe, der orthonasalen Wahrnehmung (Geruch), dem Geschmack und ihrer Beliebtheit getestet. Die Proben wurden dafür in kleinen Weckgläsern auf einem weißen Tablett in zufälliger Reihenfolge angeordnet. Das Panel bestand aus 12 bis 14 Personen, die gesundheitlich nicht beeinträchtigt waren. Die Sensorik wurde in einem dafür vorgesehenen Sensorik Prüfraum bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.2.9 Farbmessungen**

Zur objektiven Beurteilung der Farbe der einzelnen Proben wurde diese mittels des Farbmessgeräts „DigiEye“ gemessen und bewertet. Der Messaufbau besteht aus einem DigiEye Cube und einer SLR-Kamera zur Bildaufnahme. Die Auswertung fand mittels des Softwareprogramms DigiEye V2.61 statt. Alle Messungen erfolgten auf weißem Hintergrund. Zur Messung wurde die Probe in einer Petrischale in die Probenkammer platziert (möglichst mittig) und anschließend bei geschlossener Kammer fotografiert. Das Softwareprogramm ermittelt anhand der Bildaufnahme die  $L^*a^*b^*$ -Koordinaten, mit denen eine exakte Aussage

über die Lage der 48 Probenfarbe im gesamten Farbraum getroffen werden kann. Dieser Farbraum ist auf Grundlage der Gegenfarbentheorie konstruiert und ist Geräte unabhängig. Das Farbmodell ist in der EN ISO 11664-4 genormt. Jede wahrnehmbare Farbe ist durch die 3 Koordinaten  $L^*a^*b^*$  definiert.  $L^*$  steht für die Helligkeit ( $0 < L^* < +100$ ; 0=schwarz, 100=weiß), auf der  $a^*$ -Achse liegen sich Grün und Rot gegenüber ( $-150 < a^* < +100$ ;  $-a^*$ =grün,  $+a^*$ =rot), und auf der  $b^*$ -Achse liegen sich Blau und Gelb gegenüber ( $-100 < b^* < +150$ ;  $-b^*$ =blau,  $+b^*$ =gelb).

### 3.2.10 Herstellung von Modellelebensmitteln

#### Rezeptur und Herstellung von Rührkuchen

Für die Herstellung der Rührkuchen wurden die Rezepturbestandteile (vgl. Tab. 9) in eine Rührschüssel gegeben, mit einem Handrührer zunächst vermischt und anschließend der Teig für 2 Minuten auf höchster Rührstufe homogenisiert, bevor er zu je  $300 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$  in die Backformen eingefüllt wurde. Die Teige wurden 45 Minuten bei  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  und Ober-/ Unterhitze im Ofen gebacken und im Anschluss für 60 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

**Tabelle 8: Rezeptur zur Herstellung von Rührkuchen.**

Zutaten [g]	Referenz	AB-Mehl
Weizenmehl	220	154
AB-Mehl		66
Backpulver	6	6
Milch	140	140
Saccharose	200	200
Öl	68	68
Ei	108	108

#### Rezeptur und Herstellung von Weizenbrot und glutenfreien Brot

Die Zutaten wurden entsprechend der Tabelle 10 bzw. Tabelle 11 eingewogen und das Wasser auf  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Für die Herstellung der Weizenbrote wurde das Weizenmehl zu 30 % durch Ackerbohnenmehl ausgetauscht. Die trockenen Zutaten wurden mit einem Rührgerät vermischt, anschließend das temperierte Wasser zugegeben und der Teig für 1,5 Minuten bei Rührstufe 3 geknetet. Der fertige Teig wurde in gefettete Backformen zu je  $270 \pm 0,5 \text{ g}$  portioniert und bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 80 % relativer Luftfeuchte für 37 Minuten in den Gärschrank gegeben. Anschließend erfolgte der Backvorgang im Etagenbackofen bei  $220 \text{ }^\circ\text{C}$  für 35 Minuten. Die Abkühldauer bei Raumtemperatur betrug 2 Stunden.

**Tabelle 9: Rezeptur zur Herstellung von Weizenbrotten.**

Zutaten [g]	Referenz	AB-Mehl
Weizenmehl	310	217
AB-Mehl		93
NaCl	7	7
Hefe	5	5
Wasser	205	205

Für die Herstellung der glutenfreien Brote (GFB) wurden Kartoffelstärke und Ackerbohnenmehl in den Verhältnissen 50:50 sowie 70:30 eingesetzt. Darüber hinaus wurde hier für die Wasserbindung das Hydrokolloid Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) eingesetzt, die genaue Zusammensetzung der Rezeptur ist Tabelle 11 zu entnehmen. Zunächst wurden die Trockenbestandteile in eine Rührschüssel eingewogen und mit einem Rührgerät gemischt. Anschließend wurden das Öl und das temperierte Wasser hinzugegeben. Der Teig wurde ebenfalls mit einem Handrührgerät vermischt und zu je  $270 \pm 0.5$  g in die Backformen portioniert. Die glutenfreien Teige wurden anschließend im Backofen bei 220 °C für 35 Minuten gebacken, die Abkühldauer bei Raumtemperatur betrug 2 Stunden.

**Tabelle 10: Rezeptur zur Herstellung von glutenfreien Brotten.**

Zutaten [g]	50:50	70:30
Kartoffelstärke	213	298
AB-Mehl	195,5	117
HPMC	8	8
NaCl	8	8
Saccharose	2	2
Hefe	6	6
Öl	12	12
Wasser	351,5	344,5

## Herstellung von veganen Burger-Patties

Die Prozessschritte zur Herstellung der veganen Burger-Patties ist in Abbildung 11 dargestellt. Für die Herstellung der Burger-Patties wurden die trockenen Rezepturbestandteile mit einem Löffel vermischt und pflanzliches Öl mit einem Löffel eingerührt. Die flüssigen Bestandteile wurden zu den vermischten Trockenstoffen dosiert und im Thermomix gerührt. Es folgte die Zugabe von Wasser, Farb- und Geschmacksstoffen sowie ein Mischvorgang im Thermomix. Anschließend wurde Texturat zugegeben und die Masse über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag erfolgte die Zugabe von pflanzlichem Fett und ein erneuter Mischvorgang im Thermomix. Final wurde das vegane Burger-Patty geformt und vor der Verkostung mit wenig Öl angebraten.



**Abbildung 11: Bildliche Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung von veganen Burger-Patties.**

## Rezeptur und Herstellung von Schokoladendesserts

Die Zutaten wurden entsprechend der Tabelle 12 abgewogen, und vorab zu einer homogenen Mischung verarbeitet. Anschließend wurde Milch/ Wasser im Thermomix vorgelegt und die Mischung unter Rühren in den Thermomix dosiert. Die Mischung wurde unter kontinuierlichem Rühren (Rührstufe 3) bis auf 90 °C erhitzt. Nach Ablauf der Rührzeit, wurde das fertige Produkt in kleine Gläser gefüllt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 11: Rezeptur zur Herstellung von Schokoladen-Desserts.**

Rezepturbestandteile	Versuchsstufen					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
AB-Mehl [g]	80	80	100	80	80	60
AB-Konz. [g]						40
Saccharose [g]	50	50	50	50	50	50
Kakaopulver [g]	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
Milch [ml]	500	500	500			
Hafermilch [ml]				500		
Wasser [ml]					500	500
Rührzeit [min]	5	6	6	6	6	6

## 4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

### 4.1 Analytische Zusammensetzung

Die analytische Zusammensetzung der untersuchten Ackerbohnenfraktionen (gemäß AP1) ist in Tabelle 13 dargestellt.

Der höchste **Proteingehalt** lag erwartungsgemäß in der Kernfleischfraktion der Ackerbohnen vor und variierte je nach Genotyp von 27,7 % bezogen auf die TM für die Sorten Vicia 1 und Vicia 2 bis maximal 34,0 % bezogen auf die TM für die Sorte Tiffany 2. Die Schalenfraktionen der einzelnen Genotypen wiesen die geringsten Proteingehalt auf und variierten von 16,1 % für Vicia 1 bis max. 22,9 % für die Schalenfraktion des Genotyps Taifun. Auch der **Mineralstoffgehalt** war in den Kernfraktionen mit Werten von 4,7 % bezogen auf die TM (Taifun), 5,5 % bezogen auf die TM (Fuego) und 5,8 % bezogen auf die TM (Fanfare 1) deutlich höher als in den Saaten (Taifun: 3,9 % TM; Fuego: 3,8 % TM; Fanfare 1: 4,14 % TM) und in der Schalenfraktion. Die **Stärkegehalte** in den Kernfraktionen variierten von 37,0 % bezogen auf TM für die Sorte Tiffany 2 bis max. 50,8 % bezogen auf TM für die Sorte Vicia 2. Zusammenfassend fand durch die Trennung der Saaten in Kerne und Schalen eine Anreicherung des Protein-, Mineralstoff-, und Stärkegehalts in der Kernfraktion statt. Die **Fettgehalte** variierten von 0,8 % bezogen auf die TM (Vicia 2) bis max. 2,1 % TM (Det Pop). Hier war im Vergleich zur Saat die Anreicherung des Fettgehalts in der Kernfraktion nicht eindeutig sichtbar. Während die Fettgehalte der Kernfraktion in den Sorten Vicia 1, Vicia 2, und Tiffany 3 im Vergleich zur Schalenfraktion geringfügig zunahmen, zeigten alle weiteren Sorten keine Unterschiede im Fettgehalt der Kern- und Schalenfraktion. Unter Betrachtung des in der Literatur angegebenen geringen Fettgehalts für Ackerbohnen von 1-2% sind die hier ermittelten Werte vergleichbar (Karata\_, Günay, & Sayar, 2017; Vioque, Alaiz, & Girón-Calle, 2012). Der Proteingehalt für die Sorte Tiffany 4 war mit 30,8 % TM etwas niedriger als die Sorte Tiffany 2. Auch die kommerziell erhältlichen Ackerbohnenmehle lagen in einer vergleichbaren Größenordnung für den Proteingehalt.



**Tabelle 12: Grundzusammensetzung von ganzen Ackerbohnsensamen und trockentechnisch gewonnenen Fraktionen.**

<b>Probe</b>	<b>TM %</b>	<b>Protein % TM</b>	<b>Asche % TM</b>	<b>Fett % TM</b>	<b>Stärke % TM</b>
Vicia 1 - Saat	90,2 ± 0,1	24,8 ± 0,0	4,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	38,7 ± 0,4
Vicia 1 - Schale	90,9 ± 0,0	16,1 ± 0,2	3,6 ± 0,1	0,8 ± 0,0	11,5 ± 0,9
Vicia 1 - Kerne	91,0 ± 0,0	27,7 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,8 ± 0,0	<b>50,8 ± 0,4</b>
Vicia 2 - Saat	89,8 ± 0,1	25,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2	0,7 ± 0,0	37,0 ± 0,2
Vicia 2 - Schale	90,7 ± 0,1	18,3 ± 0,3	3,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	12,6 ± 0,1
Vicia 2 - Kerne	89,4 ± 0,0	27,7 ± 0,0	4,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	<b>49,3 ± 1,1</b>
Tiffany 1 - Saat	90,0 ± 0,0	27,2 ± 0,2	3,6 ± 0,0	1, ± 0,0	34,9 ± 0,4
Tiffany 1 - Schale	90,1 ± 0,0	16,8 ± 0,0	3,4 ± 0,0	0,8 ± 0,0	10,2 ± 0,6
Tiffany 1 - Kerne	88,5 ± 0,0	30,6 ± 0,1	4,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	47,4 ± 0,4
Tiffany 2 - Saat	88,9 ± 0,0	30,0 ± 0,1	3,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0	28,3 ± 0,3
Tiffany 2 - Schale	89,7 ± 0,1	21,6 ± 0,1	3,3 ± 0,0	1,2 ± 0,1	15,4 ± 0,1
Tiffany 2 - Kerne	89,0 ± 0,0	<b>34,0 ± 0,0</b>	3,4 ± 0,0	1,1 ± 0,1	37,0 ± 0,1
Divine – Saat	88,7 ± 0,0	25,6 ± 0,1	3,5 ± 0,0	1, ± 0,1	31,3 ± 0,2
Divine – Schale	89,9 ± 0,0	20,3 ± 0,0	3,5 ± 0,0	1,2 ± 0,1	16,5 ± 0,1
Divine – Kerne	89,1 ± 0,1	28,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	<b>47,8 ± 0,7</b>
Fanfare 1– Saat	87,3 ± 0,0	26,2 ± 0,2	4,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	30,6 ± 0,8
Fanfare 1– Schale	88,8 ± 0,1	19,0 ± 0,4	3,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	14,5 ± 0,1
Fanfare 1 – Kerne	87,7 ± 0,0	<b>30,6 ± 0,1</b>	<b>5,8 ± 0,1</b>	1,2 ± 0,0	39,7 ± 0,5
Taifun – Saat	86,2 ± 0,0	26,7 ± 0,19	3,9 ± 0,0	1,4 ± 0,1	30,5 ± 1,2
Taifun – Schale	88,3 ± 0,0	23,0 ± 0,2	3,6 ± 0,1	1,5 ± 0,0	17,2 ± 0,7
Taifun – Kerne	86,2 ± 0,4	29,4 ± 0,0	<b>4,7 ± 0,1</b>	1,5 ± 0,1	39,8 ± 0,4
Fanfare 2 – Saat	86,5 ± 0,1	25,9 ± 0,1	3,7 ± 0,3	1,4 ± 0,0	30,7 ± 0,9
Fanfare 2 – Schale	88,0 ± 0,1	20,4 ± 0,0	3,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	15,2 ± 1,5
Fanfare 2 – Kerne	86,4 ± 0,1	29,5 ± 0,3	4,7 ± 0,5	1,4 ± 0,0	40,1 ± 0,5
Tiffany 3 – Saat	86,3 ± 0,0	26,9 ± 0,0	3,6 ± 0,0	1,5 ± 0,0	31,6 ± 0,1
Tiffany 3 – Schale	87,9 ± 0,0	22,8 ± 0,2	3,4 ± 0,0	1,5 ± 0,0	17,1 ± 1,2
Tiffany 3 – Kerne	86,0 ± 0,1	30,6 ± 0,1	4,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	40,4 ± 0,9
Fuego – Saat	86,2 ± 0,0	26,4 ± 0,0	3,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0	32,4 ± 1,1
Fuego – Schale	88,2 ± 0,0	20,9 ± 0,0	3,3 ± 0,1	1,8 ± 0,3	16,0 ± 1,1
Fuego – Kerne	86,3 ± 0,0	29,6 ± 0,0	<b>5,5 ± 0,2</b>	<b>1,87 ± 0,0</b>	39,0 ± 0,0
Det Pop – Saat	84,5 ± 0,0	27,1 ± 0,2	3,7 ± 0,0	1,6 ± 0,0	29,2 ± 0,1
Det Pop – Schale	87,1 ± 0,0	21,9 ± 0,1	3,5 ± 0,0	1,9 ± 0,1	17,6 ± 0,6
Det Pop – Kerne	84,1 ± 0,2	<b>30,6 ± 0,2</b>	3,8 ± 0,1	<b>2,2 ± 0,1</b>	38,5 ± 0,8
Melodie – Saat	86,3 ± 0,1	26,4 ± 0,2	3,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	31,1 ± 0,7
Melodie – Schale	87,8 ± 0,1	19,7 ± 0,1	3,2 ± 0,0	1,6 ± 0,1	15,0 ± 0,5
Melodie – Kerne	86,6 ± 0,0	30,6 ± 0,1	3,7 ± 0,0	<b>1,8 ± 0,1</b>	39,9 ± 1,1
Tiffany 4	89,9 ± 0,0	30,8 ± 0,2	-	-	-
ABM1	92,2 ± 0,0	30,9 ± 0,3	-	-	-
ABM2	89,2 ± 0,1	27,8 ± 0,0	-	-	-

## 4.2 Antinutritive Inhaltstoffe

Darüber hinaus sah AP1 die Bestimmung der antinutritiven Inhaltsstoffe (Oligosaccharide, kondensierte Tannine, Phytinsäure und Vicin/Convicin) vor.

### Oligosaccharidgehalte

In Tabelle 14 sind die Gehalte an Saccharose sowie der Gesamtgehalt an Oligosacchariden bestehend aus Raffinose, Stachyose und Verbascose gegenübergestellt.

**Tabelle 13: Gegenüberstellung der Gehalte an Saccharose und Oligosacchariden in Ackerbohnenfraktionen.**

Sorte	Kerne		Schale*		Saat	
	Saccharose [% TM]	Oligosaccharide [% TM]	Saccharose [% TM]	Oligosaccharide [% TM]	Saccharose [% TM]	Oligosaccharide [% TM]
Vicia 1	1,8	4,1	0,1	0,0	1,4	2,9
Vicia 2	1,7	3,3	0,2	0,3	1,4	2,8
Tiffany 1	1,4	23,2	0,2	0,4	1,1	2,5
Tiffany 2	3,2	4,4	0,0	0,0	0,9	1,9
Divine	1,8	4,8	0,0	0,0	0,9	2,4
Fanfare 1	1,3	3,9	0,1	0,0	1,0	2,4
Taifun	1,7	4,0	0,2	0,0	1,3	2,3
Fanfare 2	1,3	3,7	0,1	0,0	1,0	1,8
Tiffany 3	1,2	3,4	0,1	0,0	0,9	2,0
Fuego	1,4	3,0	0,0	0,0	0,9	1,7
Det Pop	1,4	2,5	0,1	0,9	0,9	2,3
Melodie	1,8	3,3	0,0	0,0	1,0	1,9

\*kalkuliert auf den Anteil der Kerne/Schale.

Die höchsten Saccharosegehalte lagen in den Kernfraktionen der untersuchten Ackerbohnen-Genotypen vor, diese variierten von 1,2 % TM (Tiffany 3) bis zu 3,2 % TM (Tiffany 2). In der Schalenfraktion variierte der Saccharosegehalt von 0,1% TM (Vicia 1) bis 0,2 % TM (Tiffany 1). Die höchsten Oligosaccharidgehalte erzielten die Sorten Tiffany 2 bzw. Divine mit > 4 % TM. Die geringsten Oligosaccharidgehalte wies die Sorte Det Pop (2,5 % TM) auf. Oligosaccharide lagen in der Schalenfraktion nahezu nicht vor. Ausnahmen waren die Sorten: Vicia 2, Tiffany 1 und Det Pop, die mit 0,3 % TM, 0,4 % TM bzw. 0, % TM, bezogen auf den Schalenanteil, höhere Oligosaccharidgehalte aufwiesen. Die ermittelten Saccharidgehalte decken sich z.T. mit den ermittelten Saccharidgehalten von (Landry, Fuchs, & Hu, 2016). Im Rahmen eines Sortenscreenings von 40 Ackerbohnen Sorten wurden Saccharosegehalte von 1-4 % bezogen auf die TM und die Oligosaccharidgehalte von ca. 2,5 bis 8 % TM ermittelt.

## Phytinsäuregehalt

Die Unterschiede der Phytinsäuregehalte in den Fraktionen (Kerne, Schale, Saat) für ausgewählte Ackerbohnsorten sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 14: Phytinsäuregehalte in ausgewählten Ackerbohnsorten.**

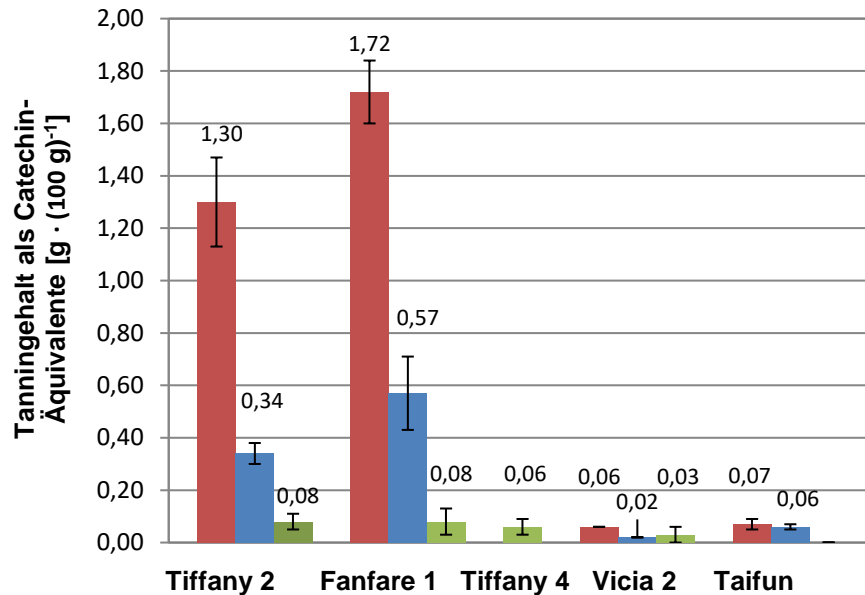
Sorte	Phytinsäuregehalte [% TM]		
	Kerne	Schale	Saat
Tiffany 2	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Divine	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1
Fanfare 1	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0
Taifun	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1
Tiffany 4	1,2 ± 0,0	-	-
ABM2	1,3 ± 0,1	-	-

Dargestellt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmung (n=2).

Im Gegensatz zu Monokotyledonen (Weizen, Hafer) wurden für die Ackerbohnen die höchsten Phytinsäuregehalte in der Kernfraktion gemessen, die Schalenfraktion wies die geringsten Phytinsäuregehalte auf. So variierten in den Kernfraktionen die Gehalte von 0,9 % TM (Tiffany 2) bis 1,5 % TM (Fanfare 1) und in den Schalenfraktionen von 0,6 % TM bis 0,9 % TM. Diese Gehalte decken sich mit den in der Literatur angegebenen Phytinsäuregehalten, die zwischen 0,6 bis 2,0 % TM (Samen) angegeben wurden (Oomah et al., 2011).

## Gehalte an kondensierten Tanninen

In Abbildung 12 sind die Tanningehalte als Catechin-Äquivalente für die Sorten Tiffany 2, Tiffany 4 und Fanfare 1 sowie für zwei weitere Sorten (Vicia 2 und Taifun), die laut Züchterangaben tanninfrei sind, dargestellt.



**Abbildung 12: Tanningehalt als Catechin-Äquivalente in den verschiedenen Ackerbohnen-Fractionen. Untersucht wurden Schale (■), Saat (■) und Kerne (■). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=4).**

In den Schalenfraktionen der Sorten Tiffany 2 ( $1,3 \pm 0,2$  [ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ ]) und Fanfare 1 ( $1,7 \pm 0,1$  [ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ ]) wurden die höchsten Tanningehalte, bestimmt als Catechin-Äquivalente, quantifiziert. Die Gehalte in der Saat waren für die Sorten Tiffany 2 und Fanfare 1 deutlich geringer ( $0,3$  bis  $0,6$  [ $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ ]) und in den Kernen nahezu nicht mehr vorhanden. In der Schalenfraktion und der Saat der Genotypen Vicia 2 und Taifun waren die kondensierten Tannine nicht nachweisbar, was die Angaben der Züchter bestätigt. Bei der Durchführung einer Massenbilanzierung auf Basis der Ausbeuten nach der Trennung in die Kern- und Schalenfraktion (siehe Kapitel 4.5) ergaben sich somit folgende Anteile der kondensierten Tannine in Saat, Schale und Kernfraktion (siehe Tab.16), die Wiederfindung lag bei 100 % (siehe theoretischer Anteil).

Tabelle 15: Übersicht der Massenbilanz zu den Tanningehalten in Saat, Kerne und Schale.

Sorte	Fraktion	Tannine [g/ 100g]	Fraktion [%]	Theoretischer Anteil [%]
Tiffany 2	Saat	0,3		0,5
	Kerne	0,1	63	0,1
	Schale	1,3	35	0,5
Fanfare 1	Saat	0,6		0,6
	Kerne	0,1	64	0,0
	Schale	1,7	33	0,6

Somit bleibt festzuhalten, dass eine trockentechnische Fraktionierung in Schale und Kernmehl zur Reduktion des Gehalts an kondensierten Tanninen führt.

### Vicin und Convicin Gehalte

Die Gehalte an Vicin und Convicin sind in Abbildung 13 für ausgewählte Ackerbohnenmehle dargestellt.

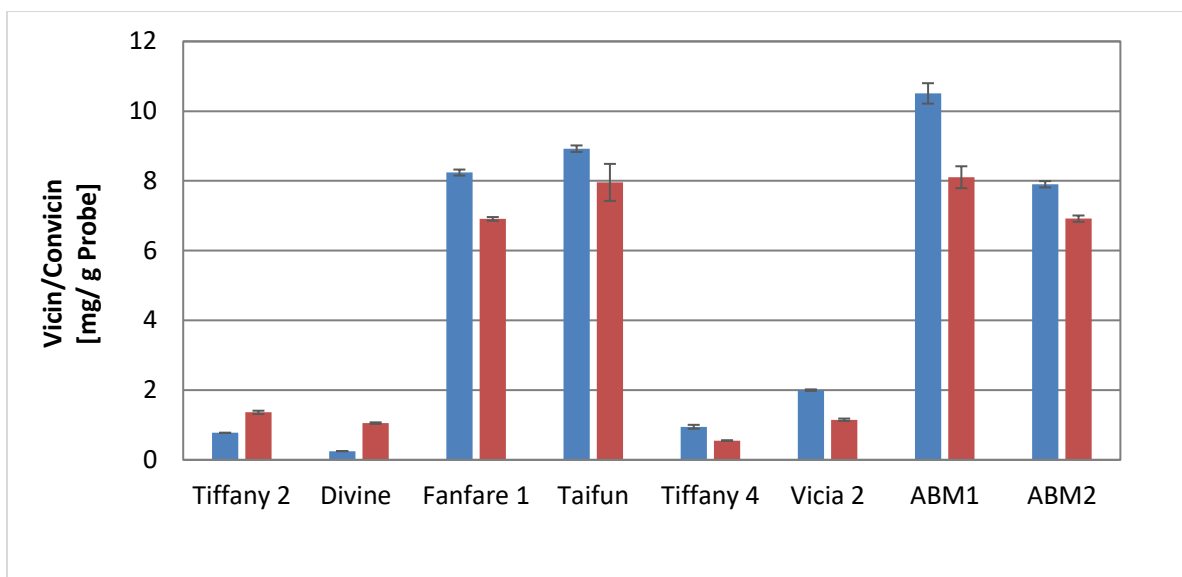


Abbildung 13: Vicin und Convicin Gehalte in ausgewählten Ackerbohnenmehlen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3) für Vicin (■) und Convicin (■).

Die Daten verdeutlichen, dass die Genotypen Tiffany und Divine mit Gehalten  $< 2$  mg/g Probe die geringsten Vicingehalte aufwiesen. In der Sorte Vicia 2 lag der Vicingehalt bei 2 mg/g Probe. Insbesondere die Sorten Fanfare 1 und Taifun wiesen sehr hohe Vicingehalte von 8-

9 mg/g Probe auf. Die industriell verfügbaren Mehle wiesen die höchsten Vicinergehalte auf, so wurden in dem Ackerbohnenmehl ABM1 > 10 mg/g Probe Vicin detektiert.

### 4.3 Trypsininhibitor-Aktivität und endogene Enzymaktivitäten

Gemäß AP2 wurden für die ausgewählten Ackerbohnen Sorten Tiffany 2, Tiffany 4 und Fanfare 1 sowohl die Trypsininhibitor-Aktivität als auch die endogene Enzymaktivität charakterisiert.

#### Trypsininhibitor-Aktivität

Die Analyse der Trypsininhibitor-Aktivität (TIA) wurde für ausgewählte Ackerbohnen Genotypen untersucht und die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14a und b zusammenfassend dargestellt.

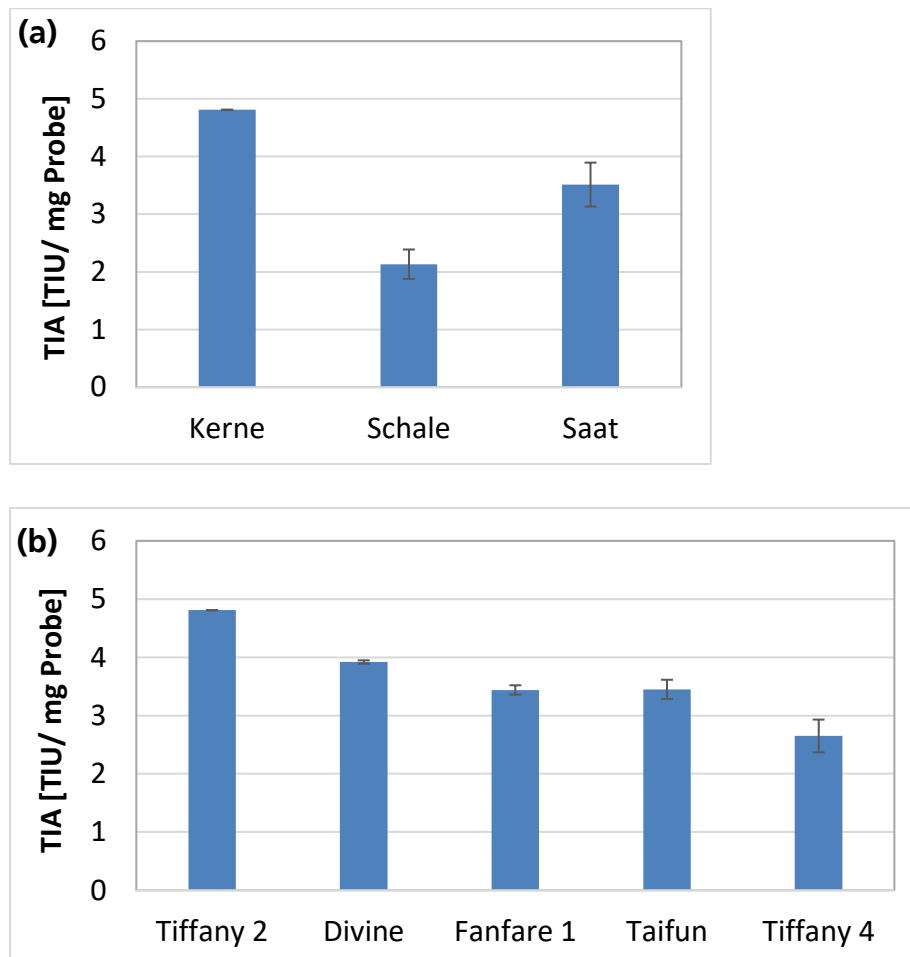


Abbildung 14: Trypsininhibitor-Aktivität vergleichend für die Kern-, Schalenfraktion und Saat der Sorte Tiffany 2 (a) und in ausgewählten Kernfraktionen von Ackerbohnen (b). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 3).

### Lipoxygensase-Aktivität

Der Kurvenverlauf der Enzymaktivität zur Lipoxygenase (LOX)-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes zeigt deutlich, dass das pH-Optimum aller drei Ackerbohnsorten bei pH 6 lag. Bei pH-Werten von 3 und > 8 war nahezu keine LOX Aktivität messbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass um eine möglichst geringe LOX-Aktivität zu erzielen, der pH-Wert bei einer wässrigen Extraktion bei < 4 bzw. > 7 liegen sollte. <sup>1</sup>

Eine Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 70 °C hatte zur Folge, dass die LOX-Aktivität über die Temperatur deutlich abnahm. Die Erhöhung von 20 °C auf 30 °C reduzierte die LOX-Aktivität um bis zu 63 % rel. Bei 60 °C war eine Restaktivität von 7,7 % für Tiffany 4 bzw. 21,9 % für Fanfare 1 zu beobachten. Eine vollständige Inaktivierung der LOX war nach Inkubation bei 70 °C für die Genotypen Tiffany 2 und Tiffany 4 sowie Fanfare 1 erreicht.<sup>1</sup>

### Peroxidase-Aktivität

Die Ergebnisse zur Peroxidase (POD)-Aktivität für die Sorten Tiffany 2, Tiffany 4 und Fanfare 1 in Abhängigkeit des pH-Wertes zeigt, dass das pH-Optimum für die untersuchten Ackerbohnen genotypen (Tiffany 2, Fanfare 1 sowie Tiffany 4) bei pH 5 lag. Die höchste POD-Aktivität wies die Sorte Tiffany 2 mit 3,1 [nkat · (mg Protein)<sup>-1</sup>] auf. Bei pH 3 und pH 7 war nahezu keine POD-Aktivität messbar. Untersuchungen zur POD Aktivität in anderen Pflanzen, zeigten ebenfalls ein pH-Optimum der POD, welches zumeist in einem Bereich zwischen pH 4–7 lag (Takahama & Egashira, 1991). Aufgrund seiner Hitzestabilität, gilt die POD als Indikator für eine vollständige Inaktivierung aller Enzyme in pflanzlichen Rohstoffen und kann somit für die Bewertung der Effizienz einer thermischen Inaktivierung herangezogen werden (Güneş & Bayindirli, 1993; Jiang et al., 2016).<sup>1</sup>

Die Temperaturerhöhung von 20 °C auf 70 °C führte bei den untersuchten Ackerbohnenrohextrakten gleichermaßen zur Reduktion der POD-Aktivität. Durch die Erhöhung von 20 °C auf 50 °C wurde für die Sorte Tiffany 2 die POD Aktivität um 38,6 % für Fanfare 1 um 47,3 % reduziert. Eine vollständige Inaktivierung der POD war nach Inkubation bei 60 °C für Tiffany 2, Tiffany 4 sowie Fanfare 1 erreicht. Auf Basis dieser Erkenntnisse scheint die in Ackerbohnen vorhandene LOX etwas temperaturstabiler zu sein als die POD.

---

<sup>1</sup> Föste et al. (2021) in preparation.

Die Überprüfung dieser Hypothese erfolgte bei der hydrothermischen Behandlung von Ackerbohnenmehlen und ist im nachfolgenden Kapitel dargestellt.<sup>1</sup>

#### 4.4 Enzymaktivitäten nach hydrothermische Behandlung

Auf Basis der in Kapitel 4.3 beschriebenen Ergebnisse wurde der Einfluss einer hydrothermischen Behandlung auf die Inaktivierung von Enzymen (AP2.2) untersucht. Tabelle 17 zeigt die nach hydrothermischer Behandlung ermittelte Trypsininhibitor-Aktivität (TIA) angegeben in (TIU/ mg Probe), sowie die Restaktivität (RA) (% rel.) in Bezug zum nativen, unbehandelten Ackerbohnenmehl der Sorten Tiffany 2, Fanfare 1 und Tiffany 4. Zusätzlich wurde ein kommerzielles, thermisch behandeltes Mehl (ABM1) als Benchmark untersucht.

Tabelle 16: Trypsininhibitor-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.

Behandlungsart	Tiffany 2		Fanfare 1		Tiffany 4		ABM1
	[TIU/ mg Probe]	RA [% rel.]	[TIU/ mg Probe]	RA [% rel.]	[TIU/ mg Probe]	RA [% rel.]	[TIU/ mg Probe]
	Trypsininhibitor-Aktivität						
nativ	4,8		3,4		2,7		0,6
Hitze-Dampf (50%) <sup>2</sup>							
Hitze-Dampf (100%) <sup>2</sup>							
Druck-Dampf <sup>2</sup>							

Aufgeführt sind die Ergebnisse nach der Hitze-Dampf Behandlung im Konvektomat bei 170 °C für 10 Minuten (50% und 100% Dampfungabe) sowie im Druck-Dampfgarer bei 120 °C für 10 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aller Proben (n=3). Abk.: TIA: Trypsininhibitor-Aktivität, RA: Restaktivität.

Tabelle 18 zeigt die nach hydrothermischer Behandlung ermittelte Lipoxygenase (LOX)-Aktivität (nkat/ mg Protein) sowie die verbleibende Restaktivität (% rel.).

Tabelle 17: Lipoxygenase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.

Behandlungsart	Tiffany 2		Fanfare 1		Tiffany 4		ABM1
	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]
nativ <sup>2</sup>							0,0
Hitze-Dampf (50%) <sup>2</sup>							
Hitze-Dampf (100%) <sup>2</sup>							

<sup>2</sup> Föste et al. (2021) in preparation.



## Druck-Dampf<sup>2</sup>

Aufgeführt sind die Ergebnisse nach der Hitze-Dampf Behandlung im Konvektomat bei 170°C für 10 Minuten (50% und 100% Dampfzufuhr) sowie im Druck-Dampfgarer bei 120°C für 10 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=4). Abk.: EA: Enzymaktivität, RA: Restaktivität

Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass die hydrothermische Behandlung zur Reduzierung der LOX-Aktivität führte. Die Behandlung im Druck-Dampfgarer reduzierte die LOX-Aktivität auf < 0,3 (nkat/ mg Protein). Im Vergleich zum nativen Mehl wurden durch die hydrothermische Behandlung unabhängig von der Behandlungsmethode über 99 % des Enzyms inaktiviert. Im Gegensatz dazu erzielte die 10-minütige Behandlung im Konvektomat bei 170 °C (Luftfeuchtigkeit 100 %) die stärkste LOX-Inaktivierung.

Die Ergebnisse zur POD-Aktivität (nkat/mg Protein) sowie zur verbleibenden Restaktivität [% rel.] sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 18: Peroxidase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl.**

Behandlungsart	Tiffany 2		Fanfare 1		Tiffany 4		ABM1
	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]
nativ <sup>3</sup>							0,0
Hitze-Dampf (50%) <sup>3</sup>							
Hitze-Dampf (100%) <sup>3</sup>							
Druck-Dampf <sup>3</sup>							

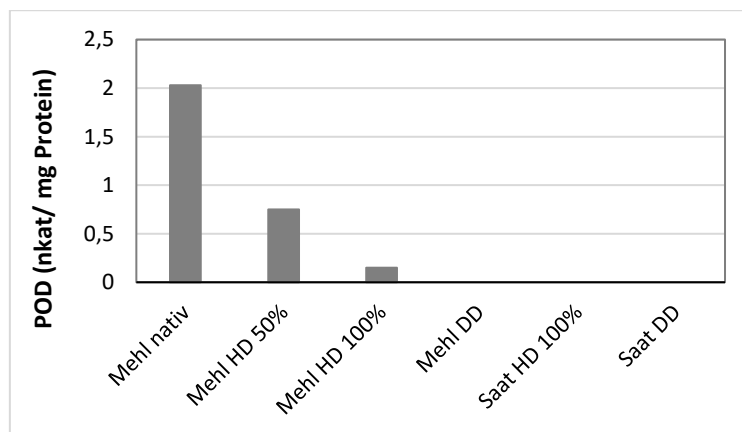
Aufgeführt sind die Ergebnisse nach der Hitze-Dampf Behandlung im Konvektomat bei 170 °C für 10 Minuten (50% und 100% Dampfzufuhr) sowie im Druck-Dampfgarer bei 120 °C für 10 Minuten. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=4). Abk.: EA: Enzymaktivität, RA: Restaktivität.

Die Erhöhung der Dampfzufuhr im Konvektomat reduzierte die POD-Aktivität. Nach der Behandlung im Konvektomat (50 % Dampfzufuhr) betrug die rel. RA 17,7 % (Fanfare 1) bzw. 37,0 % (Tiffany 4). Die Erhöhung der Dampfzufuhr auf 100 % hatte zur Folge, dass die RA unter 8 % bei allen 3 Ackerbohnenotypen gesenkt wurde. Diese Untersuchungen zeigten eine höhere Stabilität der POD in Ackerbohnenmehlen als LOX. Die höhere Stabilität im Vergleich zu den hitzebehandelten Rohextrakten könnte an Matrixeffekten liegen.

<sup>3</sup> Föste et al. (2021) in preparation.

Zusammenfassend zeigt die hydrothermische Behandlung des Mehls bzw. der Saat, dass die Inaktivierung der endogenen Enzyme (LOX, POD) sowie der Trypsininhibitoren möglich ist. Erwartungsgemäß sind die Trypsininhibitoren thermisch am stabilsten, während im Ackerbohnenmehl POD thermisch stabiler als LOX erscheint. Daher ist für die Beurteilung der Enzyminaktivierung eine Ermittlung der POD-Restaktivität als Indikator möglich.

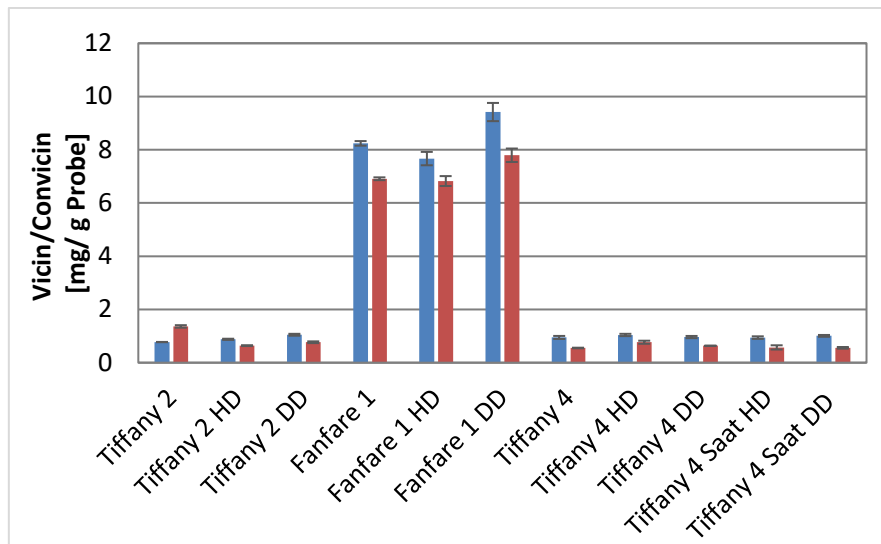
Zudem wurde die ganze Saat der Sorte Tiffany 4 hydrothermisch sowohl mittels Konvektomat als auch mittels Druck-Dampfgarer behandelt und der Einfluss auf die POD-Aktivität untersucht (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 15 Gegenüberstellung der Peroxidase-Aktivität nach hydrothermischer Behandlung von Ackerbohnenmehl und der Saat von Tiffany 4.**

Abk.: HD: Konvektomat = Hitze-Dampf; DD: Druck-Dampfgarer = Druck-Dampf. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2).

Im Vergleich zum hydrothermisch behandeltem Mehl, führten sowohl die Behandlung im Druck-Dampfgarer als auch die Behandlung im Kovektomat (100 % Dampf) zur vollständigen Inaktivierung der POD. Aus prozesstechnischer Sicht ist die hydrothermische Behandlung der ganzen Saat einer des Mehls vorzuziehen. Der Einfluss der hydrothermischen Behandlung auf die Vicingehalte ist in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 16: Vicin und Convicin Gehalte in hydrothermisch behandelten Ackerbohnenkernmehlen und -Saaten.**

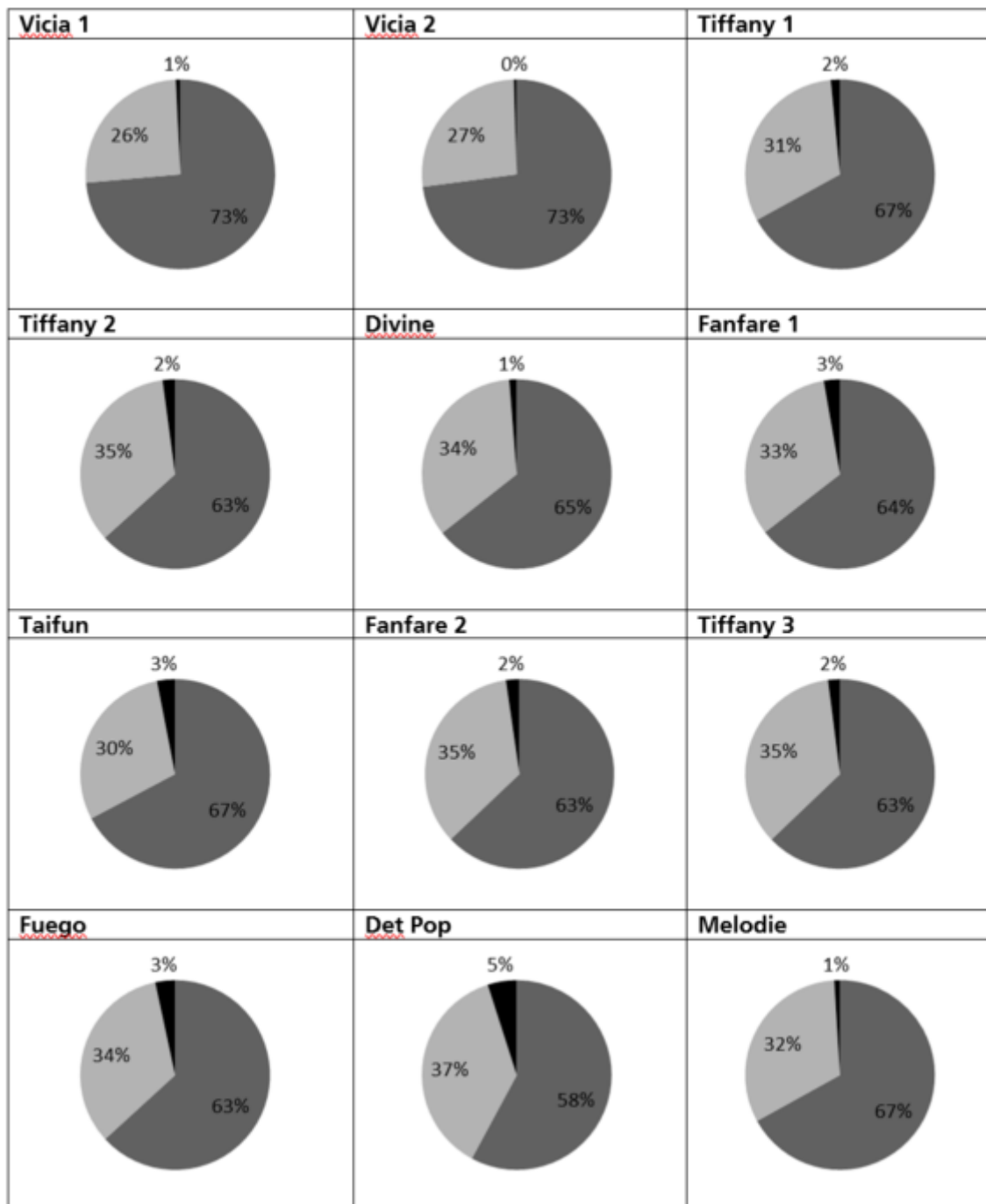
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3) für Vicin (■) und Convicin (■).

Für die Sorten Tiffany 2 und Tiffany 4 ist zu erkennen, dass sich der Vicingehalt nach der Hitze-Dampf Behandlung im Konvektomat (170 °C; 100 % Luftfeuchte) sowie nach der Behandlung im Druck-Dampfgarer, gemäß den Erwartungen, nicht wesentlich veränderte.

#### 4.5 Einfluss der Vermahlung und Siebung auf die Zusammensetzung des Ackerbohnenmehls

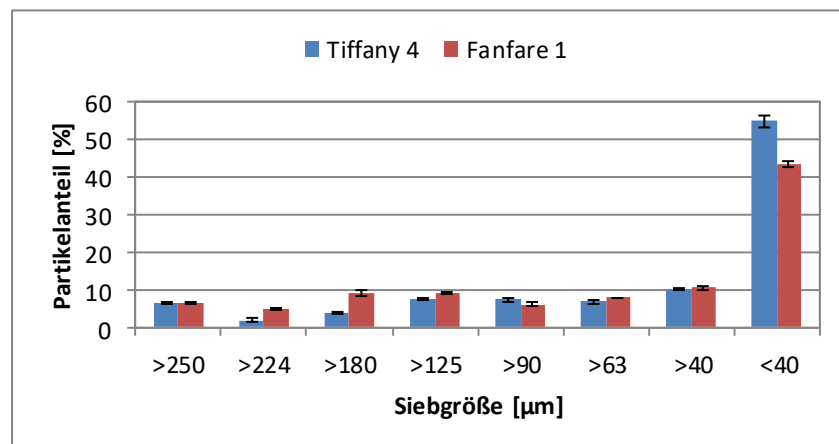
In Arbeitspaket 3 wurde die Herstellung von Mehlen und Konzentraten unter Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe untersucht. Dazu wurde gemäß AP 3.1 zunächst die Herstellung von Ackerbohnenmehlen betrachtet. Die 12 Ackerbohnen Genotypen wurden für das Sortenscreening auf den Anlagen des IVV getrennt (siehe Kapitel 3.2.1). Die folgende Tabelle 20 stellt die prozentualen Ausbeuten der Kern- und Schalenfraktionen sowie des Verlusts der jeweiligen Ackerbohnen Sorten dar. Es ist bekannt, dass die Tannine primär in der Ackerbohnen Schale lokalisiert sind und durch die Schälung reduziert werden (Gulewicz, Martinez-Villaluenga, Kasproicz-Potocka, & Frias, 2014; Multari et al., 2016). Die Ausbeuten der Kernfraktion variierten zwischen 58 % für die Sorte Det Pop bis hin zu 73 % für die Sorten Vicia 1 und Vicia 2, die Schalenfraktion erzielte Anteile zwischen 26 % (Vicia 1; Vicia 2) bis 37 % (Det Pop). Durch Schälung war keine Reduktion des Phytinsäuregehalts realisierbar.

**Tabelle 19: Ausbeuten der Separation der Ackerbohnen in Kern- und Schalenfraktion mittels Schälung und Sichtung.**



Dargestellt sind die Ausbeuten (%) für folgenden Fraktionen: Kerne (dunkelgrau), Schale (hellgrau) und Verlust (schwarz).

Basierend auf den Arbeiten aus AP1 wurden für die Vermahlung in AP3 die Sorten Tiffany 4 und Fanfare 1 verwendet. So wurden die Ackerbohnenmehle der Sorten Tiffany 4 und Fanfare 1 nach der Vermahlung durch anschließende Siebung in die Partikelgrößen (<40 µm, >40 µm, >63 µm, >90 µm, >125 µm, >180 µm, >224 µm, >250 µm) getrennt. Die Partikelanteile [%] in Abhängigkeit der Siebgröße [µm] für die Sorten Tiffany 4 und Fanfare 1 sind in Abbildung 21 aufgeführt.



**Abbildung 17: Prozentuale Partikelgrößenverteilung für die Kernmehle der Ackerbohnsorten Tiffany 4 und Fanfare 1.**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (n=2).

Die Partikelgrößenverteilung zeigt, dass über 40 % der Partikel kleiner als 40 µm waren und für die Sorte Tiffany 4 sogar mehr als 50 %. Die ausgewählten Siebfraktionen wurden hinsichtlich ihre analytische Zusammensetzung untersucht. In Tabelle 21 sind der Protein- und Phytinsäuregehalt bezogen auf die Trockenmasse dargestellt.

**Tabelle 20: Analytische Zusammensetzung von Ackerbohnenkernmehlen der Sorten Tiffany und Fanfare in Abhängigkeit der Partikelgröße.**

	Partikelgröße [µm]	TM [%]	Protein [% TM]	Phytinsäuregehalt [% TM]
Tiffany 4	300	89,9 $\pm$ 0,0	27,5 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0
	250	90,1 $\pm$ 0,1	31,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,0
	40	91,1 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,0
Fanfare 1	300	90,1 $\pm$ 0,1	29,5 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,0
	250	90,3 $\pm$ 0,0	31,0 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1
	40	89,9 $\pm$ 0,1	33,9 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,0

Auffällig war, dass für beide Sorten (Tiffany 4; Fanfare 1) mit abnehmender Partikelgröße der Proteingehalt zunahm. Durch die Reduktion der Partikelgröße stieg der Proteingehalt in den Sorten Tiffany 4 (21 % rel.) und Fanfare 1 (15 % rel.) an. Der Phytinsäuregehalt blieb mit

abnehmender Partikelgröße nahezu unverändert, so dass durch Siebung keine Abreicherung der Phytinsäure in den Mehlen erzielt wurde.

#### 4.6 Gewinnung von Proteinkonzentraten unter Berücksichtigung der Bilanzierungsdaten

Die Herstellung von Ackerbohnenkonzentraten gemäß AP3.2 wird nachfolgend beschrieben. Zur Auswahl der Extraktionsparameter wurde zunächst die Proteinlöslichkeit der Ackerbohnenkernmehle gemäß AP4 (siehe Kapitel 4.7) analysiert. Auf dieser Basis wurde in den nachfolgenden Extraktionen ein pH-Wert von 7,5 gewählt und die Extraktion in reinem Wasser durchgeführt. Für die Extraktionen wurden verschiedene Prozessparameter variiert. Die Ergebnisse sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 21 Übersicht der Bilanzierungsdaten für die gewonnenen Proteinkonzentrate.

Versuch	Sorte	Konzentrierung	PGA [%]	TMA [%]	PG [% TM]
Fällung pH 3.5	Tiffany 4	IEP	62,8	26,7	79,9
Fällung pH 4.0	Tiffany 4	IEP	72,7	30,4	81,4
Fällung pH 4.5	Tiffany 4	IEP	72,0	29,3	83,4
Fällung pH 5.0	Tiffany 4	IEP	73,1	29,1	84,9
S:L 1:5	Tiffany 4	IEP	81,3	33,4	81,3
S:L 1:10	Tiffany 4	IEP	72,7	30,4	81,4
S:L 1:15	Tiffany 4	IEP	68,0	25,2	82,9
Temperatur 25 °C	Tiffany 4	IEP	81,3	33,4	81,3
Temperatur 30 °C	Tiffany 4	IEP	78,6	34,4	81,4
SVE 4.5, E 7.5	Tiffany 4	IEP	69,5	34,8	85,1
SVE 5.5, E 7.5	Tiffany 4	IEP	57,1	30,9	90,2
S:L 1:5	Tiffany 4	IEP	66,0	24,2	82,2
S:L 1:5	Tiffany 4	UF	69,9	25,7	82,1
SVE 4.5 - Ü	Tiffany 4	UF	5,3	4,5	35,8
SVE 5.5 - Ü	Tiffany 4	UF	11,3	6,5	52,6
SVE 4.5, E 7.5	Tiffany 4	UF	62,0	19,8	94,3
SVE 5.5 E 7.5	Tiffany 4	UF	57,6	18,0	96,3
S:L 1:5 Saat HD	Tiffany 4	IEP	41,9	13,7	92,3
S:L 1:5	Fanfare 1	IEP	66,4	22,4	87,6

Abk: Trockensubstanzausbeute (TMA); Proteingesamtausbeute (PGA); Proteingehalt (PG).

Die Veränderung des pH-Werts bei der isoelektrischen Fällung (IEP) von 3,5 auf 5,0 erhöhte tendenziell die Proteingesamtausbeute (PGA) sowie den Proteingehalt (PG) in den Ackerbohnenkonzentraten. Für weitere Versuche wurde der pH-Wert 4 für die IEP gewählt.

Mit zunehmendem s:L-Verhältnis (1:5; 1:10; 1:15) nahm die PGA und die Trockensubstanzausbeute (TMA) ab. Die PGA war bei einem s:L-Verhältnis von 1:5 mit 81,3 % und einer TMA von 33,4 % am höchsten. Diese Beobachtung zur Abnahme der PGA- und TMA mit steigendem s:L-Verhältnis machten auch (Flink & Christiansen, 1973) und empfahlen ein s:L-Verhältnis von 1:6. Der Einfluss der Temperatur von 25 °C auf 30 °C zeigte nahezu keinen Einfluss auf die PGA und den PG.

Phytinsäure kann mit Proteinen eine Komplexbildung eingehen und dadurch die Proteinlöslichkeit reduzieren. Eine Möglichkeit zunächst die Phytinsäure zu lösen und dann das Protein zu extrahieren, bietet die saure Vorextraktion (SVE). Die detaillierten Prozessparameter sind dem Kapitel 3.2.3 zu entnehmen. Im Gegensatz zum Standardextraktionsprozess (T=30 °C, pH 7,5, s:l= 1:5 und t= 60 min), wurde bei der SVE das Mehl vorab in saurer Lösung bei pH 4,5 bzw. 5,5 extrahiert, die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Ohne SVE ließen sich 78,6 % der Proteine aus dem Kernmehl der Sorte Tiffany 4 gewinnen. Durch die SVE bei pH 4,5 nahm die PGA auf 69,5 % ab. Die SVE bei pH 5,5 reduzierte die PGA auf 57%, allerdings zu Gunsten eines höheren Proteingehalts von 90,2 % TM.

Die Versuche zur Gewinnung von Ackerbohnenprotein haben gezeigt, dass aus dem Ackerbohnenmehl der Sorte Tiffany 4 ca. 86 % der Proteine gelöst wurden und somit bereits im Extrakt enthalten waren. Die Untersuchungen zur Aufkonzentrierung der Proteine mittels Ultrafiltration (UF) ergaben, dass 14 % der Proteine ins Permeat gelangten und 71,3 % der Proteine im Retentat aufkonzentriert wurden. Der PG im gefriergetrockneten Konzentrat betrug 82,1%. Im Vergleich zur IEP des Standardprozesses (siehe Tabelle 22) lagen die PG beider Konzentrate in einer vergleichbaren Größenordnung (ca. 82 %). Die PGA war jedoch mit 69,9 % durch die Konzentrierung mittels UF minimal erhöht. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss die UF auf die Konzentrierung des PG im Überstand nach SVE (pH 4,5 und pH 5,5) hat. Ein höherer pH-Wert von 5,5 bei der SVE hatte zur Folge, dass mehr Proteine gelöst vorlagen und somit in den Überstand gelangten. Dadurch nahm die PGA und der PG im Konzentrat zu und war somit höher als nach SVE bei pH 4,5.

### Reduktion der antinutritiven Inhaltsstoffe in den Konzentraten

Der Einfluss einer wässrig alkalischen bzw. sauren Vorextraktion auf die Effektivität zur Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe (Phytinsäure, Vicin) wurde für ausgewählte Konzentrate (gemäß AP3) untersucht und ist in Tabelle 23 dargestellt. Im Vergleich zum nativen Kernmehl der Sorte Tiffany 4, mit einem Phytinsäuregehalt von 1,2 % TM, stieg dieser im

Ackerbohnenkonzentrat auf 2,7 % TM an. Erfolgte die SVE bei pH 4,5 veränderte sich der Phytinsäuregehalt nicht wesentlich (2,9 % TM). Durch die SVE bei pH 5,5 wurde der Phytinsäuregehalt um 43 % rel. abgereichert, war jedoch im Vergleich zum Ausgangsmehl im Konzentrat noch um 33 % erhöht. Der Vergleich beider Konzentrierungsmethoden (IEP/ UF) ließ erkennen, dass das ultrafiltrierte Konzentrat mit 3,2 % TM einen deutlich höheren Phytinsäuregehalt aufwies als jenes Produkt nach IEP (2,7 % TM). Ebenso war nach SVE der ultrafiltrierten Konzentrate sichtbar, dass der Phytinsäuregehalt durch die SVE bei pH 5,5 auf bis zu 1,64 % TM reduziert wurde.

**Tabelle 22 Überblick zum Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe in Ackerbohnenproteinkonzentraten.**

<b>Extraktionsprodukt</b>	<b>Phytinsäure [% TM]</b>	<b>Vicin [mg/g Probe]</b>	<b>Convicin [mg/g Probe]</b>
Tiffany 4 (T4)	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0
T4 K IEP	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0	1,3 ± 0,4
T4 K IEP_SVE_4,5	2,9 ± 0,0	-	
T4 K IEP_SVE_5,5	1,6 ± 0,0	-	
T4 K IEP SHD	-	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,1
T4 K UF	3,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,7 0,2
T4 K UF_SVE_4,5	2,7 ± 0,0	-	
T4 K UF_SVE_5,5	1,6 ± 0,0	-	
Fanfare 1	-	8,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1
Fanfare 1 IEP	-	4,7 ± 0,0	4,8 ± 0,0

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Löslichkeit der Phytinsäure bei pH 5,5 deutlich höher als bei pH-Wert 4,5 war. Basierend auf den Daten zur Bilanzierung bleibt festzuhalten, dass mit der Abreicherung von Phytinsäure, ein erhöhter Anteil des Proteins bei der SVE mit ausgewaschen wurde und folglich nicht mehr für den Extraktionsprozess zur Verfügung stand, was die PGA reduzierte.

Die chromatographische Analyse zum Vicingehalt der Konzentrate zeigte, dass im Vergleich zum Ausgangsmehl mit einem Vicingehalt von 1,0 mg/g Probe, dieser durch die wässrige Extraktion mit anschließender IEP abnahm (0,5 mg/g Probe). Auffällig war, dass das mittels UF gewonnene Proteinisolat einen deutlich höheren Vicingehalt (1,3 mg/g Probe) aufwies. Die Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass Ackerbohnenmehle mit einem hohen Vicingehalt, wie sie in der Sorte Fanfare 1 (8,2 mg/g Probe) vorlagen, durch eine wässrige Extraktion deutlich reduziert wurden (4,7 mg/g Probe). Zusammenfassend lag die Reduktion des Vicingehalts für die untersuchten Konzentrate in einem Bereich von bis zu 50 % rel.



## Endogene Enzymaktivität in Konzentraten

Der Einfluss einer wässrigen Extraktion auf die Reduktion endogener Enzyme und Trypsininhibitoren im Ackerbohnenisolat der Sorte Tiffany 4 ist in Tabelle 24 dargestellt.

**Tabelle 23: Restaktivitäten der Trypsininhibitor-Aktivität, Lipoxygenase-Aktivität sowie Peroxidase-Aktivität im Isolat im Vergleich zum Rohstoff.**

Medium/ Prozessschritt	TIA		LOX		POD	
	TIU [mg Probe]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]	EA [nkat/ mg Protein]	RA [% rel.]
M nativ	2,7		37,8		2,0	
K S:L 1:5 IEP	0,9	35,5	0,1	0,3	0,1	4,4
K S:L 1:5 UF					0,1	
K SVE 4.5, E 7.5 UF					0,1	

Dargestellt sind die Mittelwerte (Trypsininhibitor-Aktivität: n=4, Lipoxygenase und Peroxidase: n=6). Abk.: TIA: Trypsininhibitor-Aktivität, LOX: Lipoxygenase; POD: Peroxidase; EA: Enzymaktivität; RA: Restaktivität; E: Extraktion.

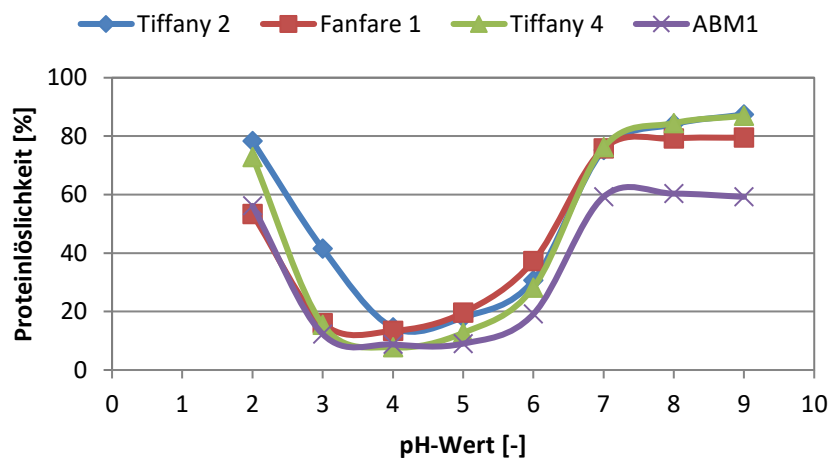
Durch die Gewinnung des Proteinisolats ließ sich die TIA auf eine Restaktivität von 35 % rel. im Vergleich zum Ausgangsmehl reduzieren. Die LOX zeigte im Konzentrat nahezu keine Restaktivität mehr (<0,3% rel.). Die relative Restaktivität der POD lag im Proteinisolat nach IEP < 5% im Vergleich zum nativen Ackerbohnenmehl der Sorte Tiffany 4. Ebenso lag in den mittels UF gewonnen Proteinisolat die relative POD-Aktivität < 5%.

### **4.7 Funktionelle Eigenschaften von Mehlen und Konzentraten**

Parallel zu den AP1 bis AP3 war eine prozessbegleitende Analytik (gemäß AP4) geplant, welche ergänzend die Bestimmung der funktionellen Eigenschaften sowie der sensorischen Bewertung vorsah. Zunächst wurde die Proteinlöslichkeit (PL) der Ausgangsmehle bestimmt, um hier die Prozessparameter für die Gewinnung der Proteinkonzentrate festzulegen.

Somit wurden die ausgewählten Sorten (Tiffany 2 Fanfare 1, Tiffany 4 und ergänzend ABM1 hinsichtlich ihrer pH-abhängigen Löslichkeit analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 aufgezeigt. Die Sorten Tiffany 2 und Tiffany 4 zeigten einen vergleichbaren Verlauf. Während die PL für die Sorten (Tiffany 2 und Tiffany 4) bei pH 2 und pH 7 nahezu identisch war (ca. 70 %) wurde für die Sorte Fanfare 1 bei pH 2 eine PL von ca. 50% ermittelt. Bei pH-Werten > 8 kommt es häufig zu negativen Auswirkungen auf die Sensorik aufgrund von

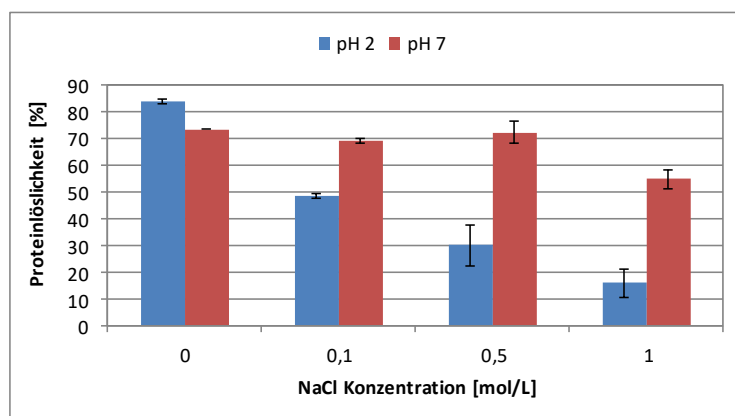
Enzymaktivitäten oder infolge von verstärkter Polyphenoloxidation. Der isoelektrische Punkt für alle Sorten lag im pH-Bereich zwischen 4-5.



**Abbildung 18: Proteinlöslichkeitsprofil unterschiedlicher Ackerbohnen Sorten in Abhängigkeit des pH-Werts.**

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2) für die Sorten Tiffany 2, Fanfare 1, Tiffany 4 und ABM1.

Da die Ackerbohne neben einem hohen Anteil an wasserlöslichen Albuminen (ca. 20%) ebenfalls einen hohen Anteil an salzlöslichen Globulinen (ca. 60%) beinhaltet (Belitz und Grosch, 2013), wurde nachfolgend der Einfluss der Salzkonzentration auf die Proteinlöslichkeit analysiert. So wurde für die Sorte Fanfare 1 überprüft, welchen Einfluss die Konzentration des Salzes (0,0; 0,1; 0,5 und 1,0 mol/L NaCl) bei den pH-Werten 2 und 7 auf die PL haben (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 19: Einfluss der Salzkonzentration auf die Proteinlöslichkeit von Ackerbohnenkernmehlen für die pH-Werte 2 und 7.**

Untersucht wurden die Sorte Fanfare 1 unter Berücksichtigung folgender NaCl-Konzentrationen: 0.0 mol/L, 0.1 mol/L, 0.5 mol/L und 1 mol/L: Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2).

Die Ergebnisse zeigten, dass die PL für die Sorte Fanfare 1 in wässrigem Medium (0.0 mol/L NaCl) am höchsten war und mit zunehmendem NaCl-Gehalt insbesondere bei pH-Wert 2

deutlich abnahm, wohingegen bei pH 7 erst eine höhere NaCl-Konzentration (1.0 mol/L) zu einer abnehmenden PL von ca. 52 % führte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die nachfolgenden Extraktionen in Wasser durchgeführt (vgl. Kapitel 4.6).

Der verfahrenstechnische Einfluss (hydrothermische Behandlung; wässrig alkalische Extraktion) auf die funktionellen Eigenschaften von Ackerbohnenmehlen und Proteinkonzentraten (gemäß AP4) zeigt Tabelle 25.

**Tabelle 24 Übersicht der funktionellen Eigenschaften von Ackerbohnenmehlen und –konzentraten.**

	<b>PL pH 7</b> [%]	<b>WBC</b> [ml/ g]	<b>EC</b> [ml/ g]	<b>LGC</b> [%]
<b><i>Mehle - nativ</i></b>				
Tiffany 2	78	1,1	520	8
Fanfare 1	71	1,2	515	8
Tiffany 4 <sup>4</sup>				
Tiffany 4 HD <sup>4</sup>				
Tiffany 4 DD <sup>4</sup>				
Tiffany 4 Saat HD <sup>4</sup>				
Tiffany 4 Saat DD <sup>4</sup>				
<b><i>Konzentrate IEP</i></b>				
Tiffany 4	50	1,9	575	14
Tiffany 4 SVE 4,5	64	1,4	490	12
Tiffany 4 Saat HD	80	0,3	790	10
Fanfare 1	69	1,9	720	14
<b><i>Konzentrate UF</i></b>				
Tiffany 4	66	1,3	610	18
Tiffany 4 SVE 4.5	79	1,6	655	14
Tiffany 4 SVE 5.5	71	2,1	590	14

Die Proteinlöslichkeit (PL) variierte in den nativen Ackerbohnenmehlen zwischen 71-78 %. Nach hydrothermischer Behandlung sowohl des Mehls als auch der Saat nahm die PL deutlich ab. Unter Berücksichtigung des Ausgangsmaterials (Mehl; Saat) war die PL mit 18-24% deutlicher niedriger, sofern das Mehl hydrothermisch behandelt wurde. Die PL in den Konzentraten variierte je nach Konzentrierungsverfahren von 50-80% nach IEP und 66-79 % nach UF. Tendenziell war die PL in den untersuchten Konzentraten etwas geringer als im nativen Mehl. Die Emulgierkapazität (EC) war in den hydrothermisch behandelten Saaten (325-380 ml/g) deutlich geringer als im nativen Mehl (515-545 ml/g). Im Gegensatz dazu

<sup>4</sup> Föste et al. (2021) in preparation.

wiesen die Proteinkonzentrate unabhängig vom verwendeten Konzentrierungsverfahren (IEP/UF) deutlich höhere EC in einem Bereich von (575-790 ml/g) auf. Die minimale Gelbildungskonzentration betrug in den nativen Ackerbohnenmehlen 8 % und veränderte sich nach hydrothermischer Behandlung auf 6 %. Die minimale Gelbildungskonzentration in den Konzentraten variierte von 12-14 % nach IEP und 14-18 % nach UF.

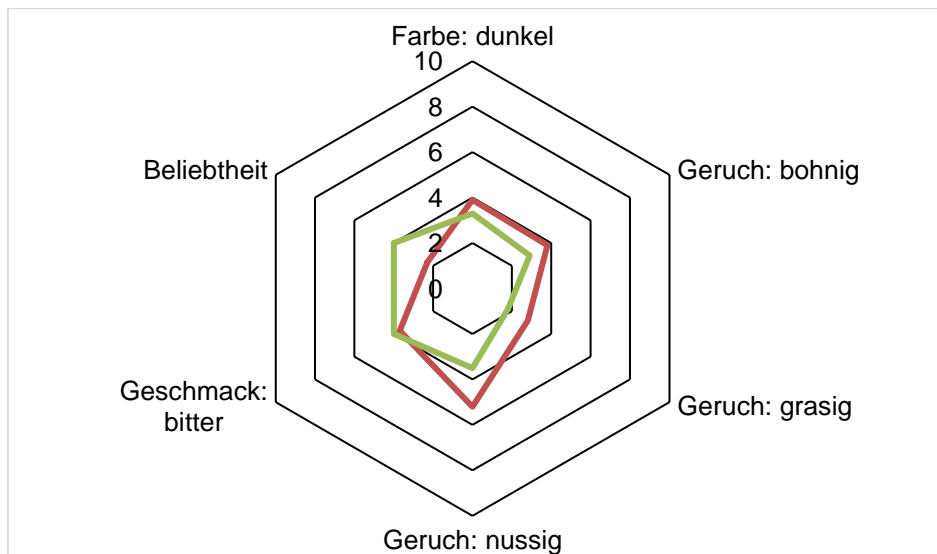
#### **4.8 Sensorik von Mehlen und Konzentraten**

Die sensorische Bewertung umfasst Attribute für die Farbe, den ortho- und retronasalen Geruch, den Geschmack und die Beliebtheit des nativen und des mittels Hitze-Dampf (100% Dampfzufuhr) behandelten Ackerbohnenmehls der Sorte Tiffany 2 zusammen (vgl. AP4). Im Vergleich zum nativen Mehl der Sorte Tiffany 2 wurde das Hitze-Dampf behandelte Mehl dunkler eingestuft. Das native Mehl wurde mit einem grasigen und bohnenigen Geruch beschrieben, wohingegen nach hydrothermischer Behandlung diese Attribute deutlich geringer wahrnehmbar waren.<sup>5</sup> Darüber hinaus wurde die hydrothermisch behandelte Mehlprobe mit einem intensiven nussigen Geruch beschrieben. Die Bildung der gerösteten bzw. nussigen Komponente könnte u.a. auf die Maillard-Reaktion zurückzuführen. Dabei entstehen bei hohen Temperaturen aus Aminosäuren und reduzierenden Zuckern typische Aromakomponenten, welche ebenfalls die Bräunung unterstützt. Im Vergleich zum nativen Mehl wurde die Beliebtheit des mittels Hitze-Dampf behandelten Mehls deutlich höher eingestuft.

---

<sup>5</sup> Föste et al. (2021) in preparation.

Die sensorische Evaluierung von ausgewählten Proteinkonzentraten wurde ebenfalls untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 20: Sensorische Evaluierung von Proteinkonzentraten aus Ackerbohnen.**

Gezeigt sind das Proteinisolat der Sorte Tiffany 4 nach IEP (■) und das Isolat der Sorte Tiffany 4 nach Hitze-Dampf Behandlung der Saat mittels Konvektomat (■). Dargestellt sind die Mittelwerte von (n=20) aus Verkostungen zweier unterschiedlicher Tage.

Im Vergleich zum Proteinisolat der Sorte Tiffany 4 nach IEP, stuften die Probanden den Geruch des Hitze-Dampf behandelten Konzentrats deutlich geringer bohlig und grasig ein. Wider Erwarten empfanden die Panelisten das mittels IEP hergestellte Konzentrat deutlich nussiger. Hinsichtlich des bitteren Geschmacks wurden keine Unterschiede festgestellt. Die Probanden stuften das Proteinisolat aus dem hydrothermisch behandelten Mehl mit der höchsten Beliebtheit ein.

#### 4.9 Scale-Up und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

In Anlehnung an AP3 wurde das Verfahren zur Gewinnung der Proteinkonzentrate in den industriellen Maßstab überführt. Dazu wurden mit Blick auf die Umsetzbarkeit und die Prozessausbeuten, die Extraktionsparameter für den Scale-Up Versuch festgelegt. So war entscheidend, dass die PGA mit ca. 41% für das Konzentrat basierend auf dem hydrothermisch behandelten Mehl der Sorte Tiffany 4 deutlich geringer war als für die Konzentrate basierend auf nativem Mehl. Hier betrug die PGA nach Konzentrierung mittels IEP (66,9%) nach UF (69,9%). Auf Basis der Laborversuche erfolgte die Extraktion bei pH 7,5 für eine Stunde mit anschließender isoelektrischer Fällung bei pH 4,5 zur Konzentrierung der Ackerbohneproteine. In Abbildung 26 sind die einzelnen Prozessschritte und jeweiligen

Stoffströme skizziert, daneben wurden die TM Gehalte der eingesetzten Rohware, aller Zwischenprodukte und des Proteinkonzentrats aufgeführt.

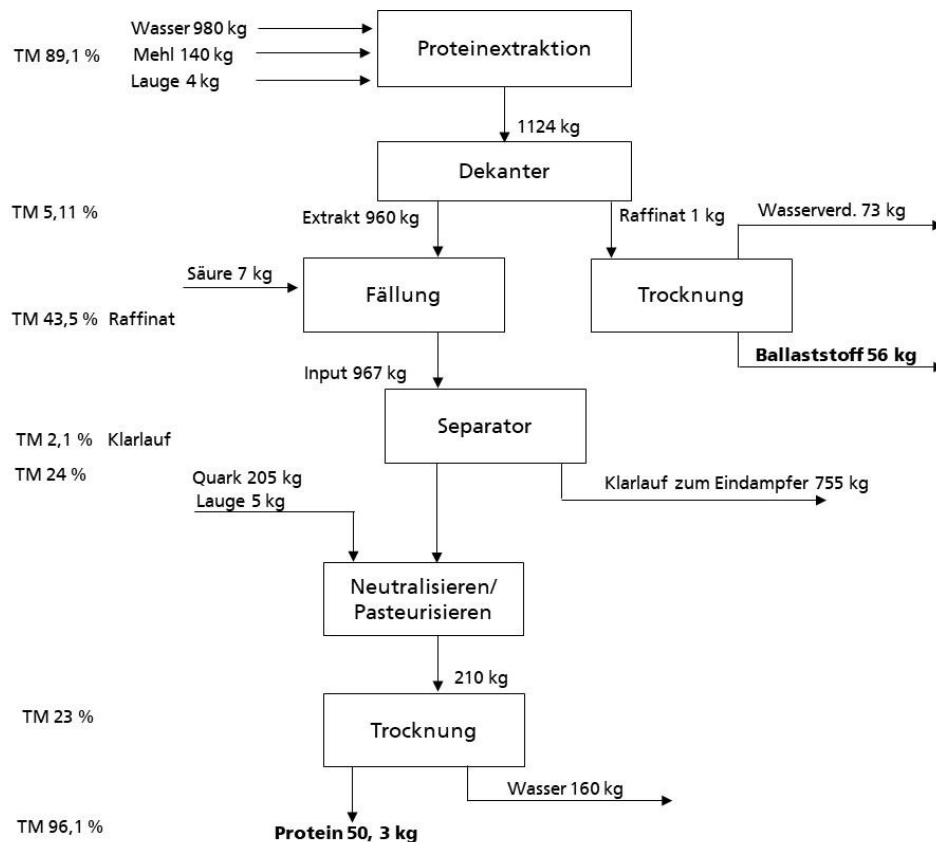


Abbildung 21: Übersicht des Scale-Up Prozesses, der Massenströme und Trockenmassegehalte.

Die analytische Zusammensetzung ergab, dass das im Scale-Up hergestellte Konzentrat einen TM Gehalt von 96,1 % und einen Proteingehalt von 80,2 % TM aufwies.

Zudem wurde für das Konzentrat des Scale-Ups die POD-Aktivität im Vergleich zum Ausgangsmehl ABM2 bestimmt (vgl. AP2). Während die POD-Aktivität im Ausgangsmehl 1,5 nkat/ mg Protein betrug, führte die Konzentratherstellung zur vollständigen Reduktion der POD (0,09 nkat/ mg Protein). Zudem wurden gemäß AP1 die antinutritiven Inhaltsstoffe (Phytinsäure, Vicin/Convicin Gehalt) im Konzentrat quantifiziert, diese sind in Tabelle 26 gegenübergestellt.

Tabelle 25 Überblick zum Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe im Scale-Up Konzentrat.

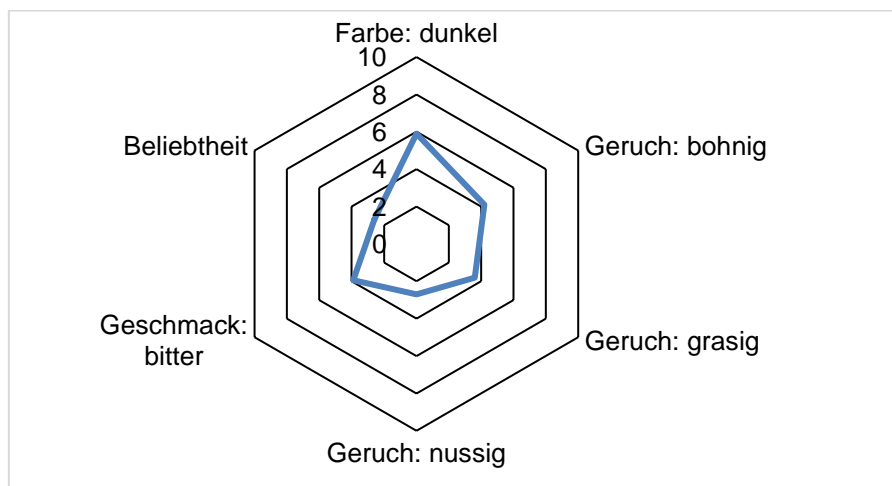
Medium	Phytinsäure [% TM]	Vicin [mg/g Probe]	Convicin [mg/g Probe]
Ackerbohnenmehl ABM2	1,3 ± 0,1	8,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1
Konzentrat IEP	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	5,4 ± 0,1

Die funktionellen Eigenschaften des Ackerbohnenmehls ABM2 im Vergleich zum Scale-Up Konzentrat sind in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 26 Übersicht der funktionellen Eigenschaften des Scale-Up Konzentrats.**

Medium	PL pH 7 [%]	WBC [ml/ g]	EC [ml/ g]	LGC [%]
Ackerbohnenmehl ABM2	60	1,4	530	8
Konzentrat IEP	52	2,0	580	14

Im Vergleich zu den nativen Ackerbohnenmehlen aus den Versuchen des IVV (Tabelle 25), wies das kommerzielle Ackerbohnenmehl ABM2 mit 60 % eine deutlich geringere PL auf. Auch das Proteinkonzentrat erzielte mit 52 % eine etwas niedrige PL. Die WBC war mit 2 ml/g etwas höher als im Ackerbohnenmehl ABM2. Die EC lag mit 580 ml/g in einer vergleichbaren Größenordnung wie das Proteinkonzentrat basierend auf der Sorte Tiffany 4 nach IEP. Die sensorische Evaluierung (vgl. AP4) für das Proteinkonzentrat ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 22: Sensorisches Bewertungsprofil für das Proteinisolat aus dem Scale-Up Versuch.** Dargestellt sind die Mittelwerte von (n=20) aus Verkostungen zweier unterschiedlicher Tage.

Die Probanden stufte das Proteinkonzentrat als dunkel ein. Der Geruch wurde im Vergleich zu anderen Konzentraten etwas grasiger bzw. bohlig empfunden. Im Vergleich Konzentrat basierend auf dem hydrothermisch behandelten Mehl, war die Beliebtheit des Scale-Up Konzentrats deutlich geringer.

### Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Um eine Wirtschaftlichkeitsbetrachtung vornehmen zu können, bedarf es zunächst eines Überblicks der einzelnen Prozessschritte und der jeweiligen Stoffströme (siehe Abbildung 26). Zur Ermittlung der Wirtschaftlichkeit werden die Erlöse aller im Prozess gewonnenen Produkte den variablen Kosten (Material-, Prozess und Personalkosten) und den Fixkosten (Anlagenkosten) gegenübergestellt, um die Kosten für ein Kilogramm Ackerbohnenproteinisolat abzuschätzen. Die Rohstoffvorbereitung wurde in diesem Beispiel nicht berücksichtigt. Für die Rohstoffe werden marktübliche Preise und für mögliche Begleitprodukte marktübliche Erlöse von ähnlichen Produkten veranschlagt. Pro Tonne Ackerbohnenmehl könnten basierend auf den im Scale-up ermittelten Ausbeuten ca. 340 kg Proteinpulver hergestellt werden. Während des Prozesses ließen sich zudem weitere Begleitstoffe wie unlösliche Ballaststoffe und Melasse (eingedampfter Fällungsüberstand) gewinnen. Die Preise für Ackerbohnenprotein wurde mit Grenzkosten von 3,29 Euro, für unlösliche Ballaststoffe mit 1,50 Euro und für Melasse mit 0,20 Euro unter der Annahme, dass die Verarbeitungskapazität bei 3000 t/a liegen und das Verfahren auf einer bestehenden Anlage durchgeführt wird, kalkuliert. Weiterhin wurde für das eingesetzte Ackerbohnenmehl ein Preis von 500 Euro/t kalkuliert, dieser Betrag kann aufgrund von jahresabhängigen Preisschwankungen und mengenabhängigen Lieferverträgen zwischen 350 und 550 Euro/t variieren.






#### 4.10 Herstellung von Modellelebensmitteln

Gemäß Arbeitsplanung (siehe AP5) wurden Modellrezepturen für Backwaren, vegane Burger-Patties und Dessertprodukte entwickelt und diese hinsichtlich ihrer Qualitätsmerkmale bewertet.

##### Rührkuchen

Die Anwendbarkeit der Ackerbohnenmehle wurde anhand einer Modellrezeptur für Rührkuchen untersucht. Die Rezeptur und Herstellungsweise sind in Kapitel 3.2.10 beschrieben. In Tabelle 28 sind ausgewählte Qualitätsmerkmale der Rührkuchen dargestellt.

Tabelle 27: Farbgebung der Krume von Rührkuchen mit Ackerbohnenmehl.

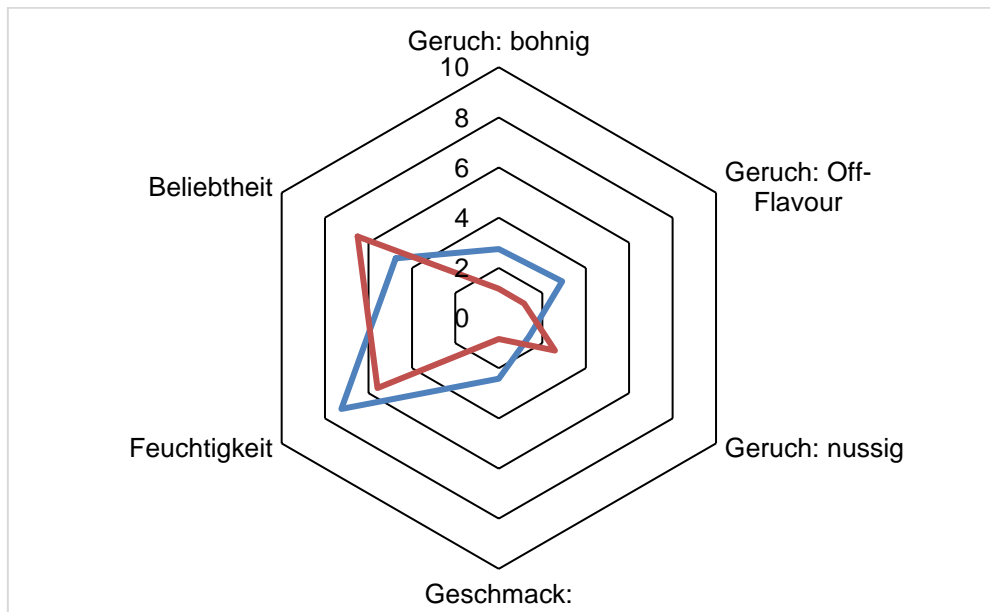
	Nativ	Hitze-Dampf (100%)	Weizenmehl
<b>Farbgebung</b>			
<b>Spezifisches Volumen [ml/ g]</b>	2,2 ± 0,0	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
<b>L*</b>	78,7	81,1	85,7
<b>a*</b>	3,8	5,2	3,79
<b>b*</b>	24,9	31,3	28,9

Gezeigt sind die Aufnahmen der Sorte Tiffany 4 unter Berücksichtigung folgender Variationsstufen: a) natives Mehl b) nach Hitze-Dampf Behandlung der Saat im Konvektomat (170 °C, 100% Dampfzufuhr, 10 min) und c) Weizenmehl. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD (n=3) für das spezifische Volumen.

Das spezifische Volumen der Kuchen mit Weizenmehl und hydrothermisch behandelten Ackerbohnenmehl betrug 2,0 mL/g. Das Kuchenvolumen nach Einsatz von nativem Ackerbohnenmehl war mit 2,2 ml/g leicht erhöht. Der optische Vergleich ließ keine sichtbaren Unterschiede zwischen dem Rührkuchen basierend auf Weizenmehl sowie dem nativen und Hitze-Dampf behandelten Ackerbohnenmehl hinsichtlich der Krumenstruktur und Farbgebung erkennen. Die ergänzende Bestimmung der Farbveränderung mittels L\*a\*b\*-Messung zeigt, dass der Weizenmehlkuchen mit einem L\*-Wert von 85,7 die hellste und der Rührkuchen mit nativem Ackerbohnenmehl (L\*-Wert von 78,7) die dunkelste Farbgebung aufwies. Sowohl der

a\* Wert (5,2) als auch der b\*Wert (31,3) war in dem hydrothermisch behandelten Mehl im Vergleich zum nativen Mehl erhöht.

Die sensorische Evaluierung der Rührkuchen ergab, dass die Rührkuchen mit nativem Mehl mit einem Off-Flavour sowie einem bohigen Geruch eingestuft wurden (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 23: Einfluss von Ackerbohnenmehl auf das Geschmacksprofil von Rührkuchen.**

Gezeigt sind das native Kernmehl Tiffany 4 (■) und das mittels Konvektomat Hitze-Dampf behandelte Kernmehl Tiffany 4 (■), welches für 10 Minuten bei 170 °C und 100% Luftfeuchtigkeit behandelt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte von (n=12) aus Verkostungen zweier unterschiedlicher Tage.




Im Gegensatz dazu stufen die Probanden den Rührkuchen mit Hitze-Dampf behandeltem Mehl sowohl im bohigen Geruch als auch hinsichtlich des Off-Flavours geringer ein. Der nussige Geruch des Hitze-Dampf behandelten Mehls wurde als weniger stark im Vergleich zu den wässrigen Suspensionen empfunden, war jedoch in den Rührkuchen immer noch leicht wahrnehmbar. Obwohl die Probanden die mit Hitze-Dampf behandelten Ackerbohnenmehl hergestellten Rührkuchen als trockener empfanden, ist davon auszugehen, dass die Reduktion des bohigen Geruchs die höhere Beliebtheit begründet.

Anknüpfend an die Ergebnisse zur endogenen Enzymaktivität (siehe AP2) wurde gezeigt, dass sowohl LOX nahezu vollständig inaktiviert vorlag und die POD eine Restaktivität von < 10% nach der Hitze-Dampf Behandlung im Konvektomat aufwies. Die Ausbildung unerwünschten Fehleraromen im Vergleich zum nativen Mehl sollte somit deutlich reduziert sein und wurde hier von den Probanden durch die sensorische Evaluierung bestätigt.

## Weizenbrote

Die Anwendbarkeit der Ackerbohnenmehle wurde anhand einer Modellrezeptur für Weizenbrote untersucht. Die Rezeptur und Herstellungsweise sind in Kapitel 3.2.10 beschrieben. In Tabelle 29 sind ausgewählte Qualitätsmerkmale der Weizenbrote dargestellt.

**Tabelle 28 Qualitätsmerkmale von Weizenbroten mit Ackerbohnenmehl.**

	Weizenmehl	Ackerbohnenmehl Tiffany 4 nativ	Ackerbohnenmehl T4 Druck-Dampf
			
<b>Krume</b>	L*: 78,4 a*: 3,5 b*: 24,6	L*: 78,8 a*: 3,8 b*: 24,5	L*: 79,0 a*: 3,6 b*: 24,9
<b>Spez. Volumen [cm<sup>3</sup>/g]</b>	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
<b>Krumenhärte [N] (2 h)</b>	10,0 ± 0,5	11,0 ± 0,6	14,6 ± 0,9
<b>(1 d)</b>	17,5 ± 2,2	20,6 ± 1,6	25,9 ± 2,2

Untersucht wurden das Ackerbohnenmehl der Sorte Tiffany 4 nativ und nach Druck-Dampf Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD (n=3) für das spezifische Volumen und (n=4) für die Krumenhärte.

Das Krumenbild der Weizenbrote mit einem 30 %igen Anteil von nativem Ackerbohnenmehl der Sorte Tiffany 4 sowie mit Druck-Dampf behandeltem Mehl der Saat, war vergleichbar mit dem Referenzprodukt. Die Krumenfarbe des Brotes mit Druck-Dampf behandeltem AB-Mehl


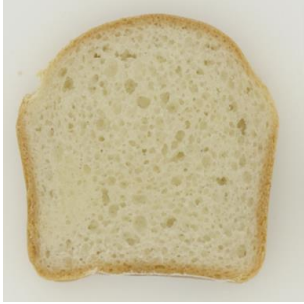


war mit einem L\*Wert von 79,0 etwas dunkler als das Referenzprodukt (78,4), und zeigte eine vergleichbare Farbe zum Brot mit 30 % nativem Ackerbohnenmehl. Das höchste spezifische Brotvolumen erzielte das Weizenbrot (2,4 ml/g), ebenso wies das Brot mit nativem Ackerbohnenmehl ein Volumen von 2,2 ml/g auf. Der Einsatz von Druck-Dampf behandeltem Mehl reduzierte das spezifische Brotvolumen (2,0 ml/g). Erwartungsgemäß war somit auch die Krumenhärte für das Brot mit Druck-Dampf behandeltem Ackerbohnenmehl am höchsten (14,6 N). Die Krumenhärte nach eintägiger Lagerung nahm für das Weizenbrot von 10 N auf 17,5 N zu. In den Broten mit Ackerbohnenmehl lag die Zunahme der Krumenhärte bei ca. 100 % rel.

Die Anwendbarkeit der Ackerbohnenmehle wurde zusätzlich auch in einer Modellrezeptur für glutenfreie Brote (GFB) untersucht. Die Rezeptur und Herstellungsweise sind in Kapitel 3.2.10 beschrieben. In Tabelle 30 sind ausgewählte Qualitätsmerkmale der GFB dargestellt.

Das Krumbild der GFB war nahezu vergleichbar, unabhängig von dem enthaltenen Anteil (50 % bzw. 30 %) an Ackerbohnenmehl ABM2. Während die Farbgebung in der Krume mit einem L\*Wert von 76 vergleichbar war, wies die Kruste der GFB signifikante Unterschiede auf. So war für jene GFB mit einem Ackerbohnenmehl Anteil von 50 % die Kruste dunkler (L\*Wert 49) im Vergleich zu dem GFB mit einem Ackerbohnenmehlanteil von 30 % (L\*Wert: 64). Zudem wies das GFB mit 30 % Ackerbohnenmehl ABM2 ein höheres, spezifisches Volumen auf (2,3 ml/g). Unabhängig vom Anteil an Mehlanteil lag die Krumenhärte in den GFB mit 11 N in einer vergleichbaren Größenordnung.

## Glutenfreie Brote



Tabelle 29 Qualitätsmerkmale von glutenfreien Broten mit Ackerbohnenmehl.

	Kartoffelstärke: Ackerbohnenmehl 50:50	Kartoffelstärke: Ackerbohnenmehl 70:30
<b>Krumenstruktur</b>		
<b>Aussehen der Kruste</b>		
<b>Krume</b>		
L*	76,1	76,2
a*	4,4	4,4
b*	28,8	29,0
<b>Kruste</b>		
L*	49,0	64,3
a*	21,9	18,6
b*	34,8	40,4
<b>Spez. Volumen [cm<sup>3</sup>/g]</b>	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1
<b>Krumenhärte [N]</b>	11,2 ± 1,3	11,6 ± 0,4

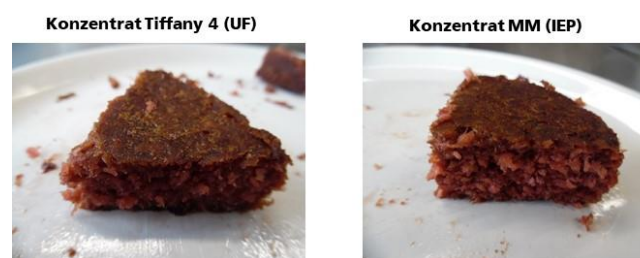
## Burger- Patties

Das Aussehen der Burger-Patties sowie die Farbgebung sind in Tabelle 31 gezeigt.

**Tabelle 30 Qualitätsmerkmale von Burger-Patties mit Ackerbohnenisolat.**

	<b>Burger Patty Isolat T4 UF</b>	<b>Burger Patty Isolat Scale Up</b>
<b>Aussehen</b>		
<b>L*</b>	41,2	41,3
<b>a*</b>	20,8	21,2
<b>b*</b>	15,9	16,3

Die sensorische Evaluierung der Burger-Patties ergab, dass der Einsatz beider Konzentrate zu einer Fadenbildung an der Oberfläche führte (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 24: Aussehen der Burger-Patties nach dem Anbraten.**

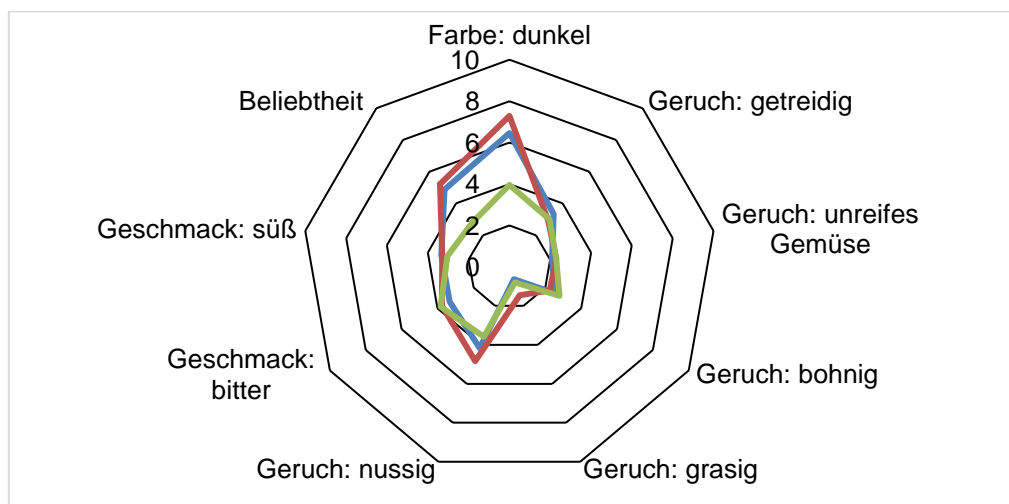
Die Schnittkante des Burger-Patties mit dem Konzentrat Tiffany 4 (UF) wies eine glatte Schnittkante auf, im Vergleich dazu war diese im Patty mit dem aus dem Scale-Up gewonnenen Konzentrat (IEP) deutlich krümeliger bzw. inhomogener. So wurde diese Textur eher mit dem Erscheinungsbild von rohem Hackfleisch assoziiert. Der Geschmack erwies sich für das mittels UF gewonnene Konzentrat deutlich weniger salzig im Vergleich zu dem mittels IEP hergestellten Konzentrat (Scale-Up). Ein bohniiger oder grasiger Geruch sowie ein bitterer Geschmack wurde in keinem der Produkte von den Probanden wahrgenommen. Das Mundgefühl wurde für die mit dem UF-Konzentrat hergestellten Burger-Patties als weicher und saftiger eingestuft. Im Gegensatz dazu wurde das Mundgefühl für das mittels IEP hergestellte Konzentrat des Scale-Ups deutlich fester, faserig und trockener empfunden. Diese Ergebnisse

zeigen das hohe Potential von Ackerbohnenproteinen in der Entwicklung von veganen Fleischersatzprodukten.

### Dessertprodukte

Die Anwendbarkeit von Ackerbohnenmehlen und Konzentraten wurde anhand von Modellrezepturen für Dessertprodukte untersucht. Die Rezeptur und Herstellungsweise sind in Kapitel 3.2.10 beschrieben. In Tabelle 32 ist das Aussehen und die Texturoberfläche der Dessertproben dargestellt. Der Mehlanteil von 80 g auf 500 g Milch bei einer Rührzeit von 5 Minuten bei 90 °C hatte zur Folge, dass die Desserts sehr viskos waren. Die Erhöhung der Rührzeit auf 6 Minuten erhöhte die Festigkeit der Dessertproben. Der Austausch von Milch gegen Leitungswasser (Proben 5 und 6) führte zu einer deutlich dunkleren Dessertfarbe, als für die Anwendung mit Milch/ Hafermilch (Proben 1-4). Die Kombination von Proteinkonzentrat und Ackerbohnenmehl (Probe 6) zeigte eine viskose Textur. Aufgrund ihrer Texturunterschiede sind für diese Produkte eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten denkbar, die von einer Dessertsoße bis hin zu einem sturz fähigen Schokoladenpudding reichen.

Zudem wurden die Dessertproben im Rahmen einer sensorischen Verkostung bewertet (siehe Abbildung 30).




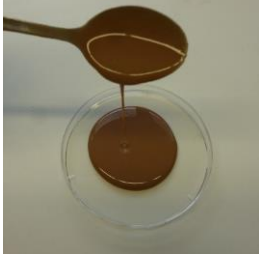








**Abbildung 25: Einfluss von Ackerbohnenmehl auf das Geschmacksprofil von Dessertproben.**

Verkostet wurden die Dessertproben in Anlehnung an die Modellrezeptur V5 (siehe Kapitel 3.2.10) nach Variation der Ackerbohnenmehle: ABM2 (■), Tiffany 4 nativ (■) Tiffany 4 Hitze- Dampf behandelt im Konvektomat (10 Minuten; 170 °C; 100% Luftfeuchtigkeit) (■). Dargestellt sind die Mittelwerte von (n=12) aus Verkostungen zweier unterschiedlicher Tage.

Die Probanden stufen die Desserts mit dem nativen Ackerbohnenmehl am dunkelsten ein. Der Geruch wurde in allen Desserts als gleichwertig getreidig, nach unreifem Gemüse und bohlig eingestuft. Im Gegensatz dazu empfanden die Probanden die Proben mit

Ackerbohnenmehl ABM2 und dem Hitze Dampf behandelten Mehl als weniger grasig. Die Bitterkeit und die Süße im Geschmack bewerteten die Probanden ebenfalls nahezu gleichwertig. Wider Erwarten wurden die Dessertproben mit dem nativen Ackerbohnenmehl Tiffany 4 und ABM2 von den Verkostern mit der höchsten Beliebtheit bewertet.

**Tabelle 31: Aussehen von Dessertprodukten mit Ackerbohnenmehl und Konzentrat.**

Rezeptur	Im Glas	Gestürzt nach 4 h
AB Mehl: 80 g Saccharose: 50 g Kakaopulver: 16,5 g Flüssigkeit (Milch): 500 g Rührzeit: 5 min		
AB Mehl: 80 g Saccharose: 50 g Kakaopulver: 16,5 g Flüssigkeit (Milch): 500 g Rührzeit: <b>6 min</b>		
AB Mehl: <b>100 g</b> Saccharose: 50 g Kakaopulver: 16,5 g Flüssigkeit (Milch): 500 g Rührzeit: 6 min		
AB Mehl: 80 g Saccharose: 50 g Kakaopulver: 16,5 g Flüssigkeit ( <b>Hafermilch</b> ): 500 g Rührzeit: 6 min		
AB Mehl: 80 g Saccharose: 50 g Kakaopulver: 16,5 g Flüssigkeit ( <b>Wasser</b> ): 500 g Rührzeit: 6 min		



<p> <b>AB Mehl: 60 g</b>  <b>AB Konzentrat: 40 g</b>            Saccharose: 50 g            Kakaopulver: 16,5 g            Flüssigkeit (Wasser): 500 g            Rührzeit: 6 min         </p>		
--	--	---

## 5. Diskussion der Ergebnisse

### Zusammensetzung und Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe

Das durchgeführte Sortenscreening der Ackerbohnen genotypen hat eindrucksvoll gezeigt, dass die Saaten und Kernmehle große Unterschiede im Proteingehalt (27-34 % TM) aufweisen. Die Auftrennung mittels Unterläuferschäler hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen, da sich der Proteingehalt nochmals in der Kernfraktion erhöhte. Zudem konnte im Rahmen dieser trockentechnischen Fraktionierung die Kerne gut von der Schale getrennt werden. Dies äußerte sich positiv auf die Reduktion des Gehalts an kondensierten Tanninen. Da diese primär in der Schale lokalisiert sind, wurden sie bereits im ersten Schritt erfolgreich abgetrennt. Für den Oligosaccharid- und Phytinsäuregehalt wurde diese Tendenz nicht gefunden. Beide antinutritiven Inhaltsstoffe waren sowohl in der Schale als auch in der Kernfraktion verteilt. Die Vicingehalte der analysierten Ackerbohnen kernmehle variierten von 0,2 mg/g bis 10 mg/g Probe. Vor allem kommerziell verfügbare Mehlen wiesen hohe Vicingehalte auf. Im Rahmen der Projektlaufzeit wurde hierzu keine rechtliche Grundlage für einen definierten Grenzwert zur potentiellen Anwendung in Lebensmitteln gefunden.

### Endogene Enzymaktivität in Kernmehlfraktionen und Eignung des entwickelten, hydrothermischen Verfahrens zur Inaktivierung

Obwohl die Temperaturkinetik der Peroxidase (POD) sowie der Lipoxygenase (LOX) gezeigt haben, dass der wässrige Rohextrakt nach bereits 70 °C inaktiviert war, reichten diese Temperaturen für die hydrothermische Behandlung des Ackerbohnenmehls nicht aus, um eine Inaktivierung der endogenen Enzyme zu erzielen. In Vorversuchen ergab die Hitze-Dampf Behandlung des Ackerbohnenmehls mittels Konvektomat bei 120 °C; 50 % Dampf, eine relative Restaktivität für die POD von über 60%. Die Erhöhung der Temperatur auf 170 °C bei 100 % Luftfeuchte erwies sich als vielversprechend, um POD und LOX zu inaktivieren und die TIA zu reduzieren (verbleibende Restaktivität 40 %. Im Vergleich zur Hitze-Dampf Behandlung (RA 40-47 % rel.), reduzierte die Dampf-Druck Behandlung die TIA deutlicher (RA 6-15 % rel.).

In Bezug auf das Ausgangsmaterial (Mehl; Saat), welches für die hydrothermische Behandlung eingesetzt wurde, ergaben sich nur geringe Unterschiede. So lag die RA der POD

nach Hitze-Dampf Behandlung mittels Konvektomat (170 °C;100 % Luftfeuchte) für die Sorte Tiffany 4 bei 7,4 % rel., wohingegen in der Saat eine vollständige Inaktivierung der POD (RA 0,0 % rel.) erzielt wurde. Aus prozesstechnischer Sicht sollte die hydrothermische Behandlung der Saat vor dem Prozessschritt der Unterläuferschälung erfolgen. Unabhängig vom hydrothermischen Verfahren war der Vicin Gehalt in den analysierten Mehlen der Sorten Tiffany 2; Tiffany 4 und Fanfare 1 unverändert hoch.

#### Einfluss der hydrothermischen Behandlung auf die funktionellen Eigenschaften und Sensorik

Hinsichtlich der Anwendbarkeit in Lebensmitteln sind vor allem die funktionellen und sensorischen Eigenschaften entscheidend. Während die nativen Ackerbohnenmehle eine hohe Proteinlöslichkeit im Bereich von 71-78 % aufwiesen, variierte diese infolge der hydrothermischen Behandlung je nach Verfahren für das Mehl Tiffany 4 (18-24 %) und die Saat (47-53 %). Auch die Emulgierkapazität war im Vergleich zum nativen Mehl (ca. 500 ml/g) in den hydrothermisch behandelten Mehlen (ca. 325-380 ml/g) stark reduziert. Allerdings wiesen die Hitze-Dampf und Druck-Dampf behandelten Mehle eine geringere minimale Gelbildung von 6 % im Vergleich zum nativen Mehl mit 8 % auf. Zudem ergab die sensorische Evaluierung, dass im Vergleich zum nativen Ackerbohnenmehl, der bohnlige und grasige Geruch durch die Behandlung im Konvektomat deutlich reduziert war. Darüber hinaus wurde das Hitze-Dampf behandelte Mehl mit einem nussigen Geruch bewertet und auch der Geschmack wurde weniger bitter eingestuft.

Die Bewertung der Konzentrate ließ erkennen, dass das hydrothermisch behandelte Konzentrat weniger bohnlige und grasig im Geruch eingestuft wurde als die Konzentrate der Sorte Tiffany 4 nach IEP sowie mit dem Ackerbohnenmehl ABM2 aus dem Scale-Up Versuch. Auffällig war, dass das Proteinkonzentrat basierend auf dem Hitze-Dampf behandelten Mehl der Saat Tiffany 4 weniger nussig bewertet wurde. Hier liegt die Vermutung nahe, dass durch den indirekten Kontakt zwischen Saat und Hitze keine Maillardreaktion und folglich Röstaromen freigesetzt wurden im Vergleich zum identisch behandelten Mehl.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Herstellung von hydrothermisch behandeltem Mehl für die Inaktivierung der endogenen Enzyme ausreichend war und die sensorischen Qualitätsmerkmale des Mehls verbesserte. Dies war jedoch andererseits mit Einschränkungen in den funktionellen Eigenschaften (Proteinlöslichkeit, Emulgierkapazität) verbunden.

#### Eignung der wässrigen Extraktion zur Abreicherung von antinutritiven Inhaltsstoffen

Das Projektziel der Gewinnung eines Konzentrats mit einem Proteingehalt > 70 % konnte im Projektverlauf von QualiFabaBean realisiert werden. Die Variation der Prozessparameter hat gezeigt, dass sich sowohl die isoelektrische Fällung (IEP) als auch die Ultrafiltration (UF) zur Konzentrierung der Proteine eignen. Gleichbedeutend hat dies allerdings zu einer starken Erhöhung des Phytinsäuregehalts um mehr als 100 % rel. geführt. Durch eine saure Vorextraktion (SVE) bei pH 5,5 ließ sich der Phytinsäuregehalt deutlich reduzieren, je nach Konzentrierungsverfahren IEP (43 % rel.) und UF (49 %rel.). In dem Zusammenhang gilt es jedoch den Einfluss auf die Bilanzdaten des Extraktionsprozesses zu berücksichtigen. Durch die SVE nahm die Proteing Gesamtausbeute deutlich ab. Die Vicinergehalte ließen sich durch die wässrige Extraktion zwar reduzieren, allerdings nicht vollständig abreichern. So lag die Reduktion des Vicinergehalts für die untersuchten Konzentrate in einem Bereich von 36 bis 52 % rel. Hier bleibt zu klären, wie hoch der Grenzwert für die Anwendung im LM sein darf. Zusammenfassend kann für die Herstellung von Ackerbohnenproteinkonzentraten unter Berücksichtigung der erzielten Daten und gewonnenen Erkenntnisse folgendes Verfahren empfohlen werden: Die Extraktion der Proteine sollte mit einem s:L Verhältnis von 1:5, bei pH 7,5 für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgen. Für die Konzentrierung der Proteine wären verschiedene Aspekte zu betrachten. Mit Blick auf die funktionellen Eigenschaften erzielten die mittels UF hergestellten Konzentrate eine etwas höhere PL von 66 % und EC von 610 ml/g, als jene mittels IEP gewonnenen Produkte (PL 50 % bzw. EC 575 ml/g) der Sorte Tiffany 4. Im Gegensatz dazu war der Phytinsäuregehalt für das mittels UF gewonnene Konzentrat mit 3,2 % TM und einem Vicin Gehalt von 1,3 mg/g Probe deutlich höher als für die mittels IEP hergestellten Konzentrate (Phytinsäure: 2,7% TM; Vicin Gehalt: 0,5 mg/g Probe), so dass unter dem Aspekt der Abreicherung antinutritiver Inhaltsstoffe die IEP deutliche Vorteile bringen kann. Aus Kostengründen wäre die IEP einer UF vorzuziehen.

Obwohl die Analysen zur Aktivität der endogenen Enzyme in den Konzentraten zeigten, dass für die Sorte Tiffany 4 noch eine rel. TIA von 35% vorlag und POD und LOX vollständig inaktiviert waren, wurden die Proteinkonzentrate hinsichtlich ihres bohigen und grasigen Geruchs sehr unterschiedlich von den Probanden bewertet. Dies lässt nunmehr darauf schließen, dass neben den endogenen Enzymen noch weitere Faktoren die sensorischen Attribute der Proteinkonzentrate basierend auf Ackerbohnen beeinflussen können. Insbesondere für weitere Arbeiten sollte im Fokus eine detaillierte Identifikation möglicher Substanzen stehen, die das bohige und grasige Aroma der Ackerbohne, neben den endogenen Enzymen, zusätzlich beeinflussen.

## Applikationsfähigkeit der Zutaten (Mehle, Konzentrate) in Modellrezepturen

Die Anwendung von Ackerbohnenmehl der Sorte Tiffany in einer Rührkuchenrezeptur lieferte im Vergleich zur Referenz vergleichbare Qualitätsmerkmale hinsichtlich des spezifischen Volumens und der Porung, und wurde zudem hinsichtlich seiner sensorischen Attribute mit einem geringen Off-Flavor im Geruch, einer reduzierten Bitterkeit im Geschmack und folglich einer höheren Beliebtheit eingestuft. Der Anteil von 30 % Ackerbohnenmehl, welches anstelle des Weizenmehls eingesetzt wurde, war vergleichsweise hoch angesetzt. Auch der 30 %ige Einsatz von Ackerbohnenmehl in einer Modellrezeptur für Weizenbrote und glutenfreie Borte lieferte vergleichbare Qualitätsmerkmale hinsichtlich Farbe und spezifischem Volumen im Vergleich zum Referenzprodukt mit Weizenmehl. Für die glutenfreien Brote (GFB) war darüber hinaus sogar die Krumenhärte mit ca. 11 N trotz Veränderung des Stärke-zu-Ackerbohnenmehl-Verhältnisses von 50:50 auf 70:30 nahezu identisch.

Die sensorische Beurteilung der Konzentrate ergab, dass das Konzentrat basierend auf dem Hitze-Dampf behandelten Mehl mit einem reduzierten bohigen und grasigen Geruch eingestuft wurde, der bittere Geschmack jedoch nahezu gleich empfunden wurde. Somit ergibt sich auch an dieser Stelle die Frage, welche molekularen Verbindungen neben den endogenen Enzymen zusätzlich das bohige bzw. grasige Aroma und den bitteren Geschmack der Ackerbohnen begünstigen könnten. Aufgrund seiner hervorragenden funktionellen Eigenschaften wurde die Eignung des Ackerbohnenproteinkonzentrats zur Herstellung von veganen Burger-Patties untersucht. Im Vergleich zu Referenzprodukten basierend auf Erbse, wurde hierbei eine leichte Fadenbildung an der Burger-Patty Oberfläche identifiziert. Nach Einsatz des mittels IEP gewonnen Konzentrats wurde der Geschmack deutlich salziger, das Mundgefühl etwas krümeliger und trockener eingestuft. Im Gegensatz dazu zeigten die mittels UF gewonnene Konzentrat hergestellten Burger-Patties eine hohe Feuchtigkeit und ein weiches Mundgefühl, was das hohe Potential der Ackerbohnenproteine für den Einsatz in Fleischersatzprodukten zeigt.

Basierend auf den hohen Gelbildungseigenschaften wurde zudem die Anwendung für die Herstellung in Dessertprodukten untersucht. In Abhängigkeit des verwendeten Mehlanteils ließen sich Produkte unterschiedlicher Viskosität bis hin zu einem sturz fähigen Dessert herstellen. Die sensorische Evaluierung zeigte, dass der bohige und grasige Geruch nicht stark ausgeprägt waren. Allerdings wurden die Desserts sehr mehlig empfunden, so dass weitere Optimierungen der Rezeptur in Betracht gezogen werden sollten. Zukünftige Arbeiten könnten hier z.B. Kombinationen mit Hydrokolloiden oder gar die Fermentation von Ackerbohnenmehl umfassen.

## **6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse - praxisrelevante Ergebnisse**

### Folgende Ergebnisse können für die Praxis relevant sein:

Die hydrothermische Behandlung von Ackerbohnenmehlen verbesserte die ernährungsphysiologische Qualität und steigerte die sensorische Attraktivität, allerdings zu Lasten der funktionellen Eigenschaften. Weder die Hitze-Dampf noch die Druck-Dampf Behandlung erwiesen sich als geeignet, um Trypsininhibitoren oder Vicin und Convicin vollständig zu reduzieren. Mit Auswahl der Sorte Tiffany kann zumindest eine Ackerbohne gewählt werden, die per se einen sehr geringen Vicin und Convicin Gehalt aufweist. Zudem war die Proteinlöslichkeit in den hydrothermisch behandelten Mehlen mit 18-53 % deutlich reduziert im Vergleich zu den nativen Ausgangsmehlen (PL 60-78 %). Für die Herstellung von Backwaren erwies sich der Einsatz des hydrothermisch behandelten Mehls als potenziell geeignet. Der anfangs bohnlige und grasige Geruchseindruck wurde nach der Hitze-Dampf Behandlung deutlich geringer wahrgenommen. Das behandelte Mehl wies einen nussigen Geruch auf und die Endprodukte wurden mit einer hohen Beliebtheit eingestuft. Somit könnten die hydrothermisch behandelten Mehle für Backwarenhersteller von großem Interesse sein und sollten unter Berücksichtigung der jeweiligen Lebensmittelmatrix (Rührkuchen, Brot) von potenziellen Industriepartnern im Hinblick auf ihre Applikationsfähigkeit getestet werden.

Die Gewinnung von Ackerbohnenkonzentraten mit einem Proteingehalt > 70 %<sub>TM</sub> wurde erfolgreich umgesetzt. Die vollständige Abreicherung von Phytinsäure, Trypsininhibitoren sowie Vicin/ Convicin war im Rahmen des Extraktionsverfahrens jedoch nicht umsetzbar. In Abhängigkeit des verwendeten Ausgangsmehls wurden die Konzentrate mit einem geringer bzw. stärker ausgeprägten grasigen und bohnligen Geruch beurteilt. Basierend auf den Erkenntnissen von QualiFabaBean zeigte sich, dass die endogenen Enzyme (POD, LOX) in den Konzentraten nahezu vollständig inaktiviert waren, so dass davon auszugehen ist, dass weitere molekulare Verbindungen das Aromaprofil negativ beeinflussen könnten. Vor diesem Hintergrund soll ein Folgeprojekt zusammen mit weiteren Forschungsinstituten aus Deutschland in Kürze eingereicht werden. Ziel dieses Vorhabens wird sein, die für den bohnligen und grasigen Geschmack verantwortlichen Substanzen zu identifizieren, um diese durch gezielte Prozessführung weiter abzureichern und somit die sensorische Attraktivität noch weiter zu verbessern.

Die in QualiFabaBean erzielten Ergebnisse stellen eine sehr gute Basis für den voraussichtlichen Nutzen der gewonnenen Lebensmittelzutaten dar. Vor einer Markteinführung sollten die entwickelten Ackerbohnenmehle und –Konzentrate insbesondere

hinsichtlich der antinutritiven Qualität und der sensorischen Attraktivität weiter optimiert werden.

Bislang wurden mit verschiedenen Partnern der Lebensmittelindustrie und auch des Lebensmittelhandwerks Ackerbohnenprodukte verkostet und auch für deren Bewertung zur Verfügung gestellt. Die Bewertung der Proteinkonzentrate an sich zeigte, dass die funktionellen Eigenschaften als gut bis hervorragend einzuschätzen sind, die sensorischen Eigenschaften sollten durch weitere Optimierung der Prozesse noch verbessert werden. Die Evaluierung in verschiedenen Lebensmittelgruppen zeigte ein hohes Potential, auch bei ausgewählten Industriepartnern, es sollten aber noch weitere Optimierungsversuche dazu stattfinden. Aktuell werden die Möglichkeiten hierzu in einem bilateralen Projekt untersucht. Nach Abschluss dieser Arbeiten und weiterer Gespräche mit Industriepartnern zur Umsetzung der Konzentratherstellung sowie weitere Ergebnisse zur sensorischen Optimierung ist die Erstellung eines Praxismerkblatts mit Industriebeteiligung anvisiert.

## 7. Gegenüberstellung ursprünglich geplante zu den tatsächlich erreichten Zielen

Geplante Ziele	Erreichte Ziele
Analyse der Zusammensetzung (u.a. Trockensubstanzgehalt, Proteingehalt, Fettgehalt, Stärkegehalt)	Die analytische Zusammensetzung wurde bestimmt
Bestimmung der funktionellen Eigenschaften (Proteinlöslichkeit, Wasserbindevermögen)	Die Proteinlöslichkeit und das Wasserbindevermögen wurden bestimmt
Antinutritive Substanzen (Phytinsäure, Vicin, kondensierte Tannine)	Gehalte an Phytinsäure, kondensierten Tanninen und Vicin wurden für ausgewählte Sorten quantifiziert
Charakterisierung sortenspezifischer Eigenschaften (u.a. Verfügbarkeit, Korngröße)	Saatenspezifische Eigenschaften (u.a. Tausendkorngewicht) wurden evaluiert
Charakterisierung endogener Enzymaktivitäten (Lipoxygenase, Peroxidase, Trypsininhibitoren)	Lipoxygenase und Peroxidaseaktivität sowie die Trypsininhibitoraktivität wurden für die Genotypen Tiffany 2; Fanfare 1 und Tiffany 4 charakterisiert.
Entwicklung eines Verfahrens zur Inaktivierung relevanter Enzyme und Ermittlung der Inaktivierungsbedingungen (u.a. Temperatur)	Die hydrothermische Behandlung wurde anhand des Konvektomats und eines Druckdampfgarers evaluiert. Temperaturstufen zur vollständigen Inaktivierung der endogenen Enzyme wurden identifiziert.
Charakterisierung des Einflusses auf die funktionellen Eigenschaften und Sensorik – Verbesserung der Sensorik als Ziel	Der Einfluss der hydrothermischen Behandlung auf die Proteinlöslichkeit, die Emulgierkapazität und minimale Gelbildung wurden untersucht. Die sensorische Evaluierung wurde für das native und hydrothermisch behandelte Mehl evaluiert.

<p>Prüfung auf welcher Prozessstufe die Inaktivierung am effektivsten war (ganze Saat, geschälte Saat, Mehl, Konzentrat)</p>	<p>Zur Prüfung der Inaktivierungseffektivität wurden folgende Prozessstufen berücksichtigt: ganzen Saat, Mehl, Konzentrat.</p>
<p>Vergleich Prallschälung und Schälung mit Unterläuferschälgang</p> <p>Einfluss des Restwassergehalts auf die Schälung</p> <p>Welchen Einfluss hat Schälung auf Reduktion antinutritiver Inhaltsstoffe (Tannine, Phytinsäure)</p> <p>Gewinnung von Konzentraten (Proteingehalt &gt;70%; reduzierter Phytinsäuregehalt)</p> <p>Gewinnung von Konzentraten mittels saurer Vorextraktion</p> <p>Gewinnung von Protein und Stärke im Neutralen bis alkalischem und Aufkonzentrierung mittels UF</p> <p>Charakterisierung der Mehle und Konzentrate hinsichtlich analytischer Zusammensetzung, Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe, Restenzymaktivitäten</p>	<p>Die Prallschälung war nicht erfolgreich und wurde nicht weiterverfolgt.</p> <p>Der Restwassergehalt in den Saaten erwies sich als ideal und wurde daher nicht variiert.</p> <p>Die Gehalte der Phytinsäure und kondensierten Tannine wurden für ausgewählte Genotypen für die Kern- sowie Schalenfraktion durchgeführt.</p> <p>Proteinkonzentrate mit einem Proteingehalt &gt; 70% wurden erzielt, die Reduktion des Phytinsäuregehalts mittels saurer Vorextraktion ist möglich</p> <p>Saure Vorextraktion wurde für die pH-Stufen 4,5 und 5,5 analysiert.</p> <p>Die Gewinnung der Proteine erfolgte bei pH 7,5, die Aufkonzentrierung wurde sowohl mittels IEP als auch UF durchgeführt.</p> <p>Die analytische Zusammensetzung der Mehle und Konzentrate wurde untersucht, der Vicingehalt und die enzymatische Restaktivität wurden für ausgewählte Sorten bewertet.</p>
<p>Sensorische Bewertung von ausgewählten Produkten hinsichtlich (Aroma, Farbe, Geruch, Geschmack)</p>	<p>Die sensorische Evaluierung wurde für ausgewählte Konzentrate durchgeführt.</p>



<p>Bestimmung funktioneller Eigenschaften (Proteinlöslichkeit, Wasserbindung, Ölbindung, Emulgierverhalten)</p>	<p>Die Konzentrate wurden hinsichtlich der Proteinlöslichkeit, des Wasserbindungsvermögens und des Emulgierverhaltens bewertet. Die Messung der Ölbindung erwies sich aufgrund der hohen Löslichkeiten als nicht sinnvoll.</p>
<p>Erstellung einer Wirtschaftlichkeitsabschätzung</p>	<p>Die Wirtschaftlichkeitsabschätzung wurde am Prozessbeispiel des Scale-Ups vorgenommen.</p>
<p>Anwendung der Mehle und/oder Konzentrate in Modellrezepturen für Feinbackwaren und Backwaren</p>	<p>Modellrezepturen für Rührkuchen, Weizenbrot glutenfreie Backwaren und Schokoladen-Desserts mit nativem und/oder hydrothermisch behandeltem Mehl wurde entwickelt. Die Anwendung des Isolats in veganen Burger-Patties wurde untersucht.</p>

## 8. Zusammenfassung

Das Projektziel von QualiFabaBean bestand darin sensorisch attraktive Mehle und Konzentrate aus Ackerbohnen mit reduziertem Gehalt antinutritiver Inhaltsstoffe zu gewinnen. Dazu wurden im ersten Schritt kondensierte Tannine über einen Schälvorgang abgetrennt. In der Ackerbohnenkernfraktion waren somit neben Phytinsäure und Vicin noch Trypsininhibitoren enthalten und endogene Enzyme (POD und LOX) aktiv. Die Untersuchung der Effizienz zweier Ansätze zur hydrothermische Behandlung; mittels Hitze-Dampf (Konvektomat) und Druck-Dampf (Druckdampfgarer), erwiesen sich zur Inaktivierung beider Enzyme (rel. Restaktivität < 10%) als geeignet. Im Gegensatz dazu variierte die Trypsininhibitor-Aktivität und zeigte nach einer Hitze-Dampf Behandlung eine rel. Restaktivität von ca. 45 %, wohingegen nach Anwendung des Druck-Dampf Verfahrens ca. 85 % der Trypsininhibitoren inaktiviert waren. Die Gehalte an Vicin und Phytinsäure waren für die Sorte Tiffany 4 nach hydrothermischer Behandlung nicht reduziert. Eine sensorische Evaluierung ergab, dass im Vergleich zum nativen Mehl, welches ein stark grasiges, bohliges Aromaprofil aufwies, die Hitze-Dampf Behandlung diese Geruchs- und Geschmacksattribute verbesserte. Charakteristisch für das Hitze-Dampf behandelte Mehl war eine etwas dunklere Farbe und ein nussiger Geruch.

In einem anschließenden Extraktionsverfahren (wässrig-alkalisch bzw. saure Vorextraktion) wurden die Möglichkeiten zur Phytinsäure Abreicherung untersucht. Während nach wässrig-alkalischer Extraktion mit anschließender IEP der Phytinsäuregehalt über 100 % anstieg, ermöglichte eine saure Vorextraktion bei pH 5,5 die Abreicherung der Phytinsäure um 43 % rel. Für die Konzentrierung mittels UF wurde eine rel. Abreicherung des Phytinsäuregehalts von 49 % ermittelt, was jedoch mit einer verringerten Proteingesamtausbeute einherging. Somit wurden unabhängig vom verwendeten Konzentrierungsverfahren (IEP/ UF) keine Unterschiede bezüglich der Phytinsäure-Abreicherung erzielt. In zukünftigen Arbeiten wäre somit zu untersuchen, welche technologischen Strategien sich zur Abreicherung von Phytinsäure in Ackerbohnen eignen. In den hergestellten Konzentraten war die POD inaktiviert und die TI wiesen eine rel. Restaktivität von ca. 35% auf. Die anschließende sensorische Evaluierung von ausgewählten Konzentraten ergab einen bitteren, bohligem und grasigen Aromaeindruck. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur die Inaktivierung von LOX und POD die sensorischen Attribute verbessern. Vielmehr bleibt anzunehmen, dass weitere volatile Verbindungen in der Ackerbohne vorliegen, die das Aroma negativ beeinflussen können. Folglich sollten in einem weiteren Forschungsprojekt die in Ackerbohnen vorliegenden Aromasubstanzen detailliert identifiziert werden, um somit den Extraktionsprozess weiter zu optimieren.

Erwartungsgemäß war die Proteinlöslichkeit und die Emulgierkapazität der hydrothermisch behandelten Mehle reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten die Proteinkonzentrate eine vergleichsweise geringere Abnahme in der Wiederlöslichkeit und auch die Emulgierkapazität war mit einigen Ausnahmen deutlich verbessert im Vergleich zum nativen Mehl. Die minimale Gelbildungskonzentration variierte von 8 % für native Mehle, über 6 % für hydrothermisch behandelte Mehle bis hin zu >14 % für die Ackerbohnenkonzentrate. Die Anwendung in Modellrezepturen erweis sich für Rührkuchen, Weizenbrote oder glutenfreie Backwaren als geeignet. Vor allem in Rührkuchen wurde das Hitze-Dampf behandelte Ackerbohnenmehl aufgrund seines nussigen Geruchs und seines reduzierten bohnligen, grasigen Aromaprofils mit einer höheren Beliebtheit eingestuft.

## 9. Literaturverzeichnis

- Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna Saldívar, S. O. (2018). Inactivation Methods of Trypsin Inhibitor in Legumes: A Review. *J Food Sci*, 83(1), 17-29. doi:10.1111/1750-3841.13985
- Bińczak, O., Samotyja, U., & Małecka, M. (2016). CHARACTERISATION OF LIPOXYGENASE ACTIVITY IN WALNUT CAKE.
- Flink, J., & Christiansen, I. (1973). The production of protein isolate from *Vicia faba*. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, 6, 102-106.
- Fritsch, C., Vogel, R. F., & Toelstede, S. (2015). Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates—influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites. *J Appl Microbiol*, 119(4), 1075-1088.
- Ghamsari, L., Keyhani, E., & Golkhoo, S. (2007). Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iran Biomed J*, 11(3), 137-146.
- Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Kasprowicz-Potocka, M., & Frias, J. (2014). Non-nutritive compounds in Fabaceae family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(2), 75-89.
- Güneş, B., & Bayindirli, A. (1993). Peroxidase and lipoxygenase inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *LWT-Food Science and Technology*, 26(5), 406-410.
- Hagerman, A. E. (2002). Hydrolyzable tannin structural chemistry. *Tannin Handbook* (<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>).
- Hamerstrand, G., Black, L., & Glover, J. (1981). Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure.
- HENDERSON, H. M., BLANK, G., & SUSTACKOVA, H. (1991). Thermal inactivation of pea flour lipoxygenase. *Journal of Food Biochemistry*, 15(2), 107-115.
- Jiang, Z.-q., Pulkkinen, M., Wang, Y.-j., Lampi, A.-M., Stoddard, F. L., Salovaara, H., . . . Sontag-Strohm, T. (2016). Faba bean flavour and technological property improvement by thermal pre-treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 68(Supplement C), 295-305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.015>

- Karata, S. Ç. k., Günay, D., & Sayar, S. (2017). In vitro evaluation of whole faba bean and its seed coat as a potential source of functional food components. *Food Chem*, 230, 182-188.
- Landry, E. J., Fuchs, S. J., & Hu, J. (2016). Carbohydrate composition of mature and immature faba bean seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 55-60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.010>
- Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Denys, I. S., & Hendrickx, M. E. (2001). Effects of high pressure on enzymes related to food quality *Ultra high pressure treatments of foods* (pp. 115-166): Springer.
- Medeghini Bonatti, P., Lorenzini, G., Baroni Fornasiero, R., Nali, C., & Sgarbi, E. (1994). Cytochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad bean leaves. *Journal of Phytopathology*, 140(4), 319-325.
- Multari, S., Neacsu, M., Scobbie, L., Cantlay, L., Duncan, G., Vaughan, N., . . . Russell, W. R. (2016). Nutritional and Phytochemical Content of High-Protein Crops. *J Agric Food Chem*, 64(41), 7800-7811. doi:10.1021/acs.jafc.6b00926
- Oomah, B. D., Luc, G., Leprelle, C., Drover, J. C., Harrison, J. E., & Olson, M. (2011). Phenolics, phytic acid, and phytase in Canadian-grown low-tannin faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *J Agric Food Chem*, 59(8), 3763-3771. doi:10.1021/jf200338b
- Panta, R. (2017). Rapid quantification of trypsin inhibitors in food and feed formulations with electrospray ionization mass spectrometry.
- Purves, R. W., Khazaei, H., & Vandenberg, A. (2018). Quantification of vicine and convicine in faba bean seeds using hydrophilic interaction liquid chromatography. *Food Chem*, 240, 1137-1145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.040>
- Rackis, J. J., Sessa, D. J., & Honig, D. H. (1979). Flavor problems of vegetable food proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part2), 262-271. doi:10.1007/bf02671470
- Schweiggert, U., Schieber, A., & Carle, R. (2005). Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 403-411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.001>

- Sosulski, F., & McCurdy, A. (1987). Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba bean. *Journal of Food Science*, 52(4), 1010-1014.
- Stephany, M., Eckert, P., Bader-Mittermaier, S., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2016). Lipoxygenase inactivation kinetics and quality-related enzyme activities of narrow-leaved lupin seeds and flakes. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 36-43.
- Takahama, U., & Egashira, T. (1991). Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochemistry*, 30(1), 73-77.
- THEERAKULKAIT, C., & BARRETT, D. M. (1995). Lipoxygenase in sweet corn germ: isolation and physicochemical properties. *Journal of Food Science*, 60(5), 1029-1033.
- Vioque, J., Alaiz, M., & Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chem*, 132(1), 67-72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033>
- Zeraik, A. E., Souza, F. S. A. d., Fatibello-Filho, O., & Leite, O. D. (2008). Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova*, 31(4), 731-734.

## **10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt**

Vermarktung von Hülsenfrüchten als Lebensmittel – Besonderheiten bei Anbau, Aufbereitung und Qualität; QualiFabaBean - Ackerbohnenmehle und –konzentrate als hochwertige Lebensmittelzutaten; Föste, M. Ulm 27.11.2018

Die Ackerbohnen – zu Unrecht verschmäht; Artikel Vermarktung von Hülsenfrüchten, 2017.06.12

Comeback der Ackerbohne als Lebensmittel, Artikel Verarbeitung Ackerbohnen, DLG Magazin Lebensmittel, 2018.07.30

IVLV Tagung – pflanzliche Proteine; Potenzial der Ackerbohnen zur Anwendung in Lebensmitteln, Föste, M., Freising, 2019.05.16

Proteina – QualiFabaBean – Potenzial von Ackerbohnenmehl und – konzentrat für die Anwendung in Lebensmitteln, Föste, M., Magdeburg, 2019.10.21.

Demonetzwerk ErbseBohne – Entwicklung von Verfahren zur Gewinnung sensorisch attraktiver Ackerbohnenproteine unter Abreicherung der antinutritiven Inhaltsstoffe, Föste, M., Freising, 2020.10.28