Gefördert durch:

Bundesministerium
für Landwirtschaft, Ernährung
und Heimat

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung

Schlussbericht zum Thema

"Erschließung des Potentials der schmalblättrigen Bitterlupine (Lupinus angustifolius L.) für die Humanernährung“

FKZ: 2819EPS003, 2819EPS004, 2819EPS005 und 2819EPS009

Projektnehmer:

FKZ: 2819EPS003
DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (DIL)

FKZ: 2819EPS004
Lupino AG (Lupino)

FKZ: 2819EPS005
ESKUSA GmbH (ESKUSA)

FKZ: 2819EPS009
Julius-Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (ZL)

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

Abschlussbericht

Projekt: LUPROME

Zahlungsempfänger: Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., ESKUSA GmbH, Lupino AG, Julius-Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (ZL)

Vorhabenbezeichnung: Erschließung des Potentials der schmalblättrigen Bitterlupine (*Lupinus angustifolius* L.) für die Humanernährung

Laufzeit des Projektes: 15.04.2020 bis zum 31.05.2023

Berichtszeitraum: 15.04.2020 - 31.05.2023

Projektpartner:

FKZ: 2819EPS003
DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. (**DIL**)
Juliette Rudzick / Carolin Bommes
Prof.-von-Klitzing-Str. 7
49610 Quakenbrück

FKZ: 2819EPS004
Lupino AG (**Lupino**)
Gerhard Kloth
Hauptstr. 31
03096 Burg/Spreewald

FKZ: 2819EPS005
ESKUSA GmbH (**ESKUSA**)
Fred Eickmeyer
Bogener Str. 24
94365 Parkstetten

FKZ: 2819EPS009
Julius-Kühn-Institut (**JKI**) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen (ZL)
Anne Zaar
Sanitz OT Groß Lüsewitz
Rudolf-Schick-Platz 3
18190 Sanitz

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS 2

II. TABELLENVERZEICHNIS 5

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 6

PROJEKTKURZFASSUNG 7

ABSTRACT 7

1 EINFÜHRUNG 8

1.1 Gegenstand des Vorhabens 8

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen der EPS oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen 9

1.3 Planung und Ablauf des Projektes 10

2 WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND 13

2.1 Einordnung der Lupine als pflanzliche Proteinquelle 13

2.2 Entbitterung von Lupine 13

3 MATERIAL UND METHODEN 15

3.1 Rohstoffe 15

3.2 Membranwerkstoffe 18

3.3 Bitteres Zuchtmaterial der Schmalblättrigen Lupine 19

3.4 Grundlagen der Membranfiltertechnologie 19

3.5 Charakterisierung der Lupinensamen 20

3.6 Extrusion 22

3.7 Charakterisierung der Chinolizidinalkaloide 22

4 AUFZÄHLUNG DER WICHTIGSTEN WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN ERGEBNISSE UND ANDERER WESENTLICHER EREIGNISSE 23

AP 1 Identifizierung geeigneter Membrane 23

TVH 1.I Untersuchung der Eignung neuartiger Membraneigenschaften 23

Charakterisierung von Membranen 24

TVH 1.II Untersuchung der Eignung verschiedener spezifischer Membraneigenschaften 26
TVH 1.III Entwicklung und Test einer geeigneten Membran 29

AP 2 Produktion und Bereitstellung von Lupinensamen 30

AP 3 Durchführung und Trennung mittels Membranen 34
TVH 3.I Ermittlung wesentlicher Einflussparameter auf das Trennverhalten 34
TVH 3.II Inbetriebnahme der Pilotanlage 35
TVH 3.III Untersuchungen zur Prozessführung der Pilotanlage 37
1. Prozessdaten Standard-Ultrafiltration 37
2. Diafiltration 37
TVH 3.IV Scale-Up Untersuchungen für den Membranprozess und Wirtschaftlichkeit 38

AP 4 Proteincharakterisierung und Prüfung in Lebensmitteln 38
TVH 4.I Charakterisierung der Lupinensamen 38
TVH 4.II Charakterisierung der Proteine und Reststoffe 40
TVH 4.III Applikation der Proteine in Lebensmittelmatrizes 48

AP 5 Analyse des Alkaloidgehaltes der Lupinensamen 55

5 DISKUSSION DER ERGEBNISSE 62

Membranauswahl 63

Versuche im Labormaßstab 63

Versuche im Pilotmaßstab 64

Scale-up 64

Wirtschaftlichkeit 64

6 VORAUSSICHTLICHER NUTZEN UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE 65

7 GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN UND HINWEISE AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN 66

8 ZUSAMMENFASSUNG 66

9 LITERATURVERZEICHNIS 68

10 ÜBERSICHT ALLER IM BERICHTSZEITRAUM VOM PROJEKTNEHMER REALISIERTEN VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM PROJEKT, BISHERIGE UND GEPLANTE AKTIVITÄTEN ZUR VERBREITUNG DER ERGEBNISSE 69

ANHANG: 69

ANHANG I: ERFOLGSKONTROLLBERICHT 69

ANHANG II: MERKBLATT MIT DEN PROJEKTERGEBNISSEN 69

ANHANG III: WEITERFÜHRENDE LITERATUR..... 69

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der acht Bitterlupinakzessionen 15
Tabelle 2: Übersicht der Proteinfraktionen für Lupinus angustifolius L. 15
Tabelle 3: Übersicht der Struktur der Chinolizidinalkaloide 17
Tabelle 4: Übersicht der Struktur der wichtigsten Oligosaccharide 18
Tabelle 5: Übersicht der Membranwerkstoffe 18*
Tabelle 6: Eigenschaftsmatrix Membranen 24
Tabelle 7: Übersicht über Erntejahrgänge und Erntemengen der Lupinenvermehrungen 31
Tabelle 8: Rohstoffdaten Lupinenflocken 35
Tabelle 9: Zusammenstellung der Versuchsdaten 35
Tabelle 10: Prozessdaten Diafiltration 35
Tabelle 11: UF-/DF Prozessanalyse 36
Tabelle 12: Auswahl von Analyseergebnissen von Lupinensamen 38
Tabelle 13: Analyseergebnisse 2019 zur Charakterisierung von Lupinensaatgut 39
Tabelle 14: Analyseergebnisse 2021 zur Charakterisierung von Lupinensaatgut 40
Tabelle 15: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenflakes 41
Tabelle 16: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakt 41
Tabelle 17: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenfasern 42
Tabelle 18: Analyseergebnisse 2021 der Nährwertzusammensetzung 43
Tabelle 19: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakt 44
Tabelle 20: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenflakes 44
Tabelle 21: Analyseergebnisse 2022 der Nährwertzusammensetzung 46
Tabelle 22: Analyseergebnisse 2023 der Nährwertzusammensetzung 47
Tabelle 23: Rezepturzusammensetzungen und Sensorikplan 50
Tabelle 24: Analyseergebnisse 2017-2020 der Chinolizidinalkaloide 55
Tabelle 25: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide von Lupinenflakes, -fasern und Extrakten. 57
Tabelle 26: Analyseergebnisse 2021 der Chinolizidinalkaloide von Lupinensamen 58
Tabelle 27: Analyseergebnisse 1 der Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen: 58
Tabelle 28: Analyseergebnisse 2 der Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen: 59
Tabelle 29: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide von Lupinensamen 59
Tabelle 30: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide (QA) 61
Tabelle 31: Übersicht bisheriger und geplanter Aktivitäten 69

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitplan für das Projekt LUPROME 12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des High-Moisture Extrusionsprozesses 22
Abbildung 3: chemische Darstellung von Polyethersulfon 28
Abbildung 4: Flachzellenlaboranlage 29
Abbildung 5: Schalenanteile an den Lupinen-Samenkörnern 32
Abbildung 6: Keimlingsanteil nach weiterer Aufbereitung, ... 33
Abbildung 7: Keimlingsanteil, bezogen auf die Ausgangsmenge an Körnern 33
Abbildung 8: Grafik Diafiltration 35
Abbildung 9: Blockbild Prozessablauf 37
Abbildung 10: Herstellung eines Frischkäse-Produktes aus Lupinenextrakt. 48
Abbildung 11: Joghurt, Mousse und Salatdressing 49
Abbildung 12: High-Moisture-Extrudate 49
Abbildung 13: Faserstruktur der verschiedenen HME Versuche 51
Abbildung 14: Sensorik-Bewertungsbogen 52
Abbildung 15: Bewertung 1 der Sensorikattribute 53
Abbildung 16: Bewertung 2 der Sensorikattribute 53
Abbildung 17: Bewertung 3 der Sensorikattribute 54
Abbildung 18: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide 61

Projektkurzfassung

Im Rahmen des hier präsentierten und von der BLE geförderten LUPROME-Projekts wurde eine Methode zur Gewinnung von Protein aus Chinolizidinalkaloid-reichen Sorten der Schmalblättrigen Lupine (Lupinus angustifolius L.) entwickelt. Die verfahrenstechnische Entbitterung erfolgt durch eine intelligente Verknüpfung verschiedener Membrantechnologien. Eine speziell angepasste Membran mit spezifischen Oberflächeneigenschaften, Porengrößenverteilung und hoher chemischer sowie mechanischer Beständigkeit wurde basierend auf einem umfassenden Screening für Membranwerkstoffe entwickelt. Laborversuche wurden erfolgreich durchgeführt, und eine mehrstufige, modulare Pilotanlage wurde entwickelt. In einer ersten Pilotstufe mit einem Spiralwickelmodul wurde die Abtrennung und Reduzierung des Chinolizidinalkaloidgehalts auf < 0,02 % nachgewiesen. Ein Scale-up auf eine industrienahe Pilotanlage mit 120 m² Filterfläche und sechs Spiralwickelmodulen wurde ebenfalls erfolgreich durchgeführt, obwohl weitere Optimierungen im Prozessablauf erforderlich sind. Die Ultra-/Diafiltration des Lupinenproteins mittels innovativer Membrantechnologie zeigt erhebliche Vorteile gegenüber dem herkömmlichen Säure-/Basen-Fällungs-Verfahren. Dieser rein physikalische Prozess erfüllt die Anforderungen an ökologische/biologische Produktion und wird im Nachfolgeprojekt LuproCess weiter untersucht. Die Nativität und Funktionalität des extrahierten Proteins bleiben weitgehend erhalten, was sich positiv auf Verarbeitungsmerkmale und Geschmack der entwickelten Produkte auswirkt. Das entwickelte Verfahren eliminiert zudem die chemische Entfettung der Lupinenflakes mittels Lösungsmitteln, was sich positiv auf die Qualität auswirkt, da ein gewisser Ölanteil im Protein toleriert und sogar als Qualitätskriterium betrachtet wird. Das Projekt markiert den ersten Schritt in einer interaktiven Zusammenarbeit zwischen Lebensmitteltechnologie und Pflanzenzüchtung. Durch diese Kooperation konnten Zuchtlinien ausgewählt werden, die sich hinsichtlich Proteinausbeute, Proteinqualität und Verfahrenstechnik als vorteilhaft erwiesen. Die erhebliche Variabilität im Zuchtmaterial wurde erfolgreich für weitere Entwicklungsarbeiten selektiert.

Abstract

In the presented LUPROME project, supported by the BLE, a method for extracting protein from alkaloid-rich varieties of narrow-leaved lupine (Lupinus angustifolius L.) with low quinolizidine alkaloid content has been developed. The de-bittering process is achieved through an intelligent combination of various membrane technologies. A specially adapted membrane, characterized by specific surface properties, pore size distribution, and high chemical and mechanical resistance, was developed based on a comprehensive screening for membrane materials. Successful laboratory experiments were conducted, and a multi-stage, modular pilot plant was designed. In an initial pilot stage with a single spiral wound module, the separation and reduction of the quinolizidine alkaloid content to < 0.02 % were

demonstrated. A scale-up to an industry-relevant pilot plant with 120 m² filter area and 6 spiral wound modules was also successfully carried out, although further optimization is needed in the process flow. The ultra-/diafiltration of lupine protein using innovative membrane technology offers significant advantages over the conventional acid/base precipitation method. This purely physical process meets the requirements for ecological/biological production and will be further explored in the follow-up project, LuproCess. The native characteristics and functionality of the extracted protein are largely preserved, positively impacting processing features and the taste of the developed products. The developed method also eliminates the chemical defatting of lupine flakes using solvents, contributing positively to quality as a certain oil content in the protein is tolerated and even considered a quality criterion. This project signifies the first instance of interactive collaboration between food technology and plant breeding. This partnership allowed for the selection of breeding lines that proved advantageous in terms of protein yield, protein quality, and processing technology. The substantial variability in the breeding material was successfully selected for further development.

1 Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Leguminosen stellen für den ökologischen Landbau ein unverzichtbares Element in der Stickstoffversorgung von Fruchtfolgen und eine wertvolle Proteinquelle für die Nutztierfütterung dar. In Deutschland werden traditionell neben Erbsen und Ackerbohnen drei annuelle Lupinenarten *Lupinus angustifolius, L. albus* und *L. luteus* angebaut. Die Verwendung dieser Lupinenarten (besonders der schmalblättrigen *L. angustifolius*) als pflanzliche Eiweißquelle aus regionaler Produktion für den Lebensmittelsektor ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückt. Dabei wird bisher auf die sogenannten Süßlupinen gesetzt, da diese einen deutlich niedrigeren Gehalt an den bitteren und giftigen Chinolizidinalkaloiden enthalten und daher einfacher zu Lebensmitteln verarbeitet werden können. Allerdings sind die Erträge der angebauten Süßlupinen noch zu niedrig und deren Ertragsstabilität ist nicht ausreichend. Zudem sind diese Sorten sehr anfällig gegen Fraßschädlinge, da ihnen die in der Evolution gebildeten Gegenmittel in Form der Chinolizidinalkaloide herausgezüchtet wurden. Weiterhin ist aufgrund scharfer Selektion das genetische Material für die Süßlupine stark eingeschränkt.

Auf der anderen Seite stehen mit den chinolizidinalkaloidreichen Formen der schmalblättrigen Lupine Pflanzen zur Verfügung, die deutlich anspruchsloser und damit für den ökologischen Landbau im Vergleich zu den derzeit angebauten Süßlupinensorten besser geeignet sind. Auch ohne Pestizidanwendungen zeigen derartige Bitterlupinen eine geringere Anfälligkeit gegenüber Fraßfeinden oder Befall mit Bakterien, Pilzen und Viren (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 2001; Philippi et al. 2016). Für die Nutzung dieser Lupine, insbesondere deren Proteine, als Lebensmittel müssen die Chinolizidinalkaloide vor der

Verwendung entfernt werden. Bisherige Verfahren, die einen Kochprozess sowie ein mehrtägiges Wässern mit häufigem Wechsel des Waschwassers beinhalten, sind zum einen sehr langwierig und führen auch zu nicht unerheblichen Verlusten an wertgebenden Inhaltsstoffen.

Im vorliegenden Projekt soll ein Verfahren entwickelt werden, um Protein aus Chinolizidinalkaloidreichen Lupinensorten in hoher Ausbeute, Qualität und Funktionalität zu gewinnen, welches konform mit der EG-Öko-Verordnung ist. Die dafür vorgesehene verfahrenstechnische Entbitterung (Abtrennung der Chinolizidinalkaloide) soll durch eine intelligente Verknüpfung verschiedener Membrantechnologien und Membrananlagen realisiert werden. Membranverfahren gelten als grüne Technologie, da sie bei geringem Energieverbrauch eine schonende und qualitätserhaltende Auftrennung ermöglichen. Die erhaltenen Proteine und weitere Komponenten der Lupinensamen werden bezüglich Qualität und Funktionalität charakterisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen werden dann geeignete Lebensmittelapplikationen identifiziert und getestet. Umgekehrt sollen aber auch die Lupinenakzessionen identifiziert werden, die aus der noch großen genetischen Breite der bitteren Formen für die Anwendungen im Lebensmittelbereich am besten geeignet sind.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes, Bezug des Vorhabens zu den einschlägigen Zielen der EPS oder zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

In dem Vorhaben sollen die Grundlagen zur Nutzung einer für den ökologischen Anbau und die technologische Aufarbeitung besonders vorteilhaften Lupinensorte als rein pflanzliche und regionale Proteinquelle im Rahmen der menschlichen Ernährung erarbeitet und anhand von Produktbeispielen umgesetzt werden. Damit leistet das Vorhaben einen Beitrag für die **ökologische und nachhaltige Lebensmittelverarbeitung entlang der Wertschöpfungskette**, wobei die Nachhaltigkeit sowohl auf der Anbauseite (höhere/sichere Erträge, weniger Pestizide, ideale technologische Eignung) als auch auf der Verarbeitungsseite (geringere Verluste) gesichert wird. Damit wird auch die **Ressourceneffizienz in der ökologischen und nachhaltigen Lebensmittelverarbeitung** erhöht und es werden **Lebensmittelabfälle, einschließlich Nacherneteverluste, minimiert**. Weiterhin wird das Vorhaben zur Steigerung der **Qualität ökologisch/nachhaltiger Lebensmittel** beitragen. Eingeschlossen sind auch sehr umfangreiche **Analysen zur Optimierung von Verarbeitungsprozessen** sowie die **Verbesserung der Qualität verarbeiteter Lebensmittel** aus der Lupine.
Gleichzeitig sollen mit dem Projekt Impulse zur Sicherung und Ausweitung des Anbaus von Schmalblättriger Lupine gegeben werden. Da bittere Lupinenformen allgemein als anspruchsloser gelten, können Anbauvorteile genutzt werden (z.B. Wegfall von Schutzmaßnahmen gegen Wildverbiss). Die Verwendung bitterer Lupinenformen erschließt eine sehr breite genetische Vielfalt der Arten, die dem heutigen Süßlupinenpool fehlt. Das Projekt baut auf Pflanzenmaterial des im Rahmen der Eiweißpflanzenstrategie von BLE/BMEL-geförderten Projektes LupiZAV auf. Es beinhaltet wichtige Schritte zur Inwertsetzung der dort erzielten Projektergebnisse.

Das Besondere an diesem Vorhaben ist, dass über die Projektpartner die gesamte Wertschöpfungskette von Züchtung/Anbau, über die Gewinnung bis zur Verarbeitung einbezogen wird, wobei der Ansatz „From farm to fork“ umgesetzt werden soll. Das heißt, über die letztendliche Qualität und Funktionalität der Lupinenproteine werden das Entbitterungsverfahren für die Lupinensamen und die am besten geeigneten Lupinenakzessionen definiert.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das Vorhaben gliedert sich in fünf Arbeitspakete (AP) mit jeweiligen Teilvorhaben (TVH).

In der Projektphase des ersten Jahres wird auf Samen aus einem bereits von ESKUSA beim Bundessortenamt in der Prüfung befindlichen Bitterlupinenstamm (LupiZAV4) zurückgegriffen, bis ab Ende August ausreichend große Muster des Zuchtmaterials mit besseren Merkmalseigenschaften aus der ersten Vermehrung zur Verfügung stehen.

Die generelle Vorgehensweise beginnt mit der Identifizierung von geeigneten Membranen für die Entbitterung der Lupine und der Gewinnung der Proteine (**AP 1**). Dazu werden die Lupine zunächst geschält und anschließend flockiert oder gemahlen. Der nächste Schritt ist dann die Extraktion in kaltem Wasser, bei der ein Großteil der Proteine und die Chinolizidinalkaloide in die wässrige Phase übergehen. Nach einer Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile (Fasern) wird das Protein in der flüssigen Phase dann mittels unterschiedlicher Membranverfahren (Ultrafiltration, Dialyse) aufkonzentriert und die Chinolizidinalkaloide abgetrennt. Parallel wird im **AP 2** die Bereitstellung von Samen der Bitterlupine aus unterschiedlichen Akzessionen in größeren Mengen bearbeitet. In dem Vorhaben soll die sonst übliche Laborphase übersprungen und damit die Entwicklungsphase um mehrere Jahre verkürzt werden. Dazu ist vorgesehen, sofort die Rohstoffmengen bereitzustellen, die direkt im Pilot-Maßstab eingesetzt werden können. Über ein Screening der Proteinqualitäten, die aus den verschiedensten Rohmaterialien mittels Membranverfahren (AP 1) gewonnen werden können, sollen diejenigen Akzessionen ermittelt werden, die das größte Potential für die Applikation in Lebensmitteln haben. Basierend auf den Ergebnissen der Arbeiten in AP 1 wird im **AP 3** die Gewinnung von Proteinen in einer Pilotanlage umgesetzt. Das ermöglicht die Herstellung der erforderlichen Mengen für eine Analyse der Proteineigenschaften und -qualitäten aber auch für die Applikation in Lebensmitteln, z.B. in Fleischanalogen. Dazu soll die entsprechende Pilotanlage angepasst und eine optimale Prozessstrategie ermittelt werden. Die sowohl während der Entwicklung des Membrantrennverfahrens anfallenden Proteinchargen (AP 1) als auch die mittels der Pilotanlage (AP 3) hergestellten Mengen werden in im **AP 4** bezüglich ihrer Mengen und Eigenschaften analysiert. Mit den Proteinen, die die beste Funktionalität aufweisen, z. B. Emulgiervermögen oder Gelbildung, werden Lebensmittel-Prototypen hergestellt und bewertet. Ein weiterer Aspekt im **AP 5** ist die Analyse der Gehalte an Chinolizidinalkaloiden in den Rohmaterialien, allen Prozessstufen (z.B. Proteinfraktionen, Flakes, Permeat) und Lebensmittel-Prototypen durch den Projektpartner JKI.

Projektpartner ESKUSA wird die erforderlichen Mengen an Rohmaterialien mit definierten Merkmalen bereitstellen und Lupino übernimmt die Gewinnung der Proteine. JKI wird die Chinolizidinalkaloidanalysen zur Bewertung von Rohmaterialien und allen Prozessstufen durchführen und DIL wird die aufbereiteten Proteine chemisch und physikalisch charakterisieren sowie Lebensmittelapplikationen entwickeln. Durch die enge Verzahnung der Projektarbeiten ist ein intensiver Informationsaustausch zwischen den Partnern gewährleistet, wobei die technologischen Anforderungen bis in die Zuchtmaterialentwicklung zurückgereicht werden.

Der Ablauf und die jeweiligen Arbeitspakete werden im folgendem Arbeitsplan zeitlich eingeordnet (vgl. Abbildung 1).

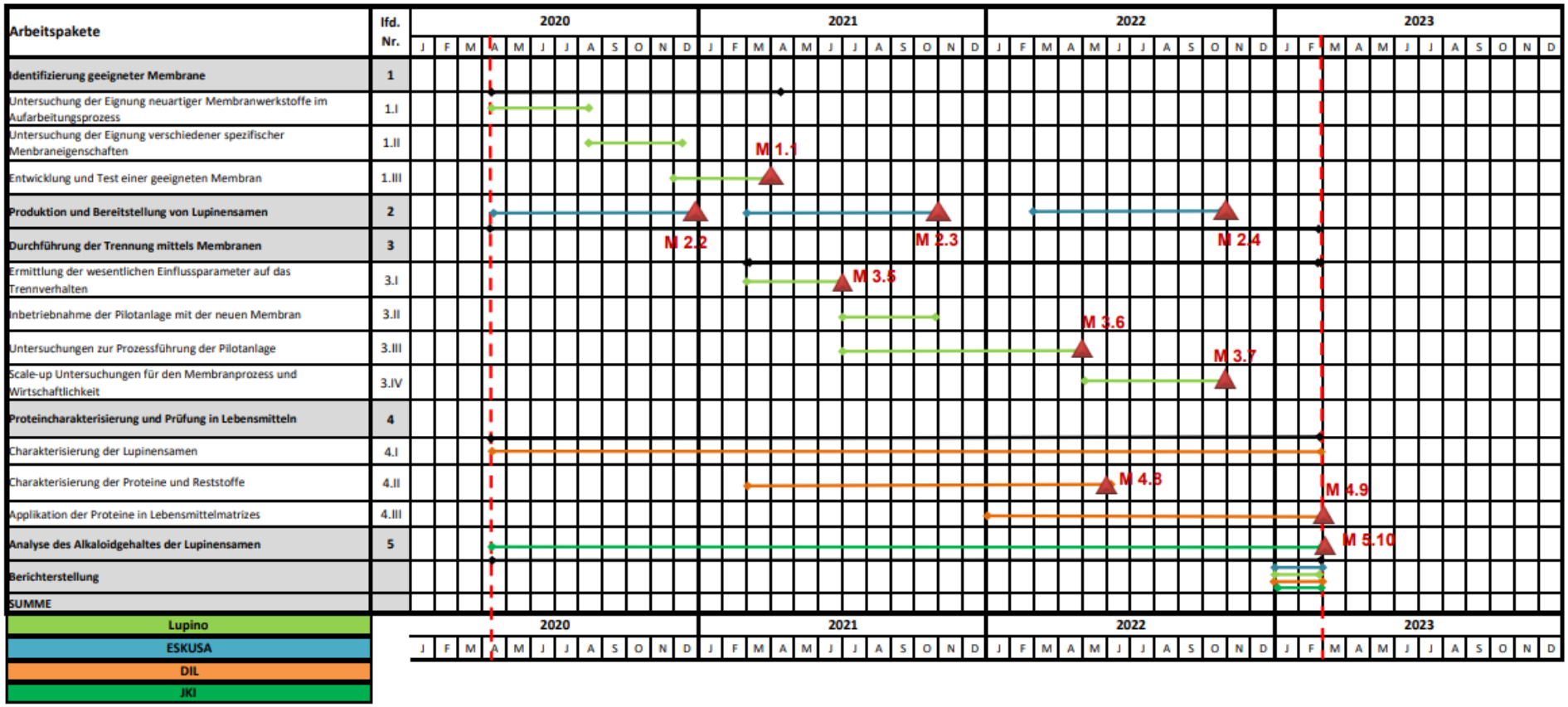


Abbildung 1: Zeitplan für das Projekt LUPROME

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

2.1 Einordnung der Lupine als pflanzliche Proteinquelle

Der weltweite Markt für pflanzliche Protein Food Ingredients umfasste in 2017 rund 7,7 Mrd. US$ und wird bis 2020 auf 10 Mrd. US$ prognostiziert. In der EU beträgt dieser Markt in 2017 rund 2 Mrd. US$ und soll bis 2024 auf 3,7 Mrd. US$ steigen. Einer weiteren Umsatzsteigerung steht zum einen das schlechte Image von Soja, als das derzeit am meisten verwendete Pflanzenprotein, aufgrund der Diskussionen um gentechnisch veränderte Sorten im Wege. Zum anderen sind die bisherigen Ersatzprodukte zu Soja - in erster Linie Erbsen - geschmacklich nicht akzeptabel, was deren Anwendungen beschränkt. Lupinen haben hingegen einen neutralen (bis nussigen) Geschmack und werden in Deutschland angebaut. Zudem gibt es weltweit keine gentechnisch veränderten Sorten. Der Samen der *L. angustifolius* besitzt ca. 350 g/kg TS Protein, ca. 60 g/kg TS Fett und einen Ballaststoffanteil von 160 g/kg TS (Sujak et al., 2006). Dies alles macht die Lupine zur Proteinpflanze mit Zukunft und bietet damit ein hervorragendes Vermarktungspotenzial.

Die Lupinensamen können jedoch auch toxikologisch relevante Bitterstoffe aufweisen (BfR, 2017). Die enthaltenen Chinolizidinalkaloide, auch nur Alkaloide genannt, rufen beim Menschen Vergiftungssymptome wie Schwindel oder Übelkeit hervor, die in hohen Dosen zu Herzstillstand und Atemlähmung führen können. Die täglich aufgenommene Dosis an Alkaloiden sollte deutlich unter 0,2 mg/kg Körpergewicht liegen (BfR, 2017).

Der Gehalt der Bitterstoffe in den Samen ist abhängig von der Art und Herkunft sowie Umweltbedingungen und Anbausystem (Beyer et al. (2015); Jansen et al. (2009);Jansen et al. (2012); Jansen et al. (2015)) der Lupine. Gezüchtete Süßlupine gelten als alkaloidarm bzw. -frei (unter 0,05 % bzw. 0,02 % in der Trockensubstanz) (Lupinenverein, 2019), wohingegen Bitterlupine hohe Gehalte an Alkaloiden aufweisen. Bei Samen von *L. angustifolius* liegen diese häufig zwischen 1,5 und 4 % mit den Hauptalkaloiden Lupanin (65 - 75 % der Gesamtalkaloide) Angustifolin (10 - 15 %) und 13-Hydroxylupanin (10 - 15 %) (Blaschek et al., 2006).

2.2 Entbitterung von Lupine

Die Verwendung von Bitterlupinensamen für die menschliche Ernährung setzt einen Prozess zur Entfernung der wasserlöslichen Chinolizidinalkaloide voraus. Die Entbitterung erfolgt meist durch Kochen und mehrtägiges Einweichen der Samen mit häufigem Wechseln des Wassers (Bleitgen et al. (1979); Aguilera et al. (1983)). Die Zugabe von Säuren, Laugen oder Aktivkohle während des Waschvorgangs kann die Konzentration im Endprodukt weiter reduzieren (Carvajal-Larenas et al. (2013);Gross et al. (1983)). Bei diesem Vorgehen werden allerdings auch wasserlösliche Kohlenhydrate, Proteine, Vitamine und Mineralstoffe ausgetragen (Karara, 1987). Eigene Vorversuche im Labormaßstab ergaben bis zu 30 % Verlust

an Trockensubstanz bei diesem Verfahren. In einzelnen Erntejahrgängen liegen auch bei Süßlupinen die Alkaloidgehalte deutlich über den oben angegebenen Werten (Wink, 2018), so dass auch hier für Lebensmittelnutzung mehrfach entbittert werden muss, was die Wirtschaftlichkeit des Aufarbeitungsprozesses für diese Lupinen erheblich reduziert.

Es liegen aktuell keine Erkenntnisse vor, die eine Nutzbarmachung der Schmalblättrigen Bitterlupine für die Humanernährung beschreiben bzw. dass eine Durchführung in praktischer Form erfolgt ist. In einigen wenigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen werden Laborversuche zur Entbitterung beschrieben. Diese Versuche beruhen auf 3 Prozessstufen:

- soaking Einweich- oder Wässerungsprozess
- boiling Kochen
- washing Waschen (nach Säurefällung)

Diese Verfahren wurden bisher aufgrund des enormen anlagentechnischen und zeitlichen Aufwands sowie des sehr hohen Wasserverbrauch - mehr als das 60-fache der Lupinensamen - in den Industriestaaten nicht in die Praxis umgesetzt. Anders sieht es in Südamerika aus - dem zweiten wichtigen Genzentrum der Lupine. Die Andenlupine ist schon im 6. und 7. Jahrhundert vor Christus kultiviert worden. In späteren Hochkulturen, wie der Nazca- (100-800 n. Chr.) und der Tiahua- naco-Kultur (800-1000 n. Chr.) war sie fester Bestandteil in der Ernährung. Schon zu dieser Zeit wurde die Lupine durch Wässern und Kochen entbittert *(Torres Tello and Nagatay, 1980).* Aktuell wird in der Andenregion u.a. in Ecuador dieses Verfahren in kleinen Kooperativen zur Entbitterung der Andenlupine (*Lupinus mutabilis*) noch heute durchgeführt. Dieser Entbitterungsprozess dauert im Durchschnitt 6 Tage. Ergänzend muss hier hinzugefügt werden, dass man bewusst die ganzen Kerne entbittert. Die entbitterten Lupinenkerne werden hauptsächlich für verschiedenartige Snacks verwendet. Darin begründet liegt auch die lange Zeitdauer des Wässerns. Das ist allerdings auch verbunden mit erheblichen Produktverlust und zum Teil ungenügender mikrobiologischer Qualität. In den nachfolgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen werden Forschungen für eine Verbesserung der Effizienz des Entbitterungsprozesses beschrieben: (Carvajal-Larenas et al., 2013; Carvajal-Larenas et al., 2014; Villacrés et al., 2020).

Das von den Projektpartnern angestrebte Verfahren einer physikalischen Entbitterung durch eine dem Siebprinzip zugrundeliegende Stofftrennung aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen und -eigenschaften ist bezogen auf den aktuellen Wissensstand ein Alleinstellungsmerkmal. Zusätzlich unterstützt wird diese Projektidee durch die Tatsache, dass im Rahmen der Protein-Extraktion der Lupino AG bereits auf Membrantechnologie zurückgegriffen wird. Auch das ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zur kommerziell üblichen Herstellung von Proteinisolaten aus Soja, Erbse, Ackerbohne u.a. Die Verfahren beruhen auf einer Säurefällung der Proteineinheit mit erheblichen Nachteilen für die Umwelt (u.a. saure Abwässer, hoher BSB-Wert). Die Säurefällung bei der Lupinenproteingewinnung nach dem Fraunhofer Verfahren führt aufgrund des Löslichkeitsverhaltens zum Verlust der physiologisch wertvollen γ - Fraktion. Es gibt auch Hinweise auf eine nachteilige Beeinflussung der Proteinqualität durch den Einsatz von Salzsäure bei der Proteinfällung. Die im Projekt

angestrebte und von der Lupino AG bereits praktizierte neutral wässrige Proteinextraktion ist im Gegensatz dazu produkt- und umweltschonend.

3 Material und Methoden

3.1 Rohstoffe

Vom Projektpartner ESKUSA wurden acht verschiedene Akzessionen von Bitterlupinen (*L. angustifolius)* bereitgestellt. Diese wurden mechanisch aufbereitet durch

- Schälen – Fliehkraftschälen
- Sichten – Steigsichter
- Flockieren – Walzenstuhl

Die Bitterlupinsamen wurden zu sehr dünnen Flocken gewalzt (= geringes Hektolitergewicht). Das verbessert die Diffusion der Chinolizidinalkaloide aus der festen Flockenmatrix in die wässrige Umgebung (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der acht Bitterlupinakzessionen

Charge	**Alkaloidgehalt [%]**	**Rohware [kg]**	**Samen [kg]**	**Schalenanteil [%]**	**Hektolitergewicht [kg]**
LupiZAV4	2,00	25	19,5	22	33,5
54, mittel	1,54	50	38,0	24	35,5
54,groß	1,88	50	38,0	24	33,0
57	1,76	50	36,6	27	33,0
60	1,55	50	39,3	22	33,0
64	1,61	50	39,0	22	32,1
80	1,86	50	36,5	27	31,0
81	1,40	50	39,5	21	33,0

Diese acht Akzessionen sind das Material für die Versuchsdurchführung zur Entbitterung mittels membranbasierter Ultra-/Diafiltrationsprozesse. Um die auf das Siebprinzip beruhende Membrantechnologie erfolgreich anwenden zu können, sind Kenntnisse der stofflichen Zusammensetzung und der Molekulargewichte der Inhaltsstoffe erforderlich.

Tabelle 2: Übersicht der Proteinfraktionen für *Lupinus angustifolius* L.
nach (Foley, 2011), mit den Bezeichnungen: Molekulargewicht (M_r), isoelektrischer Punkt (Iso-Pkt.).

Conglutin Fraktion	**Proteinfamilie**	**Ø Total-Anteil [%]**	***M*$_r$ [kDa]**	**Iso-Pkt.**	**Quarternäre Struktur**
α	11 S	24	412	5.1 - 5.8	Hexamer
Legumin β	7 S	56	216	5.0 - 6.0	Trimer
Vicilin γ	7 S	6	200	7.9	Tetramer
δ	2 S	14	13	sauer	Monomer

Globuläre Proteine haben in wässriger Lösung eine sehr kompakte, stabile und nahezu kugelförmige Struktur mit einem hydrophoben Kern und einer hydrophilen Oberfläche. Durch

die dicht gepackte innere Struktur haben die globulären Proteine eine vom Molekulargewicht abhängige Dichte von

$$\rho(M) = \left[1.410 + 1.450 \cdot exp\left(-\frac{M(kDa)}{13}\right)\right] \frac{g}{cm^3}$$

Häufig verwendet wird eine mittlere Dichte von

$$\rho = 1.37 \ \frac{g}{cm^3}$$

Dieser Wert gilt in etwa für Proteine mit einem Molekulargewicht $M >$ 30kDa. Unter Verwendung der bekannten Molekulargewichte der Lupinenproteinfraktionen (vgl. Tabelle 2) ergeben ich folgende Werte für die Proteindichte:

$$\alpha - Conglutin = 1.41\frac{g}{cm^3}; \beta - Conglutin = 1.41\frac{g}{cm^3}; \gamma - Conglutin = 1.41\frac{g}{cm^3};$$

$$\delta - Conglutin = 1.93\frac{g}{cm^3}$$

Es ist deutlich zu erkennen, dass das δ - Conglutin mit seinem niedrigen Molekulargewicht eine signifikant höhere Dichte hat im Vergleich zu den hochmolekularen Globulinen.

Für die einzelnen Fraktionen lässt sich hieraus das vom jeweiligen Protein eingenommene Volumen wie folgt berechnen:

$$V_{Protein} = \frac{M_{Protein} \cdot 10^{23}}{N_A \cdot \rho_{Protein}} \ [nm^3] \quad , \quad N_A = AVOGADRO - Konstante \ 6.022 \cdot 10^{23} \left[\frac{1}{mol}\right] ;$$

Mit den uns bekannten Molekulargewichten und der jeweiligen Proteindichte kann man über das Volumen den Radius bzw. Durchmesser für die einzelnen Proteine bestimmen:

$$r_{Protein} = \left(\frac{3V}{4\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \ [nm]$$

Die in Tabelle 2 dargestellte große Spannweite der Molekulargewichte der Lupinenproteine (13 kDa - 412 kDa), wird vermutlich auch für die Bitterlupinen Akzessionen gelten. Dies erfordert eine sorgfältige Abwägung bei der Auswahl des *molecular weight cut-off* (**MWCO**) der Membranen, denn die oben genannten Proteinfraktionen sollen zurückgehalten und

damit von den niedermolekularen Inhaltsstoffen getrennt werden. Daraus resultieren folgende Parameter:

$$r_\alpha = 22\ nm; \quad r_\beta = 18\ nm; \quad r_\gamma = 17,5\ nm; \quad r_\delta = 6,4nm$$

Der Zusammenhang zwischen der Porengröße und dem **MWCO** wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Es gibt daher unterschiedliche empirische Ansätze. Meist verwendet wird

$$d_{Pore} = 0.09 \cdot (MWCO)^{0.44}$$

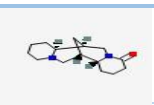
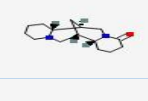
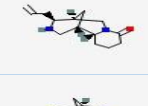
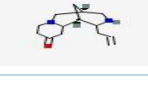
,

mit dem Porendurchmesser (d_{Pore}) in [nm] und MWCO in [Da]. Daraus wird ein MWCO für die zu verwendete Membran von 50.000 Da bzw. 50 kDa abgeleitet und ergibt einen Porendurchmesser (d_{Pore}) von ~ 10 nm. Dies entspricht auch den Angaben des Herstellers Synder Inc. zu der Porengrößenverteilung, dass ~ 84 % der Poren im Bereich von 5 bis 15 nm liegen. Mit dem gewählten Cut-off ist somit sichergestellt, dass die Proteinfraktionen α-, *β*- und *γ*- Conglutin zu 100 % sowie *δ*- Conglutin zu > 60 % zurückgehalten werden. Dies ist ein Kompromiss zugunsten der Permeabilität gegenüber der Selektivität für das *δ*- Conglutin.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die relativ enge Spannweite bei den Molekulargewichten der Chinolizidinalkaloide. Im Vergleich zu den Proteinen ist das Verhältnis $MW_{Alkaloide}$ zu $MW_{Proteine}$ von ≥ 1 : 1.000 . Das ergibt eine sehr gute Trenngrenze gegenüber den Proteinen.

Anders verhält es sich bei den Oligosacchariden, da es innerhalb dieser Gruppe eine etwas größere Spannweite gibt (vgl. Tabelle 4). Im Vergleich zu den Proteinen ist das Verhältnis $MW_{Oligosaccharide}$ zu $MW_{Proteine}$ von ≥ 1 : 250. Daraus resultiert ebenfalls eine sehr gute Trenngrenze zu den Proteinen.

Tabelle 3: Übersicht der Struktur der Chinolizidinalkaloide
sowie der anteilmäßigen Verteilung und dem Molgewicht (M).

CAS	**Bezeichnung**	**Formel**	**M [Da]**	**2D-Struktur**	**Anteil**
550-90-3	Lupanin	*C15H24N2O*	248,36		hoch
15358-48-2	13 Hydroxylupanin	*C15H24N2O2*	264,36		hoch
486-87-3	Isolupanin	*C15H24N2O*	248,36		gering
550-43-6	Angustifolin	*C14H22N2O*	234,34		mittel
-	Isoangustifolin	*C14H22N2O*	234,34		gering

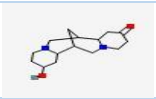
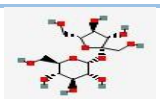
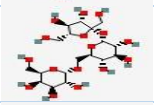
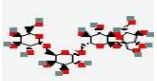
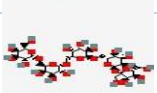
-	13 Hydroxymultiflorin	*C*15*H*24*N*2*O*2	264,36		gering

Tabelle 4: Übersicht der Struktur der wichtigsten Oligosaccharide sowie der anteilmäßigen Verteilung und dem Molgewicht (M).

CAS	**Bezeichnung**	**Formel**	**M [Da]**	**2D-Struktur**	**≥[g/100gAnteil]**
57-50-1	Sucrose	*C*12*H*22*O*11	342,3		Disaccharid
512-69-6	Ranose	*C*18*H*32*O*16	504,5		Trisaccharid
470-55-3	Stachyose	*C*24*H*42*O*21	666,6		Tetrasaccharid
546-62-3	Verbascose	*C*30*H*52*O*26	828,7		Pentasaccharid

3.2 Membranwerkstoffe

Membranverfahren haben sich in den letzten Jahren zu einer Querschnittstechnologie entwickelt, die eine effizientere Gestaltung von verfahrenstechnischen Prozessen gestattet. Der in den letzten Jahren schnell gewachsene Markt mit neuen, möglichen Einsatzfeldern brachte auch die Entwicklung neuer bzw. optimierter Membranwerkstoffe mit sich. Der bei weitem größte Anteil von Membranen für die Prozessindustrie wird aus polymeren Werkstoffen hergestellt. Durch die Verfügbarkeit spezieller Membranen mit hohen Selektivitäten und spezifischen Materialeigenschaften lassen sich Trennprozesse realisieren, die mit konventionellen Grundoperationen der Verfahrenstechnik wesentlich aufwendiger sind. Vor diesem Hintergrund wird die Entwicklung von Polymermembranen und deren Modifizierung für die Entbitterung von Lupinenprotein Lösungen angestrebt. Neben den Polymeren werden keramische Werkstoffe, Metalle und Verbundwerkstoffe für die Herstellung von Membranen verwendet. Eine Übersicht von Membranwerkstoffen geordnet nach Werkstoffgruppen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der Membranwerkstoffe*

Polymere	**Keramik**	**Metalle**	**Verbundwerkstoffe**
PVDF	Aluminiumoxid	Edelstahl	Graphene-Oxid/Polymer
PTFE	Zirkoniumoxid	Ni- Legierungen	TFC- Membranen
PSF	Siliciumoxid	Metalloxide	PSF/PEGMA
PES	Siliciumcarbid	Palladium	Polymer-/Keramik

PAN	Siliciumnitrid	Silber	PAN/PDMS
CA	Titanoxid	Sintermetalle	PAN/PAH
PC	SPG-Glas	Germanium	Keramik-/Metall

*Erläuterungen siehe Anlage

Unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit und des Anforderungsprofils an geeignete Membranwerkstoffe wurden speziell die Polymermembranen

- PVDF – Polyvinylidenfluorid
- PAN – Polyacrylnitril
- CA – Celluloseacetat
- PES – Polyethersulfon im Labormaßstab getestet.

3.3 Bitteres Zuchtmaterial der Schmalblättrigen Lupine

Die im Projekt verwendeten Saatgutherkünfte der Schmalblättrigen Lupine sind allesamt bittere Formen. Der Projektpartner ESKUSA hat 80 Saatgutmuster im Jahre 2014 dankenswerterweise von der Kuratorin der Lupinensammlung am Vavilov Institut der Pflanzenindustrie, Frau Prof. Margarita Vishnyakova, St. Petersburg erhalten. Dabei wurde explizit nach alten, bitteren Formen nachgefragt, die gegenüber dem engen Süßlupinenpool noch eine möglichst große genetische Breite besitzen. Die Saatgutmuster wurden im Rahmen des vom BMEL über die BLE im Rahmen der Eiweißpflanzenstrategie geförderten Projektes LupiZAV vermehrt und agronomisch charakterisiert. Für das LUPROME Projekt wurde aufgrund von Kornertrag und agronomischen Merkmalen eine Vorauswahl von 22 Akzessionen getroffen. Diese Akzessionen wurden von ESKUSA unter Bereinigung von Abweichlern erneut vermehrt. Die geernteten Saatgutmuster wurden von den Projektpartnern hinsichtlich Proteingehalt, Chinolizidinalkaloidgehalt und -zusammensetzung sowie auf ihre verfahrenstechnische Eignung hin geprüft. Beim Erntejahrgang 2020 wurden alle Partien direkt nach dem Drusch und noch vor der Trocknung des Saatgutes in bereits gut trockene und noch grüne Samen fraktioniert. Diese Teilfraktionen wurden ebenfalls analysiert.

3.4 Grundlagen der Membranfiltertechnologie

Ein Ausgangspunkt für die Projektidee ist die Kenntnis, dass ein wesentlicher Teil der Chinolizidinalkaloide in Wasser löslich sind. Das Bestreben von Stoffen in Lösung zu gehen - auch als Lösungstension oder Lösungsdruck bezeichnet - ist jedoch ein sehr komplexer auf Diffusion beruhender Prozess. Die Chinolizidinalkaloide befinden sich in einer festen Matrix in den Lupinensamen. Die Matrix besteht vorwiegend aus Zellwänden (Rhamnogalacturon-gerüst), Proteinen (Globuline, Albumine) sowie Kohlenhydraten (Oligosaccharide) und bildet ein polymeres Netzwerk. Durch dieses Netzwerk müssen die Chinolizidinalkaloide diffundieren um in das umgebende Wasser zu gelangen. Um einen effizienten Diffusionsprozess zu erzielen, gibt folgender theoretischer Ansatz eine Berechnungs-

möglichkeit für die notwendige Diffusionszeit der Chinolizidinalkaloide. (WALSTRA, P. 2003. Physical Chemistry of Foods, Marcel Dekker, Inc, New York. 807 pp.)

$$t = \frac{x^2}{D}$$

t = Zeit die das Alkaloidmolekül für eine Wegstrecke x benötigt $[s]$
x = Diffusionsstrecke $[m]$
D = Diffusionskoeffizient $[\frac{m^2}{s}]$

.

Aus Experimenten wurde die Wegstrecke für ein Chinolizidinalkaloidmolekül vom Kerninneren zur äußeren Hülle mit 6.4 x 10^3 m ermittelt. Zur Abschätzung der Diffusionszeit wurde ein Diffusionskoeffizient (D) von 1x10^{10} angenommen, vergleichbar mit dem Diffusionskoeffizienten für Zucker in Früchten. Der oben beschriebene reale Entbitterungsprozess dauert 6 Tage bzw. 500.000 s. Daraus resultiert ein tatsächlicher Diffusionskoeffizient (D) von 8 x 10^{11} m^2/s. Auf dem Weg vom Kerninnern zur äußeren Schicht muss das Chinolizidinalkaloidmolekül viele Hindernisse aufgrund der Tortuosität (Gebundenheit) des Transportweges in der festen Matrix überwinden. Ebenfalls führt das Wässern zur Quellung und damit Strukturveränderungen die den Diffusionskoeffizienten beeinflussen und die Diffusionsgeschwindigkeit erheblich einschränken.

Dieses Phänomen lässt sich mathematisch durch das *2. Fick'sche Gesetz* beschreiben:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_s \cdot \frac{\partial^2 c_s}{\partial x^2}$$

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_s \cdot \nabla^2 c_s$$

.

Die technologische Basis für die Entbitterung sind Membran gestützte Verfahren der Stofftrennung durch Rückhalt einer hochmolekularen Komponente (Protein) und Durchfluss der niedermolekularen Chinolizidinalkaloide. Dazu wurden in einem Screening geeignete Membranwerkstoffe getestet und bewertet. Für die Umsetzung in eine technische Anlage im Labor- und Pilotmaßstab ist daraufhin ein neuartiges Anlagenkonzept entwickelt worden. Das Screening konnte dahingehend eingegrenzt werden, dass aufgrund der Membran basierten Proteinextraktion der Lupino AG, Erfahrungen mit geeigneten Membranwerkstoffen vorhanden sind.

3.5 Charakterisierung der Lupinensamen

Proteinanalyse

Der Rohproteingehalt wird nach Kjeldahl bestimmt. Dies erfolgt durch Aufschluss der Teilprobe (Einwaage) mit Schwefelsäure in Gegenwart eines Katalysators, gefolgt von einer Destillation der Reaktionsprodukte nach Alkalisierung (Aufschlusseinheit 426,

Destillationseinheit Kjelflex K360, beide Büchi Labortechnik GmbH, 45127 Essen, Deutschland). Zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes wird der freigesetzte Ammoniaks mit einer Salzsäurelösung nach Auffangen in einer Borsäurelösung mit einer Titrationseinheit Titrino Plus (877, Metrohm GmbH & Co., 70794 Filderstadt, Deutschland) titriert. Die Berechnung des Rohproteingehalts erfolgt durch Multiplikation des Ergebnisses mit 6,25.

Bestimmung des Aschegehaltes

Die Bestimmung des Rohaschegehaltes erfolgt gravimetrisch durch Bestimmung des Masseverlustes nach Veraschung bei 550 °C im Muffelofen L9/11/P330 (Nabertherm, 28865 Lilienthal, Deutschland)

Fettanalyse

Die Bestimmung des Fettgehaltes erfolgt gravimetrisch. Dazu wird die Untersuchungsprobe durch Kochen mit verdünnter Salzsäure aufgeschlossen und der heiße Aufschluss durch einen nassen Papierfilter filtriert, um die Fettsubstanzen zurückzuhalten. Aus dem getrockneten Papierfilter wird das Fett mit Petroleumbenzin in einer Soxhlet Extraktions-Einheit extrahiert. Das Lösemittel wird durch Destillation oder Abdampfen entfernt und die extrahierten Substanzen gewogen.

Bestimmung der Trockensubstanz

Die Trockensubstanz bzw. der Wassergehalt wurden gravimetrisch mittel Seesandmethode durch Bestimmung des Masseverlustes nach Trocknung bei 103 °C im Trockenschrank UL50 (Memmert GmbH & Co.KG, 91126 Schwabach, Germany) ermittelt.

Bestimmung der Ballaststoffe

Der Ballaststoffgehalt wird gravimetrisch-enzymatisch ermittelt. Je 1 g getrocknete Proben (Duplikat) werden einem sequenziellen enzymatischen Verdau durch hitzestabile Alpha-Amylase, Protease und Amyloglucosidase unterzogen. Unlösliche Ballaststoffe (IDF) werden filtriert, der Rückstand wird mit warmem destilliertem Wasser gewaschen. Aus den vereinigten Lösungen aus Filtrat und Wasserwaschungen werden lösliche Ballaststoffe (SDF) mit 4 Volumina 95 %igem Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wird dann filtriert und getrocknet. Sowohl SDF- als auch IDF-Rückstände werden für die endgültige Berechnung der SDF- und IDF-Werte um den Proteingehalt, Aschegehalt und den Leerwert korrigiert. Für die Bestimmung der Gesamtballaststoffe (TDF) werden die löslichen Ballaststoffe (SDF) mit 95 %igem Ethanol ausgefällt, der Rückstand wird filtriert, getrocknet und gewogen. Der Gesamtballaststoffanteil wird um den Protein- und Aschegehalt in den Fitrationsrückständen sowie um den Blindwert korrigiert

3.6 Extrusion

Die Extrusionsversuche, die im Rahmen von AP 4.III „Applikation der Proteine in Lebensmittelmatrizes“ durchgeführt wurden, wurden auf einem Doppelschneckenextruder (ZSK27 MvPlus, Coperion GmbH, Stuttgart, DE) durchgeführt. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau.

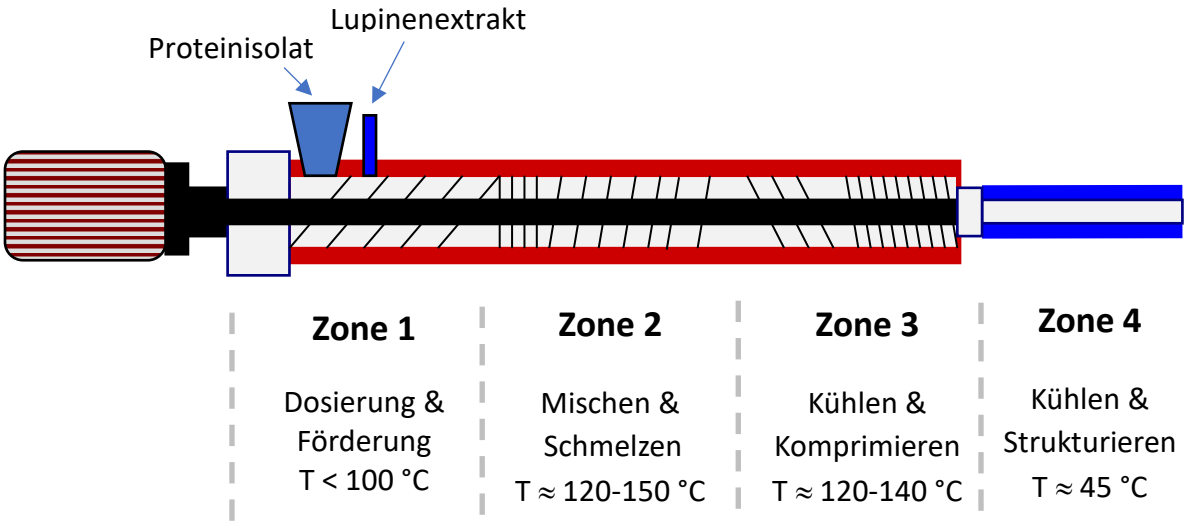


Abbildung 2: Schematische Darstellung des High-Moisture Extrusionsprozesses.

Das Proteinisolat (Soja, Erbse) wurde in im ersten Extruder Barrel über eine Feststoffdosierung eingeführt. Die Dosierung des flüssigen Lupinenextraktes erfolgte im zweiten Segment über eine Pumpe (vgl. Abbildung 2). Im mittleren Verfahrensteil des Extruders erfolgte das Schmelzen und Mischen der Materialien bei Temperaturen bis 150 °C. Im letzten Abschnitt erfolgte das Komprimieren und Abkühlen der Masse bevor sie am Extruderende durch eine nachgeschaltete Kühldüse gefördert wurde, in der durch Abkühlen und eine damit einhergehende Verfestigung des Fließprofils eine faserartige Strukturierung erfolgte. Der Gesamtdurchsatz des Materials betrug 10 kg/h, dabei betrug der Anteil an Lupinenextrakt bis 60 %. Die Schneckendrehzahl wurde konstant auf 100 min^{-1} und das Kühlaggregat zur Kühlung der Düse auf 45 °C eingestellt.

3.7 Charakterisierung der Chinolizidinalkaloide

Analyse des Rohmaterials (Samen der Schmalblättrigen Bitterlupinakzessionen)

Die Analyse der Chinolizidinalkaloide in den Samen erfolgte nach salzsaurer Extraktion mittels Gaschromatographie, wobei zuerst eine Identifizierung der spezifischen Chinolizidinalkaloide durch ein Massenspektrometer durchgeführt wurde. Die eigentliche quantitative Bestimmung der individuellen Substanzen erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibrierung unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) (Jansen et al. 2009). Zudem wurden die Proben in vierfacher Wiederholung analysiert und alle Ergebnisse werden als Mittelwelt mit n=4 und in µg/g Korn bzw. % angegeben

Analyse aller Prozessstufen der Entbitterung

Durch den mechanischen Entbitterungsprozess besitzen alle Proben/Prozessstufen einen gewissen Wasseranteil, welcher für die gaschromatographische Analyse entfernt werden muss. Daher wurden alle Proben vorab gefriergetrocknet und die Ergebnisse auf die Trockensubstanz bezogen. Durch die Angabe in Trockensubstanz wird der Chinolizidinalkaloidgehalt im Permeat etwas verzerrt dargestellt, was hier aber keine Berücksichtigung findet, da die Chinolizidinalkaloidgehalte in der Proteinfraktion entscheidend ist. Nach entsprechender Trocknung der Prozessstufen wurden die Proben analog zu den Lupinensamen analysiert und alle Ergebnisse als Mittelwelt mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz (TS) bzw. % angegeben.

4 Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse

AP 1 Identifizierung geeigneter Membrane

TVH 1.I Untersuchung der Eignung neuartiger Membraneigenschaften

Membraneigenschaften

Auswahl der geeigneten Membran für eine Trennaufgabe ist bestimmt hinsichtlich der folgenden Kriterien, die ihrer Bedeutung entsprechend aufgeführt sind:

- Scharfe Trenngrenze – Selektivität
- Hohe Permeabilität – maximaler Permeatfluss
- Anti-Fouling Eigenschaften – Ablagerungen vermeiden
- Angepasste Materialeigenschaften
    - chemisch-physikalisch z.B. hydrophile Oberfläche; Beständigkeit gegen Laugen und Säuren
    - thermisch - hohe Temperaturbeständigkeit u.a. für die Reinigung
    - mechanisch - Widerstand gegenüber hohen Drücken
    - geometrisch - optimierte zylindrische Porenform

Sämtliche Kriterien können in einem Anwendungsfall von einer einzelnen Membran oder Membranwerkstoff in der Regel nicht gleich gut abgedeckt werden. Die Membranauswahl ist daher immer ein Kompromiss, welche an den Anwendungsfall orientiert, unterschiedlich gewichtet wird, um eine optimale Membranauswahl zu gewährleisten. Der Charakterisierung der Membranen fällt daher eine außerordentlich wichtige Rolle zu. Um eine geeignet Auswahl von Membranen vornehmen zu können sind alle die Funktionalität der Membran

bestimmenden Eigenschaften herausgearbeitet worden. In Tabelle 6 ist eine Eigenschaftsmatrix zusammengestellt.

Tabelle 6: Eigenschaftsmatrix Membranen

Transporteigenschaften	**Strukturgeometrie**	**Oberflächeneigenschaften**
Volumenfluss	Porengrößenverteilung	Membranwerkstoff
Permeabilität	Porenform/-geometrie	hydrophob; hydrophil
Rückhaltevermögen	Morphologie	Oberflächenladung
Diffusion	Tortuosität; Porenlänge	ζ - Potential
Überströmgeschwindigkeit	Porösität	Oberflächenstruktur

Charakterisierung von Membranen

Für eine zielorientierte Identifizierung geeigneter Membranen sind in Tabelle 6. eine große Anzahl Parameter zur Charakterisierung der Membranen aufgeführt. Die Analyse und Bewertung dieser Parameter sind Grundlage bzw. Kriterium für die Membranauswahl.

Porengrößenverteilung – bestimmt die Qualität einer Membran in Bezug auf ihre Trenneigenschaften und den Transportmechanismus. Die Kenntnis ist eine wesentliche Voraussetzung für die Auswahl des optimalen Porendurchmessers bzw. des MWCO. Polymermembranen haben eine relativ breite Streuung des Porendurchmessers - beschrieben durch eine logarithmische Normalverteilung der Anzahl n der Poren mit dem Radius r_i

$$n(r_i) = \frac{N_{Pore}}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma \cdot r_i} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln(r_i) - \ln(r_{Pore})}{\sigma}\right)^2\right) \cdot \delta \cdot r_i$$

Selektivität – die Fähigkeit einer Membran, zwischen Komponenten einer Mischung zu unterscheiden, wird als Selektivität bezeichnet:

$$\alpha = \frac{1}{S_{Protein}} .$$

Hieraus können der erforderliche MWCO und das Zurückweisungsverhalten bzw. Rückhaltevermögen unterschiedlicher großer Moleküle oder Partikel abgeleitet werden.

Molecular Weight Cut-Off (MWCO) - bei Ultrafiltrationsmembranen kommt üblicherweise das MWCO zur Anwendung, also die Molmasse, der zu einem Anteil von 90 % oder 95 % zurückgehaltenen Moleküle.

Rückhaltevermögen R – ist eine Funktion des Siebkoeffizienten

$$S_{Protein} = \frac{C_{Filtrat}}{C_{Feed}}$$

mit

$$R = 1 - S_{Protein}$$

bzw.

$$R = 1 - \frac{C_{Filtrate}}{C_{Feed}}$$

Permeabilität – ist die Kennzahl für den Fluss bzw. Durchlässigkeit des reinen Lösungsmittel Wasser bezogen auf den Transmembrandruck

$$L_P = \frac{J_v}{\Delta P}$$

mit

$$J_v = \frac{V_{Permeate}}{A_{Membran} \cdot t}$$

und eine der wichtigsten Parameter zur Beurteilung einer Membran. Die Permeabilität verhält sich konträr zur Selektivität. Eine hohe Permeabilität verringert die Selektivität und umgekehrt.

Porendichte – Anzahl N der Poren je Membranflächeneinheit; eine hohe Porendichte ist anzustreben. Begrenzende Faktoren sind die mechanische Stabilität und das Herstellungsverfahren. Die Porendichte berechnet sich mittels *Hagen-Poiseuille* Gleichung mit Hilfe des ermittelten Fluss J_i des Lösungsmittels zu

$$J_i = \frac{N_i \pi d_i^4 \Delta P}{128 \eta \sigma}$$

Porösität – ist das Verhältnis der Porenoberfläche zur gesamten Membranoberfläche und abhängig von der Porendichte:

$$\epsilon = \frac{N \pi r_{Pore}^2}{A_{Membran}}$$

mit N - Anzahl der Poren; R - Porenradius

Tortuosität – bei der Herstellung von Polymermembranen sind die Poren nicht exakt vertikal ausgerichtet, sondern zeigen eine Verwindung. Das bedingt eine größere Porenlänge L_τ als die Membrandicke $\delta_{Membran}$ und beeinflusst damit den Permeatfluss:

$$\tau = \frac{L_\tau}{\delta_{Membran}}$$

Porengeometrie/Porenform – im Idealfall haben die die Poren zylindrische Form; herstellungsbedingt aber auch teilweise elliptisch. Neuere Herstellungsverfahren ermöglichen auch eine geschlitzte Porenform. Das soll zu einem verbesserten Permeatfluss führen. Für die Proteinaufbereitung liegen dazu noch keine Ergebnisse vor.

ζ-Potential – das ζ-Potential ist ein Maß für die elektrische Ladungsdichte an der Membran-Wasser-Grenzfläche und berücksichtigt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Membranoberfläche und den in der wässrigen Lösung befindlichen Proteinen. Die Veränderung des ζ-Potentials nach einer Proteinfiltration ist ein Maß für den Fouling- Prozess.

Oberflächenrauhigkeit – die ß Oberflächenrauhigkeit ist ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Membranen vor allem in Bezug auf die Permeabilität bzw. Permeatfluss

Hydrophilität – Hydrophilität ist eine wichtige Oberflächeneigenschaft in Bezug auf das unerwünschte Fouling und wird durch den Wasserkontaktwinkel WCA (*water contact angle*) beschrieben. Oberflächenrauhigkeit und Hydrophilität werden durch Membranoberflächenmodifikation an den jeweiligen Filtrationsprozess angepasst.

TVH 1.II Untersuchung der Eignung verschiedener spezifischer Membraneigenschaften

Vorauswahl Membranstoffe

Anhand der die Funktionalität bestimmenden Membraneigenschaften erfolgte eine Vorauswahl hinsichtlich der Werkstoffgruppen auf Polymere.

Polymere

- Polyethersulfon (PES)
- Polyvinylidenfluorid (PVDF)
- Polyacrylnitril (PAN)
- Polytetraflorethylen (PTFE)

Die aus bekannten Materialien bestehenden Membranen erreichen ihre spezifische Funktionalität durch physikalisch und /oder chemische Modifikation ihrer Oberfläche. Hier

besteht die Herausforderung den am besten geeigneten Werkstoff für eine Modifizierung zu finden, die den dualen Prozess der Chinolizidinalkaloidabtrennung und gleichzeitiger Proteinaufkonzentrierung optimal gewährleistet.

Untersuchung zur Eignung neuartiger Membranwerkstoffe

Ziel der Modifizierung sind neuartige Oberflächeneigenschaften die einen stabilen Permeatfluss gewährleisten und das sogenannte *fouling* minimieren. Das *fouling* ist gekennzeichnet durch die Ablagerung von Partikeln, Kolloiden, Makromolekülen als sogenannte *Natural Organic Matter* (NOM) auf der Membranoberfläche und/oder an den Porenwänden. Die kolloidalen Bitterlupinenproteine können durch die Neigung zum *fouling* die Membranleistung negativ beeinflussen. Entgegenwirken kann man diesen Prozess durch Erhöhung der Hydrophilität der Membranoberfläche/Porenwände durch verschiedene Modifizierungsstrategien. Da Chinolizidinalkaloide ebenfalls hydrophil sind wird deren Abreicherung sowie der Rückhalt der hydrophoben Proteine positiv beeinflusst.

Modifizierungsstrategien Spezielle Oberflächen modifizierende Stoffe, sogenannte Hydrophi**L**ic **S**urface **M**odifying **M**acromolecules (**LSMM**), verändern die Oberflächen-eigenschaften durch die Bildung kovalenter Bindungen durch ihre molekularen Untereinheiten mit den aktiv wirkenden Membranwerkstoff.

- chemische Modifizierung
  - Carboxylierung
  - Sulfonierung
  - Aminierung
  - Epoxidation

- Oberflächenrauigkeit
  - minimale Rauigkeit schon bei Produktion des Grundkörpers
  - Aufbringen eines Dünnschichtfilms z.B. durch Grenzschicht- Polymerisation
  - Neuestes Verfahren: gepfropfte Nanofilmschicht
- Physikalische-chemische Modifizierung
  - Argon- Gas Oberflächenaktivierung
  - Plasma- Niedrigdruck- Polymerisierung mit AAc, CPAm und HMDSO Monomeren [1]

Besonders geeignet für die Modifizierung zu hydrophilen Oberflächen sind Membranen auf Basis Polyethersulfon:

[1] AAc- Acrylsäure; CPAm -Cyclopropylamin; HMDSO - Hexamethyldisiloxan

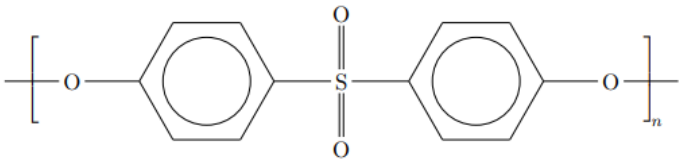


Abbildung 3: chemische Darstellung von Polyethersulfon

Wesentlich für die Identifizierung geeigneter Membranen ist neben den oben genannten physikalisch-chemischen und mechanischen Eigenschaften der Membranen auch die stoffliche Seite der abzutrennenden und zurückzuhaltenden Stoffe. Dem Trennprinzip der Ultrafiltration liegt in erster Linie der Ausschluss der abzutrennenden Stoffe nach Größe und Gestalt zugrunde. Hier spielt weitgehend unabhängig vom Polymermaterial, die Größe der suspendierten Partikel oder das Molekulargewicht und Morphologie der Makromoleküle in Lösung im Verhältnis zur Porengröße der Membran die entscheidende Rolle. Eine Membranstruktur mit möglichst hoher Porosität ist anzustreben, um die Trennung bei gleichzeitig hohen Permeatfluss zu realisieren. Es besteht eine große Differenz der Molekulargewichte zwischen den zurückzuhaltenden Proteinen und den abzutrennenden Chinolizidinalkaloiden und niedermolekularen Zucker. Das spricht eindeutig für eine Anwendung der Membrantechnologie zur Stofftrennung bei der Aufbereitung von Bitterlupinen.

Ermittlung spezifischer Membraneigenschaften

Die für die Entbitterung erforderlichen spezifischen Membraneigenschaften lassen sich durch geeignete Kenngrößen charakterisieren. Die Strategie zur Optimierung der spezifischen Membraneigenschaften lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- Bestimmung und Vergleich der Permeabilität der 4 vorausgewählten polymeren Membranen (PES, PVDF, PAN, CA) auf Grundlage der ***N**ormalized **W**ater **P**ermeability*

$$L_{NWP}\left[\frac{L}{m^2 \cdot s \cdot Pa}\right] = \frac{J_v \cdot TCF}{TMP \cdot A_{Membrane}} \quad TCF - \ Temperaturkorrekturfaktor$$

- optimaler Porendurchmesser bzw. Cut-o (MWCO) mittels folgender Beziehung ermitteln:

$$D_{MWCO} = 0.066(MWCO)^{0.33}$$

- höchst mögliche Hydrophilität durch geeignete Oberflächenmodifizierung, charakterisiert durch *ζ-Potential*; Zielgröße bei -12 *mV bis* -14 *mV*

- maximale Porendichte bzw. Porösität unter Berücksichtigung des Herstellungsverfahrens und der mechanischen Stabilität; Zielgröße: 0,5 [cm^3/cm^3]
- geringst mögliche Oberflächenrauigkeit im Rahmen der Oberflächenmodifizierung; Zielgröße ~ 1 μm

TVH 1.III Entwicklung und Test einer geeigneten Membran

Die vorausgewählten polymeren Membranen wurden im Labormaßstab mit einer Flachzellen Laboranlage der MEVAN Technology GmbH getestet.

Beschreibung:

- Typ MF25 Compact1980
- Membranfläche 80 cm^2
- Abmessungen: 750 X 750 X 500 mm
- Arbeitsdruck: max 8 MPa

Abbildung 4: Flachzellenlaboranlage

Aus dem zuvor ermittelten Zusammenhang von Proteindurchmesser und Molekulargewicht ist ein geeigneter MWCO *(molecular weight cut-off)* zu bestimmen. Aufgrund der Bandbreite von 13 kDa für die δ-Conglutin bis zu > 400 kDa für die α-Conglutin muss hier ein Kompromiss gefunden werden. Aus den Versuchen mit der Flachzellen-

Laboranlage ergab sich ein optimaler MWCO von 50 kDa. Im Vergleich wurden für die PES Membran beste Werte für die Permeabilität erzielt:

$$L_P \sim 50 \left[\frac{L}{m^2 \cdot h \cdot bar}\right].$$

Der Permeatfluss wurde mittels Proline Promag P 300 magnetisch-induktives Durchflussmessgerät (Endress + Hauser) bestimmt. Unter Berücksichtigung von Verfügbarkeit, Kosten, mechanische Stabilität und Modifizierungspotential wurde eine Membran auf Basis Polyethertsulfon (PES) mit MWCO 50 kDa identifiziert. Um die angestrebten Parameter zu erreichen wurden diese dem Hersteller Synder Filtration Inc. übermittelt. Hieraufhin erfolgte eine gezielte chemisch-physikalische Oberflächenmodifikation.

Die Membranen wurden daraufhin mit Hilfe des *non-solvent induced phase separation* (NIPS)Prozesses hergestellt, bei der ein Membranpolymer in einem aprotisch-polarem, hoch siedendem Lösemittel gelöst und nach einem Rundrakelprozess mit einem Nichtlösemittel gefällt wird. Konkret heißt dass: hergestellt aus azidiertem Polyethersulfon in N,N-Dimethylacetamid unter Zugabe von Polyvinylpyrrolidon als Porogen und Fällung in einer Mischung aus Wasser und N,N-Dimethylacetamid (Angaben des Herstellers Synder Inc.).

AP 2 Produktion und Bereitstellung von Lupinensamen

Im Laufe des Projektes wurde Saatgut von 14 Akzessionen (Erntejahre 2020 und 2021 in Tabelle 7) in Vermehrungsparzellen angebaut und akzessionsweise gedroschen. Da die Akzessionen noch nicht in Form von reinen Linien vorliegen, wurden in den Vermehrungsparzellen intensiv vom Haupttypus abweichende Pflanzen bereinigt, d.h. während der Vegetationszeit bis kurz vor der Ernte ausgemerzt.

Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die für das Projekt verwendeten Lupinenakzessionen und die an die Projektpartner abgegebenen Saatgutmengen.

Da das Projekt später als ursprünglich vorgesehen gestartet ist, lagen zu Projektbeginn schon acht Saatgutvermehrungen aus dem Erntejahr 2019 vor. Mit diesen 8 Saatgutmustern konnte bereits am Anfang des Projektes bei allen Partnern gearbeitet werden. Ursprünglich war vorgesehen, im ersten Projektjahr mit Saatgut der Bitterlupinensorte ´ESKUBLUE´ zu arbeiten. Die Auswahl weiterer Akzessionen wurde maßgeblich erleichtert durch die Chinolizidinalkaloid- und Proteingehaltsanalysen eines umfangreichen Sets von 86 Saatgutmustern aus dem LupiZAV-Vorgängerprojekt durch das JKI und das DIL (vgl. Tabelle 12 und Tabelle 24). Die in der Antragstellung genannten 15-21 Akzessionen lagen schon nach Ende der zweiten Vegetationsperiode im Jahr 2021 vor. Dies ergab die Möglichkeit, in der dritten Vegetationsperiode des Projektes im Jahr 2022 drei Akzessionen größer flächig zu vermehren, um ausreichend große Proteinextrakt-Chargen für die abschließenden High-

Moisture Extrusionsversuche bereitstellen zu können. Es wurden im Jahr 2022 von der Nr.23: 423 kg, von der Nr.57: 1191 kg und von der Nr.80: 851 kg geerntet und bis auf Restsaatgut für weitere Vermehrungen an Lupino bzw. an die Schälmühle in Vetschau übergeben.

Die an die Schälmühle übergebenen Saatgutmengen wurden gewogen und die Schalenfraktion wurde quantitativ zurückgewogen und wieder an ESKUSA übergeben. So konnten als wichtige Parameter die Schälbarkeit und die Ausbeute an geschälter Ware für die Flakesherstellung ermittelt werden (vgl. Abbildung 5). Der Schalenanteil nach dem Schälprozess liegt je nach Akzession zwischen 20 und 25%, wobei auch Effekte von Lagerung bzw. Frischverarbeitung enthalten sind.

Tabelle 7: Übersicht über Erntejahrgänge und Erntemengen der Lupinenvermehrungen

Akzession/ Prüfnummer	Erntejahr	Menge(kg) übergeben an Lupino	Menge(kg) übergeben an DIL	Menge(kg) übergeben an JKI	Restsaatgut Menge (kg)	Fraktion grün (kg)	Fraktion reif (kg)
54-1 klein	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
54-1 gfoß	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
64-1	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
66-2	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
81-1	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
4	2019	50	2	0,5	reichlich	-	-
57-1	2019	50+80	2	0,5	reichlich	-	-
80-1	2019	25+80	2	0,5	reichlich	-	-
28-1	2020	25	*2*	*0,5*	10	6,5	35
37-1	2020	40	*2*	*0,5*	10	9,8	50,5
47-2	2020	40	*2*	*0,5*	10	11	50,4
49-1	2020	35	*2*	*0,5*	10	9,8	45,3
55-1	2020	34	*2*	*0,5*	10	4,5	44
19-1	2020	17	*2*	*0,5*	5	5,3	22,5
58-1	2020	26	*2*	*0,5*	10	2,5	36
3	2021	40	*2*	*0,5*	26	1,9	7,1
18	2021	40	*2*	*0,5*	31	3,3	2,2
23	2021	30	*2*	*0,5*	14	1,5	2,6
30	2021	20	*2*	*0,5*	15	4,6	4,6
46	2021	40	*2*	*0,5*	17	nicht fraktioniert	nicht fraktioniert
66	2021	20	*2*	*0,5*	23	nicht fraktioniert	nicht fraktioniert
26	2021	35	*2*	*0,5*	18	4,0	2,1

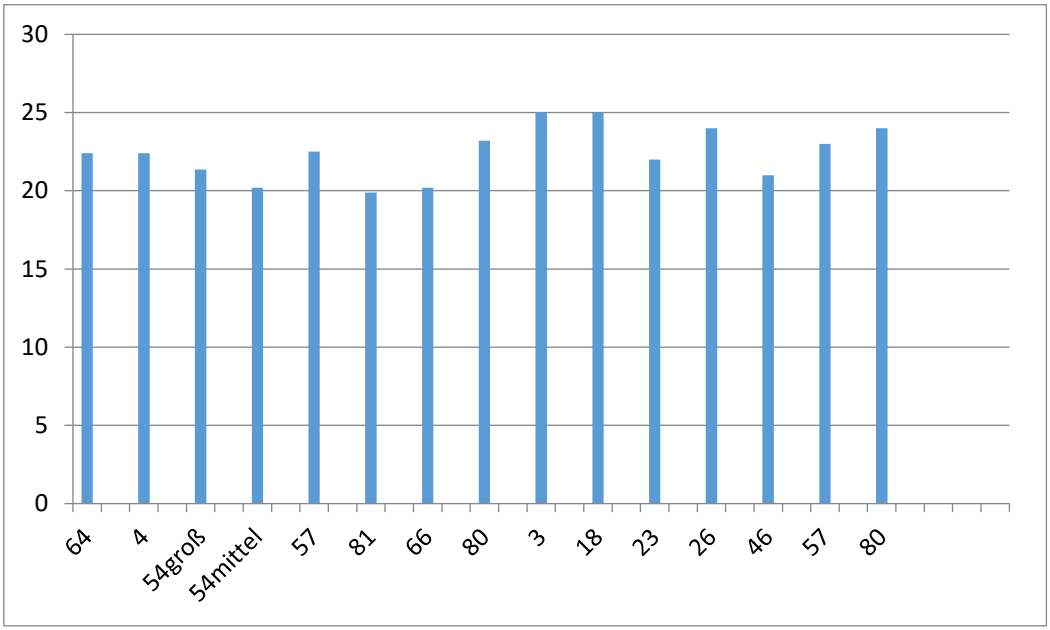


Abbildung 5: Schalenanteile an den Lupinen-Samenkörnern nach Akzessionen

Während die Kotyledonen den Hauptbestandteil der geschälten Samen ausmachen, haftet den Schalen noch ein Großteil der Keime an. Die Schalen wurden daher mittels Rebeln, Sieben und Steigsichtern weiter fraktioniert in eine proteinfreie Schalenfraktion und eine Keimfraktion (vgl. Abbildung 6). Dabei ist zu erkennen, dass das überlagerte Saatgut der Ernte 2019 (Nr. 64, 4, 54, 57, 81, 66 und 80) bei der Fraktionierung mit 6-12% einen deutlich geringeren Keimanteil in der Schale besitzt als die frisch aufbereitete 2021er Ernte (Nr. 3, 18, 23, 26, 46, 57, 80 mit 12-26%). Beide Fraktionen können Nebenstromketten zugeführt werden: Die Schalen erwiesen sich als prinzipiell gut geeignet zum Abstreuen von Jungpflanzenanzuchten gartenbaulicher Kulturen. Aus der Keimfraktion kann ein hochwertiges Keimöl hergestellt werden, das beispielsweise in der Kosmetikindustrie Verwendung finden könnte.

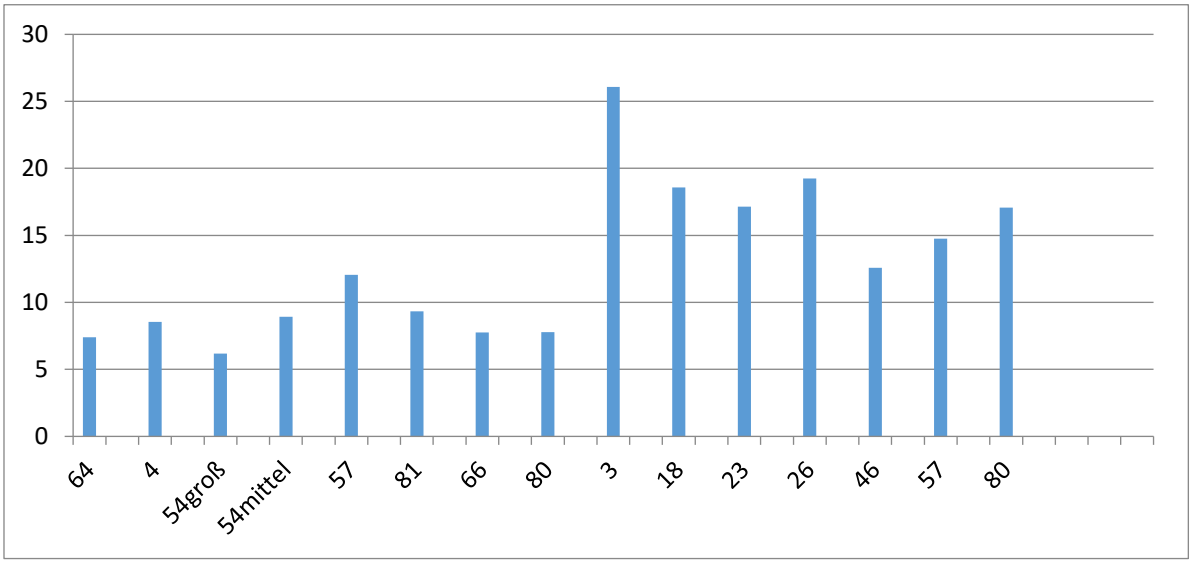


Abbildung 6: Keimlingsanteil nach weiterer Aufbereitung,
bezogen auf die Gesamtfraktion der Schalen aus dem Schälprozess

In Abbildung 6 ist der Keimlingsanteil der Akzessionen dargestellt. Dabei stammen die ersten acht Akzessionen aus der überlagerten Saatguternte 2019 (Anteil 0,5-2,5 Gewichtsprozent der aufbereiteten Körner); die rechten 7 Akzessionen stammen aus der relativ frisch aufbereiteten Ernte 2020 (Anteil 2,5 – 4,9 Gewichtsprozent der aufbereiteten Körner). Der anhaftende Keimlingsanteil an der Samenschale kann, zumindest einen Teil der bei Lupino seit langem beobachteten, besseren Proteinausbeuten bei überlagertem Saatgut erklären.

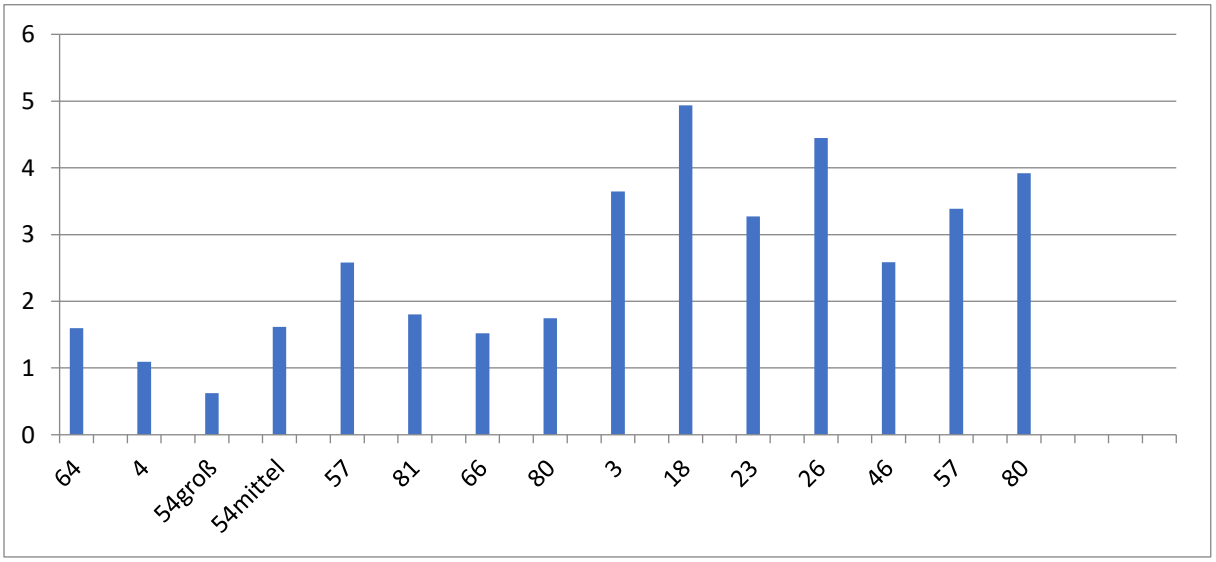


Abbildung 7: Keimlingsanteil, bezogen auf die Ausgangsmenge an Körnern

AP 3 Durchführung und Trennung mittels Membranen

TVH 3.I Ermittlung wesentlicher Einflussparameter auf das Trennverhalten

Der Filtrationsprozess wird durch nachstehend aufgeführte Parameter beschrieben. Diese Parameter werden durch die Art und Weise der Prozessführung beeinflusst. Bei der Prozessführung sind folgende Prozessbedingungen zwingend einzuhalten:

- Volumenkonstanz durch exakte Zuführung von Frischwasser simultan zum Permeatfluss
- stabiler Flux über die Regelung (FU) der Feedpumpe
- Transmembrandruck konstant halten über Regelung (FU) der Systempumpen
- Temperatur Stabilität durch aktive Kühlung der Membranen

Vorrangiges Kriterium für den Erfolg dieser Prozessführung ist die Reduzierung bzw. Endkonzentration der Chinolizidinalkaloide auf < 0,02 %. Projektpartner JKI führt dazu die Analysen durch.
Die Prozessstufe Ultrafiltration wird durch nachfolgende Kennzahlen beschrieben:

Kennzahl R

Der momentane Rückhalt R (konzentrationsunabhängig)

$$R = 1 - \frac{c_P}{c_F}$$

c_P - momentane Permeatkonzentration $_{cF}$ - Feedkonzentration R = 0,98 Lupinenprotein; $_R$ = 0,02 Chinolizidinalkaloide

Kennzahl c_p

$$c_P = c_0 \frac{X}{X-1}(1 - X^{R-1});\ Zielgrösse\ c_P \rightarrow 0; kein\ Protein\ im\ Permeat$$

c_p – Gesamtpermeationsgrenze

Die Abbildung 8 zeigt den prinzipiellen Aufbau einer UF-/DF- Anlage:

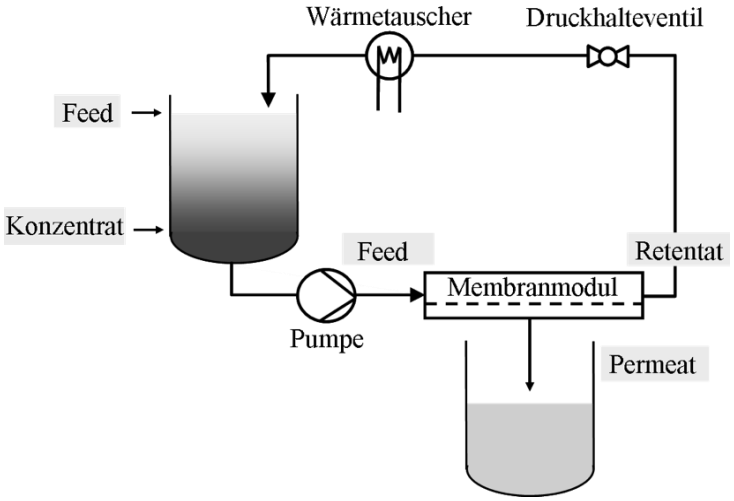


Abbildung 8: Grafik Diafiltration

TVH 3.II Inbetriebnahme der Pilotanlage

Die Anforderung an den Membranfläche-Zeit Bedarf At bei einem Ausgangsvolumen V_0 ist bestimmt durch die Summe des Permeatflusses aller 3 Prozessstufen UF1, DF und UF2:

Tabelle 8: Rohstoffdaten Lupinenflocken

Probe / Akz.	**Menge [kg]**	**Alkaloid [%]**	**Protein [%]**	**Suspension [L]**
80	225	2.51	42.0	2.250
57	225	2.40	40.0	2.250
26	185	2.06	41.2	1.850

Tabelle 9: Zusammenstellung der Versuchsdaten

Probe /Akz.	**Ansatz [L]**	**Feed $V_{f,0}$ [L]**	**V_p $V_{f,1}$ [L]**	**Feed [L]**	**Volumen$_{DF}$ [L]**
80	2.250	1.725	1.300	425	2.125
57	2.250	1.725	1.300	425	2.125
26	1.850	1.420	1.065	355	1.775

Tabelle 10: Prozessdaten Diafiltration

Probe /BLU	**Faktor D**	**Flux [$\frac{l}{m^2*h}$]**	**TMP UF [bar]**	**Flow [m/s]**	**QA Extrakt [%]**
80	5	18.0	3.0	2.5	JKI
57	5	18.0	3.0	2.5	JKI
26	5	18.0	3.5	2.5	JKI

Tabelle 11: UF-/DF Prozessanalyse

Prozessschritt	**UF1 Prozessstart: Vor-Konzentrierung**	**DF: Diafiltration N Waschstufen**	**UF2: finale Konzentration**
Beschreibung	Konzentrierung von c_0 zu c_p	n-fache Diafiltration bei c_p	Konzentrierung von c_0 auf $_cF$
Retentatvolumen Start	V_0	V_0/X_1	V_0/X_1
Retentatvolumen final	V_0/X_1	V_0/X_1	V_0/X_1X_2
Permeatvolumen je Stufe	$V_0\,(1 - 1/X_1)$	$V_0(X/X_1)$	$(V_0/X_1)(\,1 - 1/X_2)$
Volumen Wasser	0	$V_0(X/X_1)$	0
Permeatfluss $\bar{J}$	$J_0/3 + 2J_D/3$	J_D	$JD/3 + 2J_F/3$
Membranflächen-zeitbedarf A_t	$\frac{V_0(1-1/X_1)}{J_0/3+2J_D/3}$	$\frac{V_0/X_1}{J_D}$	$\frac{(V_0/X_1)(1-1/X_2)}{J_D/3+2J_F/3}$

$$\frac{At}{V_0} = \frac{3(1-1/X_1)}{J_0+2J_D} + \frac{N/X_1}{J_D} + \frac{(3/X_1)(1-1/X_2)}{J_D+2J_F}$$

Mit

$$X_1 = \frac{c_D}{c_0}$$

Vereinfacht sich obige Gleichung zu

$$\frac{At}{V_0} = \frac{Nc_0}{c_D J_D}$$

- o.g. Gleichungen zum Permeatfluss sind Näherungslösungen
- für die meisten praktischen Fälle ausreichend
- Stoffbilanzgleichung

$$\frac{dV}{dt} = -JA$$

- Gel-Modell für tiefergehende Berechnungen
- Permeatflux

$$J = kln(c_g/c)$$

- Permeatfluss

$$\frac{At}{V_0} = \frac{Nc_0}{c_D kln(c_g/c)}$$

Lösung der nichtlinearen Differentialgleichung des Permeatfluss ergibt die optimale Konzentration für den Diafiltrationsprozess

$$c_D = \frac{c_g}{\mathrm{e}}$$

bei Minimierung des Membranflächen- Zeitbedarfs.

Ablauf Gesamtprozess

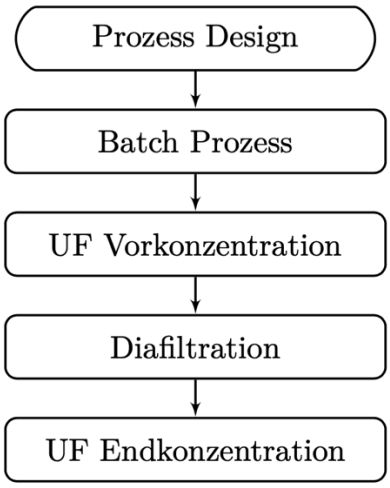


Abbildung 9: Blockbild Prozessablauf

TVH 3.III Untersuchungen zur Prozessführung der Pilotanlage

1. Prozessdaten Standard-Ultrafiltration

   - Start: Volumen Proteinlösung V_0 = 4.000 L
   - Start: Konzentration Proteinlösung c_0 = 5 %
   - Aufkonzentrierungsfaktor X = 5
   - Ende: Volumen Retentat V_R = 800 L
   - Ende: Konzentration Proteinlösung c_F
   - Ende: Prozesszeit Ultrafiltration 1,5 h
   - Ende: Flux bzw. Permeatleistung $J(t) = \frac{3.200}{120 * 1,5} = 18 \frac{l}{m^2 h}$

2. Diafiltration

   - Diafiltrationsfaktor: VCF = 5
   - Start: Diafiltrationsvolumen V_R * DF = 4.000 L
   - Ende: Diafiltration: Prozesszeit $t = \frac{V_D}{J(t) * A} = 1,8h$

TVH 3.IV Scale-Up Untersuchungen für den Membranprozess und Wirtschaftlichkeit

Die Diafiltration erfordert demnach eine zusätzliche Prozesszeit von **1,8 h**. Um den Prozess wirtschaftlich zu betreiben, muss die Permeatleistung entsprechend erhöht werden. Hier kann modular die notwendige Membran- bzw. Filtrationsfläche erweitert werden.

Beim Scale-up auf eine in der Praxis übliche Batchgröße von 4.000 L Proteinlösung (aus 5.000 L Rohsuspension Lupinenflocken : Wasser von 1 : 10) hat sich die Prozessstufe $_{UF1}$ Vor-Konzentrierung nachteilig auf nachfolgende Prozessstufe Diafiltration ausgewirkt. Die Abtrennung der Chinolizidinalkaloide wird durch die erhöhte Proteinkonzentration behindert. Bei gleicher Zahl an Waschstufen bzw. gleichem Diafiltrationsvolumen werden die Chinolizidinalkaloide nicht ausreichend reduziert. Der Diafiltrationsprozess muss mit der verdünnten 4.000 L Proteinlösung durchgeführt werden. Am Ende der Diafiltration muss dann die vollständige 5fache Aufkonzentrierung der Proteinlösung erfolgen.

AP 4 Proteincharakterisierung und Prüfung in Lebensmitteln

TVH 4.I Charakterisierung der Lupinensamen

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Lupinensamen-Charakterisierung der von ESKUSA bereitgestellten Lupinensamen aus den Erntejahren 2017 bis 2021 dargestellt.

2020 wurden 86 Saatgutmuster (ausgereifte Samen und grüne Körner) der Blauen Lupine von ESKUSA aus den Erntejahren 2017, 2018, 2019 und 2020 an das DIL zur Analyse gesendet. Diese Samen wurden auf Protein-, Fett- und Wassergehalt untersucht, um Akzessionen zu finden, die einen hohen Proteingehalt aufweisen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Auswahl von Analyseergebnissen von Lupinensamen von Eskusa aus verschiedenen Erntejahren. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Samen) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Nr	Ernte-jahr	Sorte/Akz.	F-nr.	Besonderheiten	Wasser [%]	Roh-protein [%]	Fett [%]	Roh-protein [% TS]	Fett [% TS]
56	2017	Boregine			8,69	21,50	8,12	23,55	8,89
57	2017	Boruta			8,52	28,60	7,36	31,26	8,05
58	2018	48	7.2	Miniparzelle	8,60	20,80	8,66	22,76	9,47
59	2018	50	3.1	Miniparzelle	8,12	18,60	8,38	20,24	9,12
60	2018	50	3.3	Miniparzelle	8,64	21,40	7,54	23,42	8,25
61	2018	81	1	Miniparzelle	8,72	23,70	7,28	25,96	7,98
62	2018	81	7.2	Miniparzelle	8,59	20,10	7,36	21,99	8,05
63	2020	19		gesiebt	8,80	28,10	7,44	30,81	8,16
64	2020	37		gesiebt	8,73	30,70	7,39	33,64	8,10
65	2020	28		gesiebt	8,77	26,90	7,17	29,49	7,86

66	2020	47		gesiebt	8,60	31,50	6,91	34,46	7,56
67	2020	49		gesiebt	8,93	30,80	6,63	33,82	7,28
68	2020	55		gesiebt	8,57	27,80	7,40	30,41	8,09
69	2020	58		gesiebt	8,40	28,50	7,38	31,11	8,06
70	2020	LUPIZAV 4		gesiebt	8,73	29,40	7,42	32,21	8,13
71	2020	19		grüne Körner	8,75	31,80	7,55	34,85	8,27
72	2020	37		grüne Körner	8,58	32,10	7,63	35,11	8,35
73	2020	28		grüne Körner	8,47	26,70	7,75	29,17	8,47
74	2020	47		grüne Körner	8,72	31,50	7,72	34,51	8,46
75	2020	49		grüne Körner	8,92	32,50	7,73	35,68	8,49
76	2020	55		grüne Körner	8,57	29,90	8,38	32,70	9,17
77	2020	58		grüne Körner	8,72	32,00	7,46	35,06	8,17
78	2020	LUPIZAV 4		grüne Körner	8,73	31,70	8,91	34,73	9,76

Weiterhin wurden ausgereifte Lupinensamen mit grünen, unreifen Lupinenkörnern hinsichtlich ihres Nährwertes verglichen. Auffällig war, dass die grünen Lupinenkörner in der Regel einen höheren Protein- und Fettgehalt bezogen auf die Trockensubstanz aufwiesen, als die ausgereiften Lupinensamen der gleichen Akzession. Die Analysenergebnisse dienten ESKUSA zur Auswahl der neuen Vermehrungen für das Jahr 2021.

Auch aus dem Erntejahr 2019 wurden eine Reihe von Lupinen Akzessionen zur Protein- und Fettcharakterisierung an das DIL geschickt. Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, zeichneten sich vor allem die Akzessionen 80, 57, 81 und 64 durch hohe Proteingehalte von > 30 % TS aus. Die Trockensubstanz liegt im Mittel bei 90,71 %.

Tabelle 13: Analyseergebnisse 2019 zur Charakterisierung von Lupinensaatgut unterschiedlicher Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Samen) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trockensubstanz [%]**	**Wasser [%]**	**Rohprotein [%]**	**Fett [%]**	**Rohprotein [% TS]**	**Fett [% TS]**
Saatgut Akz. 4	91,84	8,16	22,4	7,74	24,39	8,43
Saatgut Akz. 54, mittel	90,67	9,33	24,8	7,66	27,35	8,45
Saatgut Akz. 54, groß	90,11	9,89	25	7,34	27,74	8,15
Saatgut Akz. 57	90,37	9,63	29,2	7,09	32,31	7,85
Saatgut Akz. 64	90,64	9,36	27,5	8,56	30,34	9,44
Saatgut Akz. 66	90,54	9,46	25,5	8,91	28,16	9,84
Saatgut Akz. 80	90,84	9,16	29,6	6,86	32,58	7,55
Saatgut Akz. 81	90,69	9,31	28,3	6,98	31,21	7,70

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Protein- und Fettanalyse der aus dem Jahr 2021 von ESKUSA geernteten Lupinensamen dargestellt. Die Trockensubstanz der Lupinensaaten liegt im Mittel bei 89,57 % und der Wassergehalt bei 11,76 %. Den höchsten Rohproteingehalt bezogen auf die TS weisen die Samen der Charge 57 mit 32,24 % TS auf, gefolgt von Charge 26

mit 31,85 % TS und Charge 80 mit 31,44 % TS. Den niedrigsten Rohproteingehalt besitzt die Charge 66 mit 24,12 % TS. Der Fettgehalt der Samen liegt zwischen 6,02 % TS für Charge 66 und 8,63 % TS für Charge 46.

Die in Tabelle 12 aufgeführten Lupinensamen wurden außerdem im Rahmen von AP 1 vom Projektpartner Lupino AG als Rohstoffe für die Versuche zur Auswahl geeigneter Membranen für die Pilotfilteranlage verwendet. Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Reststoffanalysen der Lupinenflakes, -extrakten und -fasern dieser Akzessionen dargestellt.

Tabelle 14: Analyseergebnisse 2021 zur Charakterisierung von Lupinensaatgut unterschiedlicher Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Samen) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	Ernte-datum	Trockensubstanz [%]	Wasser [%]	Rohprotein [%]	Fett [%]	Rohprotein [% TS]	Fett [% TS]
Saatgut Akz. 57	2021	88,10	11,90	28,40	5,51	32,24	6,25
Saatgut Akz. 80	2021	88,10	11,90	27,70	5,38	31,44	6,11
Saatgut Akz. 03	2021	89,35	10,65	25,65	5,50	28,71	6,16
Saatgut Akz. 18	2021	89,35	10,65	26,80	5,60	29,99	6,27
Saatgut Akz. 23	2021	88,90	11,10	24,00	5,90	27,00	6,64
Saatgut Akz. 30	2021	92,65	7,38	26,70	6,39	28,82	6,90
Saatgut Akz. 46	2021	91,40	8,60	24,25	7,89	26,53	8,63
Saatgut Akz. 66	2021	88,50	11,50	21,35	7,61	24,12	8,60
Saatgut Akz. 26	2021	89,80	11,20	28,60	5,41	31,85	6,02

TVH 4.II Charakterisierung der Proteine und Reststoffe

Im Jahr 2020 wurden bei Lupino verschiedene Versuche zur Auswahl der geeigneten Membran durchgeführt. Unterstützend zu diesen Versuchen erfolgten am DIL im Rahmen von TVH 4.II Analysen verschiedener Lupinenextrakte, -fasern und -flakes hinsichtlich ihrer Nährstoffzusammensetzungen. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen 4 bis 10 dargestellt.

Die untersuchten Lupinenflakes der Akzessionen aus dem Erntejahr 2021 (vgl. Tabelle 14) unterschieden sich hinsichtlich ihrer Nährwertzusammensetzung, wie in Tabelle 15 ersichtlich wird. Die Lupinenflakes der Chargen 57 und 80 zeichneten sich durch einen hohen Proteingehalt von 39,77 % TS bzw. 38,69 % TS und einem vergleichsweise niedrigem Kohlenhydratgehalt von 46,78 % TS bzw. 47,17 % TS aus. Charge 54 (groß) wies hingegen einen niedrigeren Proteingehalt von 29,86 % TS und einen höheren Kohlenhydratgehalt von 56,67 % TS auf. Der Fettgehalt lag bei allen untersuchten Chargen bei ca. 9,2 bis 11,3 % TS.

Tabelle 15: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenflakes verschiedener Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Lupinenflakes) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Wassergehalt [%]**	**Protein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlenhydrate [%]**	**Asche [%]**	**Protein [% TS]**	**Fett [% TS]**
LupiZAV 4	11,7	29,1	8,63	46,9	3,72	32,96	9,77
54, groß	11,6	26,4	8,1	50,1	3,83	29,86	9,16
54, mittel	11,6	27,5	9,11	47,9	3,87	31,11	10,31
57	11,5	35,2	8,22	41,4	3,67	39,77	9,29
64	11,7	32,2	10	42,6	3,53	36,47	11,33
80	11,6	34,2	8,82	41,7	3,66	38,69	9,98
60	11,6	28,6	10	46,2	3,57	32,35	11,31
81	11,7	29,3	8,36	46,8	3,84	33,18	9,47

Aus den Lupinenakzessionen aus Tabelle 14 wurden in den Vorversuchen von Lupino ebenfalls Lupinenextrakte und -fasern gewonnen. In Tabelle 16 sind die Analyseergebnisse der Lupinenextrakte aufgelistet. Ziel war es dabei durch den Diafiltrationsprozess zum einen die Abtrennung der Chinolizidinalkaloide zu erzielen und zum anderen einen möglichst hohen Proteingehalt im Extrakt von mind. 70 g/100g TS zu erhalten.

Der Lupinenextrakt der Charge 80 wies mit 71,82 % TS den höchsten Rohproteingehalt gefolgt von Charge 57 mit 69,79 % TS auf. Den geringsten Rohproteingehalt wies der Extrakt der Charge 54 (mittel) mit 58,37 % TS auf. Der Fettgehalt bezogen auf die TS lag bei allen untersuchten Extrakten bei ca. 12-13 % TS. Mit 26,09 % TS wies die Charge LupiZAV4 mit Abstand den höchsten Fettgehalt auf. Die untersuchten Lupinenflakes der Charge LupiZAV4 zeigten hingegen keinen deutlich erhöhten Fettgehalt bezogen auf die TS (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 16: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakt (nach Dekanter) verschiedener Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Lupinenextrakt) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trocken-substanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Roh-protein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlen-hydrate [%]**	**Ballast-stoffe gesamt [%]**	**Roh-protein [% TS]**	**Fett [% TS]**
LupiZAV 4	2,3	97,7	0,21	1,43	0,60	<1	<0,5	62,17	26,09
54, groß	4,0	96,0	0,32	2,59	0,50	<1	<0,5	64,75	12,50
54, mittel	4,3	95,7	0,36	2,51	0,56	<1	<0,5	58,37	13,02
57	4,8	95,2	0,36	3,35	0,63	<1	<0,5	69,79	13,13
64	4,3	95,7	0,37	2,77	0,51	<1	<0,5	64,42	11,86
80	4,4	95,6	0,34	3,16	0,53	<1	<0,5	71,82	12,05
81	4,8	95,2	0,38	2,89	0,63	<1	<0,5	60,21	13,13

Die Nährwertanalyse der Lupinenfasern (Tabelle 17) zeigte Unterschiede im Fettgehalt zwischen den untersuchten Chargen. Dieser schwankte zwischen 6,35 % TS bei Charge 54 (groß) und 11,39 % TS bei Charge 80. Auch der Proteingehalt lag bei Charge 54 (groß) mit 9,66 % am niedrigsten. Den höchsten Proteingehalt wies hingegen die Charge 57 mit 12,63 % TS auf.

Die Nährwertanalysen der Lupinenflakes, - fasern und -extrakten zeigten einige Unterschiede verschiedenen Chargen. Besonders vorteilhaft hinsichtlich eines hohen Rohproteingehaltes bezogen auf die TS waren die Flakes, Faser und Extrakte der Chargen 57 und 80.

Tabelle 17: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenfasern verschiedener Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Lupinenfasern) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trocken-substanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Roh-protein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlen-hydrate [%]**	**Ballast-stoffe gesamt [%]**	**Roh-protein [% TS]**	**Fett [% TS]**
54, groß	20,3	79,7	0,6	1,96	1,29	<1	17,2	9,66	6,35
54, mittel	19,4	80,4	0,55	2,2	2,18	<1	16,5	11,34	11,24
57	19	81	0,69	2,4	2,11	<1	15,1	12,63	11,11
64	19,7	80,3	0,55	2,02	1,65	<1	16,4	10,25	8,38
80	20,1	79,9	0,58	2,31	2,29	<1	16,7	11,49	11,39
81	20,1	79,9	0,54	2,09	1,37	<1	16,4	10,40	6,82

Auf Grundlage der Auswahl geeigneter Membranen zur Trennung der wurden bei Lupino im Jahr 2021 das Arbeitspaket 3 „Durchführung und Trennung mittels Membranen“ durchgeführt. Im Rahmen der Ermittlung wesentlicher Einflussparameter auf das Trennverhalten (TVH 3.I) sowie der Inbetriebnahme der Pilotanlage (TVH 3.II) wurden eine Reihe von Lupinenextrakten, -flakes und -fasern an das DIL zur Analyse der Reststoffe geschickt (TVH 4.II). Dabei soll der Einfluss der Membranfilterung sowie verschiedene Filtrationsstufen auf die Nährstoffzusammensetzung ermittelt werden. Erstrebenswert ist dabei ein möglichst geringer Verlust an Protein- und Fettgehalt in den Lupinenextrakten.

Wie in

Tabelle 18 zu sehen ist, wurde von den Chargen 60, 54 groß, 80 und 81 sowohl der Extrakt aus dem Dekanter sowie der 6-fach diafiltrierte Extrakt auf seine Nährstoffzusammensetzung charakterisiert. Die reinen Extrakte wiesen dabei einen Rohproteingehalt von 55,12 % TS für Charge 60 bis 69,39 % TS für Charge 80 auf. Der Proteingehalt der 6-fach diafiltrierten Extrakte lag zwischen 74,62 % TS für Charge 54 groß und 82,62 % TS für Charge 80. Von den Chargen 54 mittel, 57 mittel und 64 mittel wurde die Reststoffanalyse lediglich für die 6-fach diafiltrierten Extrakte durchgeführt. Den geringsten Rohproteingehalt aller 6-fach diafiltrierten Extrakte wies die Charge 54 mittel mit 62,69 % TS und den höchsten der der Charge 80 mit 82,61 % TS auf.

Der Fettgehalt bezogen auf die TS lag bei den 6-fach diafiltrierten Extrakten zwischen 8,80 % TS für Charge 80 und 16,67 % TS für Charge 60. bei ca. 12-13 % TS. Die reinen Extrakte wiesen Fettgehalte von rund 13,86 % TS auf.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Charge 80 besonders geeignet ist, da der Proteingehalt nach der 6-fachen Diafiltration bei über 80 % liegt.

Tabelle 18: Analyseergebnisse 2021 der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakt (nach Dekanter), -extrakt 6-fach diafiltriert verschiedener Akzessionen (2021). Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Proteinfraktion) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	Wasser-gehalt [%]	Protein [%]	Fett [g/100g]	Kohlen-hydrate [%]	Asche [%]	Roh-protein [% TS]	Fett [% TS]
Akz. 54, mittel 6-fach Diafiltration	92,2	4,89	1,12	<1	0,36	62,69	14,36
Akz. 54, mittel 6-fach Diafiltration, verdünnt	98,8	0,66	<0,5	<1	0,42	55,00	-
Akz. 57, mittel 6-fach Diafiltration	92,4	5,91	1,00	<1	0,42	77,76	13,16
Akz. 64, mittel 6-fach Diafiltration	90,7	5,84	1,50	<1	0,56	62,80	11,81
Akz. 60, Extrakt Dekanter	95,7	2,37	0,51	<1	0,29	55,12	11,86
Akz. 54, groß, Extrakt Dekanter	96,8	1,81	<0,5	<1	0,24	56,56	<15,62
Akz. 80, Extrakt Dekanter	96,7	2,29	<0,5	<1	0,27	69,39	<15,15
Akz. 81, Extrakt Dekanter	96,1	2,44	<0,5	<1	0,30	62,56	<12,82
Akz. 60, Extrakt, konz. / 6-fach Diafiltration	93,4	5,14	1,10	<1	0,37	77,88	16,67
Akz. 54, groß, Extrakt, konz. / 6-fach Diafiltration	90,9	6,79	1,30	<1	0,46	74,62	14,29
Akz. 80, Extrakt, konz. / 6-fach Diafiltration	90,8	7,60	0,81	<1	0,48	82,61	8,80
Akz. 81, Extrakt, konz. / 6-fach Diafiltration	91,3	6,60	1,30	<1	4,94	75,86	14,94

Im Jahr 2022 wurden beim Projektpartner Lupino weitere Versuche zur Optimierung des Filtrationsprozesses mit der Akzession 57 durchgeführt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Rohprotein- und Fettanalyse des Extraktes (diafiltriert und aus dem Dekanter) sowie der Lupinenfasern dargestellt. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus

Tabelle 18 zeigt sich, dass sich für die Charge 57 ein deutlich höherer Proteingehalt von 86,47 % TS erzielen ließ. Der Proteingehalt des Extraktes aus dem Dekanter hingegen war mit 68,86 % TS vergleichbar zu dem der Charge 80 aus. Mit 17,61 % TS lag der Proteingehalt der Fasern von Akzession 57 deutlich höher als der der untersuchten Akzessionen aus Tabelle 17. Hier wurde der höchste Proteingehalt für Charge 64 mit 12,63 % TS verzeichnet.

Außerdem wurden die Lupinenflakes verschiedener Akzessionen analysiert. Einen besonders hohen Proteingehalt lieferte hier die Charge 80 mit 41,98 % TS.

Tabelle 19: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakt der Akzession 57 (2022). Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Proteinfraktion) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trockensubstanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Rohprotein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlenhydrate [%]**	**Ballaststoffe gesamt [%]**	**Rohprotein [% TS]**	**Fett [% TS]**
Lupinenextrakt - Charge 57, Dialfiltration	13,3	86,7	0,61	11,5	1,8	< 1,0	< 0,5	86,47	13,53
Lupinenextrakt - Charge 57, Dekanter	4,4	95,6	0,34	3,03	0,47	< 1,0	< 0,5	68,86	10,68
Lupinenfaser - Charge 57	21,8	78.6	0,61	3,84	1,24	< 1,0	15,6	17,61	5,69

Tabelle 20: Analyseergebnisse der Nährwertzusammensetzung von Lupinenflakes verschiedener Akzessionen (2022). Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Lupinenflakes) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trockensubstanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Rohprotein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlenhydrate [%]**	**Ballaststoffe gesamt [%]**	**Rohprotein [% TS]**	**Fett [% TS]**
Lupinenflakes Charge 57	87,6	12,4	3,45	36,2	6,79	12,0	29,2	41,32	7,75
Lupinenflakes Charge 80	87,9	12,1	3,42	36,9	6,76	11,7	29,1	41,98	7,69
Lupinenflakes Charge 3-1	88,0	12,0	3,94	34,5	7,07	10,6	31,9	39,20	8,03
Lupinenflakes Charge 18-1	88,2	11,8	3,70	35,3	7,09	10,6	31,5	40,02	8,04
Lupinenflakes Charge 23-1	87,3	12,7	3,99	30,3	7,21	8,30	37,5	34,71	8,26
Lupinenflakes Charge 26-1	88,8	11,2	3,83	36,6	6,78	9,09	32,5	41,22	7,64
Lupinenflakes Charge 46	88,5	11,5	3,75	27,2	9,64	8,71	39,2	30,73	10,89

Im Jahr 2022 wurden bei Lupino weitere Versuche zur Membranfilterung durchgeführt. Diesmal wurden die Proben einer 4-fachen Diafiltration unterzogen, um zu sehen welchen Einfluss eine geringe Anzahl an Filtrationsstufen auf den Chinolizidinalkaloid- sowie Protein- und Fettgehalt hat.

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Nährwertanalyse von Lupinenfasern, -extrakten aus dem Dekanter und -extrakten nach 4-facher Diafiltration unterschiedlicher Akzessionen dargestellt. Da die Akzession 80 bereits in vorangegangen Analysen einen hohen Proteingehalt seines Extraktes sowie der Samen selbst, der Fasern und der Flakes aufwies, wurde diese erneut in den Versuchen genutzt. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Tabelle 18 wird deutlich, dass die Lupinenextrakte nach 4-facher Diafiltration einen deutlich höheren Proteingehalt aufweisen als nach 6-facher Filtration. Der Proteingehalt der Charge 80 lag nach 4-facher Filtration bei 92,09 % TS und nach 6-facher bei lediglich 82,61 % TS. Den höchsten Proteingehalt wies der 4-fach diafiltrierte Extrakt der Akzession 26 mit 94,44 % TS auf.

Ebenso wie der Proteingehalt steigt auch der Fettgehalt im Extrakt bei geringeren Filtrationsstufen. Für Akzession 80 lag der Fettgehalt bei 6-facher Diafiltration bei 8,80 % TS und bei 4-facher bei 13,31 % TS.

Anfang des Jahres 2023 wurden weitere Versuche bei Lupino durchgeführt. Im Hinblick auf eine positive Nährwertzusammensetzung sowie gute Verarbeitbarkeit während des Filtrationsprozesses wurden die Akzessionen 80, 26 und 57 weiter betrachtet. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Nährwertanalyse von Lupinenfasern, -flakes, von dem Extrakt aus dem Dekanter sowie dem aufkonzentrierten Extrakt aufgeführt. Für die aufkonzentrierten Extrakte konnten Rohproteingehalte von 80,37 % TS für Akzession 57, 85,96 % TS für Akzession 80 und 87,34 % TS für Akzession 26 bestimmt werden. Der Fettgehalt lag dabei zwischen ca. 11,9 und 13,0 % TS.

Gefördert durch
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages
Projektträger
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Tabelle 21: Analyseergebnisse 2022 der Nährwertzusammensetzung
von Lupinenfasern, -extrakt (nach Dekanter), -extrakt 4-fach diafiltriert verschiedener Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trockensubstanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Rohprotein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlenhydrate [%]**	**Ballaststoffe gesamt [%]**	**Rohprotein [% TS]**	**Fett [% TS]**
Akz. 80 - Lupinenfaser	18,90	81,10	0,55	4,41	1,26	<1	13,40	23,33	6,67
Akz. 26 - Lupinenfaser	18,80	81,20	0,62	3,44	1,43	<1	13,00	18,30	7,61
Akz. 3 - Lupinenfaser	15,10	84,90	0,62	2,94	1,32	1,10	9,10	19,47	8,74
Akz. 18 - Lupinenfaser	17,90	82,10	0,58	3,25	1,31	1,70	11,10	18,16	7,32
Akz. 23 - Lupinenfaser	19,00	81,00	0,63	2,86	1,43	1,80	12,30	15,05	7,53
Akz. 46 - Lupinenfaser	16,80	83,20	0,51	2,19	1,32	3,00	9,80	13,04	7,86
Akz. 80 - Lupinenextrakt Dekanter	5,20	94,80	0,41	3,33	0,42	<1	<0,5	64,04	8,08
Akz. 26 - Lupinenextrakt Dekanter	4,30	95,70	0,35	2,89	0,45	<1	<0,5	67,21	10,47
Akz. 3 - Lupinenextrakt Dekanter	4,00	96,00	0,30	2,63	0,34	<1	<0,5	65,75	8,50
Akz. 18 - Lupinenextrakt Dekanter	4,20	95,80	0,28	2,70	0,36	<1	<0,5	64,29	8,57
Akz. 23 - Lupinenextrakt Dekanter	4,20	95,80	0,34	2,40	0,41	<1	<0,5	57,14	9,76
Akz. 46 - Lupinenextrakt Dekanter	4,00	96,00	0,31	2,09	0,52	<1	<0,5	52,25	13,00
Akz. 80 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	13,90	86,10	0,74	12,80	1,85	<1	0,70	92,09	13,31
Akz. 26 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	5,40	94,60	0,32	5,10	0,71	<1	<0,5	94,44	13,15
Akz. 3 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	6,70	93,30	0,36	5,96	0,95	<1	<0,5	88,96	14,18
Akz. 18 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	6,50	93,50	0,35	5,22	1,02	<1	<0,5	80,31	15,69
Akz. 23 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	4,00	96,00	0,23	2,47	0,55	<1	<0,5	61,75	13,75
Akz. 46 - Lupinenextrakt 4-fach Diafiltration	6,50	93,50	0,37	4,54	1,51	<1	<0,5	5,69	69,85

Tabelle 22: Analyseergebnisse 2023 der Nährwertzusammensetzung von Lupinenextrakte, -flakes und -fasern verschiedener Akzessionen. Ergebnisse sind dargestellt als [%] = (g/100g Lupinenflakes) bzw. als [%TS] = (g/100g Trockensubstanz).

Charge	**Trockensubstanz [%]**	**Wasser [%]**	**Asche [%]**	**Rohprotein [%]**	**Fett [%]**	**Kohlenhydrate [%]**	**Ballast-stoffe gesamt [%]**	**Asche [% TS]**	**Rohprotein [% TS]**	**Fett [% TS]**	**Ballast-stoffe gesamt [% TS]**
Akz. 80 Lupinenextrakt Dekanter	5,70	94,30	0,36	3,20	0,40	1,70	< 0,5	6,32	56,14	7,02	-
Akz. 57 Lupinenextrakt Dekanter	5,80	94,20	0,38	3,49	0,51	< 1	0,50	6,55	60,17	8,79	8,62
Akz. 26 Lupinenextrakt Dekanter	4,70	95,30	0,31	2,88	0,33	< 1	< 0,5	6,60	61,28	7,02	-
Akz. 80 Lupinenextrakt, konz.	17,10	82,90	0,63	14,7	2,04	< 1	< 0,5	3,68	85,96	11,93	-
Akz. 57 Lupinenextrakt, konz.	16,30	83,70	0,65	13,1	2,12	< 1	0,50	3,99	80,37	13,01	3,07
Akz. 26 Lupinenextrakt, konz.	15,80	84,20	0,31	13,8	1,89	< 1	< 05	1,96	87,34	11,96	-
Akz. 80 Lupinenfaser	22,20	77,80	0,68	4,45	1,86	1,6	13,60	3,06	20,05	8,38	61,26
Akz. 57 Lupinenfaser	22,90	77,10	0,66	4,18	1,67	< 1	15,70	2,88	18,25	7,29	68,56
Akz. 26 Lupinenfaser	22,10	77,90	0,65	4,62	2,17	1,7	13,00	2,94	20,90	9,82	58,82
Akz. 80 Lupinenflakes	91,20	8,85	3,65	35,7	7,05	15,6	29,20	4,00	39,14	7,73	32,02
Akz. 57 Lupinenflakes	90,30	9,74	3,49	34,7	6,87	12,8	32,40	3,86	38,43	7,61	35,88
Akz. 26 Lupinenflakes	90,80	9,17	3,27	37,0	7,60	14,7	28,30	3,60	40,75	8,37	31,17

TVH 4.III Applikation der Proteine in Lebensmittelmatrizes

Im 3. Projektjahr wurden erste Versuche zur Applikation der Lupinenextrakte in Lebensmittelmatrizes durchgeführt. Dabei wurde der diafiltrierte Lupinenextrakt von Lupino an das DIL geschickt. Da es sich um die ersten Vortests zur Produktentwicklung handelte, wurde zunächst keine Differenzierung in den Lupinen Akzessionen vorgenommen. Ziel war es die generelle Funktionalität des Extraktes in seiner Anwendung in verschiedenen Lebensmittelmatrizes zu testen.

Abbildung 10 zeigt die Herstellung eines Frischkäse-Produktes. Dazu wurde zunächst eine Frischkäse-Grundmasse hergestellt, indem das Extrakt auf 80 °C erhitzt und anschließend auf 35 °C abgekühlt wurde. Durch die Zugabe von Citronensäure wurde der pH-Wert der Masse unter kontinuierlichem Rühren auf 5 eingestellt, sodass eine Ausfällung stattfinden konnte. Zur Abtrennung der Flüssigkeit wurde die Masse auf ein Käsenetz gegeben und bis zum Erreichen der gewünschten Festigkeit stehen gelassen. Aufgrund seiner cremigen Konsistenz, eignete sich die Frischkäse-Grundmasse sehr gut als Basis für verschiedene Frischkäse Sorten. Allerdings erweist sich der typische Leguminosen-artige Geschmack als sehr prägnant und lässt sich nur schwer durch die Zugabe anderer Zutaten überdecken.

Abbildung 10: Herstellung eines Frischkäse-Produktes aus Lupinenextrakt.

Abbildung 11 zeigt weitere Anwendungsbeispiele für das Lupinenextrakt, wie Joghurt, Mousse oder Salatdressing. Auch hier konnte eine entsprechend gute Konsistenz erzielt werden. Es hat sich also gezeigt, dass das Extrakt eine gute Funktionalität in der Anwendung von alternativen Milchprodukten besitzt.

Abbildung 11: Joghurt, Mousse und Salatdressing
auf Basis von Lupinenextrakt.

Zudem war es möglich das Extrakt in der High-Moisture-Extrusion komplett gegen den Anteil an Wasser auszutauschen. Dieser betrug ca. 50 %, was bedeutet, dass 50 % Lupinenextrakt in flüssiger Form in einem Fleischanalog verarbeitet werden konnten. Die übrigen 50 % des Extrudates bestanden aus Sojaproteinisolat als Feststoff. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Extrusions Vortests dargestellt. Im Vergleich zur Referenz bestehend aus 100 % Sojaproteinisolat, weisen auch die Extrudate mit 25 und 50 % Lupinenextrakt eine ausgeprägte Faser-Struktur auf. Da das diafiltrierte Extrakt allerdings nur einen geringen TS-Gehalt besitzt, liegt der tatsächliche Lupinenprotein-Gehalt im Extrudat bei ca. 3 %. In den nächsten Versuchen wird Lupino versuchen, den TS-Gehalt des Extraktes zu erhöhen.

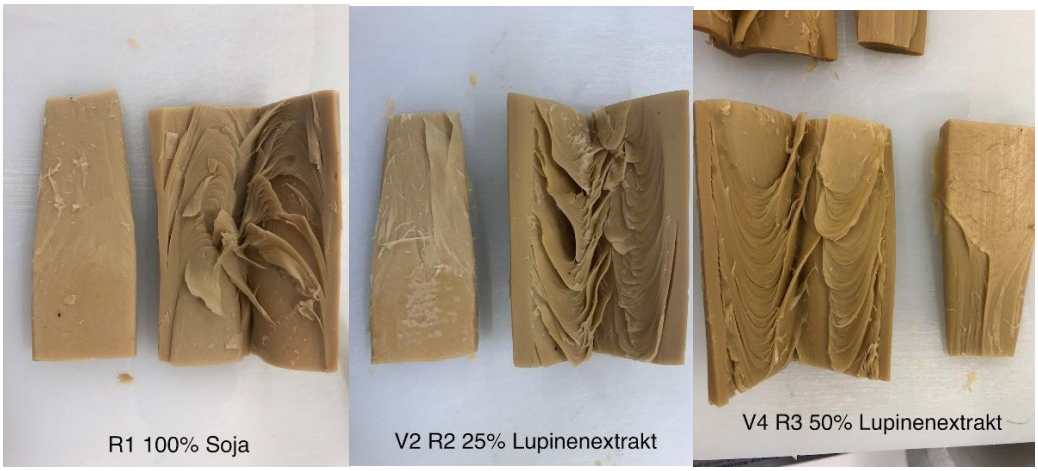


Abbildung 12: High-Moisture-Extrudate
bestehend aus 100 % Sojaproteinisolat und Mischungen aus Sojaproteinisolat und mit Lupinenextrakt (25 und 50%). Alle Proben besitzen einen Wasseranteil von ca. 50 %.

Auf Basis der Vortests wurde zudem festgestellt, dass die Verarbeitung des Lupinenextraktes einer speziellen Schneckenkonfiguration bedarf, die einen erhöhten Energieeitrag zur Strukturierung des enthaltenen Lupinenproteins unterstützt. Das es aufgrund von vermehrten Mitarbeiterausfälle durch Corona und durch verzögerte Materialbereitstellung durch den Projektpartner Lupino zu einer verspäteten Durchführung der Vortests kam, konnten die geeigneten Schneckenelemente erst kurz vor Projektende angeschafft werden. Dennoch

wurden im letzten Projektmonat wie geplant weitere High-Moisture-Extrusions-Versuche durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend in einer dreistufigen Sensorik verkostet und bewertet. In Tabelle 23 ist der Versuchsplan mit den Rezepturen dargestellt. Als Proteinbasis wurde Erbsenprotein eingesetzt. Das Lupinenextrakt wurde je zu 24,5 %, 50 % und 60 % zugegeben. Dabei wurden die Extrakte der Akzessionen 57, 26 und 80 ausgewählt, da sie vielversprechende Protein- und Fettgehalte aufwiesen. Außerdem wurde eine Probe mit Sojaprotein anstelle von Erbsenprotein hergestellt, um den Einfluss des Basisproteins zu ermitteln. Es wurden drei Sensorik-Runden mit je 16 Teilnehmern durchgeführt. Jeder Teilnehmer hat an allen drei Sensorik-Runden teilgenommen. In Sensorik 1 wurde der Unterschied zwischen den verschiedenen Akzessionen bei einem Lupinenextrakt-Gehalt von 24,5, % untersucht. Bei Sensorik 2 wurden der Einfluss einer zunehmenden Lupinenextrakt-Konzentration bei gleicher Akzession in der Probe ermittelt. In der 3. Sensorik-Runde wurde der Unterschied zwischen den verschiedenen Akzessionen bei einem Lupinenextrakt-Gehalt von 60 % untersucht. Bei jeder Runde wurde die Referenz ohne Lupinenextrakt mit verkostet.

Tabelle 23: Rezepturzusammensetzungen und Sensorikplan

	Probenbezeichnung (sample coding)										
Inhaltsstoffe (%)	**V1**	**V2**	**V3**	**V4**	**V5**	**V6**	**7**	**V8**	**V9**	**V10**	**V11**
Sojaproteinisolat											43,5
Erbsenproteinisolat	50	43,5	40	50	43,5	40	50	50	40	43,5	
Lupinenextrakt (Akz. 57)		24,5	60	50							
Lupinenextrakt (Akz. 26)					24,5	60	50				
Lupinenextrakt (Akz. 80)								50	60	24,5	24,5
Wasser	50	33			33					33	33
Sensorik Codes	**453**	**625**			**798**					**333**	**922**
Sensorik 1	x	x			x					x	x
Sensorik Codes	**230**	**901**	**544**	**143**							
Sensorik 2	x	x	x	x							
Sensorik Codes	**129**		**860**			**560**			**371**		
Sensorik 3	x		x			x			x		

Abbildung 13 zeigt Fotos von der Faserstruktur der unterschiedlichen HME Extrudate (V1-V11). Als Vergleich wird die Referenz ohne Lupinenextrakt (V1) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Faserstruktur bei einer Zugabe von 24,5 % Lupinenextrakt aller drei Akzessionen der Struktur der Referenz am meisten ähnelt. Die Probe mit Akzession 57 weist dabei die geringsten Unterschiede auf und zeichnet sich durch eine sehr gleichmäßige und ausgeprägte Strukturierung aus. Bei einer Zugabe von 50 und 60 % Lupinenextrakt ist für alle Akzessionen ein verkürztes Fließprofil und damit Faserstrukturen mit geringerem Beugungswinkel erkennbar. Zudem zeichneten sich diese Proben durch eine erhöhte Festigkeit aus und es war schwierig sie auseinander zu reißen.

Abbildung 13: Faserstruktur der verschiedenen HME Versuche (Zuordnung nach Tabelle 23).

Für die sensorische Beurteilung wurde ein hedonisches Testverfahren angewendet, bei dem die Merkmale Farbe (hell – dunkel), Festigkeit (weich – hart), Saftigkeit (trocken – saftig),

Bitterkeit (gering – intensiv) und Geschmack nach Lupine (gering – intensiv) auf einer Skala von 1 bis 10 bewertet wurden (1= hell, weich, trocken, gering; 10 = dunkel, hart, saftig, intensiv). Abbildung 14 zeigt die gefragten Attribute und die zugehörige Skala. Der Test erfolgte in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB); Untersuchung von Lebensmitteln, sensorische Prüfverfahren, Bewertende Prüfung mit Skale L 00.90.5 (DIN 10952).

Abbildung 14: Sensorik-Bewertungsbogen

In der ersten Sensorikrunde wurden 5 Proben mit je 24,5 % Lupinenextrakt der Akzessionen 57, 26 und 80 verkostet. Als Basis Protein wurde Erbsenproteinisolat der Firma Roquette eingesetzt. Zum Vergleich enthielt eine Probe mit 24,5 % Akz. 80 Sojaproteinisolat als Basis. Da die Sensorikattribute „Bitterkeit“ und „Geschmack nach Lupine“ von größter Bedeutung sind im Hinblick auf die technologische Abtrennung der Chinolizidinalkaloide, wird im Folgenden lediglich auf die Beschreibung und den Vergleich dieser Attribute näher eingegangen.

Wie aus in Abbildung 15 zu erkennen ist, wurde die Intensität der Bitterkeit sowie der Geschmack nach Lupine für die Proben mit 24,5 % der Akzession 80 am höchsten bewertet. Die Probe, die anstelle von Erbsenprotein Sojaprotein beinhaltete, wies sogar eine noch stärkere Bitterkeit und Geschmack nach Lupine auf. Die Referenz ohne Lupinenextrakt sowie die Probe mit Akzession 26 wurden mit einer eher geringen Bitterkeit und Geschmack nach Lupine bewertet.

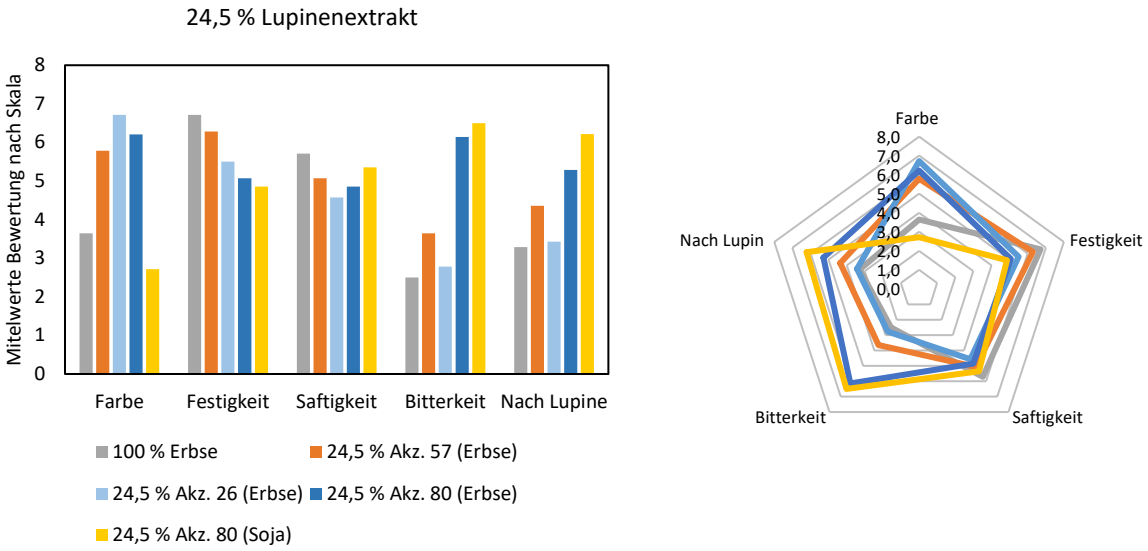


Abbildung 15: Bewertung 1 der Sensorikattribute
im Mittel (n=X) von 5 verschiedenen Proben mit je 24,5 % Lupinenextrakt der Akzessionen 57, 26 und 80 mit Erbsenprotein sowie Sojaprotein als Basis und 100 % Erbsenprotein als Referenzprobe. Farbe (Skala: 1=hell, 10=dunkel), Festigkeit (Skala: 1=weich, 10=fest), Saftigkeit (Skala: 1=safig, 10=trocken), Bitterkeit (Skala: 1=gering, 10=intensiv), Geschmack nach Lupine (Skala: 1=gering, 10=intensiv).

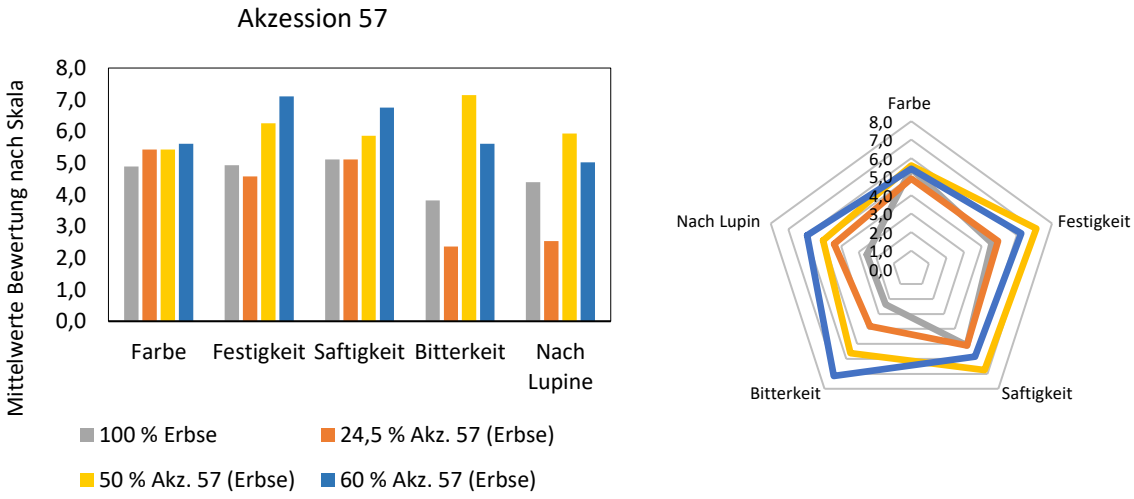


Abbildung 16: Bewertung 2 der Sensorikattribute
im Mittel (n=X) von 4 verschiedenen Proben mit 24,5 %, 50 % und 60% Lupinenextrakt der Akzessionen 57 mit Erbsenprotein als Basis und 100 % Erbsenprotein als Referenzprobe. Farbe (Skala: 1=hell, 10=dunkel), Festigkeit (Skala: 1=weich, 10=fest), Saftigkeit (Skala: 1=safig, 10=trocken), Bitterkeit (Skala: 1=gering, 10=intensiv), Geschmack nach Lupine (Skala: 1=gering, 10=intensiv).

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse von 4 Proben mit unterschiedlichen Verhältnissen an Akzession 57 in den Proben. Die Bitterkeit und der Geschmack nach Lupine wird mit zunehmendem Gehalt an Lupinenextrakt als zunehmend intensiver eingestuft. Interessant ist, dass die Proben mit steigendem Lupinenextrakt-Gehalt als trockener und fester bewertet werden.

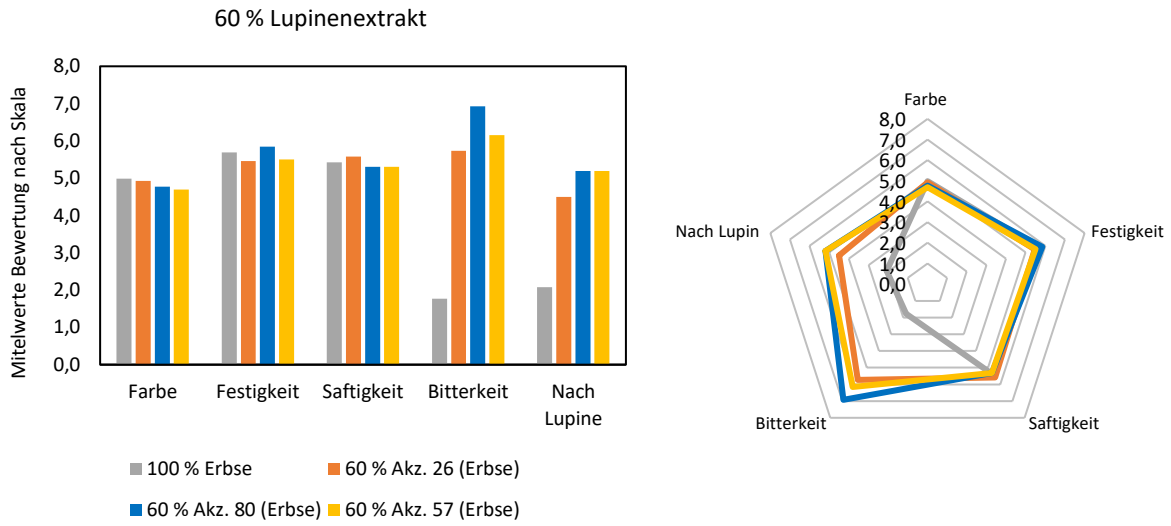


Abbildung 17: Bewertung 3 der Sensorikattribute
im Mittel (n=X) von 4 verschiedenen Proben mit je 60 % Lupinenextrakt der Akzessionen 57, 26 und 80 mit Erbsenprotein als Basis und 100 % Erbsenprotein als Referenzprobe. Farbe (Skala: 1=hell, 10=dunkel), Festigkeit (Skala: 1=weich, 10=fest), Saftigkeit (Skala: 1=safig, 10=trocken), Bitterkeit (Skala: 1=gering, 10=intensiv), Geschmack nach Lupine (Skala: 1=gering, 10=intensiv).

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für die Bewertung der Proben mit 60 % Lupinenextrakt der drei Akzessionen dargestellt. Wie auch schon in Abbildung 15 zu erkennen war, wurden die Proben mit Akzession 80 mit der intensivsten Bitterkeit und Geschmack nach Lupine beurteilt. Obwohl in Abbildung 17 deutliche Unterschiede in der Bitterkeit und dem Geschmack nach Lupine mit zunehmendem Gehalt an Lupinenextrakt wahrgenommen wurden, wird aus Abbildung 15 und Abbildung 17 ersichtlich, dass eine getrennte Verkostung von Proben mit je 24,5 % und 60 % Lupinenextrakt zu einer ähnlichen Skalen-Bewertung von rund 6-7 für das Attribut „Bitterkeit“ und rund 5 für das Attribut „Geschmack nach Lupine“ im Mittel führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Akzession 26 geschmacklich am besten abgeschnitten hat, da sie die geringste Bitterkeit und den geringsten Geschmack nach Lupine besitzt. Bei einem Gehalt von 24,5 % Lupinenextrakt wurde die Probe mit Akzession 26 zudem als am „saftigsten“ bewertet. Sie zeichnet sich allerdings durch eine vergleichbar dunkle Farbe und eine festere Konsistenz aus.

Ein weiterer positiver Aspekt der Akzession 26 ist der Proteingehalt. Wie aus hervorgeht, liegt der Rohproteingehalt für das Konzentrat des Lupinenextraktes von Akzession 26 mit 87,34 g Rohprotein/100g TS über dem der Akzessionen 57 und 80 mit 80,37 und 85,96 g/100g T.

AP 5 Analyse des Alkaloidgehaltes der Lupinensamen

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der Chinolizidinalkaloide von den bereitgestellten Lupinensamen aus den Erntejahren 2017 bis 2021 dargestellt. Dabei wurden 86 Saatgutmuster (ausgereifte Samen und grüne Körner) der Schmalblättrigen Bitterlupine (L. *angustifolius*) aus den Erntejahren 2017, 2018, 2019 und 2020 an das JKI zur Analyse der Chinolizidinalkaloide gesendet. Die gaschromatische Analyse erfolgte nach vorheriger salzsaurer Extraktion. Ziel war es Akzessionen zu charakterisieren, welche einen hohen Alkaloidgehalt aufweisen (vgl. Tabelle 24).

Tabelle 24: Analyseergebnisse 2017-2020 der Chinolizidinalkaloide von Lupinensamen der Firma ESKUSA aus verschiedenen Erntejahren. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in [µg/g] Korn bzw. [%] Korn angegeben.

Erntejahr	Akzession.	Fam.-Nr.:	Alkaloidgehalt [µg/g Korn]	Alkaloidgehalt [% Korn]
2017	1	1	6947,96	0,69
2017	3	1	6091,14	0,61
2017	4	1	9157,58	0,92
2017	5	<5,0 L.sieb	278,09	0,03
2017	7	1	6625,64	0,66
2017	8	1	6615,22	0,66
2017	9	1	7128,14	0,71
2017	10	1	5916,64	0,59
2017	11	1	5243,99	0,52
2017	12	1	6517,21	0,65
2017	13	1	5091,53	0,51
2017	14	1	6219,69	0,62
2017	15	1	7173,85	0,72
2017	16	1	5584,98	0,56
2017	17	1	6105,88	0,61
2017	18	1	7891,52	0,79
2017	19	1	7993,83	0,80
2017	20	1	6519,94	0,65
2017	21	1	6943,34	0,69
2017	23	1	6785,59	0,68
2017	24	1	8137,45	0,81
2017	25	1	7846,68	0,78
2017	26	1	7415,40	0,74
2017	29	1	7762,15	0,78
2017	30	1	8286,35	0,83
2017	33	1	6423,80	0,64
2017	34	1	7173,24	0,72
2017	35	1	7611,12	0,76
2017	37	1	8154,04	0,82
2017	39	1	7726,58	0,77

2017	43	1	7897,60	0,79
2017	44	1	8185,94	0,82
2017	45	1	8624,41	0,86
2017	46	1	9517,82	0,95
2017	46	2	10300,09	1,03
2017	46	3	9409,43	0,94
2017	47	1	8045,94	0,80
2017	47	2	7481,73	0,75
2017	48	1	7288,06	0,73
2017	50	1	7698,64	0,77
2017	51	1	1075,00	0,11
2017	56	1	6664,00	0,67
2017	58	1	6019,06	0,60
2017	59	9+10	10475,31	1,05
2017	60	1	6540,37	0,65
2017	62	1	58,46	0,01
2017	65	1	62,77	0,01
2017	65	2	60,24	0,01
2017	66	1	8620,66	0,86
2017	72	1	66,08	0,01
2017	74	1	58,35	0,01
2017	76	1	167,88	0,02
2017	78	1	45,04	0,00
2017	o.E.	I	6491,17	0,65
2017	o.E.	II	6431,71	0,64
2017	Boregine		61,85	0,01
2017	Boruta		28,17	0,00
2018	48	7.2	5868,25	0,59
2018	50	3.1	5384,23	0,54
2018	50	3.3	5913,40	0,59
2018	81	1	6392,68	0,64
2018	81	7.2	7510,68	0,75
2020	19		10877,86	1,09
2020	31		8281,99	0,83
2020	28		6037,39	0,60
2020	47		8204,25	0,82
2020	49		6652,12	0,67
2020	55		7235,93	0,72
2020	58		8882,85	0,89
2020	LUPIZAV 4		12795,90	1,28
2020	19		11967,11	1,20
2020	31		8765,18	0,88
2020	28		6175,16	0,62
2020	47		8572,84	0,86
2020	49		7981,79	0,80
2020	55		10643,38	1,06
2020	58		13096,59	1,31
2020	LUPIZAV 4		13379,57	1,34

Weiterhin wurden ausgereifte Lupinensamen mit grünen, unreifen Lupinenkörnern hinsichtlich ihres Chinolizidinalkaloidgehaltes verglichen. Auffällig war, dass die grünen Lupinenkörner in der Regel einen höheren Chinolizidinalkaloidgehalt aufwiesen, als die ausgereiften Lupinensamen der gleichen Akzession. Die Analysenergebnisse dienten dem

Projektpartner Eskusa zur Auswahl der neuen Vermehrungen für das Jahr 2021. Ferner wurden 2020, aus ausgewählten Bitterlupinen-Akzessionen des Projektpartners ESKUSA, durch den Projektpartner Lupino AG, in Vorversuchen zur Auswahl der geeigneten Membran, Lupinenflakes, Lupinenfasern und Lupinenextrakte gewonnen und am JKI auf den Gehalt an Chinolizidinalkaloide analysiert.

Tabelle 25: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide von Lupinenflakes, -fasern und Extrakten. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz (TS) bzw. % angegeben

Akzession	**Produkt**	**Alkaloidgehalt [µg/g TS]**	**Alkaloidgehalt [% TS]**
54 groß	Flakes	19422,57	1,94
	Faser	8785,26	0,88
	Extrakt	37107,27	3,71
54 mittel	Flakes	19819,00	1,98
	Faser	9114,64	0,91
	Extrakt	32083,00	3,21
57	Flakes	21169,98	2,12
	Faser	kein Probenmaterial	
	Extrakt	23216,95	2,32
60	Flakes	19045,89	1,90
	Faser	8021,40	0,80
	Extrakt	31642,50	3,16
64	Flakes	20260,96	2,03
	Faser	8807,56	0,88
	Extrakt	32343,62	3,23
80	Flakes	24069,22	2,41
	Faser	10520,88	1,05
	Extrakt	39253,38	3,93
81	Flakes	16877,15	1,69
	Faser	7473,77	0,75
	Extrakt	26382,22	2,64
LupiZAV 4	Flakes	26928,04	2,69
	Faser	kein Probenmaterial	
	Extrakt	44150,65	4,42

Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt und es ist erkennbar, dass sich der Chinolizidinalkaloidgehalt in den drei analysierten Produkten (Flakes, Faser, Extrakt) deutlich unterscheidet. So wird bei allen Akzessionen bereits während der Herstellung der Lupinenfasern der Chinolizidinalkaloidgehalt auf teilweise unter 1 % vermindert. Dies korreliert mit dem deutlich erhöhten Chinolizidinalkaloidgehalt in den daraus gewonnenen Extrakten.

Die Ergebnisse der Analysen wurden an alle Projektpartner weitergeleitet. Der Projektpartner Lupino AG konnte die nächsten Versuche zur Trennung der Proteine mittels Membrantechnologie planen.

Im zweiten Projektjahr wurden vom Projektpartner ESKUSA GmbH neun ausgereifte Lupinensamenmuster der Schmalblättrigen Bitterlupine (L. *angustifolius*) aus den Erntejahren

2021 an das JKI-ZL zur Analyse der Chinolizidinalkaloide gesendet. Die gaschromatische Analyse der Lupinen-Alkaloide analog zum ersten Projektjahr und auch hier war es das Ziel Akzessionen zu charakterisieren, welche einen hohen Chinolizidinalkaloidgehalt aufweisen (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Analyseergebnisse 2021 der Chinolizidinalkaloide von Lupinensamen der Firma ESKUSA. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Korn bzw. % angegeben

Akzession	Erntejahr	Alkaloidgehalt [µg/g Korn]	Alkaloidgehalt [% Korn]
LUB 03	2021	14336,64	1,43
LUB 18	2021	20612,12	2,06
LUB 23	2021	13736,16	1,37
LUB 26	2021	18122,60	1,81
LUB 30	2021	14637,24	1,46
LUB 46	2021	14579,27	1,46
LUB 57	2021	21104,49	2,11
LUB 66	2021	13419,87	1,34
LUB 80	2021	21433,98	2,14

Die Analysenergebnisse dienten erneut dem Projektpartner ESKUSA zur Auswahl der erneuten Vermehrungen für das Jahr 2022. Ferner wurden auch 2021, aus ausgewählten Bitterlupinen-Akzessionen des Projektpartners ESKUSA, durch den Projektpartner Lupino AG das Arbeitspaket 3 „Durchführung und Trennung mittels Membranen“ durchgeführt. Ziel ist es dabei die Abtrennung der Chinolizidinalkaloide von der Proteinfraktion mit Chinolizidin-Alkaloidgehalten <0,05 %. Es wurde dafür mit drei Akzessionen die Pilotanlage in Betrieb genommen und die anfallenden einzelnen Prozessstufen am JKI-ZL auf den Gehalt an Chinolizidinalkaloide analysiert. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt und es ist erkennbar, dass die Chinolizidinalkaloide sich mittels Membran bzw. Diafiltration von der Proteinfraktion abtrennen lassen und sich im Permeat „ansammeln“. Die Proteinfraktionen werden im folgenden Bericht als “Extrakt der Diafiltration“ bezeichnet. Bereits nach dreifacher Diafiltration konnte der Chinolizidinalkaloidgehalt deutlich gesenkt werden und nach 6-fachen Diafiltration lag er bei <1 % der Akzession ‘54 mittel‘. Die Proteinfraktionen der Akzessionen ‘57‘ und ‘60‘ wiesen nach einer 6-fachen Diafiltration mit einer Aufkonzentrierung bereits Chinolizidinalkaloidgehalte < 0,05 % auf und wären somit für die Futtermittelindustrie geeignet.

Tabelle 27: Analyseergebnisse 1 der Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen: Permeat, 3-fache Diafiltration verdünnt (Extrakt: 3-D, verd.); 6-fache Diafiltration verdünnt (Extrakt: 6-D, verd.); 6-fache Diafiltration auf konzentriert (Extrakt: 6-D, konz.). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz bzw. % angegeben.

Akzession	Prozessstufe	Alkaloidgehalt [µg/g TS]	Alkaloidgehalt [% TS]
54 mittel	Permeat	104021,18	10,40
	Extrakt: 3-D, verd.	12440,33	1,24
	Extrakt: 6-D, verd.	2457,90	0,25

	Extrakt: 6-D, konz.	3096,12	0,31
57	Permeat	189205,24	18,92
	Extrakt: 6-D, konz.	322,20	0,03
64	Permeat	151151,69	15,12
	Extrakt: 6-D, konz.	339,42	0,03

Da die Lupinenakzessionen sich während des Entbitterungsprozesses unterschiedlich verhalten, wurden weitere Akzessionen entbittert und die Prozessstufen erneut dem JKI-ZL zur Analyse der Chinolizidinalkaloide zugesendet. In Tabelle 28 sind die Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen der Lupinenakzessionen '54 groß', '60', '80' und '81' dargestellt. Es sind ebenfalls deutliche Unterschiede in den Proteinfraktionen zu erkennen, allerdings wären zu diesem Zeitpunkt alle eingesetzten Akzessionen mit der bisherigen Prozessentwicklung für die Futtermittelindustrie zugelassen, da sie einen Chinolizidinalkaloidgehalt unter 0,05 % besitzen. Die Lupinenakzession '54 groß' wäre mit einem Gehalt von 139 µg/g Trockensubstanz sogar für die Humanernährung geeignet.

Tabelle 28: Analyseergebnisse 2 der Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen:
Permeat; 6-fache Diafiltration auf konzentriert (Extrakt: 6-D, konz.); Dekanter. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz bzw. % angegeben.

Akzession	**Prozessstufe**	**Alkaloidgehalt [µg/g TS]**	**Alkaloidgehalt [% TS]**
54 groß	Permeat	94416,99	9,44
	Extrakt: 6-D, konz.	139,07	0,01
	Dekanter	42021,44	4,20
60	Permeat	74276,89	7,43
	Extrakt: 6-D, konz.	238,88	0,02
	Dekanter	36014,32	3,60
80	Permeat	95192,85	9,52
	Extrakt: 6-D, konz.	315,83	0,03
	Dekanter	47777,28	4,78
81	Permeat	76597,12	7,66
	Extrakt: 6-D, konz.	381,04	0,04
	Dekanter	28228,23	2,82

Im dritten Projektjahr wurden vom Projektpartner ESKUSA GmbH erneut neun ausgereifte Lupinensamenmuster der Schmalblättrigen Bitterlupine (L. *angustifolius*) aus dem Erntejahr 2021 an das JKI-ZL zur Analyse der Chinolizidinalkaloide gesendet. Die gaschromatische Analyse erfolgte wieder analog den Jahren zuvor und die Ergebnisse dienten der Charakterisierung der Akzessionen (vgl. Tabelle 29).

Tabelle 29: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide von Lupinensamen der Firma Eskusa aus dem Erntejahr 2022. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz bzw. % angegeben

Akzession	**Erntejahr**	**Alkaloidgehalt [µg/g TS]**	**Alkaloidgehalt [% TS]**
LUB 03-1	2021	14336,64	1,43
LUB 18-1	2021	20612,12	2,06
LUB 23-1	2021	13736,16	1,37
LUB 26-1	2021	18122,60	1,81

LUB 30-1	2021	14637,24	1,46
LUB 46	2021	14579,27	1,46
LUB 57	2021	21104,49	2,11
LUB 66-1	2021	13419,87	1,34
LUB 80	2021	21433,98	2,14

Ferner wurden vom Projektpartner Lupino sechs Akzessionen für die Verwendung der Pilotanlage eingesetzt und die anfallenden einzelnen Prozessstufen am JKI-ZL auf den Gehalt an Chinolizidinalkaloide analysiert. In Abbildung 18 sind die Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen der Lupinenakzessionen ‘03‘, ‘18‘, ‘23‘, ‘46‘ und ‘80‘ dargestellt. Es sind ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Akzessionen zu erkennen. Ferner wird deutlich, dass die Chinolizidinalkaloide während des Entbitterungsprozesses in das Permeat übergehen (Vergleich P-Start zu P-Ende). Eine Ausnahme zeigt sich allerdings bei der Akzession ‘46‘, da diese sich in der Probenaufarbeitung sowie dem Entbitterungsprozess problematisch (starke Schaumbildung, Verklebung der GC-Säule) darstellte, wird diese für weitere Prozessversuche nicht weiterbearbeitet.

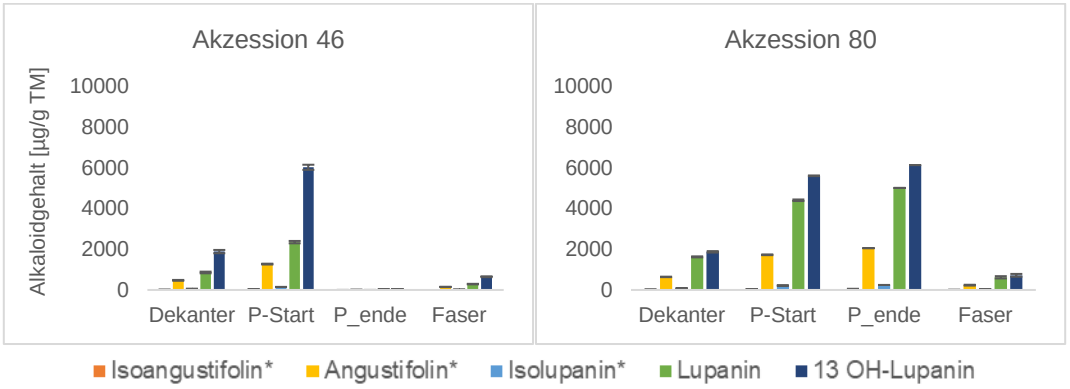


Abbildung 18: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide der einzelnen Prozessstufen der Akzession 03, 18, 23, 26, 46 und 80: Dekanter; Permeat-Start; Permeat-Ende, Faser. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 inklusive Standardabweichung und in µg/g Trockensubstanz angegeben.

Betrachtet man die Chinolizidinalkaloide als Summe und vergleicht die sechs Akzessionen bezüglich der Prozessstufen zeigt sich folgendes Ergebnis. Durch die Entbitterung gelingt es, einen Teil der Chinolizidinalkaloide bereits im 1. Prozessschritt zu entfernen. Im weiteren Prozess ist erkennbar, das bei allen sechs Akzessionen die Proteinfraktion einen signifikant geringeren Chinolizidinalkaloidgehalt besitzen gegenüber den Flakes sowie den Fasern (vgl. Tabelle 30). Bereits nach vierfacher Diafiltration lag der Chinolizidinalkaloidgehalt < 0,05 % für die Akzessionen ‘03‘, ‘23‘, ‘26‘, ‘46‘, ‘57‘ und ‘80‘. Diese wären somit für die Futtermittelindustrie geeignet. Zudem wären die Akzessionen ‘23‘, ‘46‘ und ‘80‘ mit einem Chinolizidinalkaloidgehalt ≤ 0,02 % für die Lebensmittelindustrie geeignet.

Tabelle 30: Analyseergebnisse der Chinolizidinalkaloide (QA) der einzelnen Prozessstufen: Flakes, Faser, Permeat, Proteinfraktion (4-fache Diafiltration). Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte mit n=4 und in µg/g Trockensubstanz angegeben.

Akzession	**QA [µg/g TS Flakes]**	**QA [µg/g TS Faser]**	**QA [µg/g TS Permeat]**	**QA [µg/g TS Proteinfraktion]**
LUB 03-1	2,12	1,12	3,16	0,03
LUB 18-1	2,26	0,13	4,46	0,08
LUB 23-1	1,66	0,07	0,29	0,02
LUB 26-1	2,06	0,08	0,31	0,03
LUB 46	1,87	0,11	0,33	0,01
LUB 80	2,51	1,05	3,93	0,02

5 Diskussion der Ergebnisse

Die Nutzung von Bitterlupinen für die Produktion von Lebensmittelprotein erscheint auf den ersten Blick angesichts des Vorhandenseins von Süßlupinen für die Proteinextraktion als zu aufwändig. Bei genauerem Hinsehen müssen jedoch auch Süßlupinen bei der Herstellung von Food-Protein Rest-entbittert werden, da auch Süßlupinen noch geringe Mengen an Chinolizidinalkaloiden im Saatgut enthalten. Unter ungünstigen Abreife- oder anderen Stressverhältnissen sind diese Restalkaloide jahres- oder chargenweise für chemische, einfache Entbitterungsschritte zu hoch. Teilweise können in der Süßlupinenproduktion die Richtwerte für Chinolizidinalkaloide bei Einsatz als Rohstoff für Lebensmittel nicht eingehalten werden. Es muss dann mehrfach entbittert werden, was bei jedem Prozessschritt zu hohen Proteinverlusten führt. Das hier eingesetzte Membranfilterverfahren zielt von Vornherein auf die Entbitterung hoher Chinolizidinalkaloidkonzentrationen von Bitterlupinen und konnte für die Proteinextraktion erfolgreich demonstriert werden. Die Chinolizidinalkaloidgehalte im verwendeten Rohstoff spielen damit keine Rolle mehr für die Proteinausbeute und -qualität. Im Gegenteil, sie lassen sich im Gegensatz zu niedrig konzentrierten Waschlösungen bei Süßlupinen als bereits hochkonzentrierte Waschlösungen bei Bitterlupinen gewinnbringend anreichern und zu hochwertigen Nebenprodukten weiterverarbeiten.

Im genetisch noch weiten Zuchtmaterial von Bitterlupinen konnte eine erhebliche Variabilität für verschiedene, verfahrenstechnisch relevante Merkmale gefunden werden. Merkmale, die ansonsten im Zuchtprozess nicht berücksichtigt werden. So gab es z.B. deutliche Unterschiede in der Schälbarkeit der Lupinensaaten. Die Akzessionen 54, 66 und 81 fielen dabei positiv auf. Die Menge des an der Schale in der Regel verbleibenden Keimlings zeigte extreme Unterschiede (6 bis 26%), die z.T. genetisch bedingt sind, z.T. aber auch von der Dauer der Saatgutlagerung abhängig zu sein scheinen. Der an der Schale verbleibende Keimanteil führt zwar zu Verlusten bei der Proteinextraktion im Lebensmittelbereich, kann jedoch nach Trennung von der Schale als Rohstoff für die Keimölextraktion ein hochwertiges Keimöl liefern. Hier können verschiedene Szenarien zur ökonomischen Optimierung durchgerechnet werden. Die Nutzung von Lupinenkeimen für die Keimölherstellung wird davon abhängen, ob regelmäßig ausreichend Keime dafür als Nebenprodukt der Proteingewinnung zur Verfügung stehen.

Bei den Chinolizidinalkaloidgehalten konnte festgestellt werden, dass bittere Lupinenformen mit relativ niedrigen Chinolizidinalkaloidgehalten (z.B. Akzession 23) sich nicht unbedingt einfacher und schneller entbittern ließen als solche mit hohen Chinolizidinalkaloidgehalten (z.B. Akzessionen 57 und 80). Es muss also hinsichtlich der „Bindung“ der Chinolizidinalkaloide an die Proteinfraktion Unterschiede geben. Was genau diese „Bindung“ ausmacht, konnte im Projekt nicht untersucht werden. Die Proteingehalte der Bitterlupinen im Korn liegen zwischen 20 % und 32,5 %. Nicht immer sind die Akzessionen mit den höchsten Proteingehalten auch diejenigen Akzessionen, die die höchsten Proteinausbeuten in den weiteren Verfahrensschritten zeigen. Neben dem Schälprozess (siehe oben) scheint es noch weitere Faktoren zu geben, die die Proteinausbeuten beeinflussen, z.B. die Proteinlöslichkeit. Auch

diese weiteren Einflussgrößen auf die Proteinextrahierbarkeit konnten im Projekt nicht untersucht werden. Schließlich konnte bei einzelnen Akzessionen eine stark verminderte Proteinqualität bezüglich der technischen Verarbeitbarkeit und Funktionalität gefunden werden. Insbesondere die Akzession Nr. 46 fiel hier besonders negativ durch Schaumbildung und Verstopfung der GC-Säule auf.

Durch die Konstellation der Projektpartner konnten in diesem Projekt Merkmale, die sich verfahrenstechnisch deutlich auswirken, spezifisch im Zuchtprozess berücksichtigt werden. Diese Merkmale sind normalerweise nicht Gegenstand der Sortenentwicklung. Ihre Variabilität im Bitterlupinensortiment zeigt jedoch, dass es sich lohnt, auf diese Merkmale für die lebensmitteltechnologische Verarbeitung und auch hinsichtlich deren Ökonomie zu selektieren. Die Größe der Variation lässt hier eine sehr erfolgreiche Verschiebung der Merkmale in eine günstige Richtung zu. Dies ist unseres Wissens nach bisher bei der Sortenentwicklung nie erfolgt. Insofern hat das vorliegende Projekt ein einzigartiges Ergebnis aus der Zusammenarbeit zwischen Lupinenzüchtung, Analytik und Lebensmitteltechnologie geliefert.

Membranauswahl

Nach umfangreichen Tests von Membranmaterialien auf einer Flachzellen- Laboranlage konnte eine geeignete Membran auf Basis Polyethersulfon (**PES**) und speziellen Hydrophi**L**ic **S**urface **M**odifying **M**acromolecules (**LSMM**) - hier Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit N,N-dimethylacetamid (DMAc) als Lösungsmittel entwickelt werden. Die drei wesentlichen Membraneigenschaften

- Selektivitätermeabilität
- Anti-Fouling konnten höchst möglich optimiert werden so dass ein hervorragendes Prozessverhalten (*membrane perfomance*) dieser Membran erzielt wurde. In Zusammenarbeit mit dem Membranhersteller Synder Inc. wurden die o.g. Materialzusammensetzung auf ein Spiralwickelmodul übertragen.

Versuche im Labormaßstab

Die Versuche im Labormaßstab mit einem Spiralwickelmodul (4 $_{m}^{2}$ Filtrationsfläche) führten unabhängig von der Ausgangskonzentration der Chinolizidinalkaloide zu einer deutlichen Reduzierung nahe bzw. unterhalb der geforderten 0,02 % im Proteinextrakt. Die entsprechenden Analysen wurden vom Projektpartner JKI durchgeführt. Damit wurde die Zielstellung einen Proteinextrakt aus Bitterlupinen herzustellen, der der Anforderung der Bundesanstalt für Risikobewertung (BfR) von einen maximal zulässigen Chinolizidinalkaloidgehalt von 0,02 % entspricht. Auf der Grundlage der Analysen vom Projektpartner DIL e.V. zu den wertgebenden Inhaltsstoffen wurden 3 Akzessionen mit dem höchsten Proteingehalt für die nachfolgenden Versuche im Pilotmaßstab ausgewählt.

Versuche im Pilotmaßstab

In einer ersten Stufe des Pilotmaßstabs mit einem Spiralwickelmodul (20 $_{m^2}$ Filtrationsfläche) konnten die Laborergebnisse bestätigt werden. Die Abtrennung der Chinolizidinalkaloide erfolgte in dem ausreichenden Maße wie es für eine Nutzung in der Humanernährung erforderlich ist. Die verfahrenstechnische Entwicklung eines, membrangestützten Entbitterungsprozesses von Bitterlupinen Akzessionen konnte somit im Rahmen dieses Projektes erfolgreich durchgeführt werden.

Scale-up

Bei der Übertragung vom Labormaßstab auf eine Industrie nahe Pilotanlage von 6 Spiralwickelmodulen mit einer Filtrationsfläche von 120 $_{m^2}$ wurden die im Labormaßstab erzielten Laborwerte noch nicht erreicht. Im Gegensatz zu den Vorversuchen haben wir hier aufgrund des sehr hohen Feedvolumens eine Vorkonzentration auf 12 bis 15 % vor der eigentlichen Diafiltration vorgenommen. Die Analyse der Prozessführungsparameter ergab, dass der entscheidende Faktor für eine ausreichende Reduzierung der Chinolizidinalkaloide nicht wie vermutet durch das Diafiltrationsvolumen bzw. Anzahl der Waschstufen allein erreicht wird. Die geforderte Reduzierung der Chinolizidinalkaloide wird dann erreicht, wenn der Diafiltrationsprozess ohne Vorkonzentration in der verdünnten Proteinlösung erfolgt. Das zeigt, dass der Diffusionsprozess der Chinolizidinalkaloide aus der Lupinenflocken- Matrix in das umgebende Lösungsmittel Wasser ein sehr hohes Konzentrationsgefälle bzw. niedrige Feedkonzentration von <0.05% erfordert. In einem weiteren Praxisversuch konnte diese Annahme bestätigt werden.

Wirtschaftlichkeit

Die erfolgreiche Entbitterung von Bitterlupinen Akzessionen mittel Membrantechnologie erschließt neue pflanzliche Proteinquellen für die Humanernährung. Das ist eine anzustrebende Entwicklung unter dem Aspekt einer stark steigenden Nachfrage nach Pflanzenproteinen. Dem gegenüber steht der Mehraufwand durch die erforderliche mehrstufige Diafiltration. Neben der Gewinnung der aufgereinigten Proteine sind daher die Nebenströme für eine wirtschaftliche Verwertung zu beurteilen. Die Nebenströme sind gekennzeichnet als

- Ballaststoffreiche Lupinenfaser
- Permeatstrom
    - Chinolizidinalkaloide
    - Oligosaccharide
- Lupinenschalen

Die Verwertung der Nebenströme - hier vor allem der Permeatstrom mit pharmazeutisch verwertbaren Chinolizidinalkaloiden und Oligosacchariden, ist eine notwendige

Voraussetzung, um den Membran gestützten Entbitterungsprozess in den industriellen Maßstab zu überführen. Ein weiterer Aspekt zur Erzielung einer wirtschaftlich vernünftigen Stufe ist die sorgfältige Planung der UF-/DF- Anlage zum einen zur Erzielung maximaler Permeatflüsse zum anderen die Rückführung von Waschwasser in den Produktionskreislauf. Die Umsetzung der oben genannten Maßnahmen gewährleistet ein wettbewerbsfähiges Maß an Wirtschaftlichkeit im Vergleich zur Verarbeitung von Süßlupinen. Darüber hinaus wird durch den DF-/UF- Prozess die sensorische und funktionelle Qualität des Proteinextrakts gegenüber dem herkömmlichen Süßlupinenextrakt signifikant verbessert.

Somit wurden in dem vorliegenden Projekt alle geforderten Meilensteine (vgl. Abbildung 1: Zeitplan für das Projekt LUPROME) erreicht.

6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Drei im Projekt als günstig identifizierte Akzessionen (26, 57, 80) werden bereits jeweils auf wenigen ha vermehrt, um für weitere Entwicklungsarbeiten zur Verfügung zu stehen. Die Menge des derzeit und in absehbarer Zeit benötigten Saatgutes dieser Akzessionen rechtfertigt noch keine Kosten für eine Anmeldung und Eintragung ins Sortenregister. Hier wird aktuell geprüft, inwieweit ein Produktionsmodell über Vertragsanbau im geschlossenen Kreis ohne Sortenschutz spezifisch für dieses Zuchtmaterial in Frage kommt. Diskussionen mit Lupino einerseits und potenziellen Anbauern andererseits diesbezüglich sind initiiert worden. Von den Sortenämtern werden solche Modelle für Nischenarten durchaus unterstützt und nicht als Umgehung der Richtlinien angesehen.

Die Membran gestützte Entbitterung von Bitterlupinen ist für die Lupino AG Deutschland ein wichtiger Schritt zur Erschließung alternativer Proteinquellen. Die teilweise mangelnde Ertragsstabilität bei Süßlupinen macht den Anbau für Landwirte wenig attraktiv. Die Verfügbarkeit von Süßlupinen hat sich in den letzten Jahren weiter verschlechtert. Wenn sich die Bitterlupinen Akzessionen mit stabilen Erträgen und mit höherem Rohproteingehalt im Anbau durchsetzen wird eine zeitnahe Nutzung durch die Lupino AG Deutschland erfolgen. Die Projektergebnisse lassen sich auch auf kritische Süßlupinen Sorten übertragen, die Witterung und Standort bedingt zu hohe Chinolizidinalkaloidwerte oder auch sonstige Fehlaromen aufweisen. Der UF-/DF- Aufreinigungsprozess kann hier zu einer deutlichen Verbesserung der sensorischen und funktionellen Qualität beitragen.

Eine höhere und vor allem gesicherte Rohstoffbasis ermöglicht eine Erweiterung der Produktionskapazitäten mit dem Ziel einer zunehmenden Marktpräsenz an Lupinen basierten Lebensmitteln. Jährliche Zuwachsraten von > 10 % sind real erzielbar.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen und Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Die im Projektantrag formulierte Hypothese, dass im Bitterlupinen-Zuchtmaterial eine große Variabilität hinsichtlich Lebensmittel-verfahrenstechnischer Merkmale besteht, konnte eindrucksvoll bestätigt werden. Die Variabilität des Zuchtmaterials hinsichtlich der Merkmale Schälbarkeit, Proteingehalt, Proteinausbeute und Proteinqualität war höher als erwartet und auch die erzielbaren Proteinqualitäten waren herausragend gut trotz der Nutzung von Bitterlupinen. Die im Zuchtmaterial gefundenen, Lebensmittel-verfahrenstechnischen Merkmale sollen in der weiteren Züchtung intensiv verfolgt werden, müssen jedoch durch weitere, agronomisch und wirtschaftlich wichtige Merkmale (z.B. Kalktoleranz, Hülsenplatzfestigkeit) ergänzt werden, um sie vollumfänglich nutzen zu können. Insbesondere die ausschließlich in der Akzession 46 vorkommende Kalktoleranz ist in dieser Akzession mit einer extrem schlechten, verfahrenstechnischen Proteinqualität kombiniert. Hier sollen zukünftig Studien zur Entkopplung dieser Merkmale durchgeführt werden. Vorbereitungen dazu laufen in einem kürzlich gestarteten EU-Projekt.

8 Zusammenfassung

In dem hier dargestellten und von der BLE geförderten **LUPROME**-Projekt konnte eine Methode zur Gewinnung von Protein, aus alkaloidreichen Lupinenvarietäten der Schmalblättrigen Lupine (*Lupinus angustifolius* L.), mit einem niedrigen Chinolizidinalkaloidgehalt entwickelt werden. Die dafür vorgesehene verfahrenstechnische Entbitterung wird durch eine intelligente Verknüpfung verschiedener Membrantechnologien und Membrananlagen realisiert. Auf der Grundlage eines umfassenden Screenings zur Identifizierung geeigneter Membranwerkstoffe wurde eine speziell dem Proteinaufreinigungs- und Aufkonzentrierungsprozesses angepasste Membran entwickelt. Diese zeichnet sich durch spezifische Oberflächeneigenschaften, Porengrößengrößenverteilung sowie hohe chemische und mechanische Beständigkeit aus. Nach erfolgreichen Laborversuchen wurde eine mehrstufige, modulare Pilotanlage entwickelt. Wesentliche Kennzahlen zur Beschreibung von Membraneigenschaften dienten als Grundlage für die Erarbeitung von Parametern für die Prozessführung. In einer ersten Stufe mit nur einem Spiralwickelmodul wurde im Pilotmaßstab erfolgreich die Abtrennung und damit die Reduzierung des Chinolizidinalkaloidgehaltes auf das geforderte Maß von < 0.02 %

nachgewiesen. Anschließend erfolgte ein Scale-up mit Faktor 6 auf eine industrienahe Pilotanlage mit 120 m^2 Filterfläche/ 6 Spiralwickelmodulen. Hinsichtlich des Prozessablaufs bzw. der Prozessführung gibt es hier weiteren Optimierungsbedarf. Es konnte gezeigt werden, dass die Ultra-/Diafiltration des Lupinenproteins mittels innovativer Membrantechnologie erhebliche Vorteile gegenüber dem gängigen Säure-/Basen-Fällungs-basierten Verfahren aufweist. So ist es ein rein physikalischer Prozess und erfüllt die Anforderungen an eine ökologische/biologische Produktion. Das ist ein **bedeutendes Alleinstellungsmerkmal** und wird weiter im Fokus stehen, so startet im Oktober 2023 das Nachfolgeprojekt LuproCess. Des Weiteren kann die Nativität und Funktionalität des extrahierten Proteins weitestgehend erhalten werden, was sich wiederum äußerst positiv auf Verarbeitungsmerkmale und Geschmack der entwickelten Produkte auswirkt. Bei dem entwickelten Verfahren entfällt zudem die chemische Entfettung der eingesetzten Lupinenflakes mittels Lösungsmitteln, was erneut einen positiven Effekt hat, da ein gewisser Ölanteil im Protein toleriert und sogar als Qualitätskriterium gesehen wird. Im Projekt wurde erstmals eine interaktive Zusammenarbeit zwischen Lebensmitteltechnologie und Pflanzenzüchtung in Entwicklungsarbeiten eingegangen. Dies hatte zur Folge, dass aus einem breiten Sortiment an Zuchtlinien diejenigen ausgewählt werden konnten, die sich hinsichtlich der Proteinausbeute, Proteinqualität und Verfahrenstechnik am vorteilhaftesten zeigten. Die Variabilität hinsichtlich der wesentlichen Merkmale für die Lebensmitteltechnologie war im Zuchtmaterial erheblich und konnte erfolgreich für weitere Entwicklungsarbeiten selektiert werden.

9 Literaturverzeichnis

Aguilera, J. M., Gerngross, M. F., and Lusas, E. W. (1983). AQUEOUS PROCESSING OF LUPIN SEED. *Journal of Food Technology* **18**, 327-333.

Beyer, H., Schmalenberg, A. K., Jansen, G., Jurgens, H. U., Uptmoor, R., Broer, I., Huckauf, J., Dietrich, R., Michel, V., Zenk, A., and Ordon, F. (2015). Evaluation of variability, heritability and environmental stability of seed quality and yield parameters of L. angustifolius. *Field Crops Research* **174**, 40-47.

BfR (2017). "Risk assessment of the occurrence of alkaloids in lupin seeds."

Blaschek , W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., and Schulz, V. (2006). "Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe.."

Bleitgen, R., Gross, R., and Gross, U. (1979). Die Lupine, ein Beitrag zur Nahrungsversorgung in den Anden. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **18 (2)**, 104-111.

Carvajal-Larenas, F. E., Nout, M. J. R., van Boekel, M., Koziol, M., and Linnemann, A. R. (2013). Modelling of the aqueous debittering process of Lupinus mutabilis Sweet. *Lwt-Food Science and Technology* **53**, 507-516.

Carvajal-Larenas, F. E., Van Boekel, M., Koziol, M., Nout, M. J. R., and Linnemann, A. R. (2014). EFFECT OF PROCESSING ON THE DIFFUSION OF ALKALOIDS AND QUALITY OF LUPINUS MUTABILIS SWEET. *Journal of Food Processing and Preservation* **38**, 1461-1471.

Foley, G. (2011). Three classic ultrafiltration problems solved with the Exponential Integral *Education for Chemical Engineers* **6**, 90-96.

Gross, U., Galindo, R. G., and Schoeneberger, H. (1983). THE DEVELOPMENT AND ACCEPTABILITY OF LUPINE (LUPINUS-MUTABILIS) PRODUCTS. *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition* **32**, 155-164.

Jansen, G., Jürgens, H.-U., Schliephake, E., and Ordon, F. (2012). Effect of the Soil pH on the Alkaloid Content of Lupinus angustifolius. *International Journal of Agronomy*, 1-5.

Jansen, G., Jürgens, H. U., and Ordon, F. (2009). Effects of Temperature on the Alkaloid Content of Seeds of Lupinus angustifolius Cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**, 172-177.

Jansen, G., Jürgens, H. U., Schliephake, E., Seddig, S., and Ordon, F. (2015). Effects of growing system and season on the alkaloid content and yield of different sweet L. angustifolius genotypes. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **88**, 1-4.

Karara, H. A. (1987). AN EFFICIENT METHOD FOR THE EXTRACTION OF ALKALOIDS FROM BITTER LUPIN SEED. *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* **89**, 442-446.

Lupinenverein (2019). http://lupinenverein.de/wp-content/uploads/2017/01/LUPINEN.pdf,.

Sujak, A., Kotlarz, A., and Strobel, W. (2006). Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry* **98**, 711-719.

Torres Tello, F., and Nagatay, A. (1980). METODOS DE ELIMINACION DE ALCALOIDES EN LA SEMILLA DE Lupinus mutablis, Sweet ; . *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **2**.

Villacrés, E., Alvarez, J., and Rosell, C. (2020). Effects of two debittering processes on the alkaloid content and quality characteristics of lupin (Lupinus mutabilis Sweet). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**, 2166-2175.

Wink, M. (2018). Persönliche Mitteilung.

10 Übersicht aller im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Tabelle 31: Übersicht bisheriger und geplanter Aktivitätenzur Veröffentlichung der Projektergebnisse

Veröffentlichung/Aktivität	**Art der Veröffentlichung**	**Datum**
Publikation	Paper	Planung für 2024
Tag der Leguminosen	Vortrag (AZ)	Dezember 2023
ILC 23 (Internationalen Lupinenkonferenz)	Vortrag (AZ)/Poster (FE)	Juni 2023
Regionalverbandstagung Nord/Nordost LChG	Vortrag (AZ)	März 2023
GFL Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V. Tagung	Vorträge (AZ, FE)	Januar 2023
Lebensmittelchemiker Tag	Poster (AZ)	2022
DIL Technology Days	Flyer (CB)	2023
Öko Feldtage	Stand/Flyer/Poster (AZ, CB)	2023
Zukunftsupdate Ernährung	Vortrag (CB)	2023
DIL Homepage	Bericht	2021
JKI Homepage	Bericht	2020

Anhang:

Anhang I: Erfolgskontrollbericht

Anhang II: Merkblatt mit den Projektergebnissen

Anhang III: weiterführende Literatur

Patrick Opdensteinen, Juliana I. Clodt , Catherine R. Mu?schen, Volkan Filiz and Johannes F. Buyel **A Combined Ultrafiltration/Diafiltration Step Facilitates the Purification of Cyanovirin-N From Transgenic Tobacco Extracts**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology January 2019 | Volume 6 | Article 206

Constantin Frerick, Peter Kreis und Andrzej Górak: **Optimierung von Proteinaufreinigungsprozessen basierend auf einem generischen Prozessmodell**. Chemie Ingenieur Technik 2008, 80, No. 1-2

H. Lutz: **Ultrafiltration for Bioprocessing**; Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Band 15, (2015); Kapitel 5: **Configurations** Herb Lutz EMD Millipore, Biomanufacturing Science Network,

M. Jelemensky , A. Sharma , R. Paulsen and M. Fikar **Time-optimal Operation of Diafiltration Processes in the Presence of Fouling**. Computer Aided Chemical Engineering Volume 37(2015), Pages 1577-1582

Susanne Haindl, Julia Stark1, Jannik Dippel, Sebastian Handt, and Annette Reiche **Scale-up of Microfiltration Processes.** *Chem.Ing.Tech* **2020**, 92 No.00, 1-14

Greg Foley **Three classic ultrafiltration problems solved with the Exponential Integral** Education for Chemical Engineers 6 (2011), p. 90-96

Radoslav Paulsen, Miroslav Fikar **Optimal Operation of Batch Membrane Processes**, Springer Series Advances in Industrial Control (2015)

Longyao Wang, Gang Yang, Weihong Xing, Nanping Xu **Mathematic model of the yield for diafiltration processes**. Separaion and Purification Technology, 59, (2008), 206-213

Greg Foley **Water usage in variabel volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration**, Desalination 196 (2006), 160-163

Anastasia Loman **Dissertation**, Georg-August-Universität Göttingen, 2010 **Molecular Sizing using Fluorescence Correlation Spectroscopy**

KERRY J. HOWE AND MARK M. CLARK **Fouling of Microfiltration and Ultrafiltration Membranes by Natural Waters**, Environ. Sci. Technol. 2002, 36, 3571-3576

Vítor Magueijo1, Viriato Semião, Maria Norberta de Pinho1 **E ect of Membrane Pore Size and Membrane-Solute Interactions on Lysozyme Ultrafiltration**, Materials Science Forum Vols. 514-516 (2006) pp 1483-1487

Dan Zhang, Amin Karkooti, Lu Liu, Mohtada Sadrzadeh, Thomas Thundat, Yang Liu, Ravin Narain, **Fabrication of antifouling and antibacterial polyethersulfone (PES)/ cellulose nanocrystals (CNC) nanocomposite membranes**, Journal of Membrane Science 549 (2018) 350?356

Jizhong Ren, Zhansheng Li, Fook-Sin Wong **A new method for the prediction of pore size distribution and MWCO of ultrafiltration membranes**, Journal of Membrane Science 279 (2006) 558-569

Igbal Ahmed, Faridah Kormin, Ani Idris, Rosli Bin M o d Yunus, Zulkafli Bin Hassan and Reddy Prasad **Preparation of PES Ultrafiltration Membrane using Novel Modified Microwave Casting Solution Technique**, Journal of Applied Sciences 10 (21): 2733-2736, 2010

S. Ranil Wickramasinghe, Shane E. Bower, Zhen Chen, Abhik Mukherjee, Scott M. Husson **Relating the pore size distribution of ultrafiltration membranes to dextran rejection**, Journal of Membrane Science 340 (2009) 1-8

Alberto Tiraferri, Marco Malaguti, Madina Mohamed, Mattia Giagnorio and Fynn Jerome Aschmoneit **Standardizing practices and flux predictions in membrane science via simplified equations and membrane characterization**, npj Clean Water (2023)6:58

Harold P. Erickson **Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy**, Biological Procedures Online, Volume 11, Number 1

Seren Acarer, Inci Pir, Mertol Tüfekci, Güler Türkog Demirkol and Nese Tüfekci **Manufacturing and Characterisation of Polymeric Membranes for Water Treatment and Numerical Investigation of Mechanics of Nanocomposite Membranes**, Polymers 2021, 13, 1661

Md Eman Talukder, Fariya Alam, Md. Romon Talukder, Mst. Monira Rahman Mishu, Md. Nahid Pervez, Hongchen Song, Francesca Russo, Francesco Galiaono, Lan Jiabao, George K. Stylios, Alberto Figoli and Vincenzo Naddeo **Fabrication of a polyethersulfone/polyethyleneimine porous membrane for sustainable separation of proteins in water media**, Environ. Sci.: Water Res. Technol., 2023(9), 2323-2337

Pall Corporation **Plant Protein Purification**,Filtration Solutions to Produce Highly Functional Protein Ingredients, 2023

Anuruddika Hewage, Oladipupo Odunayo Olatunde, Chamila Nimalaratne, Maneka Malalgoda, Rotimi E. Aluko, Nandika Bandara **Novel Extraction technologies for developing plant protein ingredients with improved functionality**,Trends in Food Science & Technology Volume 129, November 2022, Pages 492-511

Panadda Dechadilok and William M. Deen **Hindrance Factors for Di usion and Convection in Pores**, Ind. Eng. Chem. Res. 2006, 45, 6953-6959

Jizhong Ren, Zhansheng Li, Fook-Sin Wong **A new method for the prediction of pore size distribution and MWCO of ultrafiltration membranes**, Journal of Membrane Science 279 (2006) 558-569

Alexander Haupt **Herausforderungen in der Membranentwicklung für die Fruchtsaftklarfiltration - vom Labor in die Produktion**, Chem. Ing. Tech.2023,95, No. 9, 1394 - 1402

DuPont IntegraTec P Series Ultrafiltration T-Rack und Module for Open Plattform, **Prozessund Design Handbuch**, Form No. 45-D02234-de, Rev 6, November 2022

Bastien Pellegrin, Fernanda Mezzari, Yamina Hanafi, Anthony Szymczyk , Jean-Christophe Remigy, Christel Causserand **Filtration performance and pore size distribution of hypochlorite aged PES/PVP ultrafiltration membranes**, s. (2015) Journal of Membrane Science, vol. 474. pp. 175- 186. ISSN 0376-7388

J C Gaines, A H Clark, L Regan and C S O?Hern **Packing in protein cores**, J. Phys.: Condens. Matter 29 (2017) 293001 (15pp)

Abdul Wahab Mohammad, Ching Yin Ng, Ying Pei Lim, Gen Hong Ng **Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control**, Food Bioprocess Technol (2012) 5:1143?1156

Xiaoqin Zou and Guangshan Zhu **Microporous Materials for Separation Membranes**, First Edition, 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Seetha S Manickam,Je Gelb, Je rey R. McCutcheon **Pore structure characterization of asymmetric membranes: Non-destructive characterization of porosity and tortuosity**, Journal of Membrane Science 454 (2014) 549?554

Peipei Zuo,Jiahui Zhou,Zhengjin Yang and Tongwen Xu **Hydrophilic Microporous Polymer Membranes: Synthesis and Related Applications**, ChemPlusChem 10.1002/cplu.202000486

S.W. Schneider, J. Lärmer, R. M. Henderson, H. Oberleithner **Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy**, Pflügers Arch - Eur J Physiol (1998) 435:362?367

Myo T. Tyn, Todd W. Gusek **Prediction of Di usion Coe cients of Proteins**, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 35, Pp. 327-338 (1990)

Andrew L. Zydney, Pierre Aimar, Martine Meireles,Joseph M. Pimbley, Georges Belfort **Use of the log-normal probability density function to analyze membrane pore size distributions: functional forms and discrepancies**,Journal of Membrane Science, Volume 91, Issue 3, 1 June 1994, Pages 293-298

Vassili Piiadov, Evandro Ares de Araujo, Mario Oliveira Neto, Aldo Felix Craievich, and Igor Polikarpov **SAXSMoW 2.0: Online calculator of the molecular weight of proteins in dilute solution from experimental SAXS data measured on a relative scale**, PROTE-
IN SCIENCE 2019 | VOL 28:454-463

SYNDER FILTRATION https://synderfiltration.com/mq-max-pes-50kda/

C.M. Galanakis, R. Castro-Muñoz, A. Cassano, C. Conidi **8 - Recovery of high-added-value compounds from food waste by membrane technology**, Membrane Technologies for Biorefining, 2016, Pages 189-215

Saskia Dillmann **Untersuchungen von Layer-by-Layer Beschichtungen für polymere Ultrafiltrationsmembranen und Charakterisierung der Membraneigenschaften**, Dissertation Technischen Universität Hamburg 2022

Victor Aguirre Montesdeoca, Jaap Bakker, R.M. Boom, Anja E.M. Janssen, A. Van der Padt **Ultrafiltration of non-spherical molecules**, Journal of Membrane Science, https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.10.053

Q.X. Xiong, F. Meftah. **Determination on pore size distribution by a probabilistic porous network subjected to salt precipitation and dissolution**. Computational Materials Science, 2021, 195, pp.110491.

Thomas Reppel, Tim Fabian Korzeniowsk, Kerstin Weinberg **Stereological transformation of pore size distributions with application to soft polymer and FDM-printed specimens**, Z Angew Math Mech. 2019;99

Dharmesh M. Kanani, William H. Fissell, Shuvo Roy, Anna Dubnisheva, Aaron Fleischman, and Andrew L. Zydney **Permeability - Selectivity Analysis for Ultrafiltration: E ect of Pore Geometry**, Memb Sci. 2010 March 1; 349(1-2)

Nurul Hannan Mohd Safari,Sabariah Rozali, Abdul Rahman Hassan, Musa Ahmad **Tailoring of Narrow Pores, Pore Size Distribution and Structural Details in Asymmetric Nanofiltration Membranes via Polyvinyl-pyrrolidone Additive**, Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 66(4), pp. 576-584, 2022

Norma Alejandra Marrufo-Hernández; Maribel Hernández-Guerrero; José Manuel Nápoles-Duarte; Juan Pedro Palomares-Báez; Marco Antonio Chávez-Rojo **Prediction of the filtrate particle size distribution from the pore size distribution in membrane filtration: Numerical correlations from computer simulations**, AIP Advances 8, 035308 (2018)

Yuzhang Zhu, Liangliang Gui, Ruoyu Wang,Yunfeng Wang, Wangxi Fang, Menachem Elimelech, Shihong Lin & Jian Jin **Regulation of molecular transport in polymer membranes with voltage-controlled pore size at the angstrom scale**,Nature Communications | (2023)14:2373

Dang Thi Thanh Huyen **DETERMINATION OF PORE CHARACTERISTICS AND MOLECULAR WEIGHT CUT-OFF (MWCO) OF UF MEMBRANES VIA SOLUTE TRANSPORT AND MATHEMATICAL METHOD**, JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY IN CIVIL ENGINEERING, Vol. 11 No. 6, 11 – 2017

Sonnick, S.; Meier, M.; Ross-Jones, J.; Erlbeck, L.; Medina, I.; Nirschl, H.; Rädle, M. **Correlation of pore size distribution with thermal conductivity of precipitated silica and experimental determination of the coupling e ect.**, 2019. Applied thermal engineering, 150, 1037-1045.

Sven Johann Bohr, Fei Wang, Michael Metze , Josipa Lisicar Vukusic, Andreas Sapalidis, Mathias Ulbricht, Britta Nestler, and Stephan Barbe **State-of-the-art review of porous polymer membrane formation characterization - How numerical and experimental approaches dovetail to drive innovation**, Front. Sustain. 4:1093911.

Quezada, C.; Estay, H.; Cassano, A.; Troncoso, E.; Ruby-Figueroa, R. **Prediction of Permeate Flux in Ultrafiltration Processes: A Review of Modeling Approaches**. Membranes 2021, 11, 368.

Jayalakshmi Ayyavoo, Thi Phuong Nga Nguyen, Byung-Moon Jun, In-Chul Kim, Young-Nam Kwon **Protection of Polymeric Membranes with Antifouling surfacing via Surface**

Modifications,Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.026

Vedadghavami, Armin; Minooei, Farnaz, Hosseini, Seyed Saeid, **Practical Techniques for Improving the Performance of Polymeric Membranes and Processes for Protein Separation and Purification**,Iran. J. Chem. Chem. Eng. Review Article Vol. 37, No. 2, 2018 Nicholas Hampu, Jay R. Werber, Wui Yarn Chan, Elizabeth C. Feinberg, and Marc A. Hillmyer **Next-Generation Ultrafiltration Membranes Enabled by Block Polymers**, ACS Nano 2020, 14, 16446?16471

Peipei Li, Roshni L. Thankamony, Xiang Li, Zhen Li, Xiaowei Liu , Zhiping Lai **Nanoporous polyethersulfone membranes prepared by mixed solvent phase separation method for protein separation**, Journal of Membrane Science 635 (2021) 119507

D. Breite, M. Went, A. Prager und A. Schulze **The critical zeta potential of polymer membranes - how electrolytes impact membrane fouling**, RSC Adv. 2016, 6, 98180

Ajith J. Jose, Jincymol Kappen, Muthukaruppan Alagar **Polymeric membranes: Classification, preparation, structure physiochemical, and transport mechanisms**, Fundamental Biomaterials: Polymers. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00002-5

Dereck Koch und Mathias Ulbricht **Funktionalisierung von Ultrafiltrationsmembranen zur Integration von spezifischen Adsorbereigenschaften**, Chem. Ing. Tech. 2019, 91, No. 8, 1129-1134

Youngkun Chung, Yeo-Jin Kim, Jeong F. Kim, Mi-Young Lee, Seung-Eun Nam, Seoktae Kang **Preparation method of standard molecules for the precise estimation of molecular weight cut-o of membranes by gel permeation chromatography**, Desalination and Water Treatment 180 (2020) 74-79

Noof A. Alenazi, Mahmoud A. Hussein, Khalid A. Alamry and Abdullah M. Asiri **Modified polyether-sulfone membrane: a mini review**, Designed Monomers and Polymers, 2017

VOL. 20, NO. 1, 532-546

Tunmise Ayode Otitoju, Abdul Latif Ahmad and Boon Seng Ooi **Recent advances in hydrophilic modification and performance of polyethersulfone (PES) membrane via additive blending**, RSC Adv., 2018, 8, 22710

Amber Salim, et al. **Graphene oxide incorporated polyether sulfone nanocomposite antifouling ultrafiltration membranes with enhanced hydrophilicity**, Mater. Res. Express 9 (2022) 075503