Universität für Bodenkultur Wien
Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie

Präzipitation von Protein aus Rapspresskuchen-Extrakten

Masterarbeit

Eingereicht von Eva Marka BSc

Betreut von Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Senad Novalin

Wien, Dezember 2019

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich im Rahmen meiner Masterarbeit begleitet haben.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Senad Novalin, zum einen für die gute Betreuung und Unterstützung sowie zum anderen auch für die viele Geduld, welche die Fertigstellung meiner Masterarbeit abverlangt hat. Für die viele Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung sowohl in praktischen als auch theoretischen Belangen möchte ich auch DI Dr. Michael Reisinger danken, der sich jederzeit für meine Fragen Zeit genommen hat. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Senad Novalin und DI Dr. Michael Reisinger für die gute Zusammenarbeit bei der Abhaltung des verfahrenstechnischen Praktikums.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Priv.-Doz. Dr. Matthias Schreiner und Beteiligten der Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie für die durchgeführte Probenanalyse, sowie für die beratende Unterstützung.

Mein Dank geht außerdem an die Firma Rapso, die das Projekt ermöglicht hat, im Zuge dessen meine Masterarbeit entstehen konnte.

Darüber hinaus möchte ich meiner Familie danken – meinen Eltern Rudolf und Hermine, sowie meiner Schwester Elisabeth – die mich auf meinem bisherigen Weg immer mit ganzer Kraft unterstützt und gefördert haben. Ich danke meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums, für die viele Geduld und das Verständnis sowie für den unablässigen Rückhalt.

Kurzzusammenfassung

Bei der Herstellung von Rapsöl fällt als Nebenprodukt der entölte, proteinreiche Rückstand an, welcher hauptsächlich als Futtermittelbestandteil in der Nutztierhaltung eingesetzt wird. Aufgrund der guten ernährungsphysiologischen Qualität sowie möglicher techno-funktioneller Eigenschaften weist Rapsprotein hohes Potenzial zur Anwendung in Lebensmitteln auf, wodurch zudem eine Wertsteigerung entölter Rapssaat erzielt werden könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit sollte Rapsprotein mit möglichst hoher Reinheit und Ausbeute mittels alkalischer Extraktion und isoelektrischer Präzipitation aus Rapspresskuchen gewonnen werden. Die Extraktion der Proteine erfolgte jeweils bei pH 11,5, 60 °C und unterschiedlich langen Extraktionszeiten (60, 120, 180 min). Bei der Ausfällung im neutralen Milieu (pH 6,5 – 7,0) wurden Präzipitate mit relativ niedrigem Proteingehalt (37 – 45 % Protein in TS) und niedriger Proteinausbeute (ca. 12 %) gewonnen, während bei pH 3,0 – 5,5 Präzipitate mit einem Proteingehalt um 60 % und einer Proteinausbeute von ca. 35 % erhalten wurden. Die Produktreinheit konnte durch Abtrennung der proteinarmen Niederschläge aus dem Extrakt vor der Ausfällung des Proteinproduktes sowie durch Waschen des Präzipitates insgesamt auf ca. 80 % erhöht werden, wobei die Proteinausbeute auf ca. 24 % vermindert wurde. Insgesamt sind die erzielte Reinheit und die Proteinausbeute für die Herstellung eines verkehrsfähigen, kommerziellen Rapsproteinproduktes zu gering.

Als Ursachen für die niedrige Proteinreinheit und -ausbeute gelten einerseits sekundäre Pflanzenstoffe (phenolische Verbindungen, Glucosinolate, Phytinsäure), zudem ist die weite Verteilung der isoelektrischen Punkte der Rapsproteine über einen weiten pH-Bereich bei der Proteingewinnung mittels isoelektrischer Präzipitation hinderlich. Weiters könnten sich der Restfettgehalt im Presskuchen sowie thermische Proteinveränderungen während der Ölpressung negativ auf Reinheit bzw. Ausbeute des Produktes auswirken.

Abstract

Deoiled rapeseed meal/press cake is a protein-rich by-product of the rapeseed oil production process and is mainly used as animal feed. Due to its good nutritional quality and possible techno-functional properties, rapeseed protein provides high potential as an added-value food ingredient.

Subject of the present master thesis is the isolation of protein from rapeseed press cake using alkaline extraction and isoelectric precipitation. The protein content of the obtained product as well as the protein yield were aimed to be as high as possible. The protein extraction process was carried out at pH 11,5, 60 °C and at different extraction times (60, 120, 180 min), respectively. At neutral pH-conditions (pH 6,5 – 7,0) deposits of comparatively little protein content (34 – 45 % protein in DM) as well as low protein yield (about 12 %) were obtained, while precipitation in the pH-range of pH 3,0 – 5,5 resulted in products with protein contents of about 60 % and protein yields of about 35 %. By removal of the low-protein deposits from the extract prior to the precipitation of the protein product plus washing the precipitate, the protein content of the product was increased to an average of 80 % protein in DM, while the protein yield was decreased to about 24 %. Overall, the achieved protein contents as well as the protein yields of the obtained products are too low to provide the production of a negotiable, commercial rapeseed protein product.

The low protein content and low protein yield of the products may be caused by the presence of secondary plant metabolites (phenolic compounds, glucosinolates, phytic acid). Moreover, the wide range of the isoelectric points of rapeseed proteins is detrimental for protein recovery via isoelectric precipitation. The residual fat present in rapeseed press cake as well as thermal changes in protein structure during industrial oil pressing may also have a negative impact on the protein content or protein yield of the rapeseed protein product.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1
1 Einleitung 1
1.1 Raps 1
1.1.1 Allgemeines 1
1.1.2 Zusammensetzung der Rapssaat 3
1.1.3 Verwendung der Rapssaat 10
1.1.4 Rapspresskuchen 12
1.2 Rapsproteine 13
1.2.1 Allgemeines 13
1.2.1.1 Cruciferin 15
1.2.1.2 Napin 17
1.2.1.3 Allgemeine Eigenschaften der Rapsproteine 18
1.2.1.4 Techno-funktionelles Potenzial von Rapsproteinisolaten 18
1.2.1.5 Ernährungsphysiologische Qualität von Rapsprotein 23
1.2.1.6 Allergenes Potenzial von Rapsprotein 24
1.2.2 Gewinnung von Protein aus Rapspresskuchen 24
1.2.2.1 Feststoffextraktion 29
1.2.2.2 Isoelektrische Präzipitation von Proteinen 31
1.2.2.3 Ultrafiltration 32
1.2.3 Verwendungsmöglichkeiten von Rapsprotein 40
1.2.4 Problematiken bei der Gewinnung von Protein aus Rapspresskuchen 41
1.2.4.1 Mögliche Einflüsse der Ölgewinnungsmethode 42
1.2.4.2 Mögliche Einflüsse hoher pH-Werte bei der Proteinextraktion 44
1.2.4.3 Wechselwirkungen mit sekundären Pflanzenstoffen 44
1.2.4.4 Einfluss der pI-Werte der Rapsproteine auf die Proteinausbeute bei der isoelektrischen Proteinpräzipitation 47
1.2.5 Zusammenfassung 48
1.3 Aufgabenstellung 49
2 Material und Methoden 51
2.1 Analysenmethoden 51
2.1.1 Bestimmung der Trockensubstanz (gravimetrisch) 51
2.1.2 Bestimmung des Aschegehaltes (gravimetrisch) 51
2.1.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes über Stickstoff (Methode nach Kjeldahl) 52
2.1.4 HPLC-Analyse von Zuckern 53
2.1.5 HPLC-Analyse organischer Säuren 56
2.2 Versuchsdurchführungen und Ergebnisse 58

2.2.1 durchgeführte Versuche 58
2.2.1.1 Versuchsreihe 1: Einzelfällungen 58
2.2.1.2 Versuchsreihe 2: Feinfällungsreihe 58
2.2.1.3 Versuchsreihe 3: Vorfällungsversuche 59
2.2.1.4 Versuchsreihe 4: Reduktion phenolischer Verbindungen mittels Ultrafiltration 59
2.2.2 Versuchsdurchführungen 60
2.2.2.1 Durchführung der Versuchsreihen 1 – 3 60
2.2.2.2 Durchführung der Versuchsreihe 4 62
2.2.3 Ergebnisse 65
2.2.3.1 Versuchsreihe 1: Einzelfällungen 67
2.2.3.2 Versuchsreihe 2: Feinfällungsreihe 72
2.2.3.3 Versuchsreihe 3: Vorfällungsversuche 75
2.2.3.4 Versuchsreihe 4 zur Reduktion phenolischer Verbindungen mittels Ultrafiltration 82
3 Zusammenfassung und Ausblick 86
Literaturverzeichnis 90
Anhang I

1 Einleitung

1.1 Raps

1.1.1 Allgemeines

Raps (*Brassica napus*) zählt zur Gattung Kohl (Brassica) der Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae* oder *Cruciferae*) und ist aus der Kreuzung von Kohl (*B. oleracea*) und Rübsen (*B. rapa*) hervorgegangen (MIEDANER, 2014). Die ein- oder zweijährig kultivierte Pflanze mit gefiederten Blättern trägt im Sommer lockere, gelbe Blütentrauben und gedeiht im gemäßigten Klima (RIMBACH et al., 2015; EBERMANN und ELMADFA, 2008). Angebaut wird der Ölraps (*B. napus* ssp. *napus*) wegen seiner fettreichen Samen (s. auch Abb. 1), welche zur Ölgewinnung genutzt werden (MIEDANER, 2014).

Man unterscheidet Sommerraps (*B. napus* var. *annua*), angebaut in Kanada, Indien und China, und Winterraps (*B. napus* var. *oleifera*), welcher aufgrund der dort höheren Erträge vor allem in Mittel- und Osteuropa kultiviert wird (EBERMANN und ELMADFA, 2008; MIEDANER, 2014).

Erstmals in Kultur genommen wurde Raps im späten Mittelalter in den Niederlanden. Der Anbau verbreitete sich im 16. Jahrhundert von dort ausgehend nach Deutschland, Belgien und im 18. Jahrhundert nach England. Das Rapsöl wurde zu dieser Zeit hauptsächlich als Lampenöl genutzt, zusätzlich diente es als Grundlage für Seifen und Schmiermittel. Für Speisezwecke wurde das Öl ursprünglich aufgrund seines bitteren Geschmacks kaum verwendet. (MIEDANER, 2014)

Zusätzlich zu den sensorischen Nachteilen sprachen ursprünglich auch gesundheitliche Aspekte gegen den Verzehr des Rapsöls. Erucasäure, welche 45 – 50 % der Fettsäuren alter Rapssorten ausmacht, hat in Tierversuchen bei der Ratte zu Ablagerungen von Fetten in Herz, Leber und Niere geführt (BELITZ et al., 2008; EBERMANN und ELMADFA, 2008). Diese Erscheinung wurde jedoch nicht beim Menschen und Schwein beobachtet (MATISSEK und BALTES, 2016). Aufgrund der möglichen herzmuskelschädigenden Wirkung von Erucasäure ist in der EU basierend auf der EU-Verordnung 696/2014 (vormals VO (EG) 1881/2006) ein Erucasäure-Höchstgehalt für pflanzliche Öle und Fette sowie für Lebensmittel mit zugesetzten pflanzlichen Ölen und Fetten von 50 g/kg (bezogen auf den Gesamtgehalt an Fettsäuren in der Fettphase von Lebensmitteln) bzw. 10 g/kg für Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung festgelegt (EU, 2014a).

Die Verwendung des Rapsöls vorwiegend zu Speisezwecken wurde erst durch die Züchtung erucasäurefreier Sorten (< 1 % Erucasäure) um 1970 ermöglicht, welche als „Null-Raps“ (0-Raps) bezeichnet werden (RIMBACH et al., 2015; MIEDANER, 2014). Das Fettsäuremuster dieser Raps-Züchtungen wird von Ölsäure (ca. 50 %) und Linolsäure (ca. 20 %) dominiert (MATISSEK und BALTES, 2016).

Alte Rapssorten enthalten neben Erucasäure als weitere unerwünschte Inhaltsstoffe zudem die in Kreuzblütengewächsen charakteristischerweise vorkommenden Glucosinolate (Senfölglucoside), welche bei der Zerkleinerung des Rapssamens enzymatisch u.a. zu scharf schmeckenden Isothiocyanaten (Senfölen) und Thiocyanaten (Rhodaniden) abgebaut werden (EBERMANN und ELMADFA, 2008; BELITZ et al., 2008; RIMBACH et al., 2015). Neben dem scharfen, stechenden Geruch und Geschmack zeigen Thiocyanate bei Versuchstieren goitrogene Wirkung (s. Abschnitt 1.1.2 unter „sekundäre Pflanzenstoffe in der Rapssaat“) (EBERMANN und ELMADFA, 2008; RIMBACH et al., 2015). Dadurch sind die bei der Rapsölgewinnung anfallenden proteinreichen Pressrückstände alter Rapssorten teilweise unbrauchbar, da sie nur in geringen Anteilen dem Futtermittel beigemischt werden können (MIEDANER, 2014).

In den 80er-Jahren wurden erucasäurearme und gleichzeitig glucosinolatarme Rapssorten gezüchtet, welche als „Doppelnull-Raps“ (00-Raps, Canola) bezeichnet werden und seit Ende der Achtziger Jahre für Speisezwecke praktisch ausschließlich angebaut werden (EBERMANN und ELMADFA, 2008; MIEDANER, 2014). Gemäß den Spezifikationen der EU-Verordnung 2256/2000 liegt der Erucasäuregehalt der 00-Sorten bei unter 2 % des Gesamtfettsäuregehaltes, der Glucosinolatgehalt liegt unter 25 µmol/g (EU, 2000).

Agrarökonomische Daten

2014 betrug die weltweite Raps-Anbaufläche rund 36 Millionen ha mit einer Produktionsmenge von 74 Millionen t (Ertrag ca. 20000 hg/ha). Hauptanbauländer sind Kanada, China, Indien, Deutschland und Frankreich (s. Tabelle 1). (FAO, 2017)

Tabelle 1: Rapsanbau, -ertrag und -ernte 2014 weltweit, in den Hauptanbauländern und in Österreich (Datenquelle: FAO, 2017)

	Anbaufläche [ha]	**Ertrag [hg/ha]**	**Produktionsmenge [t]**
weltweit	36 117 722	20 433	73 800 809
Kanada	8 074 600	19 264	15 555 100
China	7 587 932	19 468	14 772 210
Indien	6 645 740	11 853	7 877 000
Deutschland	1 394 200	44 810	6 247 400
Frankreich	1 503 012	36 753	5 524 094
…			
Österreich	52 800	37 557	198 300

1.1.2 Zusammensetzung der Rapssaat

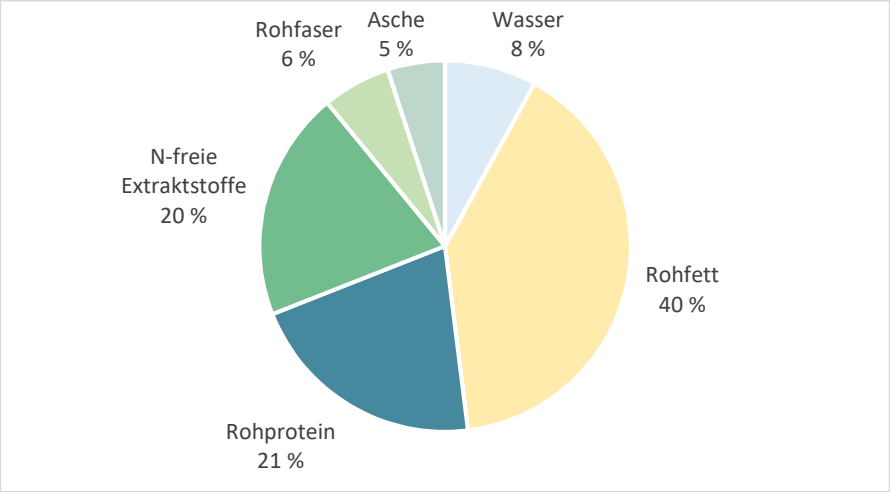

Abbildung 1: Zusammensetzung der Rapssaat (Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an LENNERTS, 1984; DLG, 2014)

Die Zusammensetzung der Rapssaat nach dem Weender-System ist in Abb. 1 dargestellt. Der Hauptbestandteil im Rapssamen ist Fett (ca. 40 %), weiters kommen Protein und Stickstoff-freie Extraktstoffe (N-freie Extraktstoffe) (zu jeweils etwa 20 %) in größeren Mengen im Rapssamen vor. Der Anteil an Rohfaser und Asche beträgt jeweils ca. 5 – 6 %. Die einzelnen Fraktionen werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

Rohfett

Der Rohfett-Gehalt im Rapssamen beträgt ca. 40 % (DLG, 2014; EBERMANN und ELMADFA, 2008; LENNERTS, 1984; VAN DOOSSELAERE, 2013). Unter dem Begriff „Rohfett“ werden nach der Weender Futtermittelanalyse jene Substanzen zusammengefasst, welche sich in Fettlösungsmitteln (z.B. Petrolether) lösen; diese Verbindungen werden auch als Lipide bezeichnet (STANGL, 2014).

Triacylglyceride sind quantitativ die bedeutendsten Lipide (STANGL, 2014). Die Neutralfette dienen den Samen als Speicherstoff (RICHTER, 1998). Das Fettsäuremuster der Triacylglyceride aktueller 00-Rapssorten setzt sich zu 53 – 63 % aus Ölsäure, 21 – 28 % Linolsäure und 10 – 16 % Linolensäure zusammen; in geringeren Mengen kommen Palmitinsäure (3 – 5 %) sowie Stearinsäure (1 – 3 %) in der Rapssaat vor (MATISSEK und BALTES, 2016; BELITZ et al., 2008; EBERMANN und ELMADFA, 2008; ACKMAN, 1990; RIMBACH et al., 2015). Der Erucasäuregehalt dieser Neuzüchtungen liegt unter 2 % (MATISSEK und BALTES, 2016).

Im Öl ausgereifter Rapssamen kommen ca. 0,3 % freie Fettsäuren vor (höhere Gehalte können bei ungeeigneter Behandlung oder Lagerung entstehen) (NIEWIADOMSKI, 1990). Als Membranlipide (polare Lipide) finden sich Phospholipide (vor allem Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol) sowie Glycolipide in der Rapssaat (NIEWIADOMSKI, 1990; HABERMEHL et al., 2008). Zu den Fettbegleitstoffen im Rapssamen zählen Phytosterole (hauptsächlich ß-Sitosterol und Campesterol sowie Sterolester wie Gramisterol und Obtusifoliol), Triterpenoidalkohole (hauptsächlich Cycloartenol und 24-methyl-cycloartanol), Hydrocarbone, Carotenoide, Tocochromanole (v.a. α- und γ-Tocopherole), Chlorophylle und Pheophytine sowie Glucosinolate (NIEWIADOMSKI, 1990; EBERMANN und ELMADFA, 2008; RIMBACH et al., 2015; MATISSEK und BALTES, 2016).

Rohprotein

Der Anteil an Rohprotein in der Rapssaat beträgt ca. 19 - 23 % (DLG, 2014; LENNERTS, 1984; VAN DOOSSELAERE, 2013). Der Begriff „Rohprotein“ umfasst neben den eigentlichen Proteinen auch andere stickstoffhaltige Verbindungen (bezeichnet als Nicht-Protein-Stickstoff- bzw. NPN-Verbindungen) (STANGL, 2014).

Etwa 80 % der Proteine im Rapssamen sind Speicherproteine (AIDER und BARBANA, 2011). Davon werden ca. 60 % durch Cruciferin (11-12S Globulin) und 20 % durch Napin (2S Albumin) gebildet, wobei das Mengenverhältnis der beiden Proteine zueinander abhängig von der Rapssorte eine größere Variabilität aufweisen kann (HÖGLUND et al., 1992;

WANASUNDARA, 2011). Die beiden Hauptspeicherproteine Cruciferin und Napin werden unter Abschnitt 1.2.1 detaillierter beschrieben.

Neben den Speicherproteinen sind in der Rapssaat zu einem geringeren Anteil Strukturproteine, hauptsächlich Oleosine, vorhanden (GHODSVALI et al., 2005; KROLL et al., 2007a; WANASUNDARA, 2011). Daneben finden sich in geringen Mengen auch verschiedene metabolische Proteine, wie Lipid-Transfer-Proteine, Proteaseinhibitoren, Calmodulin-bindende Proteine und Dehydrine (WANASUNDARA, 2011). Zudem sind als weitere Proteinbestandteile Enzyme, wie Lipase, Lipoxygenase und Myrosinase, in der Rapssaat vorhanden (NIEWIADOMSKI, 1990). Zu den NPN-Verbindungen im Rapssamen zählen etwa freie Aminosäuren, Peptide, Nucleinsäuren und Glucosinolate (NIEWIADOMSKI, 1990).

N-freie Extraktstoffe und Rohfaser

Im Rapssamen sind ca. 20 % N-freie Extraktstoffe sowie ein Rohfaser-Anteil von ca. 6 – 8 % vorhanden (LENNERTS, 1984; DLG, 2014).

Der Rohfaser-Anteil umfasst den in Säuren und Laugen unlöslichen fett-, stickstoff- und aschefreien Rückstand der Trockenmasse. Im Allgemeinen ist dieser Gruppe ein (mehr oder weniger großer) Anteil der Gerüstsubstanzen (Cellulose, Hemicellulosen, Lignin) zuzuordnen; je nach Rohmaterial bleibt jedoch ein Teil dieser Substanzen in Lösung und wird somit der Fraktion der N-freien Extraktstoffe zugeordnet. Diese Gruppe wird nur rechnerisch bestimmt und enthält alle diejenigen leichtlöslichen Stoffe, die bei den anderen Bestimmungen nicht miterfasst wurden (N-freie Extraktstoffe = organische Masse – Rohprotein – Rohfett – Rohfaser). Neben den löslichen Anteilen der Gerüstsubstanzen enthält diese Fraktion hauptsächlich Zucker, Stärke und Pektine. (STANGL, 2014)

Im Rapssamen setzen sich die N-freien Extraktstoffe sowie der Rohfaser-Anteil hauptsächlich aus Kohlenhydraten zusammen sowie aus Ligninen, die als Polymere aus Phenylpropan zu den Polyphenolen zählen (NACZK und SHAHIDI, 1990; NIEWIADOMSKI, 1990; MATISSEK und BALTES, 2016).

Lösliche Mono- und Oligosaccharide sind dabei vor allem in den Cotyledonen der Samen zu finden; dabei kommen Saccharose (und in geringen Mengen daraus stammende Fructose und Glucose), Raffinose und Stachyose als niedermolekulare Zucker in der Rapssaat vor (NACZK und SHAHIDI, 1990; NIEWIADOMSKI, 1990).

Polysaccharide finden sich hauptsächlich in den Samenschalen; dabei bildet Cellulose den Hauptbestandteil der Schalen, begleitet von Hemicellulosen (Polyosen) und Lignin (NACZK und SHAHIDI, 1990). Als weitere Polysaccharid-Bestandteile sind Pektine im Rapssamen

vorhanden; Stärke kommt nur in geringen Mengen vor (NACZK und SHAHIDI, 1990; NIEWIADOMSKI, 1990). Von den nicht-Stärke-Polysacchariden in der Rapssaat sind ca. 15 % wasserlöslich (SLOMINSKI et al., 1994).

Rohasche

Als Rohasche wird die anorganische Komponente der Trockensubstanz bezeichnet (STANGL, 2014). Der Asche-Gehalt im Rapssamen beträgt ca. 4 – 5 % (LENNERTS, 1984; DLG, 2014). Die Zusammensetzung der Mineralstoffe im Raps hängt von der Mineralstoff-Zusammensetzung des Ackerbodens ab und ist daher variabel (RODRIGUES et al., 2012). In größeren Mengen kommen im Allgemeinen Kalium und Phosphor in der Rapssaat vor, wobei Phosphor hauptsächlich in Form von Phytinsäure vorliegt (RODRIGUES et al., 2012; DOWNEY und BELL, 1990).

Sekundäre Pflanzenstoffe in der Rapssaat

Unter dem Begriff „sekundäre Pflanzenstoffe“ werden eine Vielzahl unterschiedlichster chemischer Verbindungen mit vielfältigem ökochemischen Wirkspektrum zusammengefasst, welche – im Gegensatz zu den essentiellen Primärmetaboliten (Kohlenhydrate, Proteine, Fette) – im sekundären Stoffwechsel der Pflanze synthetisiert werden und der Pflanze z.B. als Abwehr- oder Fraßschutz, als Wachstumsregulatoren oder als Farbstoffe dienen (SONNEWALD, 2014; MATISSEK und BALTES, 2016). Während in der Vergangenheit viele sekundäre Pflanzenstoffe ausschließlich als unerwünschte, antinutritive Lebensmittelbestandteile angesehen wurden, sind inzwischen zunehmend gesundheitsfördernde Effekte (etwa antioxidative, anticancerogene, antimikrobielle oder immunmodulierende Eigenschaften) vieler pflanzlicher Sekundärmetabolite bekannt (MATISSEK und BALTES, 2016; RIMBACH et al., 2015).

Im Rapssamen sind Glucosinolate, phenolische Verbindungen sowie Phytinsäure bedeutende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (KROLL et al., 2007b; SØRENSEN, 1990; THOMPSON, 1990; KOZLOWSKA et al., 1990). Diese Verbindungen (bzw. deren Abbauprodukte) sind aufgrund ihrer chemischen bzw. physiologischen und teilweise sensorischen Eigenschaften für die Nutzbarkeit der Rapssaat im Lebensmittel- und Futtermittelbereich von großer Bedeutung. Zudem sind die sekundären Pflanzenstoffe bei der Gewinnung von Rapsproteinprodukten relevant, da sie (prozessabhängig) mit den Proteinen interagieren können und damit die Qualität der Proteinprodukte beeinflussen (KROLL et al., 2007b; WANASUNDARA, 2011; AIDER und BARBANA, 2011; TAN et al., 2011). Die Verbindungen werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Glucosinolate

Glucosinolate (Senfölglucoside) kommen in den Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* als charakteristische Inhaltsstoffe vor (EBERMANN und ELMADFA, 2008; HALLER et al., 2013). Die sekundären Pflanzenstoffe dienen der Pflanze als Fraßschutz und vermutlich auch als Speicher für Stickstoff und Schwefel (SONNEWALD, 2014). Bei der Zerkleinerung der Rapssamen werden die Glucosinolate enzymatisch unter anderem zu den entsprechenden Senfölen abgebaut, welche einen scharfen, stechenden Geschmack und Geruch aufweisen und z.B. auch für die charakteristische Schärfe von Senf, Kren (Meerrettich), Radieschen und Rettich verantwortlich sind (BELITZ et al., 2008; SONNEWALD, 2014; EBERMANN und ELMADFA, 2008). Im Rapssamen wurden bisher über ein Dutzend Glucosinolate nachgewiesen, wobei drei davon mengenmäßig von Bedeutung sind: Progoitrin, Gluconapin sowie Glucobrassicanapin (LENNERTS, 1984).

Glucosinolate sind strukturell Thioglucoside (MATISSEK und BALTES, 2016). Die Grundstruktur der Glucosinolate sowie der Bildungsweg der Abbauprodukte sind in Abb. 2 dargestellt. Das abbauende Enzym, eine Thioglucosidase (Myrosinase, EC 3.2.3.1), liegt in der intakten Zelle durch Kompartimentierung von ihrem Substrat getrennt vor; erst bei der Gewebszerstörung erfolgt die hydrolytische Spaltung der Glucosinolate zu einem instabilen Zwischenprodukt, welches nachfolgend vorwiegend zu den stechend-scharfen Isothiocyanaten (Senföle) umgesetzt wird (SONNEWALD, 2014; BELITZ et al., 2008). Daneben entstehen in geringerem Umfang als Abbauprodukte der Glucosinolate Nitrile, welche teilweise toxisch wirken, sowie Thiocyanate (Rhodanide) (BELITZ et al., 2008; EBERMANN & ELMADFA, 2008; MATISSEK und BALTES, 2016). Rhodanide gelten als goitrogene Substanzen: sie hemmen die Aufnahme von Iod in der Schilddrüse, wodurch es – bei hoher Aufnahme von glucosinolathaltigen Lebensmitteln und gleichzeitig niedriger Iodzufuhr – zur Kropfbildung kommen kann (BELITZ et al., 2008). Durch Hitzeinaktivierung der Thioglucosidase kann der Entstehung der Abbauprodukte entgegengewirkt werden (HALLER et al., 2013).

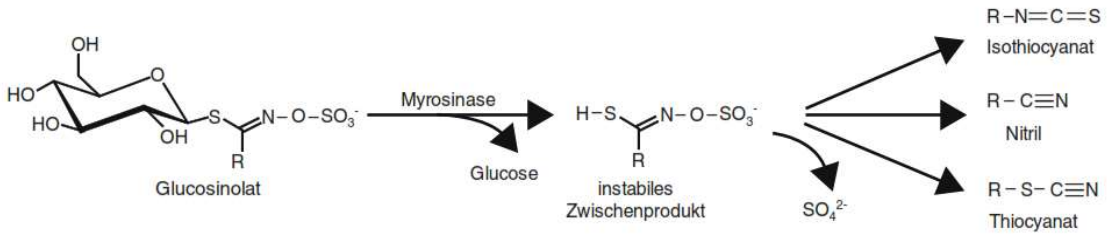

Abbildung 2: Grundstruktur der Glucosinolate und Bildungsweg der Abbauprodukte (Isothiocyanate, Nitrile und Thicyanate) durch enzymatische Hydrolyse mittels Thioglucosidase (Myrosinase) (Quelle: HALLER et al., 2013, S. 230)

Von Bedeutung sind die Spaltprodukte der Glucosinolate auch bei der Rapsölverarbeitung: die teilweise toxischen, sensorisch unerwünschten Verbindungen gehen bei der Pressung bzw. Extraktion in das Öl über und können dort bei der Fetthärtung erheblich stören (MATISSEK und BALTES, 2016; BELITZ et al., 2008). Im Zuge der Ölgewinnung erfolgt daher die Inaktivierung der Thioglucosidase durch einen geeigneten Konditionierungsschritt (Behandlung der zerkleinerten Saat mit Wasserdampf); trotzdem vorhandene Abbauprodukte der Glucosinolate können im Zuge der Raffination entfernt werden (BELITZ et al., 2008).

Wird Rapspresskuchen bzw. Rapsextraktionsschrot als Futtermittel verwendet, sind vorhandene Glucosinolate bzw. deren Spaltprodukte insofern unerwünscht, als sich die Verbindungen nachteilig auf die Gesundheit der Tiere auswirken können und aufgrund der sensorischen Eigenschaften zu einer verminderten Futteraufnahme durch das Vieh führen (LENNERTS, 1984; TRIPATHI und MISHRA, 2007; MIEDANER, 2014).

Der Glucosinolatgehalt im Raps wurde in den Achtziger Jahren durch züchterische Maßnahmen auf ca. ein Zehntel des ursprünglichen Gehaltes gesenkt: gegenwärtige Rapsvarietäten enthalten < 25 µmol Glucosinolate pro g entöltem Rapsmehl (bezogen auf die Trockenmasse), während der Glucosinolat-Gehalt alter Sorten bei 100 – 200 µmol/g TS ölfreien Rapsmehl liegt (TRIPATHI und MISHRA, 2007). Seit den späten Achtziger Jahren werden zu Speisezwecken praktisch nur noch glucosinolatarme Rapssorten (00-Raps) angebaut (RIMBACH et al., 2015; MIEDANER, 2014).

Glucosinolate zeigten in in-vitro Studien anticancerogene und antioxidative Wirkung (ELMADFA, 2015). Spaltprodukte der Glucosinolate, Isothiocyanate, weisen als gesundheitsfördernde Eigenschaften antioxidative, antimikrobielle und potenziell anticancerogene Aktivität auf (EBERMANN und ELMADFA, 2008; HALLER et al., 2013; ELMADFA, 2015).

Phenolische Verbindungen

In Pflanzen bzw. pflanzlichen Lebensmitteln sind phenolische Verbindungen sehr weit verbreitet und besitzen unterschiedlichste funktionelle Bedeutungen: die Sekundärmetaboliten fungieren etwa als Farb-, Geschmacks- oder Geruchsstoffe (STICHER, 2007; EBERMANN und ELMADFA, 2008; RIMBACH et al., 2015). Viele phenolische Verbindungen zeichnen sich durch eine potente antioxidative Wirkung aus – je nach Anzahl und Stellung der OH-Gruppen und abhängig vom pH-Wert (STICHER, 2007; EBERMANN und ELMADFA, 2008; BELITZ et al., 2008). Als gemeinsames Strukturmerkmal weisen phenolische Verbindungen mindestens einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren daran gebundenen Hydroxy-Gruppen (bzw. deren Derivate) auf (SONNEWALD, 2014; STICHER, 2007; RICHTER, 1998). Innerhalb der Stoffgruppe herrscht eine große strukturelle Vielfalt (STICHER, 2007).

Im Rapssamen ist der Gesamtgehalt an phenolischen Verbindungen wesentlich höher als in anderen Ölsaaten (KOZLOWSKA et al., 1983; NACZK et al., 1998). Im entölten Rapsmehl beträgt deren Konzentration etwa 1 – 2 % bezogen auf die Trockenmasse (SIGER et al., 2013; NACZK et al., 1998). Die dominierende phenolische Verbindung in der Rapssaat ist die *trans*-Sinapinsäure (Strukturformel der Verbindung s. Abb. 3, links) (KOZLOWSKA et al., 1983; THIYAM et al., 2009). Diese ist ein Derivat der Hydroxyzimtsäure und zählt somit zu den Phenolsäuren, welche im Allgemeinen Eigenschaften als aromatische Gerb-, Bitter- und Farbstoffe aufweisen (RICHTER, 1998; RIMBACH et al., 2015). Die Sinapinsäure liegt in der Rapssaat zum Großteil in veresterter Form vor (KOZLOWSKA et al., 1983; THIYAM et al. 2009; SIGER et al., 2013). Der vorherrschende Sinapinsäure-Ester im Rapssamen ist Sinapin, ein Cholin-Ester der Sinapinsäure (Strukturformel der Verbindung s. Abb. 3, rechts) (ZUM FELDE et al., 2007; BELITZ et al., 2008). Die phenolischen Verbindungen im Raps sind für Bitterkeit und Adstringenz verantwortlich (XU und DIOSADY, 2002).

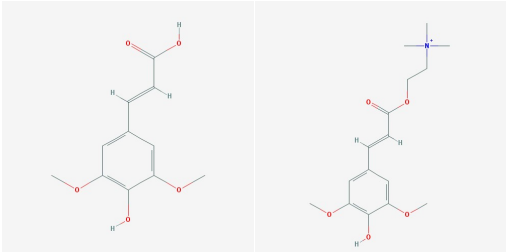

Abbildung 3: Strukturformel der trans-Sinapinsäure (links) und von Sinapin, Cholinester der Sinapinsäure (rechts) (Quelle: NCBI, 2018)

Rapsfuttermittel können bei braunlegenden Hennen mit genetischer Veranlagung zu einem fischigen Geschmack der Eier führen („Riecheier“) (EDER und ROTH, 2014; RIMBACH et al., 2015). Der Geschmacksfehler wird durch Trimethylamin (TMA) verursacht, das aus dem TMA-Prekursor Sinapin im Dickdarm der Hennen bei Fehlen des Enzyms TMA-Oxidase gebildet wird (EDER und ROTH, 2014; RIMBACH et al., 2015).

Sinapinsäure zeichnet sich durch eine stark antioxidative Aktivität aus (JUN et al, 2014). Weitere diskutierte gesundheitsfördernde Eigenschaften der Sinapinsäure sind potenzielle anticancerogene und antibakterielle Wirkung, Schutzfunktion gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen, antidiabetische sowie entzündungshemmende Wirkung (QUINN et al., 2017).

Phytinsäure

Entölte Rapssaat enthält ca. 3 – 4 % Phytinsäure (KHATTAB et al., 2010; GHODSVALI et al., 2005). Phytinsäure ist ein Hexaphosphorsäureester des *myo*-Inositols und dient der Pflanze

als Phosphatspeicher (Strukturformel s. Abb. 4) (SONNEWALD, 2014). Die Verbindung fungiert als Komplexbildner und bildet mit zweiwertigen Kationen wie z.B. Fe^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} und Mg^{2+} schwer lösliche Salze (Phytate); mit der Nahrung aufgenommene Phytinsäure kann daher die Absorption der essentiellen Mineralstoffe im Darm hemmen (RIMBACH et al., 2015). Durch technologische Prozesse, wie Erhitzung oder Teiggare (hierbei wirken sowohl pflanzeneigene als auch mikrobielle Phytasen), kann die Phytinsäure zu niedriger phosphorylierten *myo*-Inositolen hydrolysiert werden – diese Spaltprodukte weisen gegenüber der Phytinsäure eine eingeschränkte Komplexbildungsfähigkeit auf und behindern somit die Mineralstoff-Resorption im menschlichen Verdauungstrakt nicht (BELITZ et al., 2008; EBERMANN und ELMADFA, 2008).

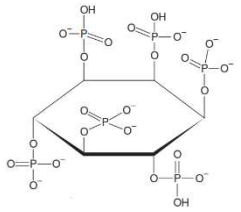

Abbildung 4: Strukturformel der Phytinsäure (Quelle: RIMBACH et al., 2015, S. 161)

Es werden anticancerogene, antioxidative, immunmodulierende, cholesterinsenkende und Blutglucose stabilisierende Wirkungen der Phytinsäure diskutiert, welche in Tierexperimenten und in-vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnten (MATISSEK und BALTES, 2016; BIESALSKI und GRIMM, 2011).

1.1.3 Verwendung der Rapssaat

In begrenzten Mengen kann Rapssamen direkt als energiedichter, fettreicher Futtermittelbestandteil in der Nutztierhaltung (v.a. bei Mastschweinen) eingesetzt werden (ROTH, 2014; LENNERTS, 1984).

Hauptsächlich wird die Rapssaat aufgrund ihres hohen Fettgehaltes zur Ölgewinnung genutzt (EBERMANN und ELMADFA, 2008). Im Allgemeinen wird Rapsöl hauptsächlich als Speiseöl verwendet (entweder kaltgepresst oder raffiniert) und nach Hydrierung als Grundstoff für die Margarineproduktion eingesetzt (RIMBACH et al., 2015; EBERMANN und ELMADFA, 2008; MATISSEK und BALTES, 2016). In der Nutztierhaltung kann Rapsöl in geringen Mengen dem Schweine-Mastfutter zugegeben werden (ROTH, 2014). Zudem findet das Öl bei der Seifenherstellung Anwendung und dient als Bestandteil technischer Fette und Öle (EBERMANN und ELMADFA, 2008; MIEDANER, 2014). Eine weitere Anwendung des

Rapsöls ist die Herstellung von Treibstoffen für Dieselmotoren („Biodiesel“) durch Umesterung der Triglyceride zu Methylestern (EBERMANN und ELMADFA, 2008; MIEDANER, 2014).

Die Gewinnung des Rapsöls kann durch Pressung und Lösungsmittelextraktion erfolgen (VAN DOOSSELAERE, 2013; EBERMANN und ELMADFA, 2008; LENNERTS, 1984). Die meisten industriellen Anlagen nutzen zur Rapsölgewinnung einen zweistufigen Prozess, bei dem die Rapssaat im ersten Schritt bis auf einen Ölgehalt von etwa 20 % mechanisch gepresst wird („Vorpressen“) und in einem darauffolgenden Schritt mittels Lösungsmittelextraktion bis auf einen Restfettgehalt von rund 1 – 2 % weiter entölt wird (VAN DOOSSELAERE, 2013; ANDERSON, 1996; WILLIAMS und HRON, 1996). Durch die Extraktion kann eine möglichst hohe Ölausbeute erzielt werden (VAN DOOSSELAERE, 2013). In kleineren Anlagen (da vergleichsweise unwirtschaftlich) wird Rapsöl alternativ auch ausschließlich mittels mechanischen Verfahren gewonnen; dabei wird die Rapssaat (mittels einmaliger Pressung über Hochleistungspressen oder mittels zweimaliger Pressung über Vor- und Fertigpressen) bis auf einen Restfettgehalt von etwa 6 – 12 % gepresst („Fertigpressen“) (VAN DOOSSELAERE, 2013; ANDERSON, 1996; WILLIAMS und HRON, 1996; LENNERTS, 1984; BOCKISCH, 2004). Die Pressung der Rapssaat erfolgt für gewöhnlich mittels kontinuierlich arbeitenden Schneckenpressen (Expellerpressen) (VAN DOOSSELAERE, 2013; WILLIAMS und HRON, 1996; LENNERTS, 1984). Eine Direktextraktion der Rapssaat ist aufgrund des hohen Ölgehaltes (ca. 40 %) nicht üblich (dieses Verfahren wird bei Samen mit einem Fettgehalt von unter 25 – 30 % durchgeführt, etwa im Falle von Soja) (VAN DOOSSELAERE, 2013; BOCKISCH, 2004; LENNERTS, 1984).

Bei der Produktion von einem Liter Rapsöl fallen ca. 1,4 kg des entölten Rückstandes an – je nach Methode der Ölgewinnung Rapspresskuchen (RPK) oder Rapsextraktionsschrot (RES) (THRÄN et al., 2016). Insgesamt ergeben sich somit große Mengen des anfallenden Nebenproduktes (WESTPHAL et al., 2003; LENNERTS, 1984). Gerade aufgrund der Biodieselproduktion ist die Menge an anfallenden RES in den letzten Jahren stark gestiegen: zwischen 1995 und 2015 hat sich die jährlich produzierte Rapsmenge weltweit mehr als verdoppelt (RODRIGUES et al., 2012; FAO, 2017).

1.1.4 Rapspresskuchen

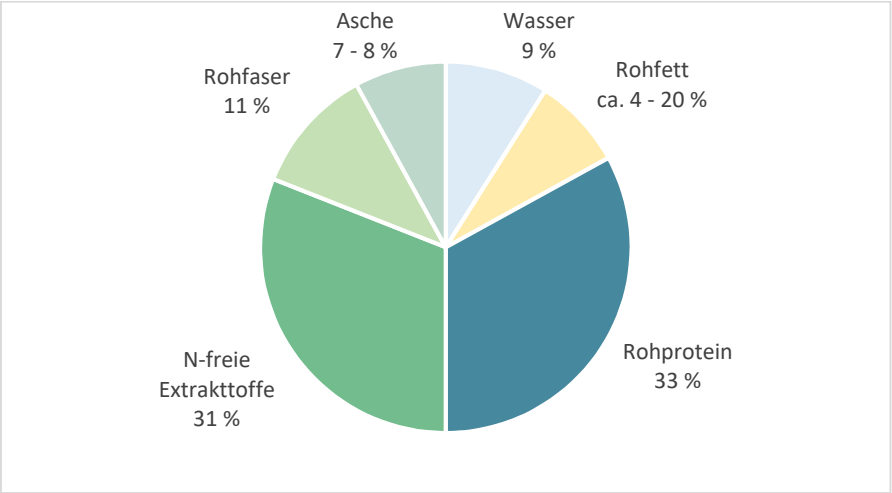

Abbildung 5: (ungefähre) Zusammensetzung von Rapspresskuchen. Der Restfettgehalt im Rapspresskuchen kann je nach Abpressgrad sehr unterschiedlich ausfallen und in einem Bereich von durchschnittlich ca. 4 - 20 % in TS liegen (Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an LENNERTS, 1984; DLG, 1997; DLG, 2014)

Wird Rapsöl ausschließlich durch mechanische Verfahren („Fertigpressen“) aus der Saat gewonnen, wird der entölte Rückstand als Rapspresskuchen (RPK; Rapskuchen, Rapsexpeller) bezeichnet (LENNERTS, 1984; BOCKISCH, 2004). Je nach Abpressgrad verbleibt dabei ein unterschiedlich hoher Restfettgehalt im RPK, welcher etwa in einem Bereich von 4 – 20 % liegen kann (DLG, 2014; DLG, 1997; SMULIKOWSKA et al., 1997; LENNERTS, 1984). Demgegenüber weist Rapsextraktionsschrot (RES), welcher durch Vorpressung und anschließende Lösungsmittelextraktion entölt wird, einen deutlich geringeren Restfettgehalt von etwa 2 – 3 % auf (DLG, 2014; DLG, 1997; LENNERTS, 1984).

Die (ungefähre) Zusammensetzung von RPK ist in Abb. 5 dargestellt. Als wesentlichen Bestandteil weist RPK einen Proteingehalt von etwa 33 % auf (LENNERTS, 1984; SMULIKOWSKA et al., 1997; DLG, 1997; DLG, 2014). Daneben bilden Faser- und Ballaststoffe einen weiteren Grundbestandteil des Pressrückstandes: die Gruppe der N-freien Extraktstoffe (ca. 31 % im RPK) und der Rohfaseranteil (ca. 11 % im RPK) werden hauptsächlich durch die Gerüstsubstanzen Cellulose, Lignin sowie durch Uronsäuren gebildet, welche zu jeweils ca. 11 – 14 % im RPK vorkommen (LENNERTS, 1984). Der Aschegehalt im RPK beträgt etwa 7 – 8 % (LENNERTS, 1984; DLG, 1997; DLG, 2014). Die angegebenen Werte können je nach Restfettgehalt des Pressrückstandes variieren.

Heutzutage findet RPK primär auf dem Futtermittelmarkt Verwendung, da er aufgrund der hohen Proteinwertigkeit eine wettbewerbsfähige Futtermittelquelle darstellt (CAMPBELL et al., 2016; TEH et al., 2014; LENNERTS, 1984). Im Gegensatz zu 00-Raps ist die Nutzung alter,

glucosinolatreicher Rapssorten als Futtermittel nur sehr begrenzt möglich, da es vom Vieh aufgrund der scharf schmeckenden Abbauprodukte der Glucosinolate nicht gut angenommen wird (MIEDANDER, 2014; LENNERTS, 1984). Zudem kann ein hoher Glucosinolatgehalt im Futter möglicherweise negative gesundheitliche Effekte mit sich bringen (TRIPATHI und MISHRA, 2007). Der hohe Gehalt an Gerüstsubstanzen, welche bezüglich der Verdaulichkeit durch Nutztiere zudem eine ungünstige Zusammensetzung aufweisen, limitiert den Einsatz von RPK bzw. RES in der Tierernährung zusätzlich (LENNERTS, 1984; RODRIGUES et al., 2012). Rapsfuttermittel finden daher vorwiegend bei Wiederkäuern Verwendung, da diese ein komplexeres Verdauungssystem besitzen (RODRIGUES et al., 2012). Den Alleinfuttermischungen von Schweinen und Geflügel können Rapsfuttermittel zu geringeren Anteilen beigemischt werden (ROTH, 2014; EDER und ROTH, 2014).

Grundsätzlich kann RPK auch als Düngemittel, ölhaltiger Brennstoff oder als Rohstoff bei der Biogasproduktion verwendet werden, wobei diese Anwendungen aus wirtschaftlichen Gründen bisher praktisch nicht relevant sind (THUNEKE et al., 2016).

Entfettete Ölsamenkuchen bzw. -schrote bieten im Allgemeinen auch die Möglichkeit zur Gewinnung pflanzlicher Proteinisolate oder -konzentrate, welche im Lebensmittelbereich eingesetzt werden können (s. Abschnitt 1.2.2) (CHEFTEL et al., 1992). Da Rapsprotein eine gute ernährungsphysiologische Qualität aufweist (s. Abschnitt 1.2.1.5) und mögliche techno-funktionelle Eigenschaften bietet (s. Abschnitt 1.2.1.4) besteht ein hohes Potenzial zur Anwendung von Rapsprotein in Lebensmitteln und somit zur Wertsteigerung von RPK bzw. RES (RODRIGUES et al., 2012; AKBARI und WU, 2015; AIDER und BARBANA, 2011; BOS et al., 2007).

1.2 Rapsproteine

1.2.1 Allgemeines

Der Großteil der Proteine des Rapssamens sind Speicherproteine, wobei (abhängig von der Rapssorte) etwa 60 % des Gesamtproteins in reifer Rapssaat durch Cruciferin (11-12S Globulin) und etwa 20 % durch Napin (2S Albumin) gebildet werden (HÖGLUND et al., 1992; WANASUNDARA, 2011).

Speicherproteine dienen der Pflanze in erster Linie als Aminosäurereserve bei der Keimung und dem anschließenden Keimlingswachstum (RICHTER, 1998). Sie werden im Pflanzensamen typischerweise in Proteinspeichervakuolen eingelagert – für eine Verwertung im Rahmen des normalen Zellstoffwechsels stehen die Speicherproteine der Pflanze dabei nicht zur Verfügung (HERMAN und LARKINS, 1999; RICHTER, 1998). Die pflanzlichen

Speicherproteine liegen häufig als Gemische verschiedener Polypeptide vor und bilden oft große, multimere Komplexe (RICHTER, 1998; SONNEWALD, 2014).

Die Klassifizierung der Proteine erfolgt auf Grundlage ihres Löslichkeitsverhaltens: nach T. B. Osborne lassen sich Proteine in vier Gruppen („Osborne-Fraktionen“) einordnen, wobei man zwischen den wasserlöslichen Albuminen, in (neutraler) Salzlösung löslichen Globulinen, in wässrigem Ethanol löslichen Prolaminen und den ausschließlich in Säuren und Basen löslichen Glutelinen unterscheidet (BELITZ et al., 2008; EBERMANN und ELMADFA, 2008; MATISSEK und BALTES, 2016). Der Sedimentationskoeffizient S (angegeben in Svedberg-Einheiten; 1S = 10^{-13} s) wird zur vergleichenden Charakterisierung der Größe biologischer Partikel herangezogen (CHRISTEN et al., 2016). Der Parameter beschreibt die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels im Zentrifugalfeld einer Ultrazentrifuge, welche neben der Masse des Partikels auch von dessen Form und Dichte abhängig ist (CHRISTEN et al., 2016).

Globuline bilden im Allgemeinen die Hauptspeicherproteine zweikeimblättriger Samen (RICHTER, 1998). Sie werden auf Basis ihres Sedimentationskoeffizienten in zwei Gruppen eingeteilt, die sich hinsichtlich ihrer Molekülstruktur unterscheiden: 7-8S Globuline (Vicilin-Typ) bilden Heterotrimere von 150 – 200 kDa und kommen als Hauptbestandteile in Leguminosen, Baumwollsamen, Palmengewächsen und Kakao vor (SHEWRY und CASEY, 1999; RICHTER, 1998). 11-12S Globuline (Globuline vom Legumin-Typ) bilden (soweit bekannt) Hexamere von ca. 320 kDa; neben dem Cruciferin aus Raps oder der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zählen zu dieser Gruppe etwa das Helianthinin der Sonnenblume, das Glycinin aus Soja oder das Legumin der Erbsen und Wicken (RICHTER, 1998; CASEY, 1999).

Albumine spielen als Speicherproteine eine eher untergeordnete Rolle; dennoch sind sie in kleineren Mengen in den Samen der Dikotyledonen weit verbreitet und kommen dort meist zusammen mit 11-12S Globulinen vor (RICHTER, 1998; SHEWRY und CASEY, 1999).

Daneben sind Prolamine und Gluteline typische Bestandteile einkeimblättriger Pflanzen (Monokotyledonen) und bilden die Hauptspeicherproteine der Getreidearten (außer Hafer und Reis) (RICHTER, 1998; SHEWRY und CASEY, 1999).

Napin und Cruciferin unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau und weisen damit unterschiedliche Eigenschaften auf (PERERA et al., 2016). Die beiden Speicherproteine werden in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.2.1.1 Cruciferin

Cruciferin ist ein neutrales (isoelektrischer Punkt, pI ca. 7,2), hochmolekulares 11-12S Globulin, das aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist (SCHWENKE, 1990; AIDER und BARBANA, 2011). Jede Untereinheit besteht aus zwei Domänen: einer α-Polypeptidkette (Molekülmasse M ca. 30 kDa) und einer ß-Polypeptidkette (M ca. 20 kDa) (NIETZEL et al., 2013; WITHANA-GAMAGE et al., 2013). Die beiden Domänen sind über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (NIETZEL et al., 2013; WITHANA-GAMAGE et al., 2013). Die α- und β-Ketten liegen in verschiedenen Isoformen vor bzw. unterscheiden sich aufgrund posttranslationaler Modifikationen; mittels Massenspektrometrie wurden bisher insgesamt über 30 verschiedene Formen des Cruciferins bestimmt (NIETZEL et al., 2013).

Die Quartärstruktur des Cruciferins besteht aus mehreren (höchstwahrscheinlich sechs oder acht) Untereinheiten (siehe folgende Absätze); die Molekülmasse des Rapsglobulins liegt dementsprechend in einem Bereich von ca. 300 – 400 kDa (PLIETZ et al., 1983; CASEY, 1999; DELSENY und RAYNAL, 1999; NIETZEL et al., 2013).

Ein hypothetisches Modell für die Quartärstruktur des Cruciferins aus *B. napus* wurde von PLIETZ et al. (1983) erstellt (untersucht mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung): das 11-12S Globulin bildet dabei ein trigonales Antiprisma, welches aus sechs Untereinheiten zusammengesetzt ist; dargestellt in Abb. 6 (PLIETZ et al., 1983; PLIETZ et al., 1986; SCHWENKE et al., 1983; SCHWENKE, 1990; WANASUNDARA, 2011). Diese hexamere Quartärstruktur wurde auch für 11-12S Globuline anderer zweikeimblättriger Pflanzensamen beschrieben, etwa dem Glycinin aus Soja (*Glycine max*), dem Helianthinin aus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) oder dem Cruciferin der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), und wird daher als typische Struktur der 11-12S Globuline der Dikotyledonen angenommen (PLIETZ et al., 1986; PLIETZ et al., 1983; SCHWENKE, 1990; CASEY, 1999; DELSENY und RAYNAL, 1999; RICHTER, 1998; WITHANA-GAMAGE et al., 2013; ADACHI et al., 2003).

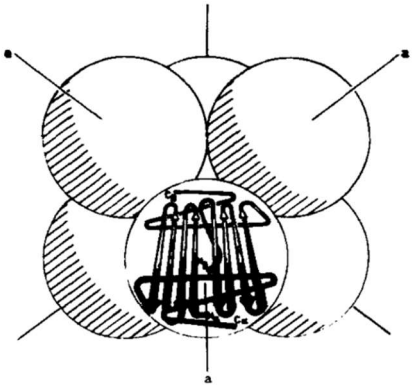

Abbildung 6: Hypothetisches Modell der 11-12S Globuline aus Pflanzensamen auf Basis von Röntgenstreuungsspektren nach PLIETZ et al., 1987. Sechs Untereinheiten bilden ein trigonales Antiprisma, wobei jedes Monomer aus einer α- und einer β-Polypeptidkette zusammengesetzt ist (Quelle: PLIETZ et al., 1987 übernommen aus SCHWENKE, 1990, S. 229)

Ein weiteres Modell der Quartärstruktur des Rapssamenglobulins wurde von NIETZEL et al. (2013) erstellt, wonach der Cruciferin-Komplex in *B. napus* aus acht Untereinheiten zusammengesetzt ist (untersucht mittels Gelelektrophoresemethoden, Massenspektrometrie und single particle Elektronenmikroskopie; das Proben-Protein wurde unter nativen Bedingungen aus reifer Rapssaat isoliert). Das Cruciferin-Modell nach NIETZEL et al. besteht aus zwei Tetrameren, welche in antiparalleler Position zueinander angeordnet sind; in der Mitte des oktameren Proteinkomplexes befindet sich eine Pore (NIETZEL et al., 2013). Abb. 7 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Cruciferin-Isolates aus *B. napus* (a, b) sowie das daraus abgeleitete 3D-Modell des Cruciferins nach NIETZEL et al. (2013) (c).

Als mögliche Erklärung für die Unterschiedlichkeit der beiden Modelle führen NIETZEL et al. (2013) zum einen den Einfluss der Probenaufbereitung auf die native Form des Proteins an: Verwendung entfetteter Rapsschrote für industrielle Zwecke oder NaCl-Extraktion, wie dies in vorangegangenen Studien erfolgte, könnten diese beeinträchtigen. Die Quartärstruktur der 11-12S Globuline könne sich außerdem innerhalb verschiedener Spezies unterscheiden [siehe etwa WITHANA-GAMAGE et al. (2013) über die Struktur von Cruciferin aus *Arabidopsis thaliana*; ADACHI et al. (2003) über Glycinin aus Sojabohnen]. Abhängig vom Expressionssystem, welches für die Globulin-Biosynthese verwendet wurde, sei eine unterschiedliche Quartärstruktur auch innerhalb derselben Spezies möglich [siehe etwa TANDANG-SILVAS et al. (2010) über die Struktur von Procruciferin, gewonnen mittels Expressionssystem aus *E. coli*]. (NIETZEL et al., 2013)

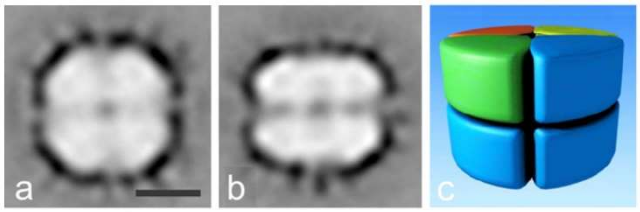

Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Cruciferin-Isolates aus Rapssamen in der Aufsicht (a) und Seitenansicht (b) sowie ein daraus abgeleitetes Modell des octameren Cruciferin-Komplexes aus *B. napus* (die Länge des Balkens beträgt 5 nm) (Quelle: Darstellung modifiziert entnommen aus NIETZEL et al., 2013, S. 2243)

Die Sekundärstruktur des Cruciferins ist durch einen relativ hohen Anteil an β-Faltblatt-Konformation (ca. 40 – 50 %) sowie einen geringen Anteil an α-Helix-Konformation (7 – 9 %) gekennzeichnet (WITHANA-GAMAGE et al., 2013; PERERA et al., 2016). Die Sekundärstrukturelemente der Cruciferin-Untereinheiten sind in der Darstellung in Abb. 8 anhand des trimären Procruciferins veranschaulicht, welches bei der Bildung des (reifen) 11-12S Globulins im Pflanzensamen als Zwischenstufe auftritt (DELSENY und RAYNAL, 1999).

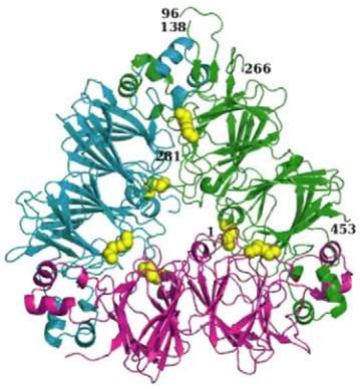

Abbildung 8: Gesamtstruktur des trimären Procruciferins zur Veranschaulichung der Sekundärstrukturelemente der Cruciferin-Untereinheiten. Die drei Untereinheiten sind jeweils in grüner, blauer und roter Farbe dargestellt, Disulfidbrücken sind gelb gekennzeichnet (Quelle: Tandang-Silvas et al., 2010, S. 1434)

1.2.1.2 Napin

Napin ist ein basisches (pI ca. 11), niedermolekulares 2S Albumin (ERICSON et al., 1986; AKBARI und WU, 2015). Das Rapsalbumin besteht aus zwei Polypeptidketten, welche Molekülmassen von jeweils ca. 9 kDa und 4 kDa aufweisen (ERICSON et al., 1986). Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (ERICSON et al., 1986; RICO et al., 1996). Die längere Kette weist zudem zwei intramolekulare Disulfidbrücken auf, welche die Stabilität des Proteins verstärken (RICO et al., 1996).

Im Rapssamen liegt das Protein als komplexes, heterogenes Gemisch verschiedener Isoformen vor, zumal es von einer Multigenfamilie codiert wird, welche zumindest 16 Gene umfasst (GEHRIG et al., 1996; SCOFIELD und CROUCH, 1987). Zudem sind Unterschiede bei den proteolytischen Prozessen im Zuge der Proteinreifung Grund für den hohen Grad an Polymorphie des Proteins (MONSALVE et al., 1990; MURÉN et al., 1995). Die Isoformen der Napin-Fraktion weisen Molekülmassen zwischen 12 kDa und 15 kDa auf, wobei hauptsächlich höhermolekulare Formen von ca. 14 kDa dokumentiert wurden (PERERA et al., 2016; SCHMIDT et al., 2004; GEHRIG et al., 1996; RICO et al., 1996; MONSALVE et al., 1990; MONSALVE et al., 1991). Eine niedermolekulare 12 kDa-Fraktion stellt eine Minorkomponente dar (MONSALVE et al., 1991).

Schätzungen bezüglich der Sekundärstruktur des Napins auf Basis von CD-Spektren lassen auf einen hohen Gehalt von α-Helix-Struktur schließen (MURÉN et al., 1996; SCHMIDT et al., 2004). Die Angaben zu den jeweiligen Anteilen der Strukturelemente in der Literatur variieren zwischen 25 – 58 % α-Helix und 7 – 38 % ß-Faltblatt (KRZYZANIAK et al., 1998; SCHMIDT et al., 2004; SCHWENKE et al., 1975, S. 161 ff. zitiert nach SCHWENKE, 1990, S. 234). Abb. 9 zeigt eine schematische Darstellung des Napins mit veranschaulichten

Sekundärstrukturelementen. Die Helix-Konformation weist eine hohe pH-Stabilität auf (SCHMIDT et al., 2004; MURÉN et al., 1996; PERERA et al., 2016). Das Vorhandensein von vier Disulfidbrücken erlaubt eine kompakte Packung der Napin-Moleküle (WANASUNDARA et al., 2016).

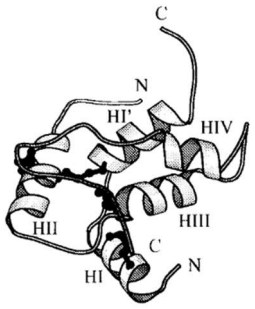

Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Napin-Isoform (BnIb) mit veranschaulichten Sekundärstrukturelementen (Quelle: RICO et al., 1996, S. 15678)

1.2.1.3 Allgemeine Eigenschaften der Rapsproteine

Die beiden Hauptspeicherproteine aus *B. napus* weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen divergierende Eigenschaften auf (PERERA et al., 2016). Aufgrund des hohen Anteils an α-Helix-Konformation sowie der Stabilisierung der Struktur durch Disulfidbrücken weist das niedermolekulare Napin eine stabile, kompakte Bauweise auf und reagiert unempfindlicher gegenüber pH- und T-Einflüssen als das hochmolekulare, oligomere Cruciferin, dessen Struktur hauptsächlich durch nicht-kovalente Bindungen stabilisiert wird (WU und MUIR, 2008; PERERA et al., 2016; WANASUNDARA et al., 2012). Während Napin über den gesamten pH-Bereich stabil und löslich ist, reagiert Cruciferin empfindlich auf saure Umgebungsbedingungen: ein niedriger pH-Wert (pH 2 – 4) bewirkt den Verlust der nativen Konformation des Proteins (WANASUNDARA et al., 2012; PERERA et al., 2016). Die Auffaltung der Proteinstruktur hat die Freilegung hydrophober Bereiche im Inneren des Moleküls zur Folge, wodurch die Oberflächenhydrophobizität des Cruciferins erhöht wird und folglich die Aggregation des Proteins resultiert (PERERA et al., 2016).

Bei Hitzeeinwirkung (im neutralen Milieu) denaturiert Cruciferin in einem Temperatur-Bereich von ca. 80 °C – 90 °C (WU und MUIR, 2008; PERERA et al., 2016; MOHAMAD RAMLAN et al., 2002). Die Denaturierungstemperatur von Napin liegt über 100 °C (WU und MUIR, 2008; PERERA et al., 2016; KRZYZANIAK et al., 1998).

1.2.1.4 Techno-funktionelles Potenzial von Rapsproteinisolaten

Proteine können im Allgemeinen abhängig von ihrer Struktur unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen, welche insbesondere bei der Anwendung in Lebensmitteln von Interesse sind (z.B. Bildung bzw. Stabilisierung von Emulsionen oder Schäumen, Gel- oder

Filmbildung, Bindung von Aromastoffen etc.) (SIKORSKI, 2001a; CHEFTEL et al., 1992). Die (native) Struktur von Proteinen, welche in Form von Konzentraten oder Isolaten als Lebensmittelzutaten Anwendung finden, wird im Allgemeinen durch die Aufbereitungsverfahren des Pflanzenmaterials beeinflusst, wodurch folglich auch die funktionellen Eigenschaften der Proteine verändert werden (SIKORSKI, 2001a; ZAYAS, 1997; CHEFTEL et al., 1992). Grundsätzlich bewirkt der Verlust der nativen Proteinkonformation, also die Proteindenaturierung (verursacht etwa durch harsche Temperatur- oder pH-Wert-Einflüsse), die Abnahme der Proteinlöslichkeit und somit die Veränderung der funktionellen Proteineigenschaften (CHEFTEL et al., 1992; SIKORSKI, 2001a). Die funktionellen Eigenschaften von Rapsproteinen sind demzufolge einerseits von den unterschiedlichen Prozessbedingungen im Zuge der Proteinisolierung abhängig (MANAMPERI et al., 2011; KARACA et al., 2011; TEH et al., 2014). Zudem hat das Ausgansmaterial (Rapsvarietät, Qualität und technologische Vorgeschichte) Einfluss auf die Erreichbarkeit der funktionellen Eigenschaften der Rapsproteine (ALUKO und MCINTOSH, 2001; DAS PURKAYASTHA et al., 2014; KHATTAB und ARNTFIELD, 2009; ZAYAS, 1997). Die Proteinzusammensetzung von Rapsproteinisolaten (Anteil an Cruciferin bzw. Napin), welche zugleich von der Methode der Proteinisolierung abhängt, ist bezüglich der funktionellen Eigenschaften naturgemäß ebenso von Bedeutung, da Cruciferin und Napin (wie unter Abschnitt 1.2.1.3 beschrieben) unterschiedliche Molekülstrukturen und damit unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Zusätzlich kann die Anwesenheit sekundärer Pflanzenstoffe die Proteineigenschaften aufgrund (prozessabhängiger) Wechselwirkungen beeinflussen (s. auch Abschnitt 1.2.4.3) (KROLL et al., 2007b; WANASUNDARA et al., 2016). Obwohl bezüglich der funktionellen Eigenschaften von Rapsproteinen bereits zahlreiche Studien veröffentlicht wurden, ist es somit schwierig, zu einer schlüssigen Einschätzung derselben zu gelangen – nicht zuletzt auch aufgrund unzureichender Methodenstandardisierung bezüglich der Bewertung funktioneller Eigenschaften von Proteinen (WANASUNDARA et al., 2016; CHEFTEL et al., 1992). Grundsätzlich weisen Rapsproteine Emulgier-, Schaum- und Geliereigenschaften auf, welche in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

Stabilisierung disperser Mehrphasensysteme – Emulgier- und Schaumeigenschaften von Rapsproteinen

Die Fähigkeit von Proteinen, emulgierend bzw. schaumbildend zu wirken, beruht im Allgemeinen auf deren Grenz- bzw. Oberflächenaktivität (WESTPHAL et al., 2003). Bei Emulsionen und Schäumen handelt es sich jeweils um disperse Systeme zweier oder mehrerer nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten (Emulsionen) bzw. um Dispersionen von Gasen in Flüssigkeiten (Schäume) (BELITZ et al., 2008). Solche Systeme sind

thermodynamisch instabil, weshalb eine spontane Phasentrennung auftritt (das thermodynamische Gleichgewicht stellt sich erst bei Erreichen der kleinstmöglichen Phasengrenzfläche, also der vollkommenen Entmischung der Dispersion, ein) (DAMODARAN, 2005; WILDE, 2000). Die Geschwindigkeit des Phasenzerfalls kann jedoch beeinflusst werden, indem die Grenzflächenspannung (zwischen zwei flüssigen Phasen) bzw. Oberflächenspannung (zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase) zwischen der kontinuierlichen Phase und den Tröpfchen bzw. Gasbläschen verringert wird (DAMODARAN, 2005). Proteine können aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Grenz- bzw. Oberflächenspannung in einem dispersen System herabsetzen, indem sie an der Grenzfläche adsorbieren (BELITZ et al., 2008). Die hydrophoben Bereiche der amphiphilen Moleküle lagern sich dabei jeweils an der Öl- bzw. Gasphase an (DAMODARAN, 2005). Der Grenzflächenadsorption folgt die Oberflächendenaturierung der Proteinmoleküle; die partiell aufgefalteten Proteine assoziieren und bilden damit stabilisierende, viscoelastische Grenz- bzw. Oberflächenfilme zwischen den Phasen aus, welche das Zusammenfließen der dispergierten Phase verhindern (BELITZ et al., 2008; WILDE, 2000; ZAYAS, 1997). Die Eignung eines Proteins als Emulgator bzw. die Fähigkeit eines Proteins zur Schaumbildung ist umso größer, je schneller es zur Grenzfläche diffundiert und je leichter es dort (partiell) denaturiert wird (BELITZ et al., 2008).

Die Emulgier- und Schaumeigenschaften von Rapsproteinen werden grundsätzlich durch die Methode der Proteinisolierung, durch die Proteinzusammensetzung (Anteil an Cruciferin/Napin) sowie durch die Anwesenheit anderer Verbindungen (etwa sekundäre Pflanzenstoffe) bestimmt (WANASUNDARA, 2011). Im Allgemeinen lässt sich auf Grundlage unterschiedlicher Studien feststellen, dass Rapsproteinisolate, welche etwa mittels Membranverfahren gewonnen wurden, gegenüber isoelektrisch gefällten Proteinisolaten bessere funktionelle Eigenschaften aufzuweisen scheinen (zu den Methoden der Proteingewinnung aus entölter Rapssaat s. Abschnitt 1.2.2) (VON DER HAAR et al., 2014; YOSHIE-STARK et al., 2008; KARACA et al., 2011; DONG et al., 2011). Dies könnte etwa auf die Anwesenheit sekundärer Pflanzenstoffe zurückzuführen sein, deren Konzentration durch die Anwendung von Membranfiltrationsverfahren (s. Abschnitt 1.2.2.3) reduziert werden kann; sekundäre Pflanzenstoffe können (prozessabhängig) mit den Proteinen interagieren, was sich negativ auf die Emulgier- und Schaumeigenschaften der Rapsproteine auswirken kann (DAS PURKAYASTHA et al., 2014; KROLL et al., 2007b).

Besonders hinsichtlich der Emulgiereigenschaften von Rapsproteinisolaten wurden (abhängig von der Methode der Proteingewinnung und somit auch von der Zusammensetzung der Proteinisolate) in verschiedenen Studien unterschiedliche Einschätzungen publiziert, sodass sich keine generelle Bewertung bezüglich der Emulgiereigenschaften von Rapsproteinen

schlussfolgern lässt (siehe etwa CHEUNG et al., 2014; CHEUNG et al., 2015; WU und MUIR, 2008; YOSHIE-STARK et al., 2008; KARACA et al., 2011; DONG et al., 2011; TAN et al., 2014a; MOHAMAD RAMLAN et al., 2002; ALUKO und MCINTOSH, 2001; MALABAT et al., 2001; DAS PURKAYASTHA et al., 2014; NITECKA und SCHWENKE, 1986; NITECKA et al.; 1986, VON DER HAAR et al., 2014; KROLL, 1991). Weniger stark beeinflusst von der Methode der Proteingewinnung konnten sowohl für Rapsproteinisolate gemischter Zusammensetzung als auch für die beiden Rapsproteine Cruciferin und Napin in isolierter Form durchwegs gute Schaumbildungs- und Schaumstabilisierungseigenschaften nachgewiesen werden, welche in vergleichenden Untersuchungen gegenüber den Schaumeigenschaften von Sojaprotein und teilweise auch Eiklarpulver besser abschnitten (NITECKA et al., 1986; NITECKA und SCHWENKE, 1986; DONG et al., 2011; VON DER HAAR et al., 2014).

Gelbildungseigenschaften von Rapsproteinen

Die Bildung von Proteingelen erfolgt im Allgemeinen durch die Zusammenlagerung von denaturierten Proteinmolekülen zu einer geordneten Netzstruktur (CHEFTEL et al., 1992). Das kohäsive Proteinnetzwerk liegt dabei als disperse Phase in einem Dispersionsmittel vor (BELITZ et al., 2008). Abhängig von Proteinstruktur, Zusammensetzung des Mediums und Prozessparametern bei der Gelbildung können hydrophobe Bindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen sowie Disulfidbrücken als Bindungskräfte an der Stabilisierung des Proteinnetzwerkes beteiligt sein (CHEFTEL et al., 1992). Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lösungsmittel sowie elektrostatische Abstoßung verhindern Proteinassoziationen und -aggregationen (CHEFTEL et al., 1992). Gelbildungsmechanismen, Gelstrukturen und -Eigenschaften können unterschiedlich sein und werden von der molekularen Struktur des jeweiligen Proteins bestimmt (CHEFTEL et al., 1992).

Cruciferin bildet bei Erhitzung ($T > 90$ °C, $pH \geq 4$) opake, unelastische Gele, wobei die Gelstärke mit steigender Proteinkonzentration, steigender Erhitzungstemperatur, steigendem pH-Wert und sinkender Ionenstärke zunimmt (MOHAMAD RAMLAN et al., 2002; TAN et al., 2014b; KIM et al., 2016a; KIM et al., 2016b; SCHWENKE et al., 1998). Im sauren Bereich ($pH \leq 4$) präzipitiert das Globulin, wodurch unter diesen Bedingungen keine Gelbildung stattfindet (TAN et al., 2014b). Napin bildet bei Erhitzung schwache, instabile Gele, welche zur Syneräse neigen (SCHWENKE et al., 1998; TAN et al., 2014b). Im Gegensatz zu Cruciferin geliert Napin auch im sauren Bereich (pH 4) (TAN et al., 2014b). Die Gelbildungseigenschaften von Rapsproteinisolaten, welche aus einem Gemisch der beiden Proteinfraktionen bestehen, werden hauptsächlich durch Cruciferin bestimmt (SCHWENKE et al., 1998). Die Gelstärke nimmt mit steigendem pH-Wert (pH 5 – 9) zu, wobei optimale Gelbildungseigenschaften im

alkalischen Bereich erreicht werden; im sauren Milieu (pH ≤ 4) findet keine Gelbildung statt (KIM et al., 2016a; TAN et al., 2014b; SCHWENKE et al., 1998). Die Gele der Rapsproteinisolate sind opak und im Vergleich zu Sojaproteingelen relativ unelastisch (TAN et al., 2014b; KIM et al., 2016a; KIM et al., 2016b; SCHWENKE et al., 1998).

Die Gelbildungseigenschaften von Rapsproteinen werden durch die Anwesenheit von NaCl beeinflusst (während NaCl einen negativen Einfluss auf die Gelbildungseigenschaften der reinen Rapsproteinfraktionen Cruciferin und Napin ausübt, konnte ein positiver Effekt höherer Ionenstärke auf Rapsproteinisolat-Gele hinsichtlich derselben Aspekte festgestellt werden) (TAN et al., 2014b). Aufgrund der Farbe und der opaken Erscheinung der Rapsprotein-Gele sowie der pH-Anforderungen (hohe Gelstärken werden nur bei alkalischen Bedingungen erreicht) ist der Einsatz von Rapsproteinen als Gelbildner in Lebensmitteln grundsätzlich eingeschränkt (TAN et al., 2014b; KIM et al., 2016a). Durch chemische Modifizierungen, wie Succinylierung oder Acetylierung, können die Gelbildungseigenschaften von Rapsproteinisolaten jedoch ggf. beeinflusst werden, etwa hinsichtlich pH- und T-Bereich der Gelierung, Stabilität der Gele, Einfluss von NaCl auf die Gelbildung oder hinsichtlich der Transparenz der Gele (PAULSON und TUNG, 1989; SCHWENKE et al., 1998).

In Abb. 10 und 11 sind Proteingele abgebildet, welche von YANG et al. (2014) durch Erhitzung einer napinreichen bzw. cruciferinreichen Suspension (15 %, w/v) auf 120 °C bei unterschiedlichen pH-Werten erhalten wurden.

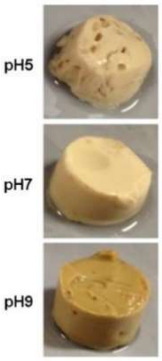

Abbildung 11: Gele eines napinreichen Rapsproteinisolates (15 %, w/v), gebildet bei 120 °C und verschiedenen pH-Werten (pH 5, 7, 9) (Quelle: modifiziert entnommen aus YANG et al., 2014, S. 234)

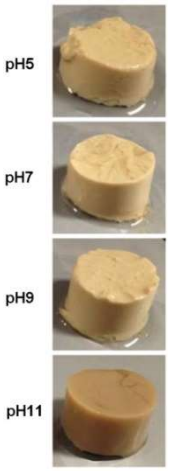

Abbildung 10: Gele eines cruciferinreichen Rapsproteinisolates (15 %, w/v), gebildet bei 120 °C und verschiedenen pH-Werten (pH 5, 7, 9) (Quelle: modifiziert entnommen aus YANG et al., 2014, S. 234)

1.2.1.5 Ernährungsphysiologische Qualität von Rapsprotein

Die Proteinqualität ist im Allgemeinen ein Maß dafür, wieviel körperspezifisches Protein aus dem aufgenommenen Nahrungsprotein gebildet werden kann (ELMADFA, 2015). Dabei ist einerseits die Aminosäurezusammensetzung (AS-Zusammensetzung) des Proteins von Bedeutung (Gehalt an essentiellen AS sowie das Verhältnis der essentiellen zu den nicht essentiellen AS), sowie andererseits die Bioverfügbarkeit der im Verdauungsprozess freigesetzten AS (dies umfasst die Verdauung des Proteins, die Absorbierbarkeit der im Verdauungsprozess freigesetzten AS, den Transport der AS zu den Zielzellen sowie die Aufnahme in den Zellen) (ELMADFA, 2015; ELMADFA und LEITZMANN, 2015).

Die Aminosäurezusammensetzung von Rapsprotein ist im Allgemeinen ausgewogen und im Abgleich mit dem FAO/WHO-Referenzprotein[1] für die menschliche Ernährung günstig (LENNERTS, 1984; WESTPHAL et al., 2003). Rapsprotein besitzt einen hohen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren (Methionin und Cystein), wobei besonders das Rapsalbumin Napin einen relativ hohen Gehalt an Cystein aufweist (LENNERTS, 1984; SCHWENKE, 1990; CAMPBELL et al., 2016). Der Gehalt an Lysin ist im Vergleich zu Sojaprotein nur geringfügig niedriger (LENNERTS, 1984). Die Proteinzusammensetzung und somit das Aminosäureprofil von Rapsproteinisolaten ist von den Prozessen der Proteingewinnung abhängig (AIDER und BARBANA, 2011).

Da Rapsprotein bisher quasi ausschließlich in der Nutztierfütterung (in Form von RES oder RPK) eingesetzt wird, sind Angaben zur Bioverfügbarkeit von Rapsprotein aus Isolaten für die menschliche Ernährung noch nicht ausgiebig beschrieben (CAMPBELL et al., 2016). Eine Studie zum Nährwert eines Rapsproteinisolates beim Menschen wurde von BOS et al. (2007) durchgeführt; die Proteinzusammensetzung des untersuchten Produktes besteht aus etwa 37 % Cruciferin und 41 % Napin. Trotz niedriger wahrer Verdaulichkeit weist das Proteinisolat eine ausgezeichnete postprandiale biologische Wertigkeit[2] auf, welche etwa mit Milchprotein vergleichbar ist. (BOS et al., 2007)

Die niedrige Verdaulichkeit ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in der Rapssaat sowohl Napin als auch Cruciferin betreffend Proteinfraktionen enthalten sind, welche aufgrund ihrer sehr kompakten Struktur gegenüber der Hydrolyse durch Pepsin teilweise resistent sind (BOS

---

[1] Das FAO/WHO-Referenzprotein enthält alle essentiellen Aminosäuren und weist hinsichtlich der biologischen Wertigkeit ein optimales Verhältnis von essentiellen zu nicht-essenziellen Aminosäuren auf (ELMADFA, 2015).

[2] Die biologische Wertigkeit ist ein Maß dafür, in welchem Umfang ein Nahrungsprotein zur Synthese von körpereigenem Protein genutzt werden kann (ELMADFA, 2015).

et al., 2007). Diese Verdauungsenzym-resistenten Proteinaggregate können bei Erhitzungsprozessen im Zuge der Rapsölgewinnung durch die Einwirkung feuchter Hitze und Druck entstehen (HEIM und KREBS, 2018). Die Verdaulichkeit und somit die Wertigkeit des Proteins könnte etwa durch den Einsatz hydrolysierter Rapsproteine noch erhöht werden. (BOS et al., 2007)

1.2.1.6 Allergenes Potenzial von Rapsprotein

Sowohl Napin als auch Cruciferin weisen allergenes Potenzial auf (PUUMALAINEN et al., 2015). Beide Proteine teilen hohe strukturelle Ähnlichkeit mit allergenen Senfsamenproteinen von *Sinapis alba* (weißer Senf) und *Brassica juncea* (brauner Senf) – eine Kreuzreaktivität zwischen Raps- und Senfproteinen ist daher wahrscheinlich (FDA, 2010).

Als Auslöser der Senfallergie unterliegt Senf in der EU der Kennzeichnungspflicht nach der europäischen Lebensmittel-Informationsverordnung (VO (EU) Nr. 1169/2011) und muss somit im Zutatenverzeichnis von Nahrungsmitteln besonders hervorgehoben werden (EU, 2011). Gemäß der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470 muss folglich auch Rapssamenprotein als neuartige Lebensmittelzutat den Hinweis tragen, dass diese Zutat bei Verbrauchern mit Allergie gegen Senf (und daraus gewonnenen Erzeugnissen) allergische Reaktionen auslösen kann (EU, 2017).

1.2.2 Gewinnung von Protein aus Rapspresskuchen

Im Allgemeinen können Proteine in Form von Proteinkonzentraten oder -Isolaten aus entölten Pflanzensamen gewonnen werden (CHEFTEL et al., 1992; RODRIGUES et al., 2012).

Proteinkonzentrate weisen einen Proteingehalt von zumindest 65 % in Trockensubstanz (TS) auf (CHEFTEL et al., 1992; RODRIGUES et al., 2012). Der Rest besteht im Allgemeinen zum Großteil aus unlöslichen Polysacchariden (15 – 25 %) sowie in geringerem Maße aus Mineralstoffen (4 – 6 %) und Lipiden (0,3 – 1,2 %) (CHEFTEL et al., 1992). Üblicherweise werden Proteinkonzentrate aus dem entölten Pflanzenmaterial gewonnen, indem die wasserlöslichen nicht-Protein-Bestandteile durch Extraktion in wässriger Lösung entfernt werden (RODRIGUES et al., 2012; WANASUNDARA, 2011; KROLL et al., 2007a). Die Proteinkonzentrate enthalten noch den Großteil des Fasergehaltes der Ölsamen (RODRIGUES et al., 2012). Der hohe Fasergehalt im Raps geht mit schlechter Verdaulichkeit einher und ist für die Anwendung in Lebensmitteln unerwünscht (RODRIGUES et al., 2012; WANASUNDARA et al., 2016).

Proteinisolate weisen einen Proteingehalt von über 90 % in TS auf (CHEFTEL et al., 1992; RODRIGUES et al., 2012; KROLL et al., 2007a; WANASUNDARA, 2011). Bei der Gewinnung der Isolate werden die Proteine aus dem entölten Pflanzenmaterial extrahiert (RODRIGUES et al., 2012; KROLL et al., 2007a). Die Löslichkeit der Proteine ist dabei von den Eigenschaften der Gruppen an der Proteinoberfläche, der Art des Lösungsmittels, der Temperatur und dem pH-Wert abhängig (RODRIGUES et al., 2012). Üblicherweise werden Proteine in wässrigen Salzlösungen extrahiert oder bei pH-Bedingungen, die weit vom isoelektrischen Punkt (pI-Wert) des Proteins entfernt sind (Proteine weisen an ihrem isoelektrischen Punkt die geringste Löslichkeit auf) (RODRIGUES et al. 2012; WESTPHAL et al., 2003; WANASUNDARA, 2011; SIKORSKI, 2001a). Die geeigneten Extraktionsbedingungen (Art des Lösungsmittels, Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur, Extraktionszeit, Lösungsmittelverhältnis), welche eine zufriedenstellende Proteinausbeute sowie -Qualität bei gleichzeitiger Wirtschaftlichkeit des Prozesses sicherstellen, richten sich dabei nach den physikochemischen Eigenschaften des Proteins und müssen hauptsächlich experimentell ermittelt werden (RODRIGUES et al., 2012; WANASUNDARA, 2011). Hinsichtlich der Gewinnung von Rapssamenproteinen stellt die alkalische Extraktion eine Standardmethode dar (WANASUNDARA, 2011; KROLL et al., 2007a). Durch das alkalische Milieu kann eine hohe Extraktionsausbeute der Rapsproteine erreicht werden (GHODSVALI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2017; FETZER et al., 2018).

Die gelösten Proteine können nach der Abtrennung des verbleibenden Extraktionsrückstandes (Zentrifugation, Filtration) durch verschiedene Aufkonzentrierungs-Methoden aus dem Extrakt gewonnen werden; üblicherweise werden die Proteine mittels isoelektrischer Präzipitation (s. Abschnitt 1.2.2.2) aus dem Extrakt ausgefällt (KROLL et al., 2007a; WANASUNDARA, 2011; RODRIGUES et al., 2012; SIKORSKI, 2001a). Die Proteinfällung kann alternativ auch durch Zugabe apolarer Lösungsmittel, durch Hitzedenaturierung oder durch Änderung der Ionenstärke des Mediums erfolgen (Erhöhung der Ionenstärke: „Aussalz-Effekt“, z.B. durch Zugabe von Ammoniumsulfat; Erniedrigung der Ionenstärke durch Dialyse oder Diafiltration) (RODRIGUES et al., 2012; HARRIS, 1989). Die ausgefällten Proteine werden durch Zentrifugation oder Filtration vom Überstand abgetrennt und getrocknet (RODRIGUES et al., 2012).

Die Aufkonzentrierung von Proteinextrakten kann auch mittels Membranverfahren (s. Abschnitt 1.2.2.3) erfolgen, wobei gleichzeitig die Entfernung gelöster, niedermolekularer Stoffe aus dem Extrakt ermöglicht wird (RODRIGUES et al., 2012; KROLL et al., 2007a). Die resultierenden Proteinprodukte weisen daher eine vergleichsweise hohe Reinheit auf, was insbesondere hinsichtlich der unerwünschten sekundären Pflanzenstoffe von Bedeutung ist (RODRIGUES et al., 2012). Der aufkonzentrierte Proteinextrakt kann entweder direkt

getrocknet werden (z.B. durch Sprühtrocknung), oder die Proteine können, wie oben beschrieben, aus dem Retentat ausgefällt werden (KROLL et al., 2007a).

Die Kombination von alkalischer Extraktion und isoelektrischer Präzipitation ist im Allgemeinen ein häufig angewandtes Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus unterschiedlichen Ölsaaten bzw. aus den entölten Pflanzensamen, etwa im Falle der Herstellung von Sojaproteinisolaten (SARI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; TAN et al., 2011; CHEFTEL et al., 1992; SIKORSKI, 2001a). Daneben stellt das „Mizell-Verfahren“ eine weitere Methode zur Gewinnung von Proteinisolaten aus Pflanzenmaterial dar, das von MURRAY et al. (1980) entwickelt wurde.

Bei dem Mizell-Verfahren werden die Proteine durch Salzextraktion aus der Pflanzenmatrix herausgelöst („Einsalzeffekt“) und durch nachfolgende Herabsetzung der Ionenstärke (durch Dialyse oder Diafiltration) aus dem Extrakt ausgefällt. Die dabei entstehenden Protein-Mizellen setzen sich als amorphe, teigige Masse ab und ergeben nach der Trocknung ein pulverförmiges Proteinisolat. Das Mizell-Verfahren wird unter schonenden pH-Bedingungen (pH 5,5 – 6,3) und Temperaturen (15 – 35 °C) durchgeführt. (MURRAY et al., 1980)

Weiters besteht die Möglichkeit, Rapsproteine mittels chromatographischer Trennmethoden aufzureinigen. Nach einer Methode von BÉROT et al. (2005) erfolgt die Fraktionierung der Proteine aus einem wässrigen Extrakt zunächst über einen Kationentauscher (cation exchange chromatography, CEC) unter alkalischen Bedingungen, wobei das neutrale Cruciferin nicht an die stationäre Phase bindet und nachfolgend mittels Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) aufgereinigt werden kann. Das basische Napin bindet an den Kationentauscher und kann nachfolgend durch einen weiteren CEC-Schritt unter sauren pH-Bedingungen sowie hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) aufgereinigt werden. (BÉROT et al., 2005)

Obwohl bisher (im Zuge von jahrzehntelanger Forschung) verschiedene Methoden zur Gewinnung von Rapsproteinisolaten publiziert oder auch patentiert wurden, sind nur wenige kommerziell erhältliche Rapsproteinprodukte verfügbar, welche im Folgenden kurz beschrieben werden (MUPONDWA et al. 2018).

Burcon NutraScience Corporation (Vancouver, Kanada) entwickelte ein napinreiches Rapsproteinisolat, Supertein™, sowie ein cruciferinreiches Rapsproteinisolat, Puratein®, welche in den Vereinigten Staaten GRAS-Status („Generally Recognized As Safe“) besitzen, d.h. von der FDA als sichere Lebensmittelzusatzstoffe anerkannt wurden (BARKER et al., 2010; FDA, 2010). Die Herstellung der beiden Rapsproteinisolate erfolgt auf Grundlage des oben beschriebenen Mizell-Verfahrens (BARKER et al., 2010; FDA, 2010).

Zwei weitere Rapsproteinprodukte, welche ebenfalls GRAS-Status besitzen, wurden von BioExx Specialty Proteins Ltd. (Toronto, Kanada) (mittlerweile TeuTexx Proteins[1]) entwickelt: Isolexx™ (Rapsproteinisolat) und Vitalexx™ (hydrolysiertes Rapsproteinisolat) (FDA, 2011). Isolexx™ wurde zudem von der EFSA als sicheres Lebensmittel (Novel Food) anerkannt (EFSA, 2013). Über den Herstellungsprozess der Rapsproteinisolate ist zumindest bekannt, dass die Proteinextraktion aus entölter, mit Phytase[2] behandelter Rapssaat im wässrigen Milieu erfolgt; der Extrakt wird mittels Membranverfahren (Ultrafiltration, Diafiltration) aufkonzentriert bzw. aufgereinigt, wordurch das nicht denaturierte Rapsproteinisolat (Isolexx™) erhalten wird. Der Extraktionsrückstand wird mit Proteasen behandelt, um die Faserstoffe von den im Rückstand verbliebenen Proteinen abzutrennen, wodurch das hydrolysierte Rapsproteinisolat (Vitalexx™) erhalten wird. (FDA, 2011)

Daneben wurde von DSM Nutritional Products (Heerlen, Niederlande) mit CanolaPro™ ein weiteres Rapsproteinprodukt mit GRAS-Status entwickelt, dessen Proteinzusammensetzung aus Cruciferin und Napin besteht. Das Herstellungsverfahren umfasst die wässrige NaCl-Extraktion der Rapsproteine sowie Anwendung von Membranverfahren (Ultrafiltration, Diafiltration) zur Konzentrierung bzw. Aufreinigung des Proteinextraktes; das Produkt wird ggf. mit Natriumhydrogensulfit ($NaHSO_3$) aufgehellt. (FDA, 2016)

Es ist anzumerken, dass als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erwähnten Rapsproteinprodukte jeweils nicht konventioneller industrieller RES verwendet wird, sondern Rapssaat, die unter besonders schonenden Bedingungen entölt wurde (etwa ohne Anwendung des konventionellen „Toastens“ der Rapssaat, das zur Entfernung des Lösungsmittels aus dem entölten Rückstand nach der Lösungsmittelextraktion dient; vgl. Abschnitt 1.2.4.1) (FDA, 2010; FDA, 2011; FDA, 2016). Es ist anzunehmen, dass durch die schonende Entölung der Rapssaat die native Struktur der Rapsproteine weitgehend unbeeinflusst bleibt, sodass eine möglichst hohe Proteinlöslichkeit (und damit Proteinausbeute) bei der nachfolgenden Extraktion gewährleistet werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Proteinlöslichkeit industriell entölter Rapssaat (sowohl im Falle von RES als auch RPK) aufgrund thermaler Proteindenaturierung, welche im Zuge der industriellen Ölgewinnungsprozesse stattfindet, vermindert (FETZER et al., 2018).

In diesem Zusammenhang soll zudem erwähnt werden, dass bei der Herstellung von Sojaproteinisolaten für die Anwendung im Lebensmittelsektor das Ausgangsmaterial (lösungsmittelextrahierter Sojaschrot) bei der Entölung besonders schonend behandelt wird,

[1] Die Rechte an den Patenten und Handelsmarken wurden 2014 von der Siebte PMI Verwaltungs GmbH (Hamburg, Deutschland) erworben (MUPONDWA et al., 2018; EU, 2014b).

[2] Die Behandlung der Rapssaat mit Phytase kann die Proteinausbeute bei der nachfolgenden Extraktion erhöhen (RODRIGUES et al., 2017; SERRAINO und THOMPSON, 1984) (s. auch Abschnitt 1.2.4.3).

um die Proteinqualität nicht negativ zu beeinflussen. So erfolgt die Entfernung der Lösungsmittelreste nach der Direktextraktion nicht mittels konventionellem Desolventierer-Toaster, wie etwa im Falle von Sojaextraktionsschrot für den Futtemittelsektor (dies hätte die Proteindenaturierung zur Folge). Stattdessen wird zur besonders schonenden Lösungsmittelverdampfung ein „Flash Desolventizer“ eingesetzt (ermöglicht die Lösungsmittelentfernung bei niedrigen Temperaturen und kurzer Behandlungszeit), wodurch die (native) Proteinstruktur (und damit eine hohe Proteinlöslichkeit) aufrecht erhalten bleibt und letztlich Proteinisolate hoher Qualität erzeugt werden können. (MUPONDWA et al., 2018)

Es ist in Anbetracht dieser Tatsachen somit fraglich, inwieweit die Rückstände der industriellen Rapsölgewinnung (aufgrund der verminderten Proteinqualität) als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von kommerziellen Proteinisolaten geeignet sind (vgl. MUPONDWA et al., 2018; FETZER et al., 2018).

Neben der Qualität des Ausgangsmaterials hat letztlich auch die Methode der Proteingewinnung Auswirkung auf die Proteinqualität und die Produktzusammensetzung und somit auch auf die Eigenschaften der Produkte (WANASUNDARA et al., 2016; KROLL et al., 2007a). Unterschiedliche Prozessbedingungen bei der Proteinisolierung können die Proteinstruktur verschiedenartig beeinflussen, wodurch die Eigenschaften der Proteine verändert werden, etwa hinsichtlich der Löslichkeit oder der Funktionalität (WANASUNDARA et al., 2016; KROLL et al., 2007a). Die Proteindenaturierung (also der Verlust der nativen Proteinkonformation, ausgelöst durch harsche physikalische oder chemische Einwirkungen, wie z.B. Temperatur-, Druck- oder pH-Wert-Einflüsse) geht im Allgemeinen mit der Verminderung der Proteinlöslichkeit einher, wodurch folglich die funktionellen Proteineigenschaften beeinflusst werden, in erster Linie Emulgier-, Schaum- und Geliereigenschaften (CHEFTEL et al., 1992; SIKORSKI, 2001a). So weisen etwa Rapsproteinisolate, welche mittels Mizell-Verfahren gewonnen wurden, infolge ihres nativen Zustandes im Allgemeinen eine höhere Funktionalität auf als alkaliextrahierte, isoelektrisch gefällte Rapsproteinprodukte (KROLL et al., 2007a). Rapsproteinisolate können zudem je nach Herstellungsverfahren und Prozessbedingungen Cruciferin, Napin und Minorkomponenten zu jeweils unterschiedlichen Anteilen enthalten, was sich ebenso auf die Produkteigenschaften auswirkt: zum einen weisen Cruciferin und Napin aufgrund ihres unterschiedlichen strukturellen Aufbaus unterschiedliche Eigenschaften auf (vgl. Abschnitt 1.2.1.3), zudem hat die Anwesenheit sekundärer Pflanzenstoffe Auswirkungen auf die Proteineigenschaften, da diese prozessabhängig mit den Proteinen wechselwirken können und somit die Proteinstruktur und -Eigenschaften beeinflussen (s. auch Abschnitt 1.2.4.3) (WANASUNDARA et al., 2016; KROLL et al., 2007b).

Im Zuge der vorliegenden Masterarbeit wurden Rapsproteine mittels alkalischer Extraktion und isoelektrischer Präzipitation aus Rapspresskuchen gewonnen. Es wurde zudem versucht, die Reinheit der resultierenden Proteinpräparate durch Ultrafiltration und Diafiltration des Proteinextraktes zu erhöhen. Die angewandten Verfahren (Extraktion, isoelektrische Präzipitation und Membranfiltration) werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.2.2.1 Feststoffextraktion

Die Feststoffextraktion (Fest/Flüssig-Extraktion) dient der Gewinnung eines Wertstoffes bzw. der Entfernung eines Schadstoffes (Extraktstoff) aus einer festen Phase (Extraktionsgut, Feed, Abgeberphase) (VAUCK und MÜLLER, 2000; SCHÖNBUCHER, 2002; HIERSIG, 1995). Dabei wird das Extraktionsgut mit selektiv wirkendem Lösungsmittel (LM; Aufnehmerphase) ausgelaugt, wobei der Extraktstoff in das angrenzende Extraktionsmittel diffundiert (VAUCK und MÜLLER, 2000). Der Extrakt, d.h. die Extraktstoff/Extraktionsmittel-Lösung, kann durch mechanische Abtrennung (Zentrifugieren, Filtrieren) vom Rückstand gewonnen werden; gegebenenfalls kann auch die Verdampfung des LM erfolgen (VAUCK und MÜLLER, 2000; SCHÖNBUCHER, 2002; HIERSIG, 1995). Der ausgelaugte Rückstand (an Extraktstoff verarmter Trägerfeststoff) wird als Raffinat bezeichnet (SCHÖNBUCHER, 2002; HIERSIG, 1995).

Der Extraktionsprozess verläuft im Allgemeinen in vier Phasen: das LM dringt in die Poren der kapillar-porösen Feststoffteilchen ein, der Extraktstoff löst sich im LM, der Extraktstoff wird aus dem Inneren der Feststoffteilchen an die Phasengrenzfläche transportiert und geht zuletzt von der Phasengrenzfläche in die flüssige Phase über und verteilt sich im gesamten Extraktionsmittel (STABNIKOW et al., 1983).

Treibende Kraft für den Stoffübergang aus der Festphase in die angrenzende Lösungsmittelphase bei der Extraktion ist der Ausgleich eines Konzentrationsgefälles durch Diffusion, welche durch das Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben werden kann (s. untenstehende Formel) (VAUCK und MÜLLER, 2000). Im Zuge des Extraktionsprozesses stellt sich (im Idealfall) ein Quasigleichgewicht ein, welches erreicht ist, wenn die Lösung in den Kapillaren des Feststoffes die gleiche Konzentration an Extraktstoff aufweist wie die Lösung, die den Feststoff umgibt (SCHÖNBUCHER, 2002).

$$g_D = -D\frac{dc}{ds}$$ (Fickssches Diffusionsgesetz)

g_D: Diffusionsgeschwindigkeit
D: Diffusionskoeffizient
c: Massenkonzentration der diffundierenden Komponente
s: Diffusionsweg

Zur Realisierung einer hohen Diffusionsgeschwindigkeit ist ein möglichst großer Konzentrationsgradient $\frac{dc}{ds}$ zwischen gesättigter Lösung an der Phasengrenze und der angrenzenden Lösung erforderlich (VAUCK und MÜLLER, 2000). Dies kann zum einen durch große Extraktionsmittelmengen (großes Lösungsmittelverhältnis) und gute Durchmischung (erzwungene Konvektion) erreicht werden (VAUCK und MÜLLER, 2000; HIERSIG, 1995). Zum anderen ist für eine möglichst weitgehende und schnelle Extraktion die Zerkleinerung bzw. Quetschung des Feststoffes erforderlich, da somit große Austauschflächen und kleine Kapillarwege erhalten werden (VAUCK und MÜLLER, 2000; HIERSIG, 1995). Mit steigender Extraktionstemperatur werden die diffusiven Transportvorgänge im Allgemeinen beschleunigt und die Löslichkeit des Extraktstoffes im LM erhöht, sodass mit zunehmender Temperatur die Feststoffextraktion zumeist begünstigt wird (HIERSIG, 1995; SCHÖNBUCHER, 2002). Der Extraktionsverlauf wird darüber hinaus durch die Lösebereitschaft des Wertstoffes im jeweiligen LM bzw. durch die Aufnahmekapazität des LM bestimmt sowie durch die Art und Struktur des festen Extraktionsgutes (Korngröße, Porosität) (VAUCK und MÜLLER, 2000; SCHÖNBUCHER, 2002; HIERSIG, 1995).

Betriebsweisen der Feststoffextraktion

Die Feststoffextraktion (FE) kann diskontinuierlich, halbkontinuierlich oder kontinuierlich erfolgen, wobei das Extraktionsgut entweder in disperser Form (Immersionsverfahren) oder als Festbett (Perkolationsverfahren) mit dem LM in Kontakt gebracht werden kann (VAUCK und MÜLLER, 2000; HIERSIG, 1995; VOESTE und WEBER, 2004).

Bei der diskontinuierlichen Feststoffextraktion wird das Extraktionsgut (in stehenden Extraktoren mit oder ohne bewegte Einbauten, rotierenden Extraktoren oder Extraktions-Filterpressen) längere Zeit mit frischem Extraktionsmittel behandelt (Einkörper-FE). Im Zuge des ersten Extraktionsschittes wird ein konzentrierter Extrakt erhalten. Wiederholte Extraktion des gleichen Extraktionsgutes mit frischem Lösungsmittel ergibt Extrakte mit abfallenden Extraktstoff-Massenanteilen. Durch mehrmalige Extraktionen kann der Extraktstoff-Anteil des Rückstandes so weit wie wirtschaftlich sinnvoll gesenkt werden. (VAUCK und MÜLLER, 2000)

Eine halbkontinuierliche Extraktionsweise kann durch das Hintereinanderschalten mehrerer Einkörper-Extraktoren erfolgen (Mehrkörper-Extraktionsanlage), wodurch höhere Durchsatzleistungen erreicht werden können als bei der Einkörper-FE (VAUCK und MÜLLER, 2000). Die mehrstufige Feststoffextraktion kann grundsätzlich in Gegenstrom- oder Kreuzstromführung des LM durchgeführt werden (HIERSIG, 1995).

Kontinuierliche Extraktoren arbeiten vorwiegend nach dem Perkolationsprinzip (VOESTE und WEBER, 2004). Dabei wird das Extraktionsgut als Festbett in bewegten Becherwerken, Zellen

oder Containern von Stufe zu Stufe mit LM (nach Möglichkeit im Gegenstrom) berieselt (VAUCK und MÜLLER, 2000; SCHÖNBUCHER, 2002; HIERSIG, 1995). Eine Immersionsextraktion in kontinuierlicher Betriebsweise kann nach dem Förderschneckenprinzip realisiert werden, wobei das LM im Gegenstrom zum Gut gefördert wird (VAUCK und MÜLLER, 2000; SCHÖNBUCHER, 2002). Der Wegfall der Handarbeit, geringerer spezifischer Dampf- und Energiebedarf sowie Schonung des Extraktionsgutes zählen zu den Vorteilen der kontinuierlichen Betriebsweise (VAUCK und MÜLLER, 2000).

Einsatzbereich der Fest-Flüssig-Extraktion ist vorwiegend die Gewinnung von Ölen und Fetten aus Ölsaaten, Presskuchen, Früchten, Knochen, Tierabfällen und Wolle, der Herstellung von Zucker aus Zuckerrübe und Zuckerrohr sowie der Gewinnung ätherischer Öle und anderer Komponenten aus Pflanzenteilen (VAUCK und MÜLLER, 2000; HIERSIG, 1995).

1.2.2.2 Isoelektrische Präzipitation von Proteinen

Die isoelektrische Präzipitation ist eine einfache und wirksame Trenn- und Reinigungsmethode von Proteinen (CHEFTEL et al., 1992; HARRIS, 1989). Durch Einstellung des pH-Wertes einer Proteinlösung auf den isoelektrischen Punkt des betreffenden Proteins aggregiert dieses und kann folglich mittels mechanischen Verfahren (wie Zentrifugation oder Filtration) aus der Lösung abgetrennt werden (MATISSEK und BALTES, 2016). Insbesondere wenn die Fällung bei niedrigen Temperaturen durchgeführt wird, aggregiert das Protein üblicherweise reversibel und ohne starke Auffaltung (CHEFTEL et al., 1992).

Theoretische Hintergründe

Die Oberfläche von Proteinmolekülen ist sowohl von positiv-geladenen als auch von negativ-geladenen Gruppen bedeckt (HARRIS, 1989). Proteine sind daher ampholytische Substanzen, d.h. sie weisen sowohl saure Eigenschaften (Protonendonator) als auch basische Eigenschaften (Protonenakzeptor) auf (CHRISTEN und JAUSSI, 2005; WESTPHAL et al., 2003). Die Ladungseigenschaften eines Proteins werden dabei durch die Ladungseigenschaften der funktionellen Gruppen seiner Seitenketten bestimmt (CHRISTEN und JAUSSI, 2005; BELITZ et al., 2008). Abhängig von den pH-Bedingungen und beeinflusst durch ihre Nachbargruppen im Proteinmolekül können diese protoniert oder deprotoniert vorliegen (CHRISTEN und JAUSSI, 2005; BELITZ et al., 2008). Somit kann die Nettoladung eines Proteins abhängig vom pH-Wert positiv, negativ oder Null sein (CHRISTEN und JAUSSI, 2005).

Jener pH-Wert, bei welchem ein Proteinmolekül eine Nettoladung von Null aufweist, also gleich viele positive wie negative Ladungen trägt, welche sich infolge gegenseitig ausgleichen,

wird als isoelektrischer Punkt (pI) des Proteins bezeichnet (MATISSEK und BALTES, 2016; BELITZ et al., 2008). Bei pH-Bedingungen unterhalb des pI-Wertes eines Proteins ist seine Moleküloberfläche hauptsächlich positiv geladen – die einzelnen, gleichgeladenen Proteine stoßen sich daher untereinander ab; ebenso erfolgt oberhalb des pI-Wertes eines Proteins die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen Proteinmoleküle (HARRIS, 1989). Bei pH-Bedingungen im Bereich des isoelektrischen Punktes eines Proteins kann es infolge fehlender elektrostatischer Abstoßung zwischen den Proteinmolekülen sowie über hydrophobe Bindungen aufgrund exponierter hydrophober Gruppen zur Präzipitation des Proteins kommen, was als „isoelektrische Fällung“ bezeichnet wird (HARRIS, 1989; BELITZ et al., 2008).

An ihrem isoelektrischen Punkt zeichnen sich Proteine durch minimale Löslichkeit und maximale Fällbarkeit sowie maximale Stabilität aus (BELITZ et al., 2008; MATISSEK und BALTES, 2016). Albumine sind als einzige Proteinfraktion nach Osborne auch an ihrem isoelektrischen Punkt wasserlöslich und können nur durch gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällt werden (zu den Osborne-Proteinfraktionen s. auch Abschnitt 1.2.1) (MATISSEK und BALTES, 2016; EBERMANN und ELMADFA, 2008).

1.2.2.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration (UF) dient der Fraktionierung von niedermolekularen gelösten Stoffen und Makromolekülen (MELIN und RAUTENBACH, 2007). Mittels UF-Prozessen können einerseits hochmolekulare Wertstoffe aufkonzentriert und von niedermolekularen Verunreinigungen befreit werden, oder unerwünschte höhermolekulare Verbindungen können aus der Ausgangslösung (Feed) abgetrennt werden, sodass ein gereinigtes Permeat als Produkt erhalten wird (BRÜSCHKE und MELIN, 2011).

In vielen industriellen Anwendungen hat sich die UF als Stand der Technik etabliert. Im Bereich der Lebensmittelindustrie wird die UF z.B. zur Klärfiltration von Fruchtsäften, Bier oder Wein sowie zum Aufkonzentrieren von Proteinen und der Herstellung von Weichkäse verwendet. Weiters kommt die UF bei der Trinkwasseraufbereitung und der Abwasserreinigung zum Einsatz. (BRÜSCHKE und MELIN, 2011)

Bei der UF handelt es sich um ein druckgetriebenes Membranverfahren, bei welchem Moleküle nach dem Prinzip des Siebeffekts aufgrund von Größenunterschieden durch poröse Membranen getrennt werden (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Der Begriff „Membran“ beschreibt dabei eine flächige, teildurchlässige Struktur; wie in Abb. 12 dargestellt, ist diese für zumindest eine Komponente eines Fluids permeabel, welche somit von der Ausgangslösung (Feed) in das Permeat übergehen kann; Substanzen, für welche die

Membran nicht durchlässig ist, werden zurückgehalten und sammeln sich im Retentat (Konzentrat) (MELIN und RAUTENBACH, 2007).

Die Triebkraft der Trennung bildet die transmembrane Druckdifferenz Δp_{trans}, welche bei UF-Prozessen üblicherweise in einem Bereich von 0,5 – 10 bar liegt (MELIN und RAUTENBACH, 2007).

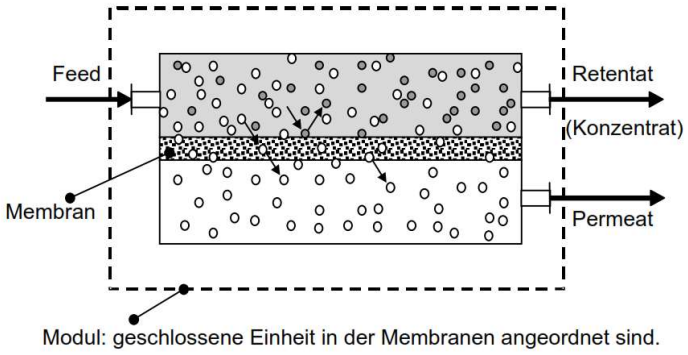

Abbildung 12: Schematische Darstellung des Trennverhaltens von Membranverfahren. Die Feed-Lösung wird von der Membran in Retentat und Permeat aufgeteilt; Substanzen, welche klein genug sind, um die Poren der Membran zu passieren, können in das Permeat übergehen, zurückgehaltene Substanzen werden aufkonzentriert (Quelle: MELIN und RAUTENBACH, 2007, S. 1)

Bei UF-Prozessen können Moleküle mit Molmassen im Bereich von 1000 – 100 000 Dalton (Da) zurückgehalten werden; die Porenweiten der Membranfilter liegen dabei in einem Bereich von ca. 0,002 – 0,2 µm (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Da UF-Membranen eine gewisse Breite in ihrer Porengrößenverteilung aufweisen, lässt sich das Trennvermögen der Membranen durch eine Kurve charakterisieren, wie in Abb. 13 dargestellt (BRÜSCHKE und MELIN, 2011). Die Trenngrenze einer UF-Membran wird zumeist durch die Angabe jener (kleinsten) Molmasse festgelegt, welche zumindest noch zu 90 % von der Membran zurückgehalten wird; dieses nominelle Rückhaltevermögen wird als „molecular weight cut-off“ (MWCO) bezeichnet (s. auch Abb. 13) (MELIN und RAUTENBACH, 2007; BRÜSCHKE und MELIN, 2011; KRAUME, 2012). Der cut-off-Wert wird in realen Anwendungen jedoch nicht nur allein von der Größe der Molmasse bestimmt, sondern auch von der Struktur der zurückgehaltenen Moleküle sowie von deren Wechselwirkungen mit der Membran und mit anderen Substanzen der Feed-Lösung (BRÜSCHKE und MELIN, 2011). Bei der Durchströmung der Membran mit einer Feed-Lösung treten – im Gegensatz zum Reinwasserfluss – neben dem gewünschten, selektiven Transportwiderstand der aktiven Membranschicht schließlich weitere Transportwiderstände auf, die zu Leistungs- und Selektivitätsminderungen der Membran führen (MELIN und RAUTENBACH, 2007). Auf die zugrundeliegenden Phänomene wird in den folgenden Absätzen näher eingegangen.

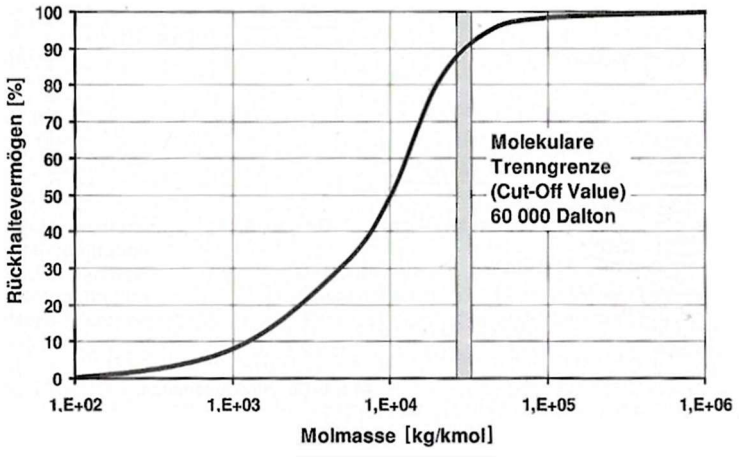

Abbildung 13: Charakterisierung einer UF-Membran. Der cut-off-Wert bezeichnet jene Molmasse, welche von der Membran noch zumindest zu 90 % von der Membran zurückgehalten wird (Quelle: BRÜSCHKE und MELIN, 2011, S. 528).

Im Zuge des Filtrationsprozesses bildet sich eine Deckschicht bzw. Filterkuchen auf der Membran (BRÜSCHKE und MELIN, 2011). Dadurch wird sowohl die Dicke der aktiven Trennschicht vergrößert, als auch der nominale Porendurchmesser der Membran verändert – die gebildete Deckschicht weist daher eine zusätzliche Filtrationswirkung auf (BRÜSCHKE und MELIN, 2011; MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Struktur und Dicke der Deckschicht sind für die Lage des effektiven Trennschnittes von großer Bedeutung (MELIN und RAUTENBACH, 2007). Die (reversible) Deckschicht kann periodisch durch Spülung der Membran zwischen den Filtrationsintervallen entfernt werden; dies wird häufig durch eine kurzzeitige Flussumkehr durch die Membran realisiert (Permeatrückspülung) (MELIN und RAUTENBACH, 2007).

Zusätzlich kommt es im Laufe der Filtration zu leistungsmindernden Verschmutzungen der Membran, welche über die reversible Deckschichtbildung hinaus gehen – die dauerhaften Verschmutzungen verursachen die Abnahme des Permeatflusses sowie Selektivitätsminderungen der Membran und werden unter dem Begriff „Fouling“ zusammengefasst. Als Fouling-Mechanismen treten dabei verschiedene physikalisch-chemische Wechselwirkungen auf, welche die Haftung der Feed-Inhaltsstoffe sowohl untereinander als auch an der Membran zur Folge haben. Neben sterischer Porenverblockung und der Adsorption membrangängiger Substanzen in den Poren (resultierend in Porenverengung) kann die Entstehung einer irreversiblen Deckschicht erfolgen. Dabei bildet sich eine Schicht aus adsorbierten Makromolekülen auf der Membran, in welche sich kleinere Substanzen einlagern können; zudem können gelartige Beläge durch die Ausfällung aufkonzentrierter Substanzen auf der Membran entstehen. Durch Komprimierung kann die Deckschicht zusätzlich kompaktieren. Eine Entfernung der Verschmutzung durch die

hydrodynamischen Bedingungen im Normalbetrieb der Anlage ist nicht möglich – es ist daher eine chemische Reinigung der Membran außerhalb des normalen Filtrationsbetriebes erforderlich. Verschmutzungen, welche sich auch mittels chemischer Reinigung nicht mehr entfernen lassen, werden als „irreversibles Fouling“ bezeichnet. (MELIN und RAUTENBACH, 2007)

Fouling-Prozesse sind hauptsächlich betriebszeitabhängig und teilweise konzentrationsabhängig (CHERYAN, 1986).

Ein weiteres Phänomen, das eine Leistungsminderung der Membran zur Folge haben kann, ist die „Konzentrationspolarisation“: an der Membranoberfläche kommt es zur Konzentrationserhöhung der zurückgehaltenen Komponente (BRÜSCHKE und MELIN, 2011). Dadurch wird einerseits der Fluss durch die Membran verringert, da die Triebkraft der abzutrennenden Komponente vermindert wird (BRÜSCHKE und MELIN, 2011). Andererseits kann auch die Selektivität der Membran und somit die Qualität des Permeates beeinträchtigt werden, da die Triebkraft der zurückgehaltenen Komponente erhöht wird (BRÜSCHKE und MELIN, 2011; MELIN und RAUTENBACH, 2007). Konzentrationspolarisationseffekte werden von Betriebsparametern wie Strömungsgeschwindigkeit, Druck, Temperatur und Feed-Konzentration beeinflusst und sind – im Gegensatz zu den Fouling-Effekten – nicht betriebszeitabhängig (CHERYAN, 1986).

Ultrafiltrations-Membranen

Bei der UF kommen asymmetrische Porenmembranen zum Einsatz. Asymmetrische Membranen bestehen aus einer dünnen, trennaktiven Schicht und einer darunter liegenden porösen Stützschicht, welche als Träger dient und der aktiven Schicht mechanische Stabilität verleiht. Dadurch wird der Einsatz möglichst dünner Membranen ermöglicht, wodurch ein möglichst hoher Fluss erzielt werden kann. (MELIN und RAUTENBACH, 2007)

UF-Membranen können aus organischen oder anorganischen Werkstoffen bestehen. Anorganische Materialien zeichnen sich durch hohe Temperaturbeständigkeit und meist eine hohe Lösungsmittelbeständigkeit aus. Im Falle der organischen Membranen steht eine Vielzahl unterschiedlicher Polymere (oder Polymermischungen) als Membranmaterial zur Verfügung; die Struktureigenschaften der Polymere bestimmen dabei die thermische, chemische und mechanische Beständigkeit der Membran, sowie auch beispielsweise die Permeabilität des Polymers für eine bestimmte Komponente. Die Wahl des membranbildenden Polymers für ein bestimmtes Trennproblem orientiert sich an bestimmten strukturellen Erfordernissen der Polymerverbindung. (MELIN und RAUTENBACH, 2007)

Der Stofftransport durch Porenmembranen findet vorwiegend konvektiv statt (MELIN und RAUTENBACH, 2007). Bei Vernachlässigung der zeitlichen Abnahme des Permeatflusses durch die Deckschichtbildung kann im Allgemeinen gesagt werden, dass die Höhe des stationären Permeatflusses mit steigender transmembraner Druckdifferenz, steigender Temperatur, steigender Feed-Überströmung und abnehmender Feed-Konzentration ansteigt (KRAUME, 2012).

Prozessführung

UF-Prozesse können diskontinuierlich (Dead-End-Filtration) oder kontinuierlich (Querstrom- bzw. Cross-Flow-Filtration) erfolgen. Die Art der Prozessführung ist dabei unter anderem vom Feststoffgehalt der Feed-Lösung, der Trennaufgabe sowie vom zu verarbeitendem Stoffsystem abhängig. Von zentraler Bedeutung ist die Gewährleistung eines hohen Permeatflusses über den gesamten Filtrationsprozess. (MELIN und RAUTENBACH, 2007)

Bei der Dead-End-Filtration durchströmt der Feed die Membran orthogonal. Während des Filtrationsprozesses lagern sich alle zurückgehaltenen Teilchen auf der Membran ab – es bildet sich eine Deckschicht, welche einen zeitlich anwachsenden Strömungswiderstand bildet und (bei konstantem Transmembrandruck) die Abnahme des Permeatflusses durch die Membran bewirkt (s. Abb. 14). Die Deckschicht muss daher durch Spülen der Membran regelmäßig entfernt werden. Zwischen den Intervallen kann die Kompensierung der Permeatflussabnahme durch Erhöhung des Transmembrandruckes erfolgen. Die statische Betriebsweise zeichnet sich durch einen geringen spezifischen Energiebedarf aus, setzt jedoch einen geringen Feststoffgehalt der Feed-Lösung voraus. (MELIN und RAUTENBACH, 2007)

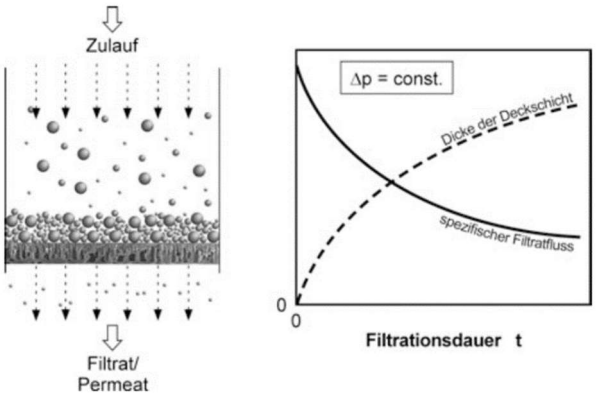

Abbildung 14: Prinzip der Dead-End-Filtration. Bei konstantem Transmembrandruck nimmt die Dicke der Deckschicht mit zunehmender Filtrationsdauer kontinuierlich zu, woraus eine kontinuierliche Abnahme des Permeatflusses resultiert (Quelle: KRAUME, 2012, S. 279)

Die Cross-Flow-Filtration ermöglicht einen kontinuierlichen Prozess mit längerer Nutzungsdauer der Filtereinheit, da die Deckschichtbildung auf der Membran und somit der

Filterwiderstand kontrolliert auf geringem Niveau gehalten werden kann (KRAUME, 2012; MELIN und RAUTENBACH, 2007). Die Feed-Lösung überströmt die Membran dabei in tangentialer Richtung, sodass Überströmungs- und Filtratflussrichtung kreuzweise zueinander stehen (KRAUME, 2012). Mit der Querströmung werden Scher- und Auftriebskräfte auf der Membranoberfläche erzeugt, sodass abgelagerte Partikel aus der Deckschicht in die Kernströmung zurückgeführt werden können (reversible Deckschichtbildung) (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Eine dünne Partikelgrundschicht bleibt dabei erhalten (KRAUME, 2012). Nach einer Einlaufphase stellt sich im Idealfall zwischen Ablagerung und Mitreißen der Teilchen ein Gleichgewicht ein, woraus eine konstante Deckschichtdicke und somit ein stationärer Permeatfluss resultiert, wie in Abb. 15 schematisch dargestellt ist (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Zusammensetzung und Dicke der Partikelgrundschicht sind dabei von den jeweiligen Betriebsbedingungen abhängig (KRAUME, 2012). In realen Prozessen zeigt sich häufig eine betriebszeitabhängige, schleichende Abnahme des Filtratflusses (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012). Dies wird z.B. durch feine Teilchen verursacht, welche die Partikeldeckschicht bzw. das Filtermedium blockieren (KRAUME, 2012). Eine periodische Abtragung der Deckschicht (z.B. durch Permeatrückspülung) ist somit auch bei der Querstromfiltration erforderlich (MELIN und RAUTENBACH, 2007). Gegenüber der Dead-End-Betriebsweise erfordert die Cross-Flow-Filtration aufgrund der hohen Überströmungsgeschwindigkeiten entlang der Membranoberfläche (2 – 5 m/s) einen deutlich höheren Energieeintrag (MELIN und RAUTENBACH, 2007; KRAUME, 2012).

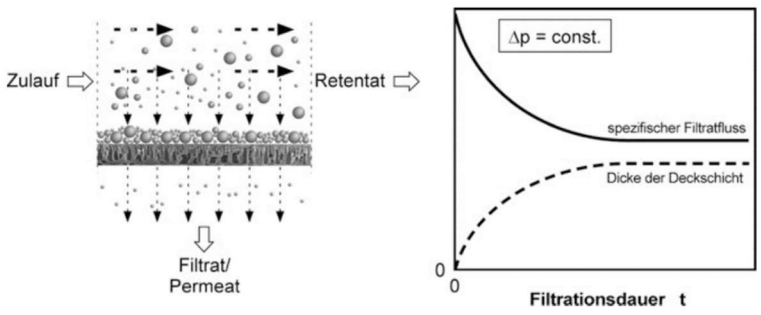

Abbildung 15: Prinzip der Cross-flow-Filtration. Bei konstantem Transmembrandruck stellt sich mit zunehmender Filtrationsdauer (idealisierter Weise) eine konstante Deckschichtdicke und damit ein konstanter Permeatfluss ein (Quelle: KRAUME, 2012, S. 280)

Diafiltration

Mittels Diafiltration können die permerierenden gelösten Substanzen aus dem Konzentrat ausgewaschen werden, indem dem Retentat frisches Lösungsmittel zugegeben wird. Die Diafiltration kann sowohl diskontinuierlich als auch kontinuierlich erfolgen. (CHERYAN, 1986)

Im Falle einer diskontinuierlichen Diafiltration wird die bereits aufkonzentrierte Feed-Lösung mit frischem Lösungsmittel auf ein bestimmtes Volumen zurückverdünnt und mittels UF wieder aufkonzentriert, wie in Abb. 16 (oben) schematisch dargestellt ist. Es können mehrere Diafiltrationsschritte hintereinander erfolgen, bis die gewünschte Reinheit des Konzentrates erreicht ist. (CHERYAN, 1986)

Bei der kontinuierlichen Diafiltration wird dem Feed bzw. Retentat während des UF-Prozesses kontinuierlich frisches Lösungsmittel zugegeben (im gleichen Verhältnis, wie Permeat abfließt), wie in Abb. 16 (unten) schematisch dargestellt ist. Das Gesamtvolumen des Systems sowie auch die Konzentration der zurückgehaltenen Substanzen bleiben somit während der kontinuierlichen Diafiltration konstant. Diese Betriebsweise der Diafiltration ist besonders dann hilfreich, wenn die Konzentration der zurückgehaltenen Stoffe zu groß ist, um eine effektive Ultrafiltration oder diskontinuierliche Diafiltration zu ermöglichen. (CHERYAN, 1986)

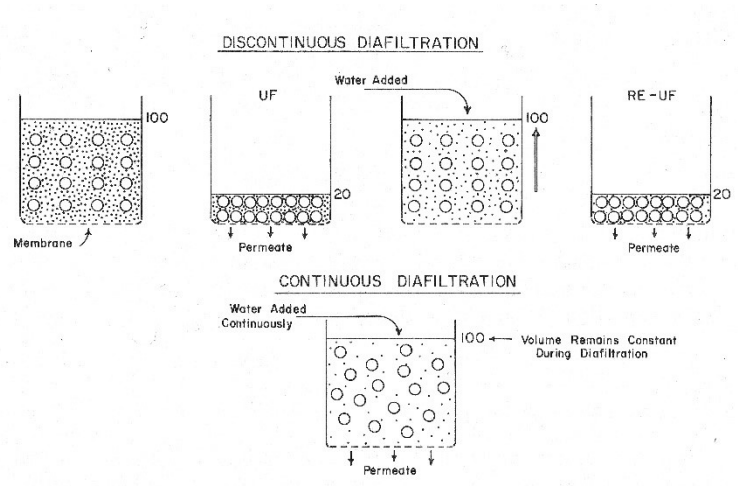

Abbildung 16: Schematische Darstellung der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Diafiltration. (Quelle: CHERYAN, 1986, S. 206)

Grundbegriffe der Ultrafiltration

Transmembrandruck

Der Transmembrandruck Δp_{trans} ist die treibende Kraft für den Permeatfluss durch die Membran (CHERYAN, 1986). Die transmembrane Druckdifferenz lässt sich über den Druck vor dem Membranmodul (Eingangsdruck p_e), nach dem Membranmodul (Ausgangsdruck p_a) und dem permeatseitigen Druck p_p berechnen (CHERYAN, 1986):

$$\Delta p_{trans} = \frac{p_e + p_a}{2} - p_p$$

Fluss

Der Fluss (J_P) ist der Permeatvolumenstrom ($\dot{V}_P$) bezogen auf die Membranfläche (A_M), ausgedrückt in $l \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ (CHERYAN, 1986; KRAUME, 2012):

$$J_P = \frac{\dot{V}_P}{A_M}$$

Permeabilität

Wird der Fluss J_P auf die transmembrane Druckdifferenz Δp_{trans} bezogen, ergibt sich daraus die Permeabilität P (KRAUME, 2012):

$$P = \frac{\dot{V}_P}{A_M \, \Delta p_{trans}}$$

Rückhaltevermögen

Das Rückhaltevermögen ist ein Maß für die Trennschärfe einer Membranfiltration bezüglich einer Schlüsselkomponente i, beschreibt also, wie gut eine Membran einen gelösten Stoff zurückhält (KRAUME, 2012; MELIN und RAUTENBACH, 2007; CHERYAN, 1986). Der Rückhalt wird durch die Prozessparameter und die Membraneigenschaften beeinflusst (CHERYAN, 1986). Mit x_i als Konzentration der Komponente i im Feed und y_i als Konzentration der Komponente i im Permeat berechnet sich das Rückhaltevermögen für die Komponente i nach folgender Formel:

$$R_i = \frac{x_i - y_i}{x_i} = 1 - \frac{y_i}{x_i}$$

Selektivität

Die Selektivität (S_{ij}) beschreibt die Fähigkeit einer Membran, zwischen zwei Komponenten i und j einer Mischung zu unterscheiden (KRAUME, 2012). Sie ist (wie das Rückhaltevermögen) ein Maß für die Trennschärfe einer Membran und über die Zusammensetzung der Ausgangsmischung sowie des Produktes definiert (MELIN und RAUTENBACH, 2007):

$$S_{ij} = \frac{y_i \,/\, y_j}{x_i \,/\, x_j}$$

wobei x_i die Konzentration der Komponente i im Feed und y_i die Konzentration der Komponente i im Permeat darstellt (KRAUME, 2012).

Porosität

Das freie Volumen des Membranmaterials wird durch die Porosität ε charakterisiert (KRAUME, 2012). Sie ist charakterisiert als:

$$\varepsilon = \frac{V_{Pore}}{V_{Gesamt}}$$

1.2.3 Verwendungsmöglichkeiten von Rapsprotein

Aufgrund der ausgewogenen Aminosäurezusammensetzung (s. Abschnitt 1.2.1.5) sowie den möglichen techno-funktionellen Eigenschaften (etwa Emulgier-, Schaum- und Gelbildungseigenschaften, s. Abschnitt 1.2.1.4) bietet Rapsprotein gutes Potenzial zur Anwendung als funktionelle Lebensmittelzutat, etwa als Eigelb- oder Eiweißersatz (AIDER und BARBANA, 2011; WANASUNDARA, 2011; TAN et al., 2011). Bisher wurden die Einsatzmöglichkeiten von Rapsproteinen etwa in emulgierten Fleischprodukten wie Würsten, in Mayonnaise oder in Backwaren untersucht (VON DER HAAR et al., 2014; YOSHIE-STARK et al., 2006; CUMBY et al., 2008; MANSOUR et al., 1999).

Die von Burcon NutraScience entwickelten Rapsproteinisolate Puratein® und Supertein™ sowie die von BioExx Specialty Proteins Ltd. (TeuTexx Proteins) entwickelten Rapsproteinprodukte Isolexx™ und Vitalexx™ (vgl. Abschnitt 1.2.2) sollen jeweils sehr gute Emulgier- und Schaumeigenschaften aufweisen (etwa vergleichbar mit Soja-, Ei- oder Molkenprotein) sowie über eine hohe ernährungsphysiologische Proteinqualität verfügen (FDA, 2010; FDA, 2011). Neben den oben genannten Verwendungsmöglichkeiten werden als weitere potenzielle Anwendungsgebiete der Proteinprodukte etwa auch der Einsatz (als funktionelle oder nutritive Bestandteile) in Milcherzeugnissen oder -Ersatzprodukten, Fleischersatzprodukten, Getränken oder Proteinsupplementen (Proteinpulver, -Riegel, -Shakes) angegeben (FDA, 2010; FDA, 2011).

Ebenso ist das von DSM Nutritional Products entwickelte Rapsproteinisolat CanolaPro™ etwa zum Einsatz als Emulgator, Schaumbildner, Verdickungs- oder Geliermittel in Backwaren, Fleischersatzprodukten, Milchprodukten oder Getränken sowie als pflanzliche Proteinquelle (etwa in Form von Proteinriegel oder -Drinks) vorgesehen (FDA, 2016).

In der EU wurde Rapssamenprotein 2014 mit dem Durchführungsbeschluss 2014/424/EU als neuartige Lebensmittelzutat (Novel Food) zugelassen und unterliegt damit der „Novel-Food-Verordnung“ (VO (EU) 2015/2283) (EU, 2014b; EU, 2015). Die Spezifikationen und Kennzeichnungsvorschriften für zugelassene Rapsproteinerzeugnisse sind in der Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 geregelt. Unter Anderem wird ein Proteingehalt

von mind. 90 % vorgeschrieben, zudem soll das getrocknete Proteinpulver weiß bis cremefarben sein (s. Abb. C 1 im Anhang, S. VII) (EU, 2017). Sowohl die Erreichung der geforderten Reinheit als auch der Farbe der Rapsproteinprodukte stellt jedoch bisher in der praktischen Durchführung eine Hürde dar; zudem ist die erreichte Proteinausbeute oft zu niedrig, um einen ökonomischen Prozess zur Herstellung von Rapsproteinisolaten zu gewährleisten (s. Abschnitt 1.2.4) (CAMPBELL et a., 2016; FETZER et al., 2018).

Neben den Verwendungsmöglichkeiten im Lebensmittelsektor besteht für Rapsproteine die Möglichkeit zum Einsatz in technischen Anwendungen – geringe Mengen von nicht-Protein Verunreinigungen im Endprodukt sind im non-food Bereich unbedeutend (FETZER et al., 2018). Rapsproteine bieten etwa Potenzial zur Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen sowie zum Einsatz in Biokompositen oder Bioklebstoffen (DELGADO et al., 2018; MANAMPERI et al., 2010; WANG et al., 2014; BANDARA et al., 2018).

1.2.4 Problematiken bei der Gewinnung von Protein aus Rapspresskuchen

Die Gewinnung von Rapsproteinprodukten aus den Rückständen der Ölgewinnung bringt verschiedene Problematiken bzw. Herausforderungen mit sich. Im Vergleich zu Sojaprotein, das im kommerziellen Umfang mittels alkalischer Extraktion und isoelektrischer Präzipitation aus den entölten Bohnen gewonnen wird, geht die Gewinnung von Rapsproteinen mit einer niedrigeren Reinheit sowie einer niedrigeren Proteinausbeute einher (CAMPBELL et al., 2016; SARI et al., 2015; CHEFTEL et al., 1992). Problematisch sind vor allem auch Wechselwirkungen der Proteine mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (phenolische Verbindungen, Abbauprodukte der Glucosinolate sowie Phytinsäure), welche etwa zu einer unerwünschten dunklen Farbe sowie einem unangenehmen Geschmack der Rapsproteinpräparate führen und sich negativ auf die Proteinausbeute auswirken können, wie unter Abschnitt 1.2.4.3 näher beschrieben wird (CAMPBELL et al., 2016; KROLL et al., 2007b; XU und DIOSADY, 2000; XU und DIOSADY, 2002; RODRIGUES et al., 2017).

Im Zuge der Aufarbeitung der Rapssaat (sowohl während den Prozessen betreffend der Ölgewinnung als auch während der Isolierung der Proteine aus dem entölten Rückstand) kann es prozessabhängig zu unterschiedlichen physikochemischen Veränderungen der Proteine kommen (CAMPBELL et al., 2016; FETZER et al., 2018; HEIM und KREBS, 2018). Dabei können auch die Löslichkeitseigenschaften der Proteine beeinflusst werden, welche bei der Gewinnung von Proteinisolaten etwa hinsichtlich der erzielbaren Proteinausbeute von Bedeutung sind (FETZER et al., 2018; HEIM und KREBS, 2018; CHEFTEL et al., 1992). Die Einflüsse verschiedener Extraktions- und Aufreinigungsmethoden auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Rapsproteine sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt

oder widersprechen sich innerhalb unterschiedlicher Studien (DAS PURKAYASTHA et al., 2014). In den folgenden Abschnitten werden mögliche Proteinveränderungen im Zuge der Verarbeitungsprozesse der Rapssaat näher erläutert.

1.2.4.1 Mögliche Einflüsse der Ölgewinnungsmethode

Die Methode der Ölgewinnung kann einerseits aufgrund von (optionalen) Erhitzungsprozessen Einfluss auf die Proteine der Ölsaaten ausüben, zudem kann der verbleibende Restfettgehalt im entölten Rückstand bei der Gewinnung von Proteinisolaten problematisch sein (FETZER et al., 2018; CAMPBELL et al., 2016; MUPONDWA et al., 2018).

Mögliche Einflüsse von Erhitzungsprozessen im Zuge der Ölgewinnung auf die Rapsproteine

Bei der Verarbeitung der Rapssaat im Zuge der Ölgewinnung finden (verfahrensabhängig) Erhitzungsprozesse statt. Die gewalzte Rapssaat wird zunächst vor dem Pressen in einem Konditionierungsschritt auf etwa 90 – 105 °C erhitzt, um eine möglichst hohe Ölausbeute bei der Gewinnung von raffiniertem Rapsöl zu erzielen (RIMBACH et al., 2015; VAN DOOSSELAERE, 2013; WILLIAMS und HRON, 1996). Dies bewirkt das Aufbrechen der ölhaltigen Zellen (LENNERTS, 1984; WILLIAMS und HRON, 1996; VAN DOOSSELAERE, 2013; RIMBACH et al., 2015). Durch die Hitzebehandlung werden zudem Proteine denaturiert und somit koaguliert, welche das Öl zuvor gewissermaßen in Emulsion gehalten haben – fein dispergierte Öltröpfchen können somit zusammenfließen (WILLIAMS und HRON, 1996). Weiters wird durch die Hitze die Viskosität des Öls erniedrigt, wodurch es besser ablaufen kann; Enzyme werden inaktiviert, Schimmel- und Bakterienwachstum wird vorgebeugt (WILLIAMS und HRON, 1996; VAN DOOSSELAERE, 2013; RIMBACH et al., 2015). Im Zuge der Konditionierung wird die Rapssaat außerdem auf einen bestimmten Feuchtigkeitsgehalt eingestellt (etwa 3 – 5 %), welcher einen effizienten Betrieb der Ölpresse gewährleistet (WILLIAMS und HRON, 1996; VAN DOOSSELAERE, 2013). Die Erwärmung der Rapssaat erfolgt auch während der Pressung durch den hohen Pressdruck sowie die mechanische Beanspruchung (ANDERSON, 1996; BOCKISCH, 2004). Während der Druck in einer Hochleistungs-Vorpresse maximal 220 bar beträgt (das Öl erwärmt sich dabei auf ca. 80 °C), werden in Fertigpressen Drücke von über 900 bar erreicht, um so viel Öl wie möglich aus der Saat zu entfernen (BOCKISCH, 2004; WILLIAMS und HRON, 1996). Die Schalenanteile der Rapssaat verursachen zusätzlich Reibungshitze (das Schälen der kleinen Rapssamen vor der Pressung ist schwierig und technisch aufwendig und wird daher üblicherweise nicht angewandt) (RIMBACH et al., 2015; LENNERTS, 1984). Wird die Rapssaat nach der (Vor-)Pressung zusätzlich extrahiert, muss das Lösungsmittel durch Erhitzen auf etwa

102 – 105 °C aus dem RES entfernt werden („Toasten“) (LENNERTS, 1984; BOCKISCH, 2004).

Hohe Temperaturen im Zuge der Ölgewinnung können die (partielle) Denaturierung der Proteine zur Folge haben, ebenso kann die Einwirkung hoher Drücke (ab 0,5 bar) die Proteindenaturierung bewirken (FETZER et al., 2018; SIKORSKI, 2001b; CHEFTEL et al., 1992; HEIM und KREBS, 2018). Durch die dabei auftretende Dekonformation der Proteinmoleküle werden reaktive Gruppen freigelegt, welche daraufhin mit anderen Komponenten in der Umgebung (temperatur- und zeitabhängig) interagieren können (SIKORSKI, 2001b). Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass bei der Heißpressung von Rapsöl (95 – 135 °C) Quervernetzungen zwischen bzw. innerhalb von Peptidketten sowie zwischen Peptiden und Kohlenhydraten gebildet werden bzw. Maillard-Reaktionen stattfinden (HEIM und KREBS, 2018). Die Proteindenaturierung durch Hitzebehandlungen der Rapssaat im Zuge der Ölgewinnung vermindert einerseits die Proteinlöslichkeit, was sich negativ auf die Proteinausbeute bei der Gewinnung von Rapsproteinprodukten auswirkt, zudem wird auch die Verdaulichkeit und Nährstoffverfügbarkeit der Proteine beeinflusst (FETZER et al., 2018; XU und DIOSADY, 2002; HEIM und KREBS, 2018; THEODORIDOU und YU, 2013). Insgesamt wird durch die Proteindenaturierung die Qualität des entölten Rückstandes für weitere Verwendungen reduziert (FETZER et al., 2018; HEIM und KREBS, 2018).

Möglicher Einfluss des Restfettgehaltes entölter Rapssaat auf die Proteine

Lipide, welche nach der Ölgewinnung im Rückstand verbleiben, können kovalent mit Proteinen reagieren: in Mehlen aus Ölsaaten kann die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Lipidoxidationsprodukten und Proteinen erfolgen (CHEFTEL et al., 1992). Dies kann einerseits über Reaktionen mit freien Radikalen geschehen, was die Polymerisation der Proteine zur Folge hat (CHEFTEL et al., 1992). Dabei reagieren Öle in Gegenwart von Sauerstoff zunächst zu Fettsäure-Hydroperoxiden, welche Radikal-Pools darstellen und vielfältige Folgereaktionen auslösen (WESTPHAL et al., 2003). Über eine Disproportionierung der Hydroxyperoxide entstehen Oxyfettsäuren, welche in weiterer Folge mit Proteinen zu Verbindungen mit einer Lipoproteinstruktur verknüpft werden (WESTPHAL et al., 2003). Die gebildeten Cross-linking-Komplexe können als Radikale in ablaufende Kettenreaktionen eintreten oder diese auslösen (WESTPHAL et al., 2003). Die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Lipidoxidationsprodukten und Proteinen können auch über Carbonyl-Amin-Reaktionen erfolgen, wobei Aldehydderivate aus der Oxidation ungesättigter Fettsäuren unter Ausbildung Schiff´scher Basen an Aminogruppen von Proteinen binden (CHEFTEL et al., 1992).

Ist der Restfettgehalt im Rapspresskuchen zu hoch, kann dies eine effiziente Protein-Extraktion verhindern (CAMPBELL et al., 2016; MUPONDWA et al., 2018). Bei der

Verwendung von Rapspresskuchen als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Proteinisolaten könnte somit ein zusätzlicher Entölungsschritt notwendig sein (im Gegensatz zu Rapsextraktionsschrot, welcher einen geringeren Restfettgehalt aufweist) (CAMPBELL et al., 2016; MUPONDWA et al., 2018).

1.2.4.2 Mögliche Einflüsse hoher pH-Werte bei der Proteinextraktion

Die Löslichkeit von Rapsproteinen ist im alkalischen Milieu am höchsten und steigt zwischen pH 8 und pH 12,5 mit dem pH-Wert an; folglich kann bei der Extraktion im alkalischen Milieu die höchste Proteinausbeute erzielt werden (XU und DIOSADY, 2000; GHODSVALI et al., 2005; AKBARI und WU, 2015; RODRIGUES et al., 2017; FETZER et al., 2018). Die Behandlung von Proteinen bei hohen pH-Werten kann jedoch zur Protein-Denaturierung, Racemisierung und über Quervernetzungsreaktionen zur Bildung von Lysinoalanin führen, das bei der Ratte nephrotoxische Wirkung zeigt (bei Maus, Hamster und Affe konnte eine vergleichende Wirkung nicht festgestellt werden) (SCHWASS und FINLEY, 1984; MAURON, 1990; CHEFTEL et al., 1992; SIKORSKI, 2001b; WESTPHAL et al., 2003). In Abhängigkeit der Alkalität, Temperatur und Behandlungsdauer kann durch die Einwirkung hoher pH-Werte schließlich die Proteinfunktionalität sowie die Verdaulichkeit der Proteine beeinträchtigt werden (SARI et al., 2015; SIKORSKI, 2001b; CHEFTEL et al., 1992). Stark alkalische Extraktionsbedingungen können überdies zur Proteinhydrolyse führen: FETZER et al. (2018) berichteten, dass die alkalische Extraktion von Proteinen aus entölter Rapssaat bei pH 12 (20 °C, 60 min) bereits bei Raumtemperatur zur Hydrolyse von Cruciferin und größtenteils auch Napin führt. Hingegen bleibt die Struktur der Proteine weitgehend intakt, wenn die Extraktion bei pH 11 (20 °C, 60 min) durchgeführt wird (FETZER et al., 2018).

1.2.4.3 Wechselwirkungen mit sekundären Pflanzenstoffen

Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in der Rapssaat (phenolische Verbindungen, Abbauprodukte der Glucosinolate sowie Phytinsäure; s. auch Abschnitt 1.1.2 unter „sekundäre Pflanzenstoffe in der Rapssaat“) können mit Proteinen (prozessabhängig) interagieren, was mit einer Veränderung der Proteineigenschaften einher geht, etwa bezüglich des Löslichkeitsverhaltens der Proteine, deren isoelektrischen Punkte oder dem Verhältnis von hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften der Proteine (KROLL et al., 2007b). Die Wechselwirkungen können die Proteinausbeute bei der Extraktion negativ beeinflussen und wirken sich zudem nachteilig auf Farbe und Geschmack der Proteinisolate aus (RODRIGUES et al., 2017; XU und DIOSADY, 2002). Es wird daher angestrebt, den Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen im Zuge der Herstellung von Rapsproteinprodukten so weit wie möglich zu

senken, was jedoch eine große Herausforderung darstellt – das Scheitern an der vollständigen Entfernung der unerwünschten Verbindungen kann als ein Hauptproblem bei der Entwicklung von Rapsproteinisolaten für den Einsatz in Lebensmitteln angesehen werden (CAMPBELL et al., 2016; LAMPART-SZCZAPA, 2001; DAS PURKAYASTHA et al., 2014). Selbst wenn bei der Proteinextraktion nur geringe Mengen der pflanzlichen Sekundärmetabolite an Proteine binden, kann der Gehalt dieser Verbindungen im Endprodukt inakzeptable Mengen erreichen (XU und DIOSADY, 2002). Die folgenden Absätze sollen einen Überblick über unterschiedliche mögliche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen der Rapssaat und Proteinen vermitteln, insbesondere im Zusammenhang mit der Proteinextraktion im alkalischen Milieu.

Phenolische Verbindungen

Phenolische Verbindungen (bzw. deren Derivate) können über unterschiedliche Mechanismen mit Proteinen reagieren, was zu unerwünschten Veränderungen der Farbe und zu bitterem Geschmack der Proteine führt (XU und DIOSADY, 2000; XU und DIOSADY, 2002; OZDAL et al., 2013). Weiters können dadurch die physikochemischen Eigenschaften der Proteine verändert sowie die Proteinverdaulichkeit herabgesetzt werden (OZDAL et al., 2013; SASTRY und RAO, 1990; ROHN et al., 2005).

Phenolsäuren bzw. deren Derivate reagieren bei hohen pH-Werten hauptsächlich über ionische Bindungen mit Rapsproteinen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Rapsproteine mit steigendem pH-Wert (oberhalb ihres pI-Wertes) zunehmend negative Ladungen aufweisen, Sinapin (der dominierende Phenolsäureester in der Rapssaat; vgl. Abschnitt 1.1.2 unter „sekundäre Pflanzenstoffe in der Rapssaat“) unter diesen Bedingungen hingegen positiv geladen vorliegt. Somit entstehen elektrostatische Anziehungskräfte und die Ausbildung von Ionenbindungen. Im sauren Bereich sind diese Bindungen geschwächt. (XU und DIOSADY, 2000)

Um die ionischen Bindungen zwischen Proteinen und Phenolsäure-Derivaten zu schwächen, kann die Zugabe von Natriumchlorid zum alkalischen Proteinextrakt erfolgen (RUBINO et al., 1996; XU und DIOSADY, 2002; PICKARDT et al., 2011). Dabei reagieren die Natriumionen mit den negativen Ladungen an der Proteinoberfläche (bzw. neutralisieren diese), wodurch die Anzahl der Bindungsstellen am Protein für die Interaktionen mit den unerwünschten Verbindungen reduziert wird (RUBINO et al., 1996; SASTRY und RAO; 1990).

Kondensierte Tannine binden hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen an die Rapsproteine (XU und DIOSADY, 2000). Die hydrophoben Interaktionen können durch Behandlung des Proteinextraktes mit Natriumdodecylsulfat (SDS) geschwächt werden, da das Detergens an Proteine bindet und somit nicht-kovalente Wechselwirkungen der Proteine

inhibieren kann (XU und DIOSADY, 2002; KROLL et al., 2003). SDS darf jedoch aus gesundheitlichen und sensorischen Gründen nicht im Endprodukt verbleiben; das Detergens kann mittels Ultrafiltration und Diafiltration aus dem Extrakt entfernt werden (Grundlagen der Ultrafiltration s. auch Abschnitt 1.2.2.3) (XU und DIOSADY, 2002).

Bei der alkalischen Extraktion kann die Oxidation phenolischer Verbindungen erfolgen; gebildete Oxidationsprodukte, Chinone, können über kovalente Bindungen mit Proteinen reagieren (KROLL et al., 2003; ROHN et al., 2005; CZUBINSKI und DWIECKI, 2017; DAS PURKAYASTHA et al., 2014; PICKARDT et al., 2011; SASTRY und RAO, 1990; XU und DIOSADY, 2000). Chinone polymerisieren außerdem zu braunen Melaninen (MATISSEK und BALTES, 2016; KROLL et al., 2003). Die Oxidation phenolischer Verbindungen führt daher zu einer dunklen, braun-grünen Farbe der Proteinisolate, welche aus dem Endprodukt nicht mehr abgewaschen werden kann (DAS PURKAYASTHA et al., 2014; XU und DIOSADY, 2002; XU und DIOSADY, 2000; PICKARDT et al., 2011). Zudem kann es zur Bildung von quervernetzten Protein-Polymeren kommen (KROLL et al., 2003; ROHN, 2014). Um den oxidativen Prozessen und den damit einhergehenden unerwünschten Proteinveränderungen bei der alkalischen Proteinextraktion entgegenzuwirken, kann die Zugabe eines Reduktionsmittels (z.B. Na_2SO_3) bei der Extraktion erfolgen (XU und DIOSADY, 2002; SASTRY und RAO, 1990).

Die Entfernung phenolischer Verbindungen von Rapsproteinisolaten durch Verwendung eines spezifischen Adsorptionsmittels (Polyvinylpyrrolidon, PVP) zeigte bei löslichen Proteinisolaten Wirkung, nicht jedoch bei präzipitierten Proteinen (XU und DIOSADY, 2002).

Phytinsäure

Die Wechselwirkungen zwischen Phytinsäure und Proteinen wirken sich negativ auf die Ausbeute bei der alkalischen Extraktion von Rapsproteinen aus (RODRIGUES et al., 2017; AKBARI und WU, 2015; GHODSVALI et al., 2005; BLAICHER et al., 1983). Neben der verminderten Proteinlöslichkeit kann der isoelektrische Punkt der Rapsproteine durch die Reaktion mit Phytinsäure vom neutralen in den sauren Bereich verschoben werden (KROLL, 1991). Zudem können die funktionellen Eigenschaften der Proteine sowie die Protein-Verdaulichkeit beeinträchtigt werden (KROLL, 1991; SELLE et al., 2000).

Phytinsäure interagiert mit Proteinen abhängig vom pH-Wert (SERRAINO und THOMPSON, 1984; GHODSVALI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2017). Es wird angenommen, dass im sauren Milieu die Bildung von binären Protein-Phytat-Komplexen erfolgt, da in diesem pH-Bereich Rapsproteine positiv geladen sind (pH-Bedingungen unterhalb der pI-Wertes der Rapsproteine), Phytinsäure hingegen negative Ladungen trägt (SERRAINO und THOMPSON, 1984). Bei höheren pH-Werten ist sowohl der Großteil der Rapsproteine als auch Phytinsäure negativ geladen; die Interaktion zwischen Phytinsäure und Proteinen erfolgt daher in

Abhängigkeit von der Anwesenheit polyvalenter Kationen, resultierend in der Bildung ternärer Protein-Mineal-Phytat-Komplexe (SERRAINO und THOMPSON, 1984). Im stärker alkalischen Bereich (pH 10 – 12) sind die Reaktionen zwischen Proteinen und Phytinsäure demgegenüber vermindert (GHODSVALI et al., 2005). Hohe pH-Werte bei der alkalischen Extraktion (um pH 12,5) können die Proteinausbeute daher verbessern (RODRIGUES et al., 2017; GHODSVALI et al., 2005).

Um die Bildung ternärer Protein-Mineral-Phytat-Komplexe zu verhindern, kann ein Komplexbildner wie EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) eingesetzt werden (SERRAINO und THOMPSON, 1984).

Eine enzymatische Vorbehandlung des Rapsschrotes mit Phytase vor der alkalischen Extraktion wurde als zielführend beschrieben, um den Reaktionen zwischen Phytinsäure und Proteinen entgegenzuwirken und somit die Proteinausbeute zu erhöhen (RODRIGUES et al., 2017; SERRAINO und THOMPSON, 1984).

Eine Reduktion des Phytinsäuregehaltes des Pflanzenmaterials (resultierend in einer Erhöhung der Proteinausbeute) kann auch durch Waschen der entölten Rapssaat in wässriger Lösung bei saurem pH-Wert vor der alkalischen Extraktion erfolgen (AKBARI und WU, 2015).

Glucosinolate

Isothiocyanate, Abbauprodukte der Glucosinolate (vgl. Abschnitt 1.1.2 unter „sekundäre Pflanzenstoffe in der Rapssaat“), reagieren bevorzugt mit den freien Aminogruppen und den Sulfhydrylgruppen der Proteinseitenketten; dadurch entstehen im ersten Fall Thioharnstoff-Derivate, im zweiten Fall Dithiocarbamatester (RAWEL et al., 1998; KROLL et al., 2007b). Die physikochemischen Eigenschaften der Proteine, wie Löslichkeit und Hydrophobizität, werden dadurch beeinflusst und der isoelektrische Punkt der Proteine kann in den sauren Bereich verschoben werden (RAWEL et al., 1998). Zudem kann die Verdaulichkeit der Proteine durch die Derivatisierung mit Isothiocyanaten negativ beeinflusst werden (RAWEL et al., 1998; KÜHN et al., 2018; KROLL et al., 2007b).

1.2.4.4 Einfluss der pI-Werte der Rapsproteine auf die Proteinausbeute bei der isoelektrischen Proteinpräzipitation

Die Erzielung einer ausreichend hohen Proteinausbeute ist für die Entwicklung eines ökonomischen Prozesses zur Gewinnung von Rapsproteinisolaten obligat. Neben den oben beschriebenen Einflussfaktoren (Einwirkung von Hitze oder alkalischen pH-Werten auf die Rapssaat, Reaktionen der Proteine mit Lipidoxidationsprodukten oder Phytinsäure) kann die

vergleichsweise geringe Ausbeute von Rapsproteinen auch auf die Verteilung der isoelektrischen Punkte zurückzuführen sein (MANAMPERI et al., 2010; CAMPBELL et al., 2016). Diese erstrecken sich über einen weiten pH-Bereich (insgesamt ca. pH 4 – 11, großteils ca. pH 3,5 – 5,5), sodass eine möglichst gesamtheitliche Ausfällung der Proteine bei einem bestimmten pH-Wert nicht realisierbar ist (MANAMPERI et al., 2010; CAMPBELL et al., 2016). Da entölte Rapssaat etwa im Vergleich zu Sojaextraktionsschrot einen relativ geringen Proteinanteil aufweist (36 % vs. 48 % Protein in TS), kann somit insgesamt die Ausbeute der Rapsproteine zu gering sein, um die Wirtschaftlichkeit des Proteinisolierungs-Prozesses zu gewährleisten (CAMPBELL et al., 2016). Eine sequentielle isoelektrische Fällung der Proteine könnte hilfreich sein, um eine höhere Proteinausbeute zu erzielen (MANAMPERI et al., 2010). Die isoelektrischen Punkte der Rapsproteine können durch Wechselwirkungen mit sekundären Pflanzenstoffen jedoch verändert werden (KROLL et al., 2007b).

Grundsätzlich muss angemerkt werden, dass Napin, wie alle Albumine, auch an seinem isoelektrischen Punkt (pI ca. 11) wasserlöslich ist und daher nicht durch die Einstellung des pH-Wertes präzipitiert werden kann (Albumine können im Allgemeinen nur durch gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung ausgefällt werden); es ist jedoch möglich, dass die Rapsalbumine bei der isoelektrischen Fällung von Cruciferin teilweise mitgerissen werden (KROLL et al., 2007a; MATISSEK und BALTES, 2016; EBERMANN und ELMADFA, 2008).

1.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Rapsprotein aufgrund der hohen ernährungsphysiologischen Wertigkeit sowie der möglichen techno-funktionellen Eigenschaften hohes Potenzial für den Einsatz in Lebensmitteln bietet (für Übersichtsarbeiten siehe etwa TAN et al., 2011; AIDER und BARBANA, 2011; WANASUNDARA, 2011; WANASUNDARA et al., 2016). Dies würde mit einer Wertsteigerung der Rückstände der Rapsölgewinnung einhergehen, welche zurzeit hauptsächlich am Futtermittelmarkt Verwendung finden (RODRIGUES et al., 2012). Die Gewinnung von Protein aus entölter Rapssaat ist zumindest seit Einführung der 00-Rapssorten Ende der Achtziger Jahre Gegenstand wissenschaftlicher Forschung (siehe etwa OWEN et al., 1973; EL NOCKRASHY et al., 1977; BLAICHER et al., 1983). Dabei gelten bis heute eine niedrige Reinheit der Proteinprodukte sowie eine unzureichende Proteinausbeute als wesentliche Problematiken bei der Entwicklung kommerzieller Rapsproteinprodukte (CAMPBELL et al., 2016). Insbesondere stellen die nativen sekundären Pflanzenstoffe der Rapssaat (phenolische Verbindungen, Glucosinolate, Phytinsäure) eine Hürde bei der Gewinnung von Rapsprotein dar, da diese Verbindungen etwa zu einer dunklen, braun-grünen Farbe sowie zu einem

unangenehmen, bitteren Geschmack der Produkte führen – der Einsatz von Rapsproteinisolate in Lebensmitteln wäre dadurch limitiert (XU und DIOSADY, 2000; KROLL et al., 2007b; AIDER du BARBANA, 2011; CAMPBELL et al., 2016). Zudem kann sich die Anwesenheit von Phytinsäure negativ auf die Proteinausbeute bei der alkalischen Extraktion auswirken (RODRIGUES et al., 2017; AKBARI und WU, 2015; GHODSVALI et al., 2005; BLAICHER et al., 1983). Die thermische Proteindenaturierung, welche im Zuge der industriellen Ölgewinnungsprozesse stattfindet, vermindert die Proteinlöslichkeit und somit die Extrahierbarkeit der Rapsproteine aus dem entölten Pflanzenmaterial (FETZER et al., 2018: MUPONDWA et al., 2018). Die Qualität des Ausgangsmaterials ist bei der Gewinnung von Proteinen aus Ölsaaten daher ein zusätzlicher wichtiger Faktor. Obwohl die Gewinnung von Protein aus Ölsaaten bzw. aus entölten Pflanzensamen mittels Kombination von alkalischer Extraktion und isoelektrischer Präzipitation grundsätzlich eine übliche Vorgehensweise darstellt (etwa im Falle der Isolierung von Sojaprotein aus Sojaextraktionsschrot), bedarf es zur Gewinnung von Proteinisolaten aus den Rückständen der Rapsölgewinnung zur Anwendung im Lebensmittelsektor weiterer Forschungsarbeit (SARI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; CHEFTEL et al., 1992; AIDER und BARBANA, 2011).

1.3 Aufgabenstellung

Die vorliegende Masterarbeit entstand im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgruppe für Prozesstechnik des Instituts für Lebensmitteltechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien unterstützt durch die Firma Rapso Österreich GmbH, welches die Untersuchung der Möglichkeit zur Gewinnung eines verkehrsfähigen, kommerziellen Proteinisolates aus Rapspresskuchen zur Anwendung im Lebensmittelsektor zum Inhalt hatte. Rapssamenprotein wurde 2014 in der EU als neuartige Lebensmittelzutat zugelassen (EU, 2014b); das Erzeugnis soll gemäß den Spezifikationen der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470 etwa einen Proteingehalt von zumindest 90 % aufweisen und im getrockneten Zustand eine helle Farbe (weiß bis cremefarben) besitzen (EU, 2017; s. auch Abb. C 1 im Anhang, S. VII). Im Zuge des Projektes sollte nach Möglichkeit ein Prozess zur Herstellung eines aus RPK isolierten Proteinproduktes entwickelt werden, das den Spezifikationen der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470 entspricht. Zudem sollte bei der Proteinisolierung aus dem Pflanzenmaterial eine möglichst hohe Ausbeute erzielt werden, um die Wirtschaftlichkeit des Proteingewinnungsprozesses gewährleisten zu können.

Aufbauend auf Vorversuchen, welche im Rahmen des Projektes durchgeführt wurden, sollten im Zuge der vorliegenden Masterarbeit weiterführende Untersuchungen zur isoelektrischen Präzipitation von Protein aus alkalischen RPK-Extrakten erfolgen. Dabei sollten Rapsproteine mit möglichst hoher Reinheit und Ausbeute aus dem Proteinextrakt ausgefällt werden. Zudem

sollte versucht werden, die Reinheit und Farbe der Proteinprodukte durch die Anwendung von Membranverfahren zu verbessern (Abtrennung von nicht-Protein-Verunreinigungen aus dem Proteinextrakt mittels Ultrafiltration).

2 Material und Methoden

2.1 Analysenmethoden

2.1.1 Bestimmung der Trockensubstanz (gravimetrisch)

Die Bestimmung der Trockensubstanz erfolgte gravimetrisch über den Trocknungsverlust. Die Proben wurden bis zur Massekonstanz getrocknet und der Rückstand durch Differenzwägung ermittelt.

Durchführung

verwendete Geräte:

- Analysenwaage: Sartorius BP 210 S (Ablesbarkeit: 0,0001 g)
- Trockenschrank: Heraeus Instruments UT 6060
- Schnellverascher: Harry Geistigkeit SVR/E

Als Wägegefäße wurden Porzellantiegel verwendet, welche für etwa 3 h bei ca. 1000 °C im Schnellverascher vorgeglüht wurden. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Leergewicht jedes Tiegels durch Wägung auf der Analysenwaage bestimmt. Es wurden schließlich jeweils ca. 5 g flüssige Probe bzw. 1 g feste Probe in einen Porzellan-Tiegel eingewogen und über Nacht im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Die Tiegel wurden für etwa eine Stunde im Exsikkator vollständig abgekühlt und danach zur Bestimmung des Trocknungsverlustes der Proben auf der Analysenwaage ausgewogen. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Berechnung der Trockensubstanz (TS) der Proben erfolgte nach der folgenden Formel:

$$TS\ [\%] = \frac{Probenmasse\ nach\ dem\ Trocknen\ [g]}{Probenmasse\ vor\ dem\ Trocknen\ [g]} \cdot 100$$

2.1.2 Bestimmung des Aschegehaltes (gravimetrisch)

Die Bestimmung des Aschegehaltes erfolgte durch direkte Veraschung der Proben und Ermittlung des Glührückstandes durch Differenzwägung.

Durchführung

verwendete Geräte:

- Analysenwaage: Sartorius BP 210 S (Ablesbarkeit: 0,0001 g)
- Trockenschrank: Heraeus Instruments UT 6060
- Schnellverascher: Harry Geistigkeit SVR/E

Als Wägegefäße wurden Porzellantiegel verwendet, welche für etwa 3 h bei ca. 1000 °C im Schnellverascher vorgeglüht wurden. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Leergewicht jedes Tiegels bestimmt. Es wurden daraufhin ca. 5 g flüssige Probe bzw. ca. 1 g feste Probe in einen Tiegel eingewogen, über Nacht im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und danach im Exsikkator abgekühlt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden die bereits getrockneten und ausgewogenen Proben der Trockensubstanzbestimmung zur Bestimmung des Aschegehaltes verwendet.

Die Tiegel wurden im Schnellverascher bei 800 °C geglüht, wobei die Temperatur anfangs nur langsam erhöht wurde (400 °C für 1 h, danach 600 °C für 1 h). Die Proben wurden so lange geglüht, bis die Asche durchgehend weiß aussah. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Berechnung des Aschegehaltes der Proben erfolgte nach der folgenden Formel:

$$Asche\ [\%] = \frac{Probenmasse\ nach\ der\ Veraschung\ [g]}{Probenmasse\ vor\ der\ Veraschung\ [g]} \cdot 100$$

2.1.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes über Stickstoff (Methode nach Kjeldahl)

Die Bestimmung des (Roh-)Proteingehaltes der Proben erfolgte nach der Kjeldahl-Methode über den Stickstoffgehalt. Die Proben werden dabei mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches oxidativ aufgeschlossen, wodurch der Proben-Stickstoff als Ammoniumsulfat vorliegt. Mittels Wasserdampfdestillation wird das nach Zusatz von Natronlauge freigesetzte Ammoniak in eine borsäurehaltige Vorlage eingeleitet. Die quantitative Bestimmung des entstandenen Ammoniumtriborats erfolgt titrimetrisch mittels HCl-Maßlösung. Über den ermittelten Stickstoffgehalt wird schließlich der Proteingehalt der Proben unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Stickstoffanteils der vorliegenden Proteinart durch Zuhilfenahme eines Faktors – im vorliegenden Fall 6,25 – berechnet. (MATISSEK et al., 2014)

Durchführung

verwendete Utensilien und Chemikalien:

- Präzisionswaage: Sartorius AW 4202 (Ablesbarkeit: 0,01 g)
- Kjeldahl-Aufschlussapparatur: Müller-Scherr Gerhardt Kjeldaltherm
- Wasserdampfdestillierapparat: Behr destillation unit S4
- Digitalbürette: Hirschmann Laborgeräte Solarus 50 ml
- Katalysator-Gemisch: Carl Roth Kjeldahl-Tabletten
- H_2SO_4 (96 %)
- NaOH (30 %)
- H_3BO_3 (40 g/l)
- HCl-Maßlösung (0,1 %)
- Tashiro-Mischindikator

Je 2 - 5 g der flüssigen Proben bzw. jeweils ca. 0,5 g der pastösen Proben wurden in einem Kjeldahl-Kolben mit Kjeldahl-Tablette (Katalysator-Gemisch) eingewogen und mit ca. 20 ml H_2SO_4 (96 %) versetzt. Die Proben wurden in der Aufschlussapparatur langsam stufenweise auf 370 °C erhitzt (die Anfangstemperatur von 150 °C wurde etwa alle 10 min um ca. 20 °C erhöht). Die Temperatur wurde so lange gehalten, bis alle Proben farblos und klar erschienen. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in der Wasserdampf-Destillationsapparatur destilliert, wobei die Zugabe von H_2O, NaOH (30 %), H_3BO_3 (40 g/l) sowie das Absaugen der Probe vollautomatisch erfolgte. Die Destillate wurden mit je 1 – 2 Tropfen Tashiro-Mischindikator versetzt und mit HCl-Maßlösung (0,1 mol/l) bis zum ersten Farbumschlag (von grün-blau nach grau) titriert. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Der prozentuale Proteingehalt der Proben wurde nach der folgenden Formel unter Zuhilfenahme des Faktors F = 6,25 berechnet:

$$Protein\,[\%] = \frac{Verbrauch\ an\ HCl\ Maßlösung\ [ml] \cdot 1{,}4008 \cdot 6{,}25}{Probeneinwaage\ [g]}$$

2.1.4 HPLC-Analyse von Zuckern

Die Bestimmung von Zuckern erfolgte mittels HPLC und Brechungsindex-Detektion (RI-Detektion), wobei die Zucker über eine Blei-Säule aufgetrennt wurden. Die Trennung beruht dabei auf dem Prinzip der Ionenausschlusschromatographie, wonach starke Elektrolyte von schwachen Elektrolyten und Nichtelektrolyten durch die Verwendung eines Ionenaustauscherharzes getrennt werden. Nach dem Prinzip des Donnan-Gleichgewichtes haben Ionen in den Poren einer Matrix mit gleichem Ladungsvorzeichen eine niedrigere

Konzentration als in der umgebenden Lösung, während Nichtelektrolyte dagegen innerhalb und außerhalb der Poren in der gleichen Konzentration vorliegen. Demzufolge resultiert bei genügend großen Ladungsunterschieden die Trennung von starken und schwachen Elektrolyten in der Chromatographiesäule. (MIKEŠ, 1984)

Der Zuckergehalt flüssiger Proben wurde einerseits direkt bestimmt, zudem erfolgte die Ermittlung des Gesamtzuckergehaltes flüssiger und pastöser Proben nach Probenaufschluss mittels konzentrierter Schwefelsäure.

Die qualitative Zuckerbestimmung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen. Die quantitative Zuckerbestimmung erfolgte mit Hilfe externer Standards über die Peakflächen der erhaltenen Chromatogramme. Zur Korrektur von Verlusten, welche durch den Abbau von Zuckern während der sauren Hydrolyse auftreten, wurde ein „sugar recovery standard“ (SRS) verwendet. Dieser enthält die Saccharide Stachyose, Saccharose, Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose, Fructose und Glycerol jeweils in den Konzentrationen von 0,1 g/l, 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l sowie 20 g/l. Der SRS war bereits als gebrauchsfertige Lösung vorhanden und wurde nicht selbst hergestellt (die Lagerung erfolgte im Gefrierfach).

Durchführung

verwendete Utensilien und Chemikalien:

- HPLC-Säule: Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide Pb+2 (8%)
- HPLC-Autosampler: VWR Hitachi LaChrom Elite L-2200
- HPLC-Säulenofen: VWR Hitachi LaChrom Elite L-2350
- RI-Detektor: VWR Hitachi LaChrom Elite L-2490
- Mikrozentrifuge: Eppendorf 5415 D
- Analysenwaage: Sartorius BP 210 S (Ablesbarkeit: 0,0001 g)
- Trockenschrank: Heraeus Instruments UT 6060
- Wasserbad: Lauda ECO E4
- Autoklav: VWR CV-EL 12L/18L
- H_2SO_4 (72 %)
- $BaCO_3$
- Carrez-Lösung I: $K_4[Fe(CN)_6]$, 150 g/l
- Carrez-Lösung II: $Zn(CH_3COO)_2$, 230 g/l
- sugar recovery standard (SRS)

Probenvorbereitung zur direkten Bestimmung des Zuckergehaltes in den flüssigen Proben

Zur Entfernung bei der Analyse störenden Proteins wurde eine Carrez-Klärung der Proben durchgeführt. Dazu wurden je 500 µl flüssige Probe in einem Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) mit jeweils 40 µl Carrez-Lösung I, 40 µl Carrez-Lösung II und 420 µl UHQ-H_2O versetzt, wobei die Probe nach jeder Zugabe am Orbitalschüttler gut durchmischt wurde (die Carrez-Reagenzien waren bereits als gebrauchsfertige Lösungen vorhanden und wurden daher nicht selbst hergestellt). Nach dem Zentrifugieren (5 min, 13000 rpm) wurde der Probenüberstand durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) in ein HPLC-Vial überführt. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Probenvorbereitung zur Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes mittels Probenaufschluss

Von den flüssigen Proben sowie von dem SRS wurden je 4,0 g in 10 ml Schraubfläschchen eingewogen und mit jeweils 140,4 µl H_2SO_4 (72 %) versetzt. Alle Probenansätze wurden für 60 min bei 125 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden etwa 5 ml eines jeden Probenaufschlusses in einem Becherglas durch Zugabe von $BaCO_3$ neutralisiert (die Überprüfung des pH-Wertes erfolgte mit pH-Indikatorpapier). Der Probenüberstand wurde durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) in ein HPLC-Vial überführt.
Pastöse Proben wurden zunächst bei 65 °C im Trockenschrank getrocknet und danach fein zerkleinert. Von der Probe wurden je 150 mg in ein 50 ml Schraubfläschchen eingewogen und mit 1,5 ml H_2SO_4 (72 %) versetzt. Die Proben wurden für 60 min ins Wasserbad (30 °C) gestellt, wobei die Fläschchen innerhalb der Inkubationszeit mehrmals geschwenkt wurden. Danach wurde jeder Probe 42 g H_2O zugegeben.
Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt

Probenanalyse

Es wurde eine Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide Pb+2 (8%) HPLC-Säule zur Bestimmung der Zucker verwendet. Die Probeninjektion in die HPLC-Probenschleife erfolgte vollautomatisch mittels Autosampler. Der HPLC-Lauf wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer Säulentemperatur von 80 °C durchgeführt; als Laufmittel wurde UHQ-H_2O verwendet. Die Detektion der Probenpeaks erfolgte über den Brechungsindex mittels RI-Detektor.

2.1.5 HPLC-Analyse organischer Säuren

Die Bestimmung von Säuren erfolgte mittels HPLC und RI-Detektion nach Aufschluss der Proben mittels konzentrierter Schwefelsäure. Die Säuren wurden dabei über eine Wasserstoff-Säule aufgetrennt. Die Trennung beruht auf dem Prinzip der Ionenausschlusschromatographie, wobei starke Elektrolyte von schwachen Elektrolyten und Nichtelektrolyten nach dem Prinzip des Donnan-Gleichgewichts durch die Verwendung eines Ionenaustauscherharzes als stationäre Phase getrennt werden (MIKEŠ, 1984).

Die qualitative Bestimmung der Säuren erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen. Die quantitative Bestimmung der Säuren erfolgte mit Hilfe von Vergleichsstandards über die Peakflächen der erhaltenen Chromatogramme. Als Vergleichsstandards dienten Lösungen von Glucuronsäure und Galacturonsäure in den Konzentrationen von jeweils 1 g/l und 0,1 g/l.

Durchführung

verwendete Utensilien und Chemikalien:

- HPLC-Säule: Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%)
- HPLC-Autosampler: VWR Hitachi LaChrom Elite® L-2200
- HPLC-Säulenofen: VWR Hitachi LaChrom Elite L-2350
- RI-Detektor: VWR Hitachi LaChrom Elite L-2490
- Analysenwaage: Sartorius BP 210 S (Ablesbarkeit: 0,0001 g)
- Trockenschrank: Heraeus Instruments UT 6060
- Wasserbad: Lauda ECO E4
- Autoklav: VWR CV-EL 12L/18L
- H_2SO_4 (72 %)
- Glucuronsäure-Standard: 0,1 g/l und 1,0 g/l
- Galacturonsäure-Standard: 0,1 g/l und 1,0 g/l

Probenvorbereitung

Zunächst wurden Glucuronsäure- und Galacturonsäure-Standards jeweils in den Konzentrationen von 0,1 g/l und 1,0 g/l hergestellt.

Von den flüssigen Proben sowie die Vergleichsstandards wurden jeweils 4,0 g in ein 10 ml Schraubfläschchen eingewogen und mit 140,4 µl H_2SO_4 (72 %) versetzt. Die Proben wurden für 60 min bei 125 °C autoklaviert. Die Probenaufschlüsse wurden durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) in ein HPLC-Vial überführt.

Pastöse Proben wurden zunächst bei 65 °C getrocknet und fein zerkleinert. Von dem Granulat wurden jeweils 150 mg in ein 50 ml Schraubfläschchen eingewogen und mit 1,5 ml H_2SO_4 (72 %) versetzt. Die Proben wurden für 60 min im Wasserbad (30 °C) unter gelegentlichem Schwenken inkubiert und danach mit 42 g H_2O aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren (60 min, 125 °C) wurden die Probenaufschlüsse durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) in ein HPLC-Vial überführt.
Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Probenanalyse

Es wurde eine Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) HPLC-Säule zur Bestimmung der organischen Säuren verwendet. Die Injektion der Proben in die HPLC-Probenschleife erfolgte vollautomatisch mittels Autosampler. Der HPLC-Lauf wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer Säulentemperatur von 65 °C durchgeführt; als Laufmittel wurde 0,005 M H_2SO_4 verwendet. Die Detektion der Probenpeaks erfolgte über den Brechungsindex mittels RI-Detektor.

2.2 Versuchsdurchführungen und Ergebnisse

2.2.1 durchgeführte Versuche

Die Gewinnung von Protein aus Rapspresskuchen erfolgte in allen durchgeführten Versuchsreihen mittels alkalischer Extraktion der Proteine bei pH 11,5 und 60 °C (jeweils konstant über die gesamte Extraktionsdauer) sowie nachfolgender Ausfällung der Proteine aus dem alkalischen Extrakt mittels isoelektrischer Präzipitation bei sauren pH-Werten (s. auch Tab. 2). Die gewonnenen Präzipitate wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung charakterisiert (Analyse des Gehaltes an TS, Asche, Protein, Zucker sowie organischen Säuren).

Die Wahl der angewandten Extraktionsbedingungen basiert auf Vorversuchen, welche von der Arbeitsgruppe Prozesstechnik im Zuge des Projektes zur Gewinnung von Rapsprotein aus RPK durchgeführt wurden und der Ermittlung geeigneter Extraktionsparameter zur Erzielung einer möglichst hohen Proteinausbeute dienten.

Flussdiagramme der Versuchsreihen 1, 3 und 4 finden sich im Ergebnisteil (Abschnitt 2.2.3, Abb. 19 und 20 (Versuchsreihe 1), Abb. 28, 29 und 30 (Versuchsreihe 3) sowie Abb. 37 (Versuchsreihe 4).

2.2.1.1 Versuchsreihe 1: Einzelfällungen

Versuchsreihe 1 diente der Ermittlung des Einflusses der Extraktionsdauer auf die Proteinausbeute sowie auf die Reinheit der daraus gewonnenen Proteinisolate. Es wurden zwei Proteinextraktionen durchgeführt, jeweils bei einer Extraktionsdauer von 60 min und 180 min. Die Fällung der Proteine erfolgte aus aliquoten Teilmengen beider Extrakte jeweils bei pH 5,5 sowie bei pH 3.

Es wurde zudem untersucht, ob sich die Reinheit der Proteinpräzipitate durch einen nachfolgenden Waschschritt erhöhen lässt. Dazu wurden die Präzipitate mit der fünffachen Menge Wasser bei dem pH-Wert der isoelektrischen Fällung (pH 5,5 bzw. pH 3,0) gewaschen.

2.2.1.2 Versuchsreihe 2: Feinfällungsreihe

Versuchsreihe 2 diente der Ermittlung des bestmöglich geeigneten pH-Wertes zur isoelektrischen Präzipitation der Rapsproteine aus dem alkalischen Proteinextrakt. Es sollten dabei jene pH-Werte eruiert werden, bei welchen die Rapsproteine mit möglichst großer Ausbeute sowie möglichst großer Reinheit aus dem alkalischen Extrakt ausgefällt werden

können. Dazu wurde der pH-Wert des alkalischen Proteinextraktes (180 min Extraktionsdauer) im Bereich von pH 7,0 – 3,0 stufenweise in Schritten von 0,1 pH-Einheiten gesenkt, wobei bei jedem pH-Wert der jeweils ausgefallene Niederschlag vom Überstand abgetrennt wurde (sequenzielle Fällung der Proteine aus dem Extrakt).

2.2.1.3 Versuchsreihe 3: Vorfällungsversuche

Versuchsreihe 3 wurde basierend auf den Ergebnissen der Versuchsreihe 2 durchgeführt. Ziel der Versuche war es, Proteinpräzipitate höher Reinheit zu erhalten, indem vor der Ausfällung des Rapsproteinproduktes bei pH 5,0 eine Fällung bei pH 6,5 („Vorfällung“) durchgeführt wurde. Damit sollten Niederschläge geringerer Reinheit vor der eigentlichen Proteinfällung aus dem Proteinextrakt abgetrennt werden. Es sollte damit vermieden werden, dass die nicht-Protein-Verunreinigungen bei der Fällung des Proteinproduktes mitgerissen werden und folglich dessen Reinheit erniedrigen. Die Vorfällungsversuche wurden mit Extrakten unterschiedlicher Extraktionsdauer von jeweils 60, 120 oder 180 min durchgeführt.

Die bei pH 5,0 ausgefällten Proteinprodukte wurden mit der fünffachen Menge Wasser (bei pH 5,0) gewaschen, um deren Reinheit möglichst noch weiter zu erhöhen.

2.2.1.4 Versuchsreihe 4: Reduktion phenolischer Verbindungen mittels Ultrafiltration

Ziel der Versuchsreihe 4 war die Reduktion phenolischer Verbindungen im Proteinextrakt, um eine höhere Reinheit sowie eine hellere Farbe der Proteinprodukte zu erhalten. Die verschiedenen Maßnahmen zur Reduktion phenolischer Verbindungen wurden modifiziert nach dem Verfahren von XU und DIOSADY (2002) durchgeführt. Diese Maßnahmen umfassen die Zugabe von Natriumsulfit (Na_2SO_3), Natriumchlorid (NaCl) und Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie die Anwendung von Ultrafiltration (UF) und Diafiltration (DF) im Rahmen der Proteinisolierung aus RPK mittels alkalischer Extraktion (120 min) und isoelektrischer Präzipitation (bei pH 3,5). Zusätzlich wurde der Fällungsüberstand mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) behandelt.

Na_2SO_3 wurde als Reduktionsmittel bei der Proteinextraktion zugegeben (entsprechend 0,1 % im LM) und sollte der Oxidation phenolischer Verbindungen im Zuge des Extraktionsprozesses entgegenwirken, da gebildete Oxidationsprodukte kovalent mit den Proteinen interagieren können und zu einer unerwünschten dunklen Farbe der Proteinprodukte führen können (XU und DIOSADY, 2002; vgl. auch Abschnitt 1.2.4.3).

Der Proteinextrakt wurde nachfolgend unter Zugabe von NaCl (entsprechend 0,05 M) und SDS (entsprechend 0,1 %) mittels UF aufkonzentriert (auf etwa ein Drittel des Ausgangsvolumens).

NaCl sollte dabei elektrostatische Anziehungskräfte zwischen Phenolsäure-Derivaten und Proteinen schwächen, während SDS die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen kondensierten Tanninen und Proteinen vermindern sollte (XU und DIOSADY, 2002; vgl. auch Abschnitt 1.2.4.3). Zur nachfolgenden Diafiltration wurde das Konzentrat jeweils mit Natriumsulfit-Lösung (0,1 %) verdünnt (im ersten DF-Durchgang mit der dreifachen Konzentrat-Menge, im zweiten DF-Durchgang mit der entsprechenden Konzentrat-Menge). Der Anteil an sekundären Pflanzenstoffen im Proteinextrakt sollte durch die Anwendung von UF und DF vermindert werden, da die niedermolekularen Verbindungen die verwendete UF-Membran (MWCO = 10 kDa) passieren können, sofern sie nicht an Protein gebunden vorliegen, während die makromolekularen Proteine zurückgehalten werden.

PVPP stellt ein spezifisches Adsorbens für phenolische Verbindungen dar und wurde dem Überstand der isoelektrischen Fällung zugegeben (entsprechend jeweils 10 % bzw. 1 % der Masse an RPK, welche bei der Proteinextraktion eingesetzt wurde, um die betreffende Menge an Überstand zu erhalten).

2.2.2 Versuchsdurchführungen

2.2.2.1 Durchführung der Versuchsreihen 1 – 3

Verwendete Utensilien und Chemikalien:

- Magnetrührer mit Heizplatte (Heizrührer)
- elektronisches Kontaktthermometer
- pH-Meter: Metrohm Typ 744
- Konduktometer: Thermo Scientific Orion 3 Star Benchtop
- Zentrifuge: Hettich Rotanta 466
- NaOH (50 % w/w)
- HCl (12,3 % w/v)

Durchführung der alkalischen Proteinextraktion und Waschen des Extraktionsrückstandes

Jeweils 200 g Rapspresskuchen wurden mit 1700 g heißem Leitungswasser vermengt (entsprechend einem Mischungsverhältnis RPK:LM von 1:8,5). Das Gemisch wurde auf dem Heizrührer auf 60 °C erhitzt, nach Erreichen der Temperatur wurde durch Zugabe von NaOH (50 %) der pH-Wert des Breies auf pH 11,5 eingestellt. Die Extraktion wurde nach erfolgter pH-Wert-Einstellung bei konstanter Temperatur (60 °C) für jeweils 60, 120 oder 180 min unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer durchgeführt (s. Tab 2). Dabei wurde der pH-Wert

des Extraktionsgemisches über die gesamte Extraktionsdauer durch ständiges Zutröpfeln von NaOH (50 %) konstant auf pH 11,5 gehalten (NaOH-Zugabe und pH-Verlauf aller durchgeführten Extraktionen der Versuchsreihen 1 - 3 sind im Anhang S. III – IV in Abb. A 1 – A 6 dargestellt). Um Verdunstungsverlusten entgegenzuwirken wurde das Extraktionsgefäß mit Alufolie abgedeckt. Über den gesamten Verlauf wurden pH-Wert, Temperatur und Leitfähigkeit des Gemisches periodisch aufgezeichnet. Nach Ablauf der vorgegebenen Extraktionsdauer wurde der Extrakt (Extrakt 1) durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 min) vom Rückstand abgetrennt.

Der Extraktionsrückstand wurde mit 400 g Leitungswasser vermengt (entsprechend der doppelten Menge der ursprünglich eingesetzten Masse an RPK); unter ständigem Rühren wurde der Brei zunächst auf 60 °C erhitzt und danach mit NaOH auf einen pH-Wert von 11,5 eingestellt. Das Waschwasser (Extrakt 2) wurde unmittelbar nach erfolgter pH-Wert-Einstellung vom Rückstand abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min).

Die beiden erhaltenen Extrakte wurden vereint und für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Eine in geringer Menge vorhandene aufschwimmende Phase wurde vom Extrakt abgetrennt.

Durchführung der isoelektrischen Proteinfällung

Dem auf Raumtemperatur (ca. 25 °C) abgekühlten Proteinextrakt (vereinte Extrakte 1 und 2) wurde unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer langsam HCl-Lösung (12,3 %) zupipettiert. Der pH-Wert des betreffenden Extraktes wurde dabei auf den in der jeweiligen Versuchsreihe festgelegten pH-Wert eingestellt (s. Tab. 2). Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (3500 rpm, 10 min) vom Überstand abgetrennt.

In Versuchsreihe 1 (Einzelfällungen) erfolgte die Präzipitation der Proteine aus aliquoten Mengen des Proteinextraktes einmal bei pH 5,5 sowie bei pH 3,0.

In Versuchsreihe 2 (Feinfällungsreihe) wurden die Präzipitate zwischen pH 7,0 und 3,0 in Schritten von 0,1 pH-Einheiten sequenziell aus dem Extrakt ausgefällt. Bei jeder Stufe wurde der Extrakt abzentrifugiert, um auch Niederschläge unauffälliger Mengen aus dem Extrakt abzutrennen.

In Versuchsreihe 3 (Vorfällungsversuche) wurde zunächst eine (Vor-)Fällung bei pH 6,5 durchgeführt, der Niederschlag wurde abzentrifugiert und aus dem Überstand wurde nachfolgend ein Proteinpräzipitat bei pH 5,0 ausgefällt.

Waschen der Proteinpräzipitate

Ausgewählte Proteinpräzipitate wurden mit der jeweils fünffachen Menge an Wasser vermengt und der pH-Wert des Gemisches wurde durch Zugabe von HCl (12,3 %) auf jenen pH-Wert eingestellt, bei dem die isoelektrische Fällung der Produkte erfolgte. Die gewaschenen Proteinpräzipitate wurden durch Zentrifugation (3000 rpm, 15 min) vom Überstand abgetrennt.

Tabelle 2: Übersicht über die variierten Parameter der durchgeführten Versuchsreihen 1 – 3 bezüglich der Proteinextraktion und isoelektrischen Proteinpräzipitation. Die Extraktion wurde jeweils mit Wasser als LM bei einem Mischungsverhältnis RPK:LM von 1:8,5 sowie bei 60 °C und pH 11,5 durchgeführt. Die Präzipitation der Proteine aus dem Extrakt erfolgte jeweils bei Raumtemperatur (ca. 25 °C). (* sequenzielle Fällung)

	Bezeichnung der Versuchsreihe	**Extraktionsdauer [min]**	**pH-Wert Proteinfällung**
1	Einzelfällungen	60	5,5
		60	3,0
		180	5,5
		180	3,0
2	Feinfällungsreihe	180	7,0 - 3,0*
3	Vorfällungsversuche	60	6,5; 5,0*
		120	6,5; 5,0*
		180	6,5; 5,0*

2.2.2.2 Durchführung der Versuchsreihe 4

Verwendete Utensilien und Chemikalien:

- Magnetrührer mit Heizplatte (Heizrührer)
- elektronisches Kontaktthermometer
- pH-Meter: Metrohm Typ 744
- Konduktometer: Thermo Scientific Orion 3 Star Benchtop
- Zentrifuge: Hettich Rotanta 466
- Membranfiltrationseinheit (vgl. Abb 17)
- UF-Membran: MICRODYN NADIR UP010 P, MWCO = 10 kDa (Datenblatt s. Anhnahng S. VI, Abb. B 1)
- Waage mit automatischer Datenaufzeichnung
- NaOH (50 % w/w)
- NaCl
- SDS
- Na_2SO_3

- HCl (12,3 % w/v)
- Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)

Durchführung der alkalischen Proteinextraktion

200 g Rapspresskuchen wurden mit 2400 g heißem LM (Leitungswasser mit 0,1 % Na_2SO_3) vermengt (entsprechend einem Mischungsverhältnis RPK:LM von 1:12). Das Gemisch wurde auf dem Heizrührer auf 60 °C erhitzt und nach Erreichen der Temperatur durch Zugabe von NaOH (50 %) auf pH 11,5 eingestellt. Sobald der pH-Wert erreicht war, wurde die Extraktion für 120 min unter ständigem Rühren auf dem Heizrührer bei konstanter Temperatur (60 °C) durchgeführt. Der pH-Wert des Extraktionsgemisches wurde über die gesamte Extraktionsdauer durch ständiges Zutröpfeln von NaOH (50 %) konstant auf pH 11,5 gehalten (NaOH-Zugabe und pH-Verlauf der Extraktion von Versuchsreihe 4 ist im Anhang S. V in Abb. A 7 dargestellt). Um Verdunstungsverlusten entgegenzuwirken, wurde das Extraktionsgefäß mit Alufolie abgedeckt. Über den gesamten Verlauf wurden pH-Wert, Temperatur, und Leitfähigkeit des Gemisches periodisch aufgezeichnet. Der Extrakt wurde nach Ablauf der 120-minütigen Extraktionsdauer durch Zentrifugation (3500 rpm, 10 min) vom Extraktionsrückstand abgetrennt.

Durchführung Ultrafiltration und Diafiltration

Die UF wurde mittels Membranfiltrations-Testzelle im Labormaßstab durchgeführt, deren Aufbau in Abb. 17 schematisch dargestellt ist. Der Feed wird im Vorratsbehälter (gesamtes Fassungsvermögen ca. 1,8 l) mittels Heizspirale und Thermostat auf die gewünschte Temperatur eingestellt und mittels Magnetrührer durchmischt. Unterhalb des Rührkerns befindet sich die Membranfolie, welche auf einem porösen Trägerstoff aufliegt. Der erforderliche Druck für die Membranfiltration wird mittels Druckgas (N_2) aufgebracht. Das Permeat wird auf einer Waage aufgefangen, welche an ein System zur automatischen periodischen Datenaufzeichnung von Masse und Zeit angeschlossen ist. Als UF-Membran wurde eine Flachfolienmembran aus Polyethersulfon (PES) mit einem cut-off-Wert (MWCO) von 10 kDa verwendet (das Datenblatt der verwendeten UF-Membran findet sich im Anhang S. VI in Abb. B 1). Die Membranfläche beträgt 0,017 m^2. Es muss angemerkt werden, dass die Abschätzung der Konzentratmasse jeweils durch Berechnung über die Permeatmasse erfolgte und sich dadurch leichte Ungenauigkeiten ergeben, etwa durch unvermeidbare Verdunstungsverluste des Permeates. Permeat und Konzentrat konnten zudem nicht vollständig gesammelt werden, da jeweils ein gewisser Anteil zwangsläufig in der Zelle zurückbleibt.

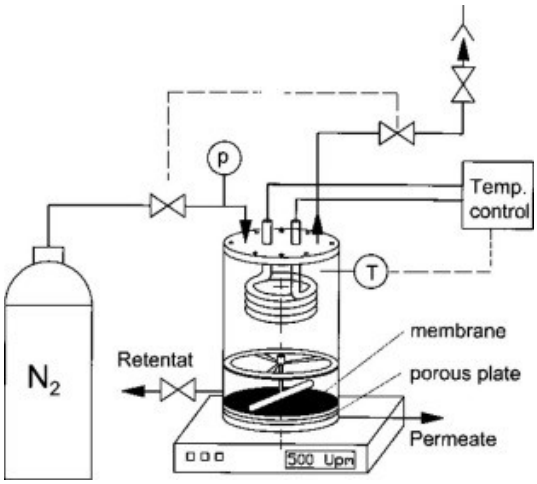

Abbildung 17: schematische Darstellung der verwendeten Membranfiltrationseinheit (Pruksasri et al., 2015)

1500 g des Proteinextraktes wurden mit 4,38 g NaCl (entsprechend 0,05 M) sowie 1,50 g SDS (entsprechend 0,1 %) versetzt und nach guter Durchmischung auf dem Magnetrührer in der Membranfiltrationseinheit auf 50 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Feedlösung durch Druckaufbringung mittels UF (MWCO = 10 kDa) bei einem Eingangsdruck von 5 bar und einer konstanten Feed-Temperatur von 50 °C auf etwa ein Drittel* (443 g) aufkonzentriert (Konzentrierungsfaktor cf = 3,38). Das Permeat wurde in einem mit Alufolie abgedeckten Gefäß gesammelt, um Verdunstungsverlusten entgegenzuwirken. Permeatmasse sowie Betriebszeit wurden während des UF-Prozesses periodisch aufgezeichnet; Temperatur und Druck wurden über die gesamte Filtrationsdauer konstant gehalten. Die Abschätzung der Masse an verbleibendem Konzentrat in der Membranfiltrationseinheit erfolgte jeweils durch Berechnung über die Permeatmasse.

Zur Diafiltration (DF) wurde Leitungswasser mit 0,1 % (w/w) Na_2SO_3 und 0,05 M NaCl als DF-Lösung verwendet. Im ersten DF-Durchgang (DF 1) wurde dem konzentrierten Extrakt die dreifache Menge* (1290 g) an DF-Lösung zugegeben. Die Feed-Lösung wurde wieder auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert, wobei der DF-Prozess bei einer Feed-Temperatur von 50 °C und bei einem Betriebsdruck von 5 bar durchgeführt wurde. In einem zweiten DF-Durchgang (DF 2) wurde das Retentat mit der gleichen Menge* (370 g) an DF-Lösung verdünnt. Die Feed-Lösung wurde bei 50 °C und einem Betriebsdruck von 10 bar wieder auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert.

* die Abschätzung der Konzentratmasse erfolgte jeweils durch Berechnung über die Permeatmasse

Durchführung der isoelektrischen Proteinfällung

Dem auf Raumtemperatur (ca. 25 °C) abgekühlten, konzentrierten und diafiltrierten Proteinextrakt wurde unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer langsam HCl-Lösung (12,3 %) zupipettiert, bis der pH-Wert des Extraktes stabil auf pH 3,5 eingestellt war. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min, 3500 rpm) vom Überstand abgetrennt.

PVPP-Behandlung des Überstandes nach der Proteinfällung

Jeweils 50 ml des Überstandes der isoelektrischen Fällung wurden mit 2,80 g bzw. 0,28 g PVPP versetzt (entsprechend jeweils 10 % bzw. 1 % der Masse an RPK, welche bei der Proteinextraktion eingesetzt wurde, um die betreffende Menge an Überstand zu erhalten). Die Proben wurden für etwa 15 h bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) am Magnetrührer gerührt und danach für 10 min bei 3500 rpm abzentrifugiert.

2.2.3 Ergebnisse

Zusammensetzung des Rapspresskuchens

Die Analysenergebnisse über die Zusammensetzung des Rapspresskuchens (RPK) sind in Abb. 18 grafisch dargestellt. Für den RPK wurde ein Trockensubstanzgehalt (TS-Gehalt) von ca. 92 % bestimmt, der analysierte Proteingehalt beträgt rund 32 % (entsprechend 35 % in TS). Es wurden etwa 27 % Zucker (entsprechend 29 % in TS) und ca. 9 % Säuren (10 % in TS) im untersuchten RPK nachgewiesen.

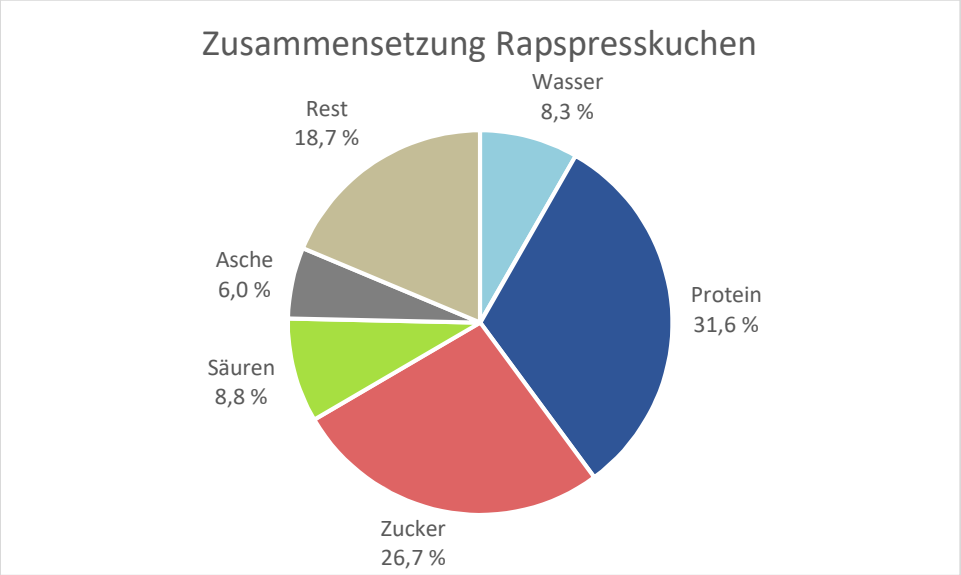

Abbildung 18: Analysenergebnisse bezüglich der Zusammensetzung des Rapspresskuchens

Bei den Zuckern, die aus dem RPK extrahiert wurden und teilweise mit den Proteinen ausgefällt wurden, handelt es sich hauptsächlich um Saccharose, in geringeren Mengen Stachyose und Glucose; weiters wurde Glycerin (Zuckeralkohol) nachgewiesen.

Als Säuren kommen hauptsächlich Glucuronsäure und Galacturonsäure im RPK vor, welche jeweils Bausteine von Strukturpolysacchariden wie Hemicellulosen (Polyosen) bzw. Pektinen darstellen (EBERMANN und ELMADFA, 2008; HABERMEHL et al., 2008). Daneben kommen geringe Mengen an Essigsäure im RPK vor.

Proteinextrakte und -Präzipitate

Bei dem Extraktionsprozess wurden neben den Proteinen (44 – 48 % bezogen auf die TS der Extrakte) hauptsächlich Zucker (18 – 22 % in TS) sowie Säuren (6 – 7 % in TS) aus dem Rapspresskuchen extrahiert. Der Aschegehalt der Proteinextrakte beträgt je 16 % in TS, wovon jeweils fast zwei Drittel durch die Natronlauge gebildet wird, die während des Extraktionsprozesses zugegeben wurde (entsprechend 10 % Asche aus NaOH in TS der Extrakte).

Die Proteinausbeute der Extrakte beträgt durchschnittlich 60 % (50 – 71 %), bei einer TS-Ausbeute von rund 45 %.

Die Ergebnisse lassen keinen wesentlichen Einfluss der Extraktionsdauer (60, 120 oder 180 min) auf den Proteingehalt oder die Proteinausbeute der Extrakte erkennen.

Die Präzipitate unterscheiden sich je nach pH-Wert der isoelektrischen Fällung (sowohl hinsichtlich der prozentualen Zusammensetzung als auch der TS- und Proteinausbeute). In allen Fällen stellt Protein den größten Anteil (zumindest 37 %) an der Trockensubstanz dar. Daneben kommen Zucker (6 – 14 % in TS), Säuren (2 – 13 % in TS) sowie Asche (3 – 15 % in TS; zum Großteil aus NaOH) als Bestandteile der Präzipitate vor (die angegebenen Zahlen beziehen sich auf ungewaschene Pellets). Der Fettgehalt untersuchter Proteinpräzipitate (Versuchsreihe 1, ungewaschen) liegt bei ca. 10 % in TS (die Bestimmung des Fettgehaltes wurde von der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Matthias Schreiner am Institut für Lebensmittelwissenschaften der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt).

Bei isoelektrischer Fällung im neutralen bzw. schwach sauren pH-Bereich (pH 6,5 bis 7,0), wurden im Allgemeinen Präzipitate vergleichsweise niedrigen Proteingehaltes (37 – 45 % Protein in TS) und niedriger Proteinausbeute (durchschnittlich 12 %) erhalten. Bei der Proteinfällung im pH-Bereich von pH 3,0 – 5,5 konnten demgegenüber Präzipitate höherer Reinheit (um 60 % Protein in TS) und höherer Proteinausbeute (durchschnittlich 35 %) gewonnen werden.

Die Reinheit der Proteinpräzipitate konnte jeweils durchschnittlich um 10 % erhöht werden, indem die Pellets nach der Fällung gewaschen wurden. Es reduzierte sich dadurch hauptsächlich der Aschegehalt (auf ca. die Hälfte bis auf ein Drittel des ursprünglichen Gehaltes) sowie der Zuckergehalt (auf ca. zwei Drittel bis auf die Hälfte des ursprünglichen Gehaltes) der Präzipitate. Der Säuregehalt der Präzipitate wurde durch den Waschschritt durchschnittlich auf zwei Drittel des ursprünglichen Gehaltes reduziert, wobei die Werte bei den unterschiedlichen Produkten stärker schwanken (von geringfügig bis ca. 50 %).

Die Proteinausbeute der Proteinprodukte wurde durch den Waschschritt um durchschnittlich 5 % vermindert.

Alle gewonnenen Präzipitate waren im feuchten Zustand ockerfarben, nach der Trocknung im Trockenschrank weisen die Produkte schwarz-braune Farbe auf.

Die Rohdaten der Analysenergebnisse finden sich im Anhang S. I in Tab. A 1 (Analysenergebnisse der Versuchsreihen 1 – 3) sowie S. II in Tab. A 2 (Analysenergebnisse der Versuchsreihe 4).

2.2.3.1 Versuchsreihe 1: Einzelfällungen

Die Massenbilanzen der Einzelfällungen sind als Flussdiagramme in Abb. 19 (60-minütige Extraktion) bzw. Abb. 20 (180-minütige Extraktion) dargestellt. Die Probennahmen wurden in den Darstellungen jeweils aus den Massenbilanzen herausgerechnet.

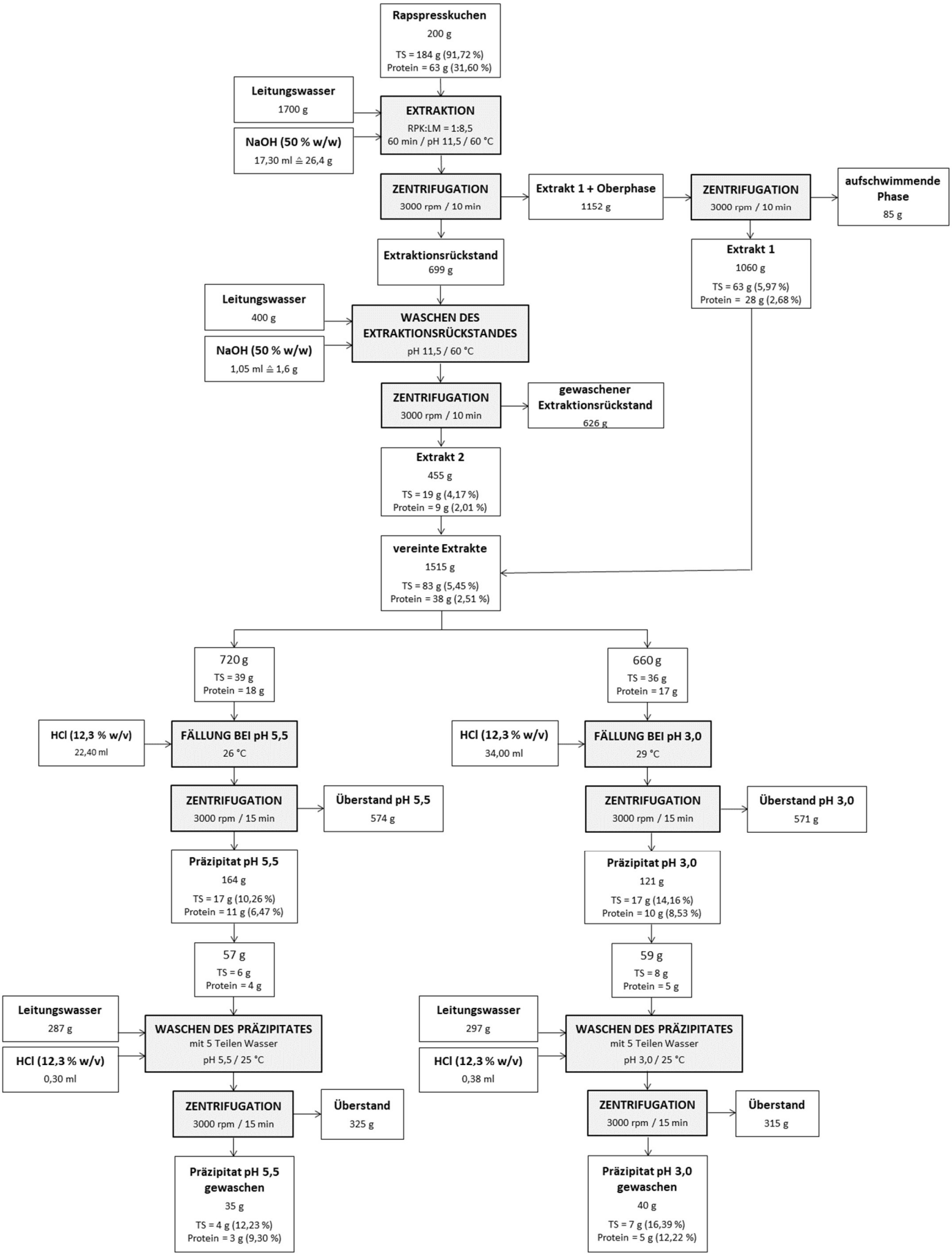

Abbildung 19: Massenbilanz der Einzelfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

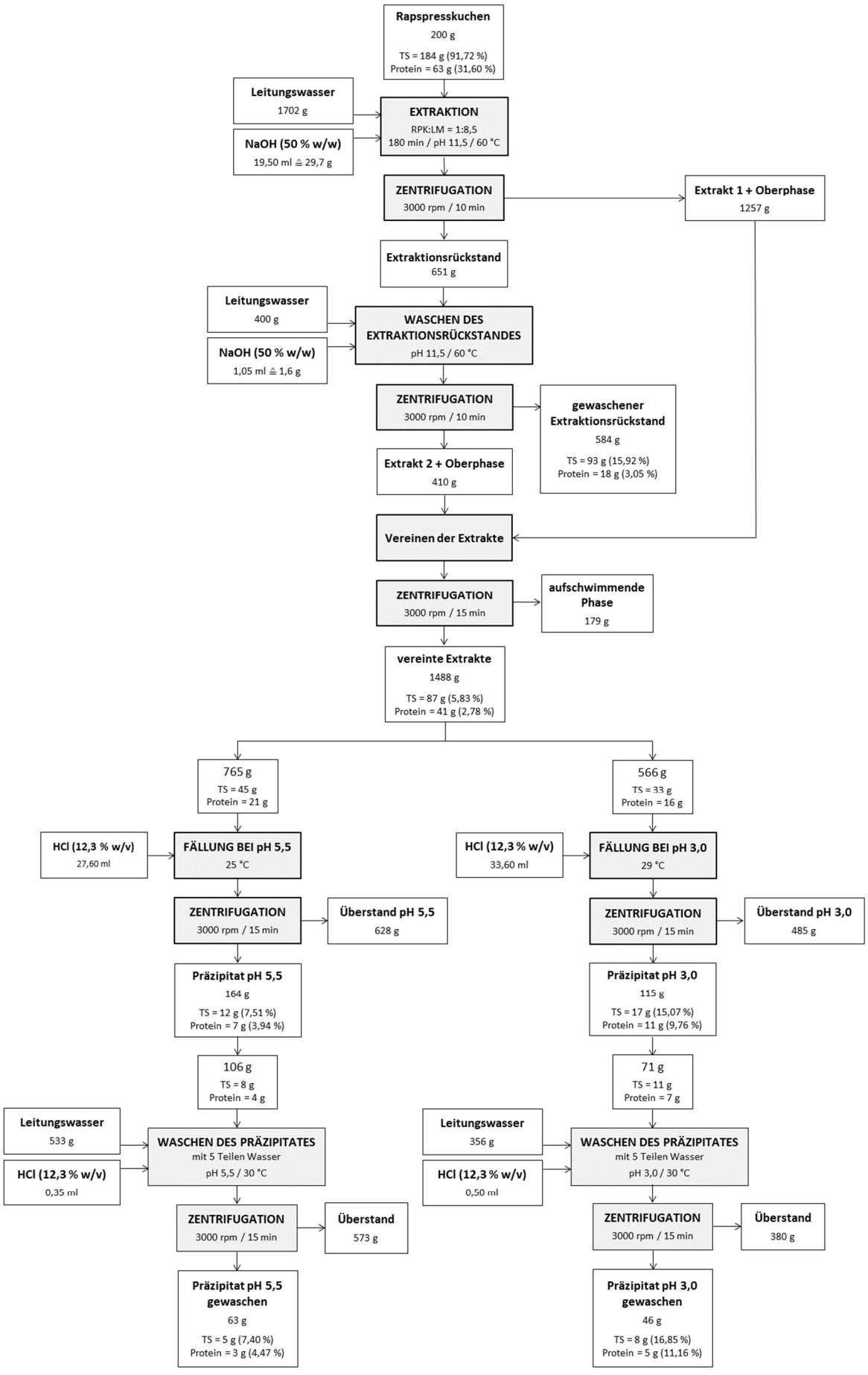

Abbildung 20: Massenbilanz der Einzelfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

Die Analysenergebnisse über die Zusammensetzung der Proteinextrakte sowie der Proteinpräzipitate der Versuchsreihe 1 sind in Abb. 21 und 22 in Balkendiagrammen dargestellt.

Für beide Extrakte wurde ein Proteingehalt von durchschnittlich 47 % in TS nachgewiesen, die Proteinausbeute der Extrakte beträgt 60 % (60 min) bzw. 65 % (180 min), bei TS-Ausbeuten von durchschnittlich je 46 % (s. Abb. 23 und 24).

Die Präzipitate, welche nach 60-minütiger Extraktionsdauer bei den unterschiedlichen pH-Werten aus dem Extrakt ausgefällt wurden, unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und Proteinausbeute nicht wesentlich voneinander. Der analysierte Proteingehalt der Präzipitate beträgt 63 % in TS (pH 5,5) bzw. 60 % in TS (pH 3,0). Die Proteinausbeute beträgt dabei 35 % (pH 5,5) bzw. 37 % (pH 3,0), bei TS-Ausbeuten von jeweils 20 – 21 % (s. Abb. 23).

Die Reinheit der Präzipitate konnte durch Waschen auf jeweils 75 – 76 % Protein in TS erhöht werden. Dabei wurde der Aschegehalt der Präzipitate von ursprünglich 9 % (pH 5,5) bzw. 6 % (pH 3,0) auf jeweils 3 % in TS reduziert, der Gehalt an Zucker verringerte sich von jeweils 9 – 10 % auf je 4 – 6 % in TS. Der Säuregehalt der Präzipitate beträgt nach dem Waschschritt jeweils knapp 6 % in TS, bei einem ursprünglichen Gehalt von je 6 – 8 % Säuren in TS (s. Abb. 21). Die Proteinausbeute der gewaschenen Produkte beträgt 31 % (pH 5,5) bzw. 37 % (pH 3,0) (s. Abb. 23).

Die Proteinpräzipitate, welche nach 180-minütiger Extraktionsdauer erhalten wurden, weisen einen Proteingehalt von 53 % (Fällung bei pH 5,5) bzw. 65 % (Fällung bei pH 3,0) auf. Die Proteinausbeute beträgt 20 % (pH 5,5) bzw. 47 % (pH 3,0) (s. Abb. 22 und 24). Aufgrund der abweichenden Werte gegenüber den Proteinpellets der 60-minütigen Extraktion ist es nicht auszuschließen, dass der Extrakt bei der Teilung in zwei Teilmengen vor der separaten Proteinfällung möglicherweise nicht ausreichend durchmischt war. Der Einfluss der Extraktionsdauer auf Proteinpräzipitate wird im Zuge der Versuchsreihe 3 wiederholt untersucht.

Ein Großteil des Aschegehaltes der Extrakte stammt jeweils von der Natronlauge, welche im Zuge der Proteinextraktion zugegeben wurde. Um den Einfluss der zugesetzten Natronlauge auf den Aschegehalt der Präzipitate zu veranschaulichen, sind in den Abb. 23 und 24 die berechneten Asche-Ausbeuten aller Proben dargestellt, in welchen die Asche aus der zugegebenen Natronlauge nicht inkludiert ist („Ausbeute Asche exkl. NaOH“).

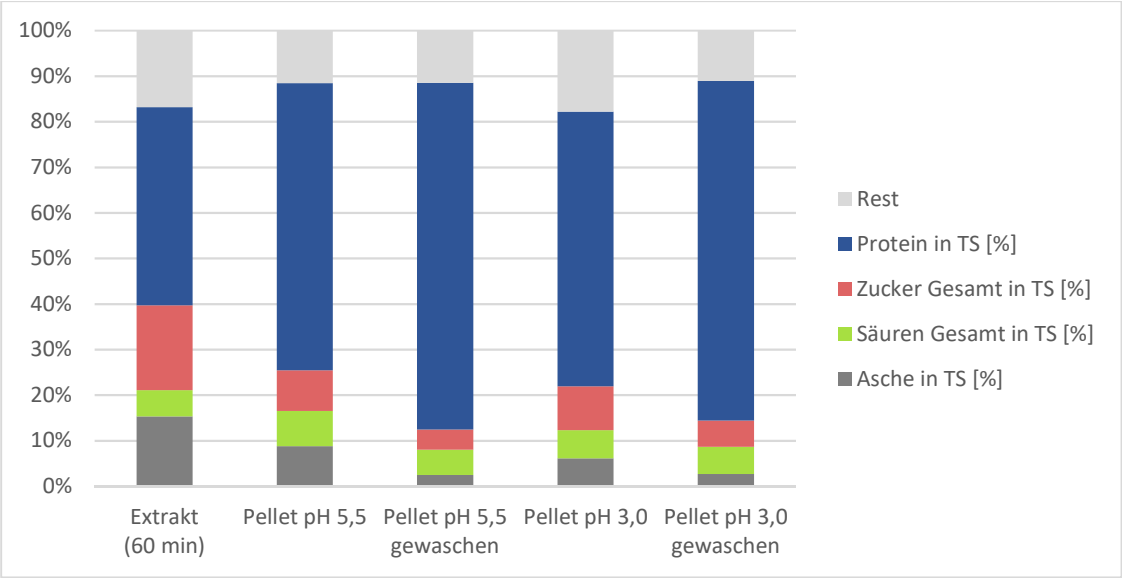

Abbildung 21: Zusammensetzung des Extraktes und der Präzipitate der Einzelfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

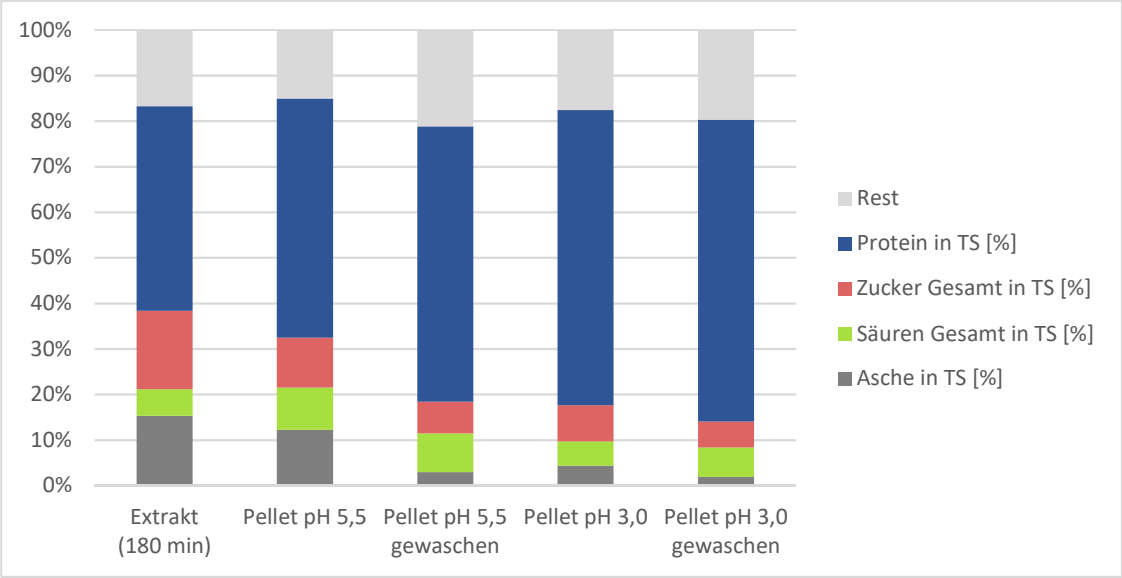

Abbildung 22: Zusammensetzung des Extraktes und der Präzipitate der Einzelfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

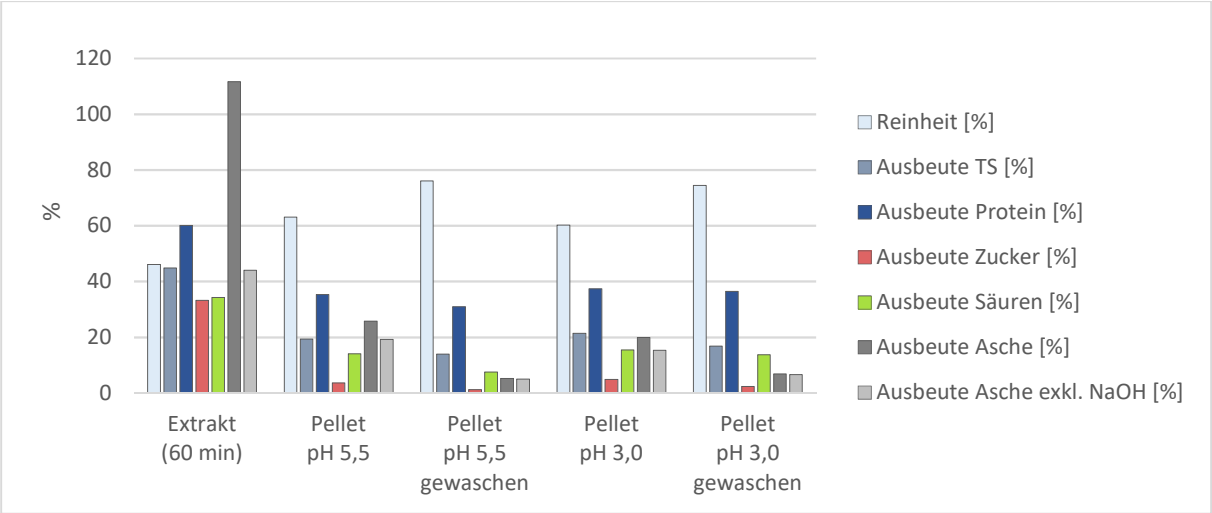

Abbildung 23: Proteinreinheit und Ausbeuten der untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate der Einzelfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

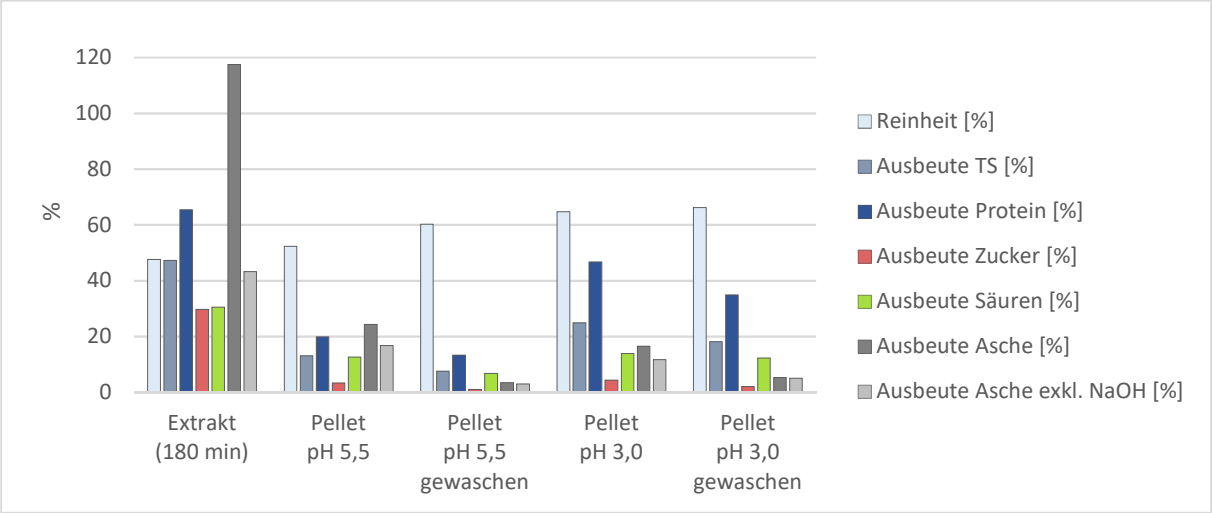

Abbildung 24: Proteinreinheit und Ausbeuten der untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate der Einzelfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

Die Proteinpräzipitate (ungewaschen, 60-minütige Extraktionsdauer) enthalten jeweils ca. 10 % Fett in TS; die Bestimmung des Fettgehaltes wurde von der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Matthias Schreiner am Institut für Lebensmittelwissenschaften der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt.

2.2.3.2 Versuchsreihe 2: Feinfällungsreihe

Der Extrakt der Versuchsreihe 2 (180-minütige Extraktion) weist einen Proteingehalt von 46 % in TS auf; die Proteinausbeute beträgt 71 %, bei einer TS-Ausbeute von 53 % (s. Abb. 26).

Bei der sequenziellen isoelektrischen Proteinpräzipitation im pH-Bereich von 7,0 bis 3,0 wurden bei den pH-Werten 7,0, 5,4, 5,3, 5,2 sowie 5,1 signifikante Mengen an Präzipitat ausgefällt. Zur Veranschaulichung der Masse an Niederschlag, welche jeweils bei einem bestimmten pH-Wert innerhalb des untersuchten Bereichs aus der gegebenen Masse an Extrakt erhalten wurde, dient Abb. 25 (die Darstellung enthält keine Informationen über TS- oder Proteingehalt der Präzipitate). Die Zusammensetzung der Präzipitate bzw. die entsprechende Ausbeute untersuchter Analyten ist jeweils in Abb. 26 bzw. 27 dargestellt.

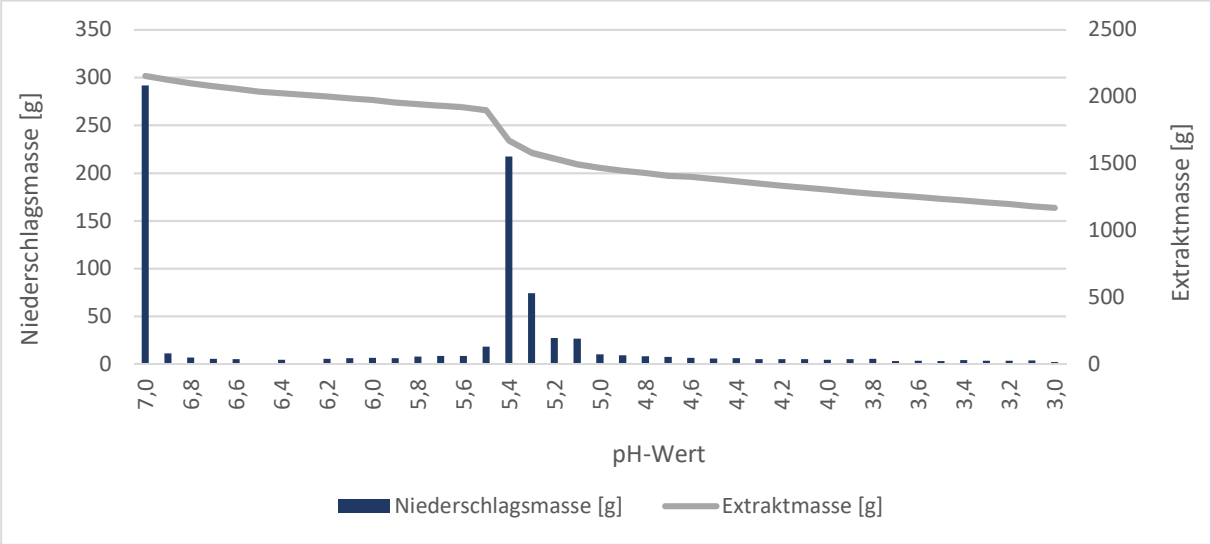

Abbildung 25: Veranschaulichung der Masse an Niederschlag, welche bei der sequenziellen isoelektrischen Präzipitation jeweils bei einem bestimmten pH-Wert aus der gegebenen Extraktmasse ausgefällt wurde

Das Präzipitat, welches bei pH 7,0 ausgefällt wurde, weist mit 37 % Protein in TS die weitaus geringste Reinheit auf; Protein- und TS-Ausbeute betragen jeweils 9 % (s. Abb. 26 und 27).

Die Präzipitate, welche nachfolgend im pH-Bereich von 5,4 – 5,1 ausgefällt wurden, weisen jeweils eine Reinheit von 72 – 78 % auf. Die Proteinausbeute der Produkte beträgt 24 % bei pH 5,4, 12 % bei pH 5,3 bzw. jeweils 5 % bei pH 5,2 und 5,1. Die TS-Ausbeute der Präzipitate liegt bei 11 % (pH 5,4), 5 % (pH 5,3) bzw. jeweils 2 – 3 % bei pH 5,2 und 5,1 (s. Abb. 26 und 27).

Da von den Präzipitaten bei pH 5,2 und 5,1 zu wenig Probe vorhanden war, konnte keine Bestimmung des Zucker- sowie Säuregehaltes durchgeführt werden; die beiden Proben wurden daher nicht in das Balkendiagramm in Abb. 26 aufgenommen. Zudem sind aus diesem Grund die Werte für die Zucker- und Säure-Ausbeute der beiden Proben in Abb. 27 nicht dargestellt.

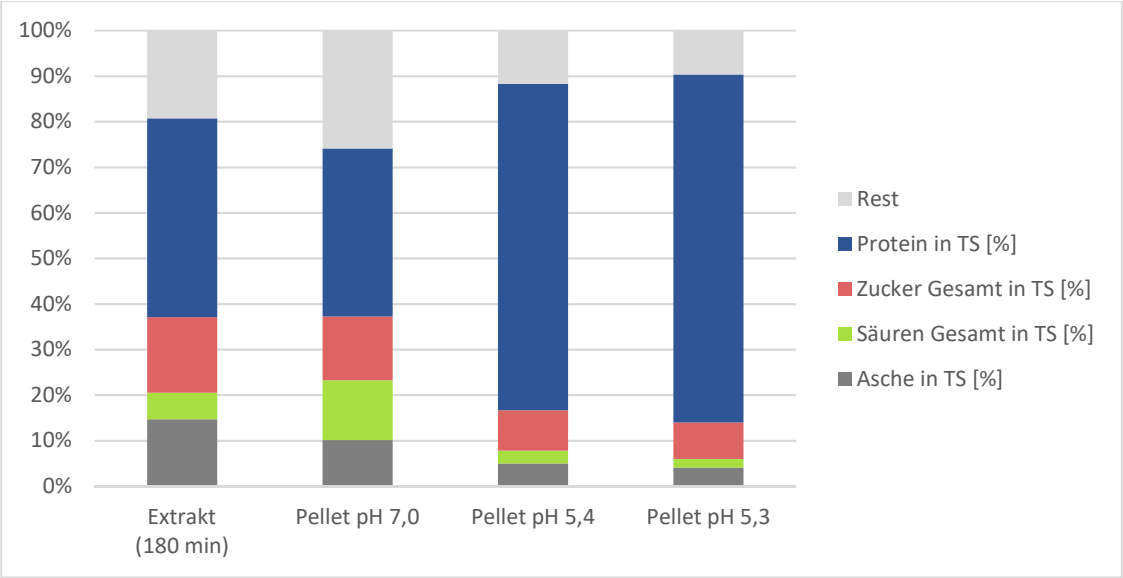

Abbildung 26: Zusammensetzung des Extraktes sowie der Präzipitate, welche bei der sequenziellen isoelektrischen Fällung (in relevanten Mengen) erhalten wurden. Die Präzipitate, welche bei pH 5,2 sowie 5,1 ausgefällt wurden, sind in diesem Diagramm nicht dargestellt, da von beiden Proben nicht genügend Material vorhanden war, um die Bestimmung des Zucker- und Säuregehaltes durchzuführen.

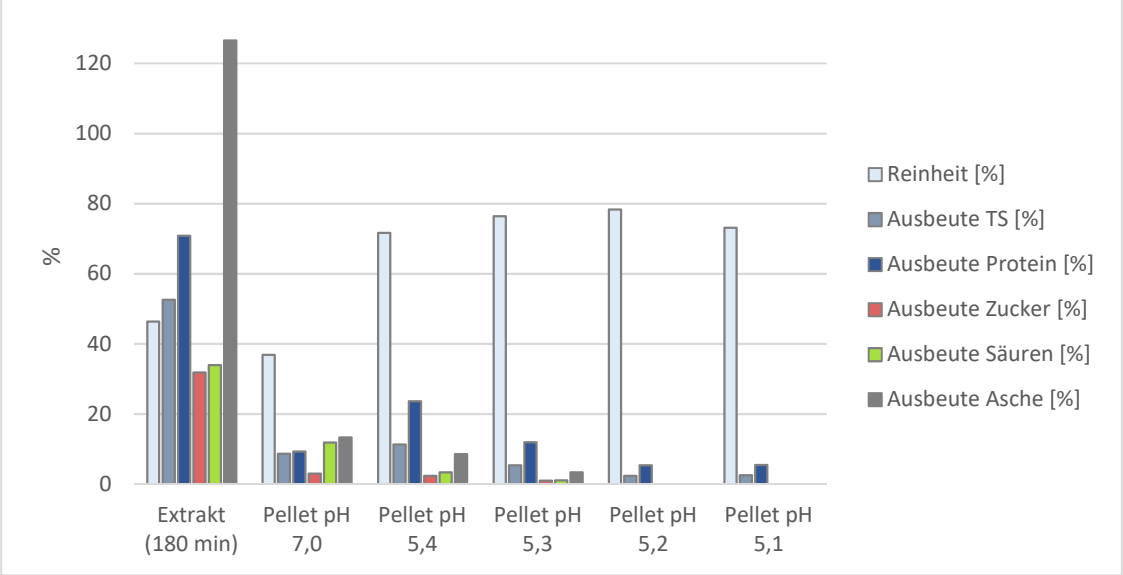

Abbildung 27: Proteinreinheit und Ausbeuten der jeweils untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate, welche bei der sequenziellen isoelektrischen Fällung (in relevanten Mengen) erhalten wurden. Die Ausbeute an Zucker sowie Säuren der Präzipitate, welche bei pH 5,2 sowie 5,1 ausgefällt wurden, sind in diesem Diagramm nicht dargestellt, da von beiden Proben nicht genügend Material vorhanden war, um die Bestimmung des Zucker- und Säuregehaltes durchzuführen.

Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse sollte im Zuge der nachfolgenden Versuchsreihe festgestellt werden, ob sich die Produktreinheit erhöhen lässt, indem die Niederschläge niedrigeren Proteingehaltes aus dem Extrakt abgetrennt werden, bevor das Proteinprodukt

ausgefällt wird. Ein mögliches Mitreißen der nicht-Protein-Verunreinigungen bei der Proteinfällung soll somit vermieden werden.

2.2.3.3 Versuchsreihe 3: Vorfällungsversuche

Die Massenbilanzen der durchgeführten Vorfällungsversuche sind als Fließdiagramm in Abb. 28 (60-minütige Extraktion), Abb. 29 (120-minütige Extraktion) bzw. Abb. 30 (180-minütige Extraktion) dargestellt.

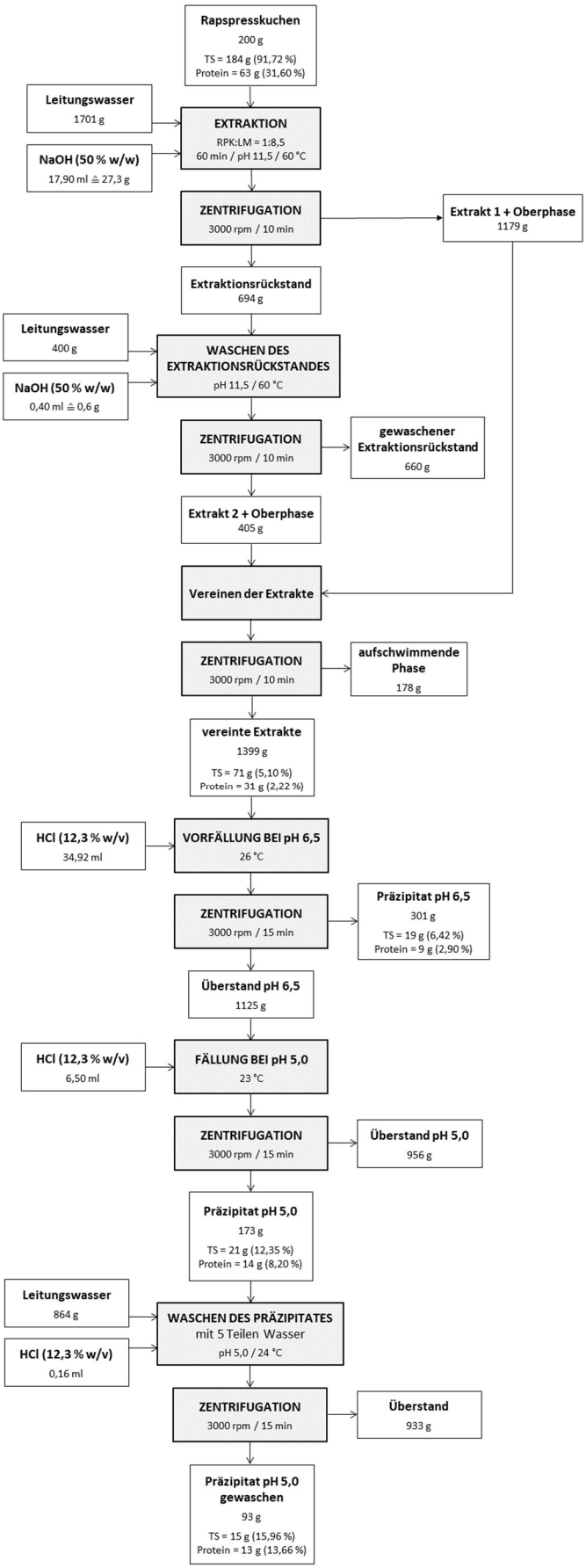

Abbildung 28: Massenbilanz der Vorfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

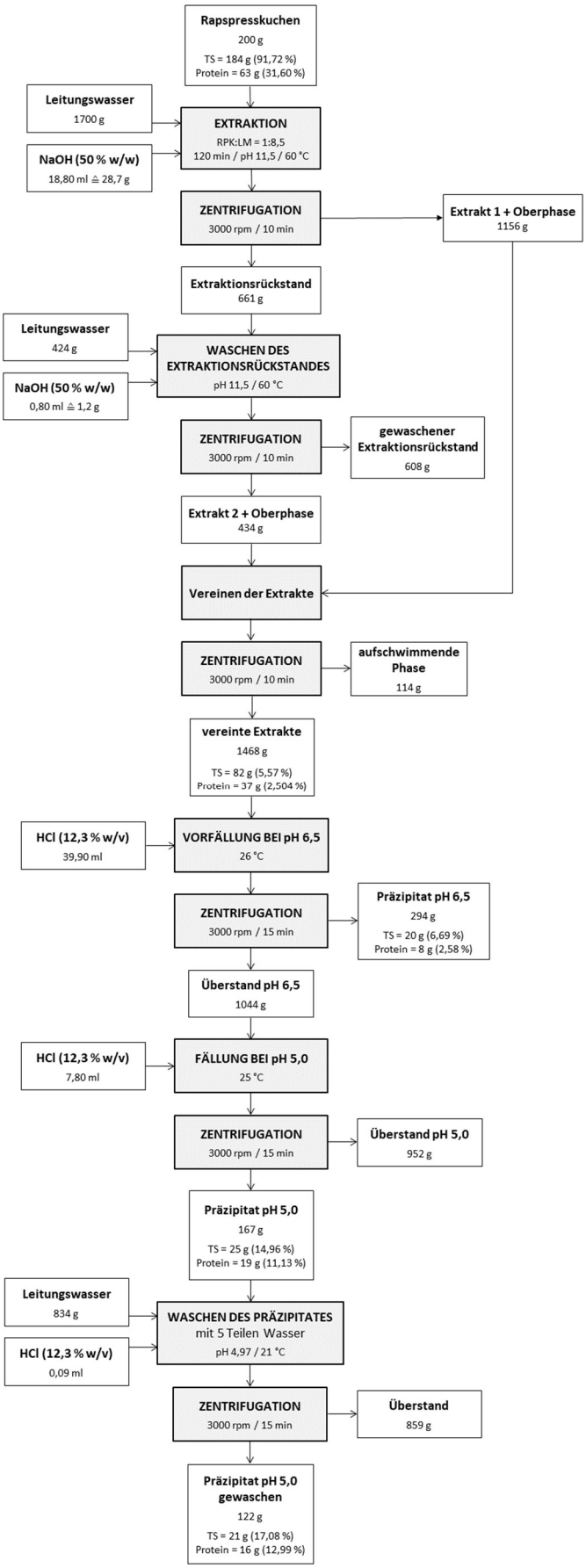

Abbildung 29: Massenbilanz der Vorfällungsversuche bei 120-minütiger Extraktionsdauer

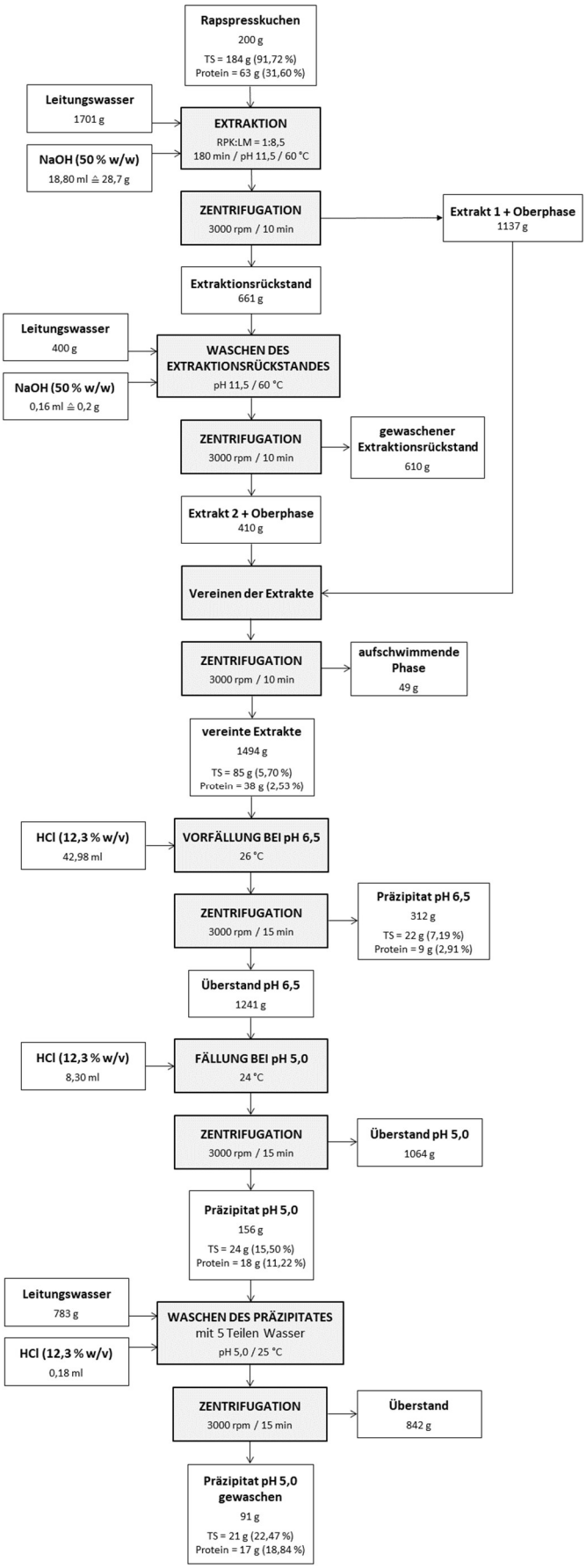

Abbildung 30: Massenbilanz der Vorfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

Die Analysenwerte über die Zusammensetzungen der Extrakte und Präzipitate bei 60-, 120- bzw. 180-minütiger Extraktionsdauer sind jeweils in den Abbildungen 31, 32 und 33 dargestellt. Die Abbildungen 34, 35 und 36 veranschaulichen jeweils die Ausbeute der untersuchten Bestandteile aller Extrakte und Präzipitate.

Alle Extrakte weisen einen Proteingehalt um 44 % in TS auf (s. Abb. 31, 32 bzw. 33). Die Proteinausbeuten betragen 49 % (60-minütige Extraktionsdauer), 58 % (120 min) und 60 % (180 min), bei TS-Ausbeuten von 39 % (60 min), 45 % (120 min) und 47 % (180 min) (s. Abb. 34, 35 bzw. 36). Jeweils knapp zwei Drittel des Aschegehaltes der Extrakte, entsprechend 10 % Asche in der Extrakt-TS, stammen von der Natronlauge, die während des Extraktionsprozesses zugegeben wurde (s. Abb. 31, 32 bzw. 33).

Die Vorfällungs-Präzipitate, welche bei pH 6,5 ausgefällt wurden, zeichnen sich jeweils durch einen vergleichsweise niedrigen Proteingehalt (39 – 45 % in TS) sowie einen relativ hohen Gehalt an Zucker (11 – 14 % in TS) und Säuren (11 – 12 % in TS) aus; der Aschegehalt beträgt jeweils 13 – 15 % in TS, wobei davon jeweils etwa die Hälfte (7 – 8 %) aus NaOH stammt (s. Abb 31, 32 bzw. 33). Die Proteinausbeute der betreffenden Präzipitate beträgt jeweils 12 – 14 %, bei einer TS-Ausbeute von je 11 – 12 % (s. Abb. 34, 35 bzw. 36).

Die nachfolgend bei pH 5,0 aus den Extrakten ausgefällten Präzipitate weisen einen Proteingehalt von 66 % in TS (60-minütige Extraktion) bzw. 73 – 74 % in TS (120- und 180-minütige Extraktion) auf. Der Gehalt an Zucker ist mit jeweils 6 – 7 % in TS im Vergleich zu den Präzipitaten der Vorfällung nur etwa halb so hoch. Der Säuregehalt der Proteinprodukte liegt bei jeweils 2 – 3 % in TS und ist somit gegenüber den Vorfällungs-Präzipitaten deutlich (auf ca. ein Sechstel) reduziert. Der Aschegehalt der Präzipitate beträgt jeweils knapp 6 % in TS und somit weniger als die Hälfte verglichen mit den Vorfällungs-Präzipitaten; jeweils 3 – 4 % des Aschegehaltes stammen dabei von der Natronlauge, die bei der alkalischen Extraktion zugegeben wurde (s. Abb. 31, 32 bzw. 33). Die Proteinausbeuten betragen jeweils 23 % (60-minütige Extraktion) bzw. 28 - 29 % (120- und 180-minütige Extraktion), bei TS-Ausbeuten von 12 % (60 min) bzw. 13 – 14 % (120 und 180 min) (s. Abb. 34, 35 bzw. 36).

Durch Waschen der Proteinprodukte konnte deren Reinheit auf 86 % (60-minütige Extraktion), 76 % (120-minütige Extraktion) bzw. 84 % (180-minütige Extraktion) erhöht werden. Die gewaschenen Präzipitate enthalten noch jeweils 3 – 5 % Zucker, 1 – 2 % Säuren sowie 1 – 2 % Asche bezogen auf die TS (s. Abb. 31, 32 und 33). Durch den Waschprozess wurden die Proteinausbeuten um jeweils ca. 3 % verringert (s. Abb. 34, 35 und 36).

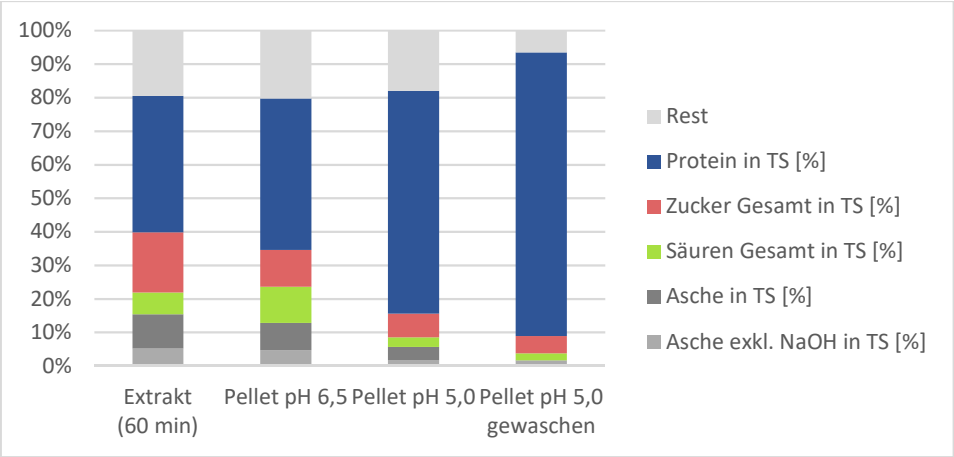

Abbildung 31: Zusammensetzung des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

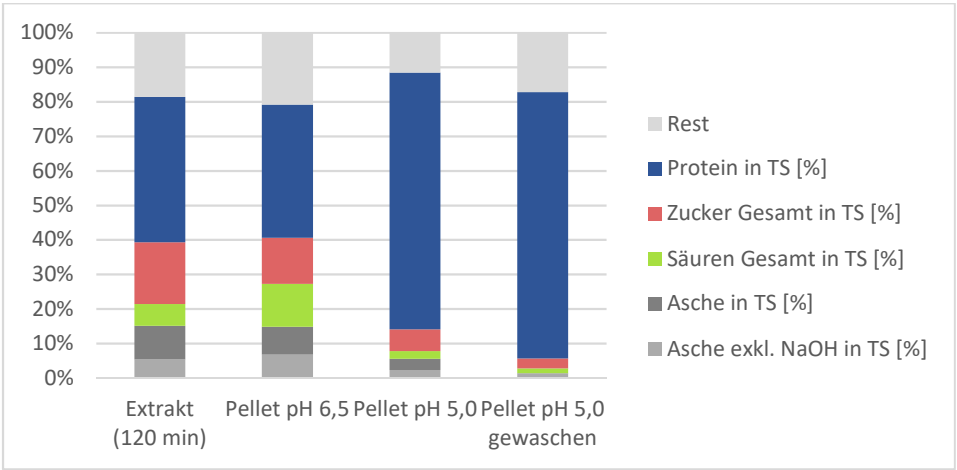

Abbildung 32: Zusammensetzung des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 120-minütiger Extraktionsdauer

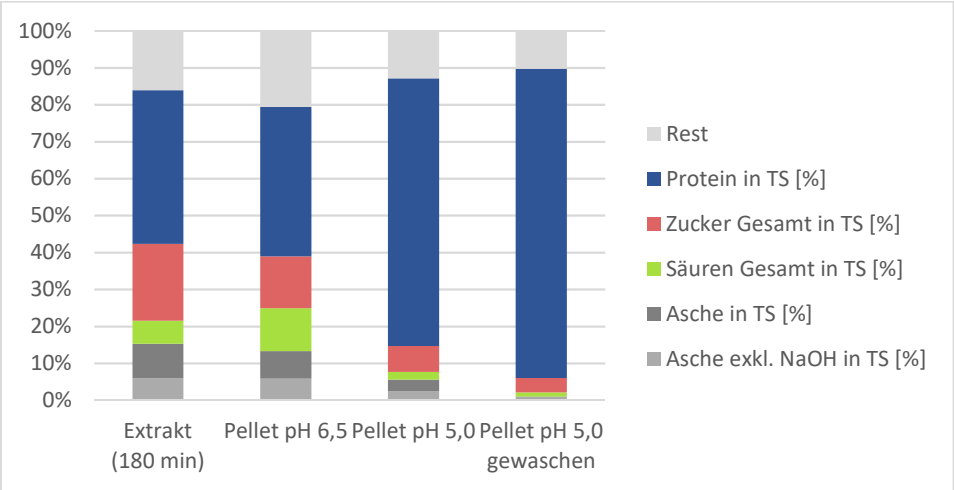

Abbildung 33: Zusammensetzung des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

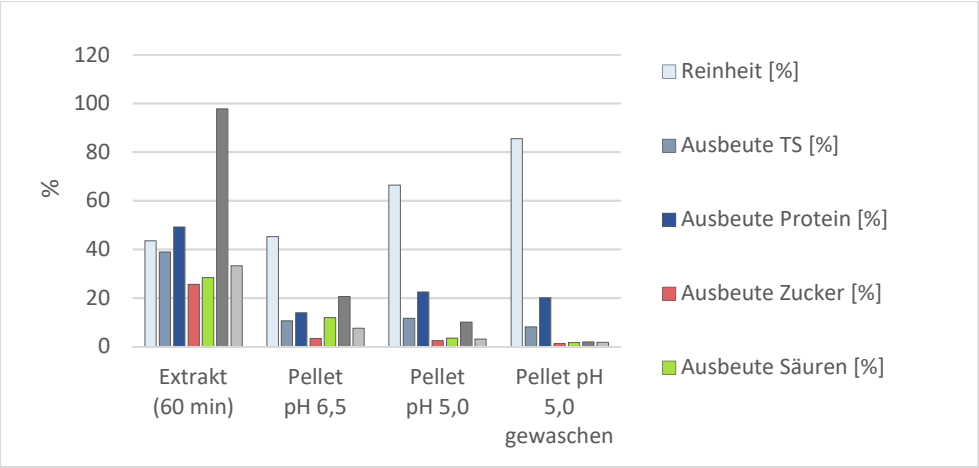

Abbildung 34: Proteinreinheit und Ausbeuten der jeweils untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 60-minütiger Extraktionsdauer

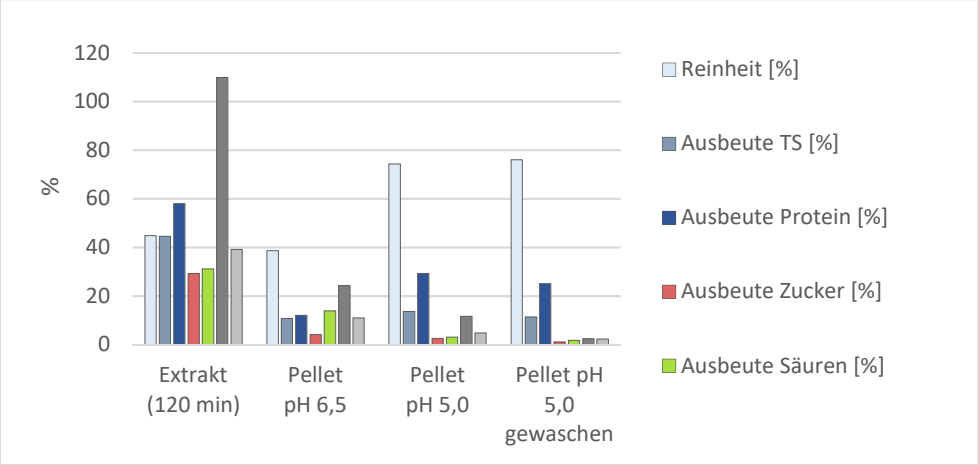

Abbildung 35: Proteinreinheit und Ausbeuten der jeweils untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 120-minütiger Extraktionsdauer

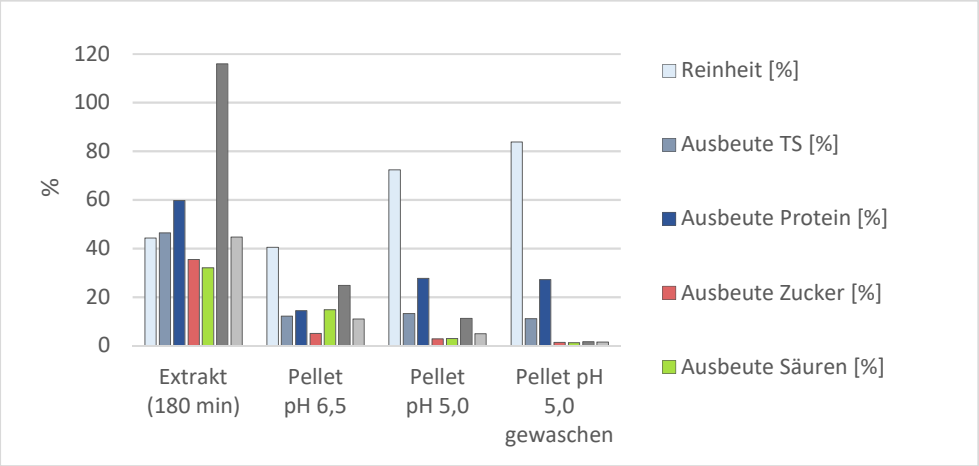

Abbildung 36: Proteinreinheit und Ausbeuten der jeweils untersuchten Analyten des Extraktes und der Präzipitate der Vorfällungsversuche bei 180-minütiger Extraktionsdauer

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reinheit der Proteinprodukte durch die Vorfällung und das Waschen der Präzipitate insgesamt auf 76 – 86 % erhöht werden konnte; die Proteinausbeuten liegen dabei zwischen 20 % und 27 %. Hinsichtlich der unterschiedlich langen Extraktionszeiten (60, 120 bzw. 180 min) konnte sowohl bei den Proteinextrakten als auch den Präzipitaten bezüglich der Proteinausbeute oder Reinheit kein wesentlicher Trend festgestellt werden. Dass die Extraktionsdauer keinen merklichen Einfluss auf die Proteinausbeute hat, steht auch im Einklang mit den Ergebnissen von RODRIGUES et al. (2016) sowie FETZER et al. (2018).

2.2.3.4 Versuchsreihe 4 zur Reduktion phenolischer Verbindungen mittels Ultrafiltration

Die Massenbilanz der Versuchsreihe 4 ist als Flussdiagramm in Abb. 37 dargestellt.

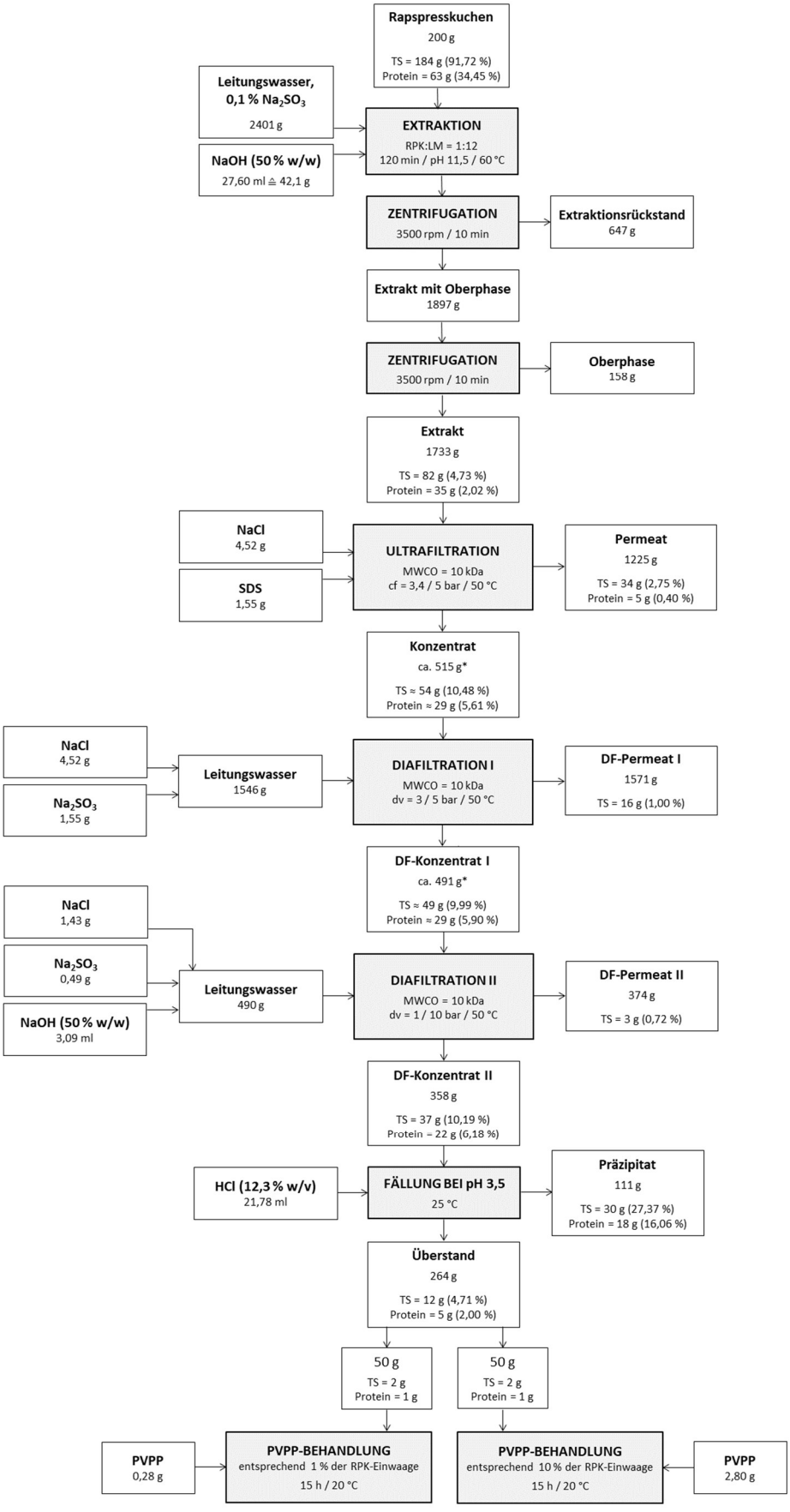

Abbildung 37: Massenbilanz der Versuchsreihe 4.
*Die Retentat-Masse (Konzentrat, DF-Konzentrat I) wurde jeweils über die Permeatmasse berechnet

Der Extrakt der Versuchsreihe 4 (120-minütige Extraktionsdauer) weist einen Proteingehalt von 43 % in TS auf; die Proteinausbeute beträgt 56 % (s. Abb. 38 und 39). Durch die Aufkonzentrierung mittels Membranfiltration wurde der TS-Gehalt des Extraktes von 5 % auf 10 % erhöht, während der Proteingehalt von 2 % auf 6 % gesteigert wurde. Die Reinheit des Extraktes konnte durch UF und DF insgesamt von 43 % auf 61 % Protein in TS erhöht werden, wobei durch den ersten DF-Durchgang (dv = 3) die Reinheit des aufkonzentrierten Extraktes von 54 % auf 59 % gesteigert wurde (s. Abb. 38). Die Proteinausbeute des Extraktes wurde durch die Membranfiltrationsprozesse von 56 % auf 35 % vermindert, die TS-Ausbeute wurde dabei von 45 % auf 20 % reduziert (s. Abb. 39).

Für das UF-Permeat wurde ein (Roh-)Proteingehalt von 14 % in TS nachgewiesen (s. Abb. 38), wobei anzumerken ist, dass bei der Proteinbestimmung nach Kjeldahl neben dem eigentlichen Protein („Reinprotein“) auch andere stickstoffhaltige Verbindungen erfasst werden (MATISSEK et al., 2014). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den N-Verbindungen im Permeat um Peptide und freie Aminosäuren handelt, welche nach Angaben in der Literatur ca. 13 % des Rohproteingehaltes der Rapssaat ausmachen (NIEWIADOMSKI, 1990).

Das gewonnene Proteinprodukt, welches bei pH 3,5 aus dem aufkonzentrierten und diafiltrierten Extrakt ausgefällt wurde, weist einen TS-Gehalt von 27 % und einen Proteingehalt von 16 % auf. Verglichen mit den TS- und Proteingehalten der Proteinprodukte der zuvor durchgeführten Versuchsreihen (durchschnittlich ca. 10 – 16 % TS bzw. 8 – 11 % Protein, jeweils bezogen auf ungewaschene Präzipitate) sind diese Werte auffallend höher. Die Reinheit des gewonnenen Proteinpräzipitates liegt bei 59 % Protein in TS, die Proteinausbeute bei 28 % (s. Abb. 38 und 39). Die Reinheit ist im Vergleich mit den (ungewaschenen) Präzipitaten anderer Versuchsreihen, welche zumindest 60 % bis > 70 % Protein in TS aufweisen, als unterdurchschnittlich zu beurteilen, während die Proteinausbeute vergleichsweise durchschnittlich ausfällt. Die Farbe des Präzipitates ist nicht von der Farbe der Proteinprodukte zuvor durchgeführter Versuchsreihen zu unterscheiden – alle Präzipitate waren im feuchten Zustand ockerfarben, die getrockneten Produkte (Trockenschrank, 65 °C) weisen eine schwarz-braune Farbe auf.

Der Überstand der isoelektischen Präzipitation weist einen Proteingehalt von 42 % in TS auf. Durch die PVPP-Behandlung konnte dessen Reinheit nicht erhöht werden.

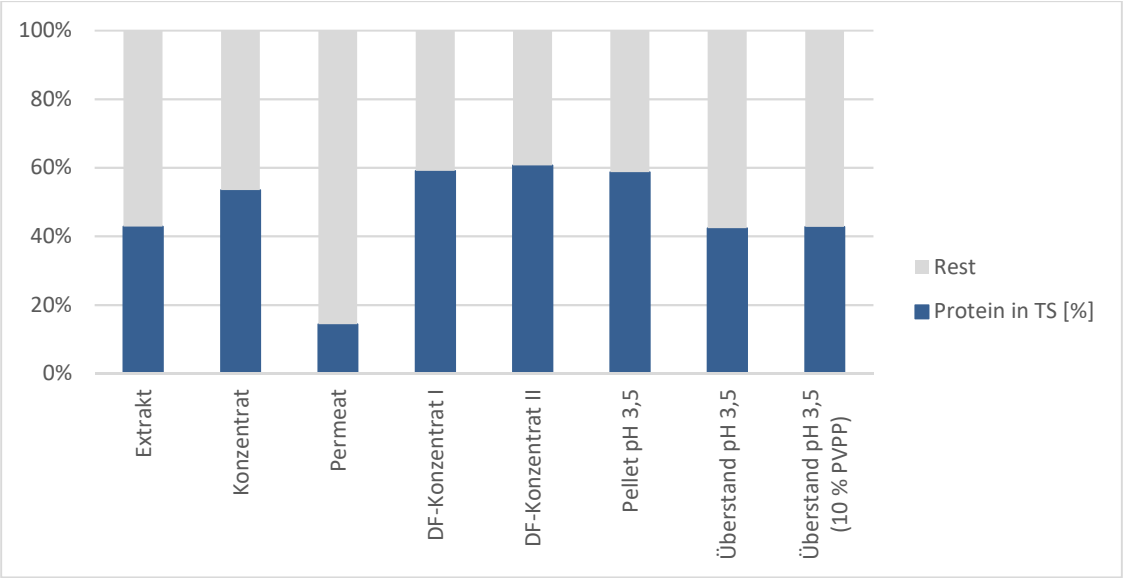

Abbildung 38: Proteinreinheiten der Proben von Versuchsreihe 4. Der Extrakt (120 min Extraktionsdauer) wurde mittels UF (MWCO = 10 kDa) auf ca. ein Drittel (cf =3,4) aufkonzentriert und in zwei Durchgängen diafiltriert (DF I: dv = 3, DF II: dv = 1). Aus dem diafiltrierten Konzentrat (DF-Konzentrat II) wurde das Proteinpräzipitat bei pH 3,5 ausgefällt, der Überstand der Fällung wurde mit PVPP behandelt.

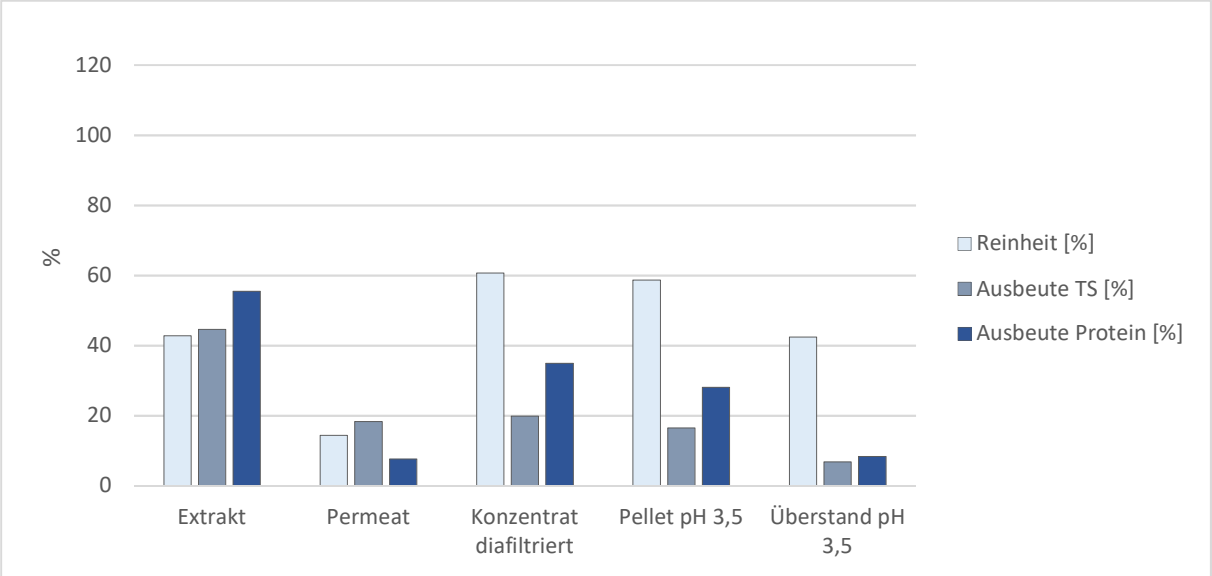

Abbildung 39: Reinheit und Ausbeute an TS sowie Protein der Proben von Versuchsreihe 4

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das durchgeführte Verfahren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht als geeignet erwiesen hat, Reinheit oder Proteinausbeute des Proteinproduktes auf ein überdurchschnittliches Maß zu erhöhen oder die Farbe des Präzipitates positiv zu beeinflussen.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Herstellung von Rapsöl fällt als Nebenprodukt der entölte, proteinreiche Rückstand (Rapsextraktionsschrot, RES, bzw. Rapspresskuchen, RPK) an, welcher gegenwärtig hauptsächlich als Futtermittelbestandteil in der Nutztierhaltung eingesetzt wird. Entölte Rapssaat weist einen Proteinanteil von ca. einem Drittel auf, daneben bilden Faser- und Ballaststoffe (v.a. Cellulose, Lignin und Uronsäuren) weitere Hauptbestandteile des entölten Pflanzenmaterials (LENNERTS, 1984). Sekundäre Pflanzenstoffe (darunter hauptsächlich phenolische Verbindungen, Glucosinolate und Phytinsäure), welche als Minorkomponenten im Rapssamen vorkommen, sind etwa für einen unangenehmen, bitteren Geschmack oder die Bildung dunkler Farbstoffe verantwortlich (XU und DIOSADY, 2000; XU und DIOSADY, 2002).

Rapsprotein zeichnet sich durch eine gute ernährungsphysiologische Wertigkeit sowie mögliche techno-funktionelle Eigenschaften aus (etwa Bildung bzw. Stabilisierung von Emulsionen und Schäumen sowie Gelbildung) und weist daher hohes Potenzial zur Anwendung in Lebensmitteln auf, wodurch zudem eine Wertsteigerung entölter Rapssaat erzielt werden könnte (AIDER und BARBANA, 2011; WANASUNDARA et al., 2016; KROLL et al., 2007a).

Die Isolierung von Protein aus den Rückständen der Rapsölgewinnung ist seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Die Realisierung einer ausreichend hohen Proteinreinheit sowie Proteinausbeute stellen bisher jedoch Hindernisse bei der Entwicklung kommerzieller Rapsproteinprodukte dar. Insbesondere ist die dunkle Farbe von Rapsproteinisolaten, welche durch phenolische Verbindungen verursacht wird, problematisch. Für die Anwendung in Lebensmitteln ist diese unerwünscht, die Entfernung der sekundären Pflanzenstoffe bei der Rapsproteinisolierung stellt bisher jedoch eine Schwierigkeit dar.

Rapssamenprotein wurde 2014 in der EU mit dem Durchführungsbeschluss 2014/424/EU als neuartige Lebensmittelzutat zugelassen und unterliegt der Novel-Food-Verordnung (VO (EU) 2015/2283) (EU, 2014b; EU, 2015). Gemäß den Spezifikationen der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470 soll das Erzeugnis etwa einen Proteingehalt von zumindest 90 % aufweisen und im getrockneten Zustand eine helle Farbe (weiß bis cremefarben) besitzen.

Die vorliegende Masterarbeit entstand im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgruppe für Prozesstechnik des Instituts für Lebensmitteltechnologie an der Universität für Bodenkultur Wien unterstützt durch die Firma Rapso Österreich GmbH, welches die Untersuchung der Möglichkeit zur Gewinnung eines verkehrsfähigen, kommerziellen Proteinisolates aus Rapspresskuchen zur Anwendung im Lebensmittelsektor zum Inhalt hatte. Aufbauend auf

Vorversuchen, welche im Zuge des Projektes durchgeführt wurden, sollte im Rahmen der Masterarbeit Rapsprotein mit möglichst hoher Reinheit und Ausbeute mittels isoelektrischer Präzipitation aus alkalischen RPK-Extrakten ausgefällt werden. Weiters wurde im Zuge der Arbeit versucht, die Reinheit und Farbe der Proteinprodukte durch die Anwendung von Membranverfahren zu verbessern (Abtrennung von nicht-Protein-Verunreinigungen aus dem Proteinextrakt mittels Ultrafiltration).

Die alkalische Extraktion von Protein aus RPK erfolgte jeweils bei pH 11,5 und 60 °C sowie bei unterschiedlich langen Extraktionszeiten (60, 120 und 180 min). Die Ausfällung von Rapsprotein aus den Extrakten erfolgte je nach durchgeführter Versuchsreihe bei unterschiedlichen pH-Werten. Die erhaltenen Extrakte und Präzipitate wurden bezüglich ihrer Zusammensetzung charakterisiert (Analyse des Gehaltes an TS, Asche, Protein, Zucker und Säuren).

Bei der alkalischen Proteinextraktion (pH 11,5, 60 °C) wurden Extrakte mit einem Proteingehalt von jeweils 44 – 48 % in TS erhalten. Die Proteinausbeute der Extrakte beträgt jeweils etwa 60 %, bei einer TS-Ausbeute von rund 45 %. Es konnte kein wesentlicher Einfluss der Extraktionsdauer (60, 120 bzw. 180 min) auf die Proteinausbeute oder den Proteingehalt der Extrakte sowie auf die daraus gewonnenen Proteinpräzipitate festgestellt werden.

Die isoelektrisch gefällten Proteinpräzipitate unterscheiden sich in ihrem Proteingehalt je nach pH-Wert der Fällung. Bei pH 6,5 – 7,0 wurden Präzipitate niedrigen Proteingehaltes (37 – 45 % Protein in TS) und niedriger Proteinausbeute (durchschnittlich 12 %) ausgefällt. Durch isoelektrische Präzipitation im pH-Bereich von 3,0 – 5,5 wurden Präzipitate höherer Reinheit (um 60 % Protein in TS) und höherer Proteinausbeute (durchschnittlich 35 %) erhalten.

Neben Protein weisen die isoelektrisch gefällten Präzipitate Zucker (6 – 14 % in TS; hauptsächlich Saccharose), Säuren (2 – 13 % in TS; hauptsächlich Glucuron- und Galacturonsäure) sowie Asche (3 – 15 % in TS; davon stammt über die Hälfte von NaOH, die bei der alkalischen Extraktion zugegeben wurde) als weitere Bestandteile auf; der Fettgehalt untersuchter Proteinpräzipitate beträgt ca. 10 % in TS.

Durch Abtrennung der Niederschläge geringen Proteingehaltes aus dem Extrakt vor der Ausfällung des Proteinproduktes („Vorfällung“) konnte die Reinheit der Präzipitate auf durchschnittlich 71 – 73 % erhöht werden; die Proteinausbeute der Produkte beträgt dabei durchschnittlich 18 – 27 %.

Durch das Waschen der Proteinpräzipitate mit der fünffachen Menge an Wasser (bei dem pH-Wert der isoelektrischen Fällung) konnte deren Reinheit um durchschnittlich 10 % Protein in

TS des Produktes erhöht werden, wobei dadurch die Proteinausbeute leicht vermindert wurde (durchschnittlich um 5 %).

Durch die Anwendung von Membranverfahren (UF und DF) unter Zugabe von NaCl, Na_2SO_3 und SDS bei der Extraktion bzw. Membranfiltration konnte im Rahmen der durchgeführten Arbeit keine Verbesserung der Reinheit oder Farbe des Proteinproduktes gegenüber den anderen Versuchsreihen erzielt werden. Das aus dem diafiltrierten UF-Konzentrat (61 % Protein in TS) ausgefällte Präzipitat weist eine Reinheit von 59 % Protein in TS bei einer Proteinausbeute von 28 % auf – verglichen mit den Produkten der anderen Versuchsreihen ist die erzielte Produktreinheit als durchschnittlich einzuordnen, die Proteinausbeute fällt vergleichsweise unterdurchschnittlich aus.

Die höchste Produktreinheit wurde im Rahmen der durchgeführten Arbeit durch Kombination von Vorfällung bei pH 6,5 (Abtrennung proteinarmer Niederschläge aus dem Extrakt vor der Ausfällung des Proteinproduktes) und Waschen des bei pH 5,0 gefällten Präzipitates erzielt und beträgt durchschnittlich 82 % Protein in TS; die entsprechenden Produkte weisen dabei eine Proteinausbeute von durchschnittlich 24 % auf.

Alle gewonnenen Rapsproteinpräzipitate sind ockerfarben und weisen nach der Trocknung (65 °C, Trockenschrank) eine schwarz-braune Farbe auf. Untersuchte Proteinpräzipitate weisen einen Fettgehalt von ca. 10 % in TS auf.

Die angestrebte Reinheit der Proteinprodukte von 90 %, welche gemäß der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470 für Rapssamenprotein als neuartige Lebensmittelzutat gefordert wird, konnte im Zuge der durchgeführten Arbeit nicht erreicht werden. Der Fettgehalt untersuchter Präzipitate, welcher entsprechend den Spezifikationen < 2 % betragen soll (s. Anhang S. VII, Abb. C 1), ist mit ca. 10 % in TS deutlich zu hoch. Ebenso entspricht die Farbe der gewonnenen Proteinprodukte nicht den Anforderungen. Die erzielten Proteinausbeuten der Präzipitate sind jeweils zu gering, um die Entwicklung eines ökonomischen Prozesses zur Herstellung eines Proteinisolates aus RPK zu ermöglichen.

Die Problematik der geringen Proteinreinheit und -ausbeute kann unterschiedliche mögliche Ursachen haben. In der Literatur wird als Hindernis bei der Gewinnung von Proteinisolaten aus den Rückständen der Rapsölgewinnung einerseits die Anwesenheit sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe beschrieben, welche mit den Proteinen über verschiedene Mechanismen prozessabhängig interagieren können und etwa für eine dunkle, braun-grüne Farbe sowie einen unangenehmen, bitteren Geschmack der Proteinprodukte verantwortlich sind und sich zudem negativ auf die Extrahierbarkeit der Proteine auswirken können; eine ausreichende Entfernung der unerwünschten Stoffe aus dem Pflanzenmaterial stellt bisher noch eine Herausforderung dar (CAMPBELL et al., 2016; WANASUNDARA et al., 2016; VON DER

HAAR et al., 2014; DAS PURKAYASTHA et al., 2014; KROLL et al., 2007b; XU und DIOSADY, 2000; RODRIGUES et al., 2017). Zudem können Verarbeitungsprozesse im Zuge der Ölgewinnung Einfluss auf die Proteine im Rapssamen ausüben: die thermische Proteindenaturierung während des Pressvorgangs kann etwa die Löslichkeit der Rapsproteine und somit deren Extrahierbarkeit erniedrigen (FETZER et al., 2018; HEIM und KREBS, 2018). Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass durch die Proteindenaturierung bei der Heißpressung von Rapsöl Quervernetzungen zwischen bzw. innerhalb von Peptidketten sowie zwischen Peptiden und Kohlenhydraten gebildet werden (HEIM und KREBS, 2018). Insgesamt ist fraglich, inwieweit die Rückstände der industriellen Rapsölgewinnung aufgrund der verminderten Proteinqualität als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von kommerziellen Proteinisolaten geeignet sind (MUPONDWA et al., 2018; FETZER et al., 2018). Ein weiteres Hindernis bei der Isolierung von Protein aus den Pressrückständen könnte der relativ hohe Restfettgehalt im Rapspresskuchen darstellen: in Mehlen aus Ölsaaten können Lipidoxidationsprodukte kovalent mit Proteinen interagieren, was etwa die Polymerisation der Proteinketten zur Folge hat (CHEFTEL et al., 1992). Ist der Restfettgehalt im Rapspresskuchen zu hoch, kann dies eine effiziente Proteinextraktion verhindern und einen zusätzlichen Entölungsschritt notwendig machen (CAMPBELL et al., 2016; MUPONDWA et al., 2018). Einen weiteren Grund für die niedrige Proteinausbeute bei der isoelektrischen Fällung von Rapsproteinen kann die weite Verteilung der isoelektrischen Punkte der Proteine über einen weiten pH-Bereich (pH 4 – 11) darstellen (CAMPBELL et al., 2016; MANAMPERI et al., 2010). Da bei einem bestimmten pH-Wert die Proteine folglich nur teilweise ausgefällt werden können, wäre eine sequenzielle Präzipitation der Rapsproteine diesbezüglich möglicherweise nutzbringend (MANAMPERI et al., 2010).

Weitere Untersuchungen bezüglich der Erhöhung der Produktreinheit und Proteinausbeute bei der Gewinnung von Rapsproteinisolaten aus Rapspresskuchen wurden im Zuge des Projektes von der Arbeitsgruppe Prozesstechnik am Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt.

Literaturverzeichnis

ACKMAN, R.G. (1990): Canola Fatty Acids–An Ideal Mixture for Health, Nutrition, and Food Use. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 81 – 98.

ADACHI, M.; KANAMORI, J.; MASUDA, T.; YAGASAKI, K.; KITAMURA, K.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. (2003): Crystal Structure of Soybean 11S Globulin: Glycinin A3B4 Homohexamer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 7395–7400. Online: https://doi.org/10.1073/pnas.0832158100 (23.01.2018).

AIDER, M.; BARBANA, C. (2011): Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. Trends in Food Science & Technology 22: 21–39. Online: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.002 (04.10.2016).

AKBARI, A.; WU, J. (2015): An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal. LWT - Food Science and Technology 64: 308–315. Online: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.046 (10.10.2016).

ALUKO, R.E.; MCINTOSH, T. (2001): Polypeptide profile and functional properties of defatted meals and protein isolates of canola seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 81: 391–396. Online: https://doi.org/10.1002/1097-0010(200103)81:4<391::AID-JSFA823>3.0.CO;2-S (17.10.2016).

ANDERSON, D. (1996): A Primer on Oils Processing Technology. In: HUI, Y.H. (Hrsg.): BAILEY´S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS. Bd. 4: Edible Oil and fat products: processing technology. New York: John Wiley & Sons, 1–60.

BANDARA, N.; AKBARI, A.; ESPARZA, Y.; WU, J. (2018): Canola Protein: A Promising Protein Source for Delivery, Adhesive, and Material Applications. Journal of the American Oil Chemists' Society 95: 1075–1090. Online: https://doi.org/10.1002/aocs.12039 (15.11.2018).

BARKER, L.D.; MARTENS, R.W., MURRAY, E.D. (2010): Production of oil seed protein isolate. US Patent 7687087B2.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. (2008): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Aufl., Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-540-73202-0 (18.05.2017).

BÉROT, S.; COMPOINT, J.P.; LARRÉ, C.; MALABAT, C.; GUÉGUEN, J. (2005): Large scale purification of rapeseed proteins (Brassica napus L.). Journal of Chromatography B 818: 35–42. Online: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.001 (03.10.2016).

BIESALSKI, H.K.; GRIMM, P. (2011): Taschenatlas der Ernährung. 5. Aufl., Stuttgart: Thieme.

BLAICHER, F.M.; ELSTNER, F.; STEIN, W.; MUKHERJEE, K.D. (1983): Rapeseed protein isolates: Effect of processing on yield and composition of protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry 31: 358–362. Online: https://doi.org/10.1021/jf00116a044 (04.10.2016).

BOCKISCH, M. (2004): Öle und Fette (außer Margarine). In: HEISS, R. (Hrsg.): Lebensmitteltechnologie: biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. 6. Aufl., Berlin: Springer, 103–121.

BOS, C.; AIRINEI, G.; MARIOTTI, F.; BENAMOUZIG, R.; BÉROT, S.; EVRARD, J.; FÉNART, E.; TOMÉ, D.; GAUDICHON, C. (2007): The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. Journal of Nutrition 137: 594–600. Online: https://doi.org/10.1093/jn/137.3.594 (20.11.2018).

BRÜSCHKE, H.; MELIN, T. (2011): Membrantechnik. In: GOEDECKE, R. (Hrsg.): Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis. Weinheim: Wiley-VHC, 495–580.

CAMPBELL, L.; REMPEL, C.B.; WANASUNDARA, J.P. (2016): Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions-Workshop Proceedings of IRC 2015. Plants 5: 17–284. Online: https://doi.org/10.3390/plants5020017 (04.10.2016).

CASEY, R. (1999): Distribution and Some Properties of Seed Globulins. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (Hrsg.): Seed proteins. Dordrecht: Springer Netherlands, 159–169.

CHEFTEL, J.-C.; CUQ, J.-L.; LORIENT, D. (1992): Lebensmittelproteine: Biochemie, funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, chemische Modifizierung. Dt. Bearbeitung von: REIMERDES, E.H.; MÜLLER, G. Hamburg: Behr.

CHERYAN, M. (1986): Ultrafiltration handbook. Lancaster: Technomic.

CHEUNG, L.; WANASUNDARA, J.; NICKERSON, M.T. (2014): The Effect of pH and NaCl Levels on the Physicochemical and Emulsifying Properties of a Cruciferin Protein Isolate. Food Biophysics 9: 105–113. Online: https://doi.org/10.1007/s11483-013-9323-2 (01.05.2018).

CHEUNG, L.; WANASUNDARA, J.; NICKERSON, M.T. (2015): Effect of pH and NaCl on the Emulsifying Properties of a Napin Protein Isolate. Food Biophysics 10: 30–38. Online: https://doi.org/10.1007/s11483-014-9350-7 (13.03.2018).

CHRISTEN, P.; JAUSSI, R. (2005): Biochemie: eine Einführung mit 40 Lerneinheiten. Berlin: Springer.

CHRISTEN, P.; JAUSSI, R.; BENOIT, R. (2016): Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten. Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-46430-4 (28.02.2018).

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. (2008): Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry 109: 144–148. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039 (15.11.2018).

CZUBINSKI, J.; DWIECKI, K. (2017): A review of methods used for investigation of protein–phenolic compound interactions. International Journal of Food Science & Technology 52: 573–585. Online: https://doi.org/10.1111/ijfs.13339 (29.08.2018).

DAMODARAN, S. (2005): Protein Stabilization of Emulsions and Foams. Journal of Food Science 70: R54–R66. Online: https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x (23.06.2018).

DAS PURKAYASTHA, M.; GOGOI, J.; KALITA, D.; CHATTOPADHYAY, P.; NAKHURU, K.S.; GOYARY, D.; MAHANTA, C.L. (2014): Physicochemical and functional properties of rapeseed protein isolate: Influence of antinutrient removal with acidified organic solvents from rapeseed meal. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62: 7903–7914. Online: https://doi.org/10.1021/jf5023803 (04.10.2016).

DELGADO, M.; FELIX, M.; BENGOECHEA, C. (2018): Development of bioplastic materials: From rapeseed oil industry by products to added-value biodegradable biocomposite materials. Industrial Crops and Products 125: 401–407. Online: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.013 (16.11.2018).

DELSENY, M.; RAYNAL, M. (1999): Globulin Storage Proteins in Crucifers and Non-Legume Dicotyledonous Families. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (Hrsg.): Seed proteins. Dordrecht: Springer Netherlands, 427–451.

DLG (DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTS-GESELLSCHAFT) (Hrsg.) (1997): DLG-Futterwerttabellen - Wiederkäuer. 7. Aufl., Frankfurt am Main: DLG-Verlag.

DLG (DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTS-GESELLSCHAFT) (Hrsg.) (2014): DLG-Futterwerttabellen - Schweine. 7. Aufl., Frankfurt am Main: DLG-Verlag.

DONG, X.; GUO, L.; WEI, F.; LI, J.; JIANG, M.; LI, G.; ZHAO, Y.; CHEN, H. (2011): Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. Journal of the Science of Food and Agriculture 91: 1488–1498. Online: https://doi.org/10.1002/jsfa.4339 (05.10.2016).

DOWNEY, R.K.; BELL, J.M. (1990): New Developments in Canola Research. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 37–46.

EBERMANN, R.; ELMADFA, I. (2008): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Wien: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-211-49348-9 (06.10.2016).

EFSA (European Food Safety Authority) (Hrsg.) (2013): Scientific Opinion on the safety of “rapeseed protein isolate” as a Novel Food ingredient. EFSA Journal 11: 1–23. Online: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3420 (30.01.2019).

EDER, K.; ROTH, F.X. (2014): Geflügelfütterung. In: KIRCHGEßNER, M. (Hrsg.): Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. 14. Aufl., Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 579–623.

EL NOCKRASHY, A.S.; MUKHERJEE, K.D.; MANGOLD, H.K. (1976): Rapeseed protein isolates by countercurrent extraction and isoelectric precipitation. Journal of agricultural and food chemistry 25: 193–197. Online: https://doi.org/10.1021/jf60209a022 (05.10.2016).

ELMADFA, I. (2015): Ernährungslehre. 3. Aufl., Stuttgart: Ulmer.

ELMADFA, I.; LEITZMANN, C. (2015): Ernährung des Menschen: 270 Tabellen. 5. Aufl., Stuttgart: Ulmer.

ERICSON, M.L.; RÖDIN, J.; LENMAN, M.; GLIMELIUS, K.; JOSEFSSON, L.G.; RASK, L. (1986): Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. Journal of Biological Chemistry 261: 14576–14581. Online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3771543 (20.02.2018).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2000): Verordnung (EG) Nr. 2256/2000 der Kommission vom 11. Oktober 2000 zur Abweichung - hinsichtlich des Verzeichnisses der Sorten und Verbundsorten von Saatgut von "Doppel-Null"-Raps und -Rübsen - von der Verordnung (EG) Nr. 2316/1999 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 1251/1999 des Rates zur Einführung einer Stützungsregelung für Erzeuger bestimmter landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Amtsblatt der Europäischen Union L 258 vom 12.10.2000, S. 15–23. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32000R2256 (25.01.2019).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2011): Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission. Amtsblatt der Europäischen Union L 304 vom 22.11.2011, S. 18–63. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32011R1169 (25.01.2019).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2014a): Verordnung (EU) Nr. 696/2014 der Kommission vom 24. Juni 2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte an Erucasäure in pflanzlichen Ölen und Fetten sowie in Lebensmitteln mit zugesetzten pflanzlichen Ölen und Fetten. Amtsblatt der Europäischen Union L 184 vom 25.6.2014, S. 1–2. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32014R0696 (25.01.2019).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2014b): 2014/424/EU: Durchführungsbeschluss der Kommission vom 1. Juli 2014 zur Genehmigung des Inverkehrbringens von Rapssamenprotein als neuartige Lebensmittelzutat gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates. Amtsblatt der Europäischen Union L 196 vom 3.7.2014, S. 27–29. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32014D0424 (25.01.2019).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2015): Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission. Amtsblatt der Europäischen Union L 327 vom 11.12.2015, S. 1–22. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32015R2283 (26.01.2019).

EU (Europäische Union) (Hrsg.) (2017): Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission vom 20. Dezember 2017 zur Erstellung der Unionsliste der neuartigen Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates über neuartige Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union L 351 vom 30.12.2017, S. 72–201. Online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32017R2470 (25.01.2017).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Hrsg.) (2017): FAOSTAT Agricultural Data, Production Crops. Online: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC (29.07.2017).

FDA (Food and Drug Administration) (Hrsg.) (2010): GRAS Notice 327: GRAS Notification for Cruciferin-Rich and Napin-Rich Protein Isolates Derived from Canola/Rapeseed (Puratein® and Supertein™). Online: https://wayback.archive-it.org/7993/20170607005953/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM269508.pdf (23.01.2019).

FDA (Food and Drug Administration) (Hrsg.) (2011): GRAS Notice 386: GRAS Notification for BioExx Canola Proteins: Canola Protein Isolate (Isolexx™) and Hydrolyzed Canola Protein Isolate (Vitalexx™). Online: http://wayback.archive-it.org/7993/20171031045146/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM277309.pdf (30.01.2019).

FDA (Food and Drug Administration) (Hrsg.) (2016): GRAS Notice 683: The safety and the generally recognized as safe (GRAS) status of the proposed uses of canola/rapeseed protein isolate in human food. Online: https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm542217.pdf (04.02.2019).

FETZER, A.; HERFELLNER, T.; STÄBLER, A.; MENNER, M.; EISNER, P. (2018): Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. Industrial Crops & Products 112: 236–246. Online: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.011 (11.11.2018).

GEHRIG, P.M.; KRZYZANIAK, A.; BARCISZEWSKI, J.; BIEMANN, K. (1996): Mass Spectrometric Amino Acid Sequencing of a Mixture of Seed Storage Proteins (Napin) from Brassica napus, Products of a Multigene Family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 3647–3652. Online: https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3647 (17.03.2018).

GHODSVALI, A.; KHODAPARAST, M.H.H.; VOSOUGHI, M.; DIOSADY, L.L. (2005): Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. Food Research International 38: 223–231. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.007 (28.05.2018).

HABERMEHL, G.; HAMMANN, P.E.; KREBS, H.C.; TERNES, W. (2008): Naturstoffchemie: Eine Einführung. 3. Aufl.; Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-540-73733-9 (08.10.2017).

HALLER, D.; GRUNE, T.; RIMBACH, G. (2013): Polyphenole. In: HALLER, D.; GRUNE, T.; RIMBACH, G. (Hrsg.): Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe. Berlin: Springer, 207–215. Online: https://doi-1org-100001df6140b.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-642-29374-0_13 (26.06.2018).

HARRIS, E.L. V. (1989): Concentration of the Extract. In: HARRIS, E.L. V.; ANGAL, S. (Hrsg.): Protein purification methods: a practical approach. Oxford: IRL PRESS, 125–174.

HEIM, R.; KREBS, G. (2018): Expeller Barrel Dry Heat and Moist Heat Pressure Duration Induce Changes in Canola Meal Protein for Ruminant Utilisation. Animals 8: 147, 1–29. Online: https://doi.org/10.3390/ani8090147 (14.09.2018).

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. (1999): Protein storage bodies and vacuoles. The Plant Cell 11: 601–613. Online: https://doi.org/10.2307/3870887 (22.02.2018).

HIERSIG, H.M. (1995): Feststoffextraktion. In: Lexikon Produktionstechnik, Verfahrenstechnik. Düsseldorf: VDI-Verlag, 290–295.

HÖGLUND, A.-S.; RÖDIN, J.; LARSSON, E.; RASK, L.; (1992): Distribution of Napin and Cruciferin in Developing Rape Seed Embryos. Plant Physiology 98: 509–515. Online: https://doi.org/10.1104/pp.98.2.509 (06.12.2017).

JUN, H.-I.; WIESENBORN, D.P.; KIM, Y.-S. (2014): Antioxidant activity of phenolic compounds from canola (Brassica napus) seed. Food Science and Biotechnology 23: 1753–1760. Online: https://doi.org/10.1007/s10068-014-0240-z (31.07.2018).

KARACA, A.C.; LOW, N.; NICKERSON, M. (2011): Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction. Food Research International 44: 2991–2998. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.009 (01.05.2018).

KHATTAB, R.; GOLDBERG, E.; LIN, L.; THIYAM, U. (2010): Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. Food Chemistry 122: 1266–1272. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.081 (14.08.2018).

KHATTAB, R.Y.; ARNTFIELD, S.D. (2009): Functional properties of raw and processed canola meal. LWT - Food Science and Technology 42: 1119–1124. Online: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.009 (29.05.2018).

KIM, J.H.J.; VARANKOVICH, N.V.; NICKERSON, M.T. (2016a): The effect of pH on the gelling behaviour of canola and soy protein isolates. Food Research International 81: 31–38. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.029 (04.06.2018).

KIM, J.H.; VARANKOVICH, N.V.; STONE, A.K.; NICKERSON, M.T. (2016b): Nature of protein-protein interactions during the gelation of canola protein isolate networks. Food Research International: 89, 408–414. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.018 (28.05.2018).

KOZLOWSKA, H.; ZADERNOWSKI, R.; SOSULSKI, F.W. (1983): Phenolic acids in oilseed flours. Nahrung 27: 449–453. Online: https://doi.org/10.1002/food.19830270517 (01.08.2018).

KOZLOWSKA, H.; NACZK, M.; SHAHIDI, F.; ZADERNOWSKI, R. (1990): Phenolic Acids and Tannins in Rapeseed and Canola. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 193–210.

KRAUME, M. (2012): Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzungen. 2. Aufl., Berlin: Springer Vieweg. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-642-25149-8 (25.09.2017).

KROLL, J. (1991): Selected functional properties of detoxified rapeseed protein preparations effected by phytic acid. Nahrung 35: 619–624. Online: https://doi.org/10.1002/food.19910350610 (31.08.2018).

KROLL, J.; KRAUSE, J.-P.; RAWEL, H.M. (2007a): Rapssamenproteine - Struktur, Eigenschaften, Gewinnung und Modifizierung. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103: 109–118.

KROLL, J.; KRAUSE, J.-P.; RAWEL, H.M. (2007b): Native sekundäre Inhaltsstoffe in Rapssamen - Eigenschaften und Wechselwirkungen mit Proteinen. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 103: 149–153.

KROLL, J.; RAWEL, H.M.; ROHN, S. (2003): Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. Food Science and Technology Research 9: 205–218. Online: https://doi.org/10.3136/fstr.9.205 (29.08.2018).

KRZYZANIAK, A.; BUROVA, T.; HAERTLÉ, T.; BARCISZEWSKI, J. (1998): The structure and properties of Napin-seed storage protein from rape (Brassica napus L.). Nahrung 42: 201–204. Online: https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(199808)42:03/04<201::AID-FOOD201>3.0.CO;2-U (18.03.2018).

KÜHN, C.; OESEN, T.; VON HANSCHEN, F.S.; ROHN, S. (2018): Determination of isothiocyanate-protein conjugates in milk and curd after adding garden cress (Lepidium sativum L.). Food Research International 108: 621–627. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.001 (28.08.2018).

LAMPART-SZCZAPA, E. (2001): LEGUME AND OILSEED PROTEINS. In: SIKORSKI, Z. (Hrsg.): Chemical & functional properties of food proteins. Boca Raton: CRC Press, 407–436.

LENNERTS, L. (1984): Ölschrote, Ölkuchen, pflanzliche Öle und Fette: Herkunft, Gewinnung und Verwendung. Hannover: Strothe.

MALABAT, C.; SANCHEZ-VIOQUE, R., RABILLER, C.; GUÉGUEN, J. (2001): Emulsifying and foaming properties of native and chemically modified peptides from the 2S and 12S proteins of rapeseed (Brassica napus L.). Journal of the American Oil Chemists' Society 78: 235–242. Online: https://doi.org/10.1007/s11746-001-0251-x (01.05.2018).

MANAMPERI, W.A.R.; CHANG, S.K.C.; ULVEN, C.A.; PRYOR, S.W. (2010): Plastics from an Improved Canola Protein Isolate: Preparation and Properties. Journal of the American Oil Chemists' Society 87: 909–915. Online: https://doi.org/10.1007/s11746-010-1616-8 (05.10.2016).

MANAMPERI, W.A.R.; WIESENBORN, D.P.; CHANG, S.K.C.; PRYOR, S.W. (2011): Effects of Protein Separation Conditions on the Functional and Thermal Properties of Canola Protein Isolates. Journal of Food Science 76: E266–E273. Online: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02087.x (28.05.2018).

MANSOUR, E.H.; DWORSCHÁK, E.; POLLHAMER, Z.; GERGELY, Á.; HÓVÁRI, J. (1999): Pumpkin and canola seed proteins and bread quality. Acta Alimentaria 28: 59–70.

MATISSEK, R.; BALTES, W. (2016): Lebensmittelchemie. 8. Aufl., Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-47112-8 (09.10.2017).

MATISSEK, R.; STEINER, G.; FISCHER, M. (2014): Lebensmittelanalytik. 5. Aufl., Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-642-34829-7 (07.07.2018).

MAURON, J. (1990): Influence of Processing on Protein Quality. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 36: S57–S69. Online: https://doi.org/10.3177/jnsv.36.4-SupplementI_S57 (14.09.2018).

MELIN, T.; RAUTENBACH, R. (2007): Membranverfahren. 3. Aufl., Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-540-34328-8 (07.07.2018).

MICRODYN-NADIR (2018): Technical Data Sheet Flat Sheet Membrane UP010 P. Online: https://static1.squarespace.com/static/54e2b7aee4b0902efd671f90/t/5bc8ca7de2c483e07724e7a2/1539885694267/UP010+P+Flat+Sheet+Membrane.pdf (22.01.2019).

MIEDANER, T. (2014): Kulturpflanzen: Botanik - Geschichte - Perspektiven. Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-642-55293-9 (02.08.2017).

MIKEŠ, O. (1984): Ion exchange chromatography. In: DEYL, Z. (Hrsg.): Separation Methods. Amsterdam: Elsevier, 205–270.

MOHAMAD RAMLAN, B.M.S.; MARUYAMA, N.; ADACHI, M.; HONTANI, N.; SAKA, S.; KATO, N.; OHKAWA, Y.; UTSUMI, S. (2002): Comparison of protein chemical and physicochemical properties of rapeseed cruciferin with those of soybean glycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 7380–7385. Online: https://doi.org/10.1021/jf0202537 (21.02.2018).

MONSALVE, R.I.; LOPEZ-OTIN, C.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R. (1991): A new distinct group of 2 S albumins from rapeseed: Amino acid sequence of two low molecular weight napins. FEBS Letters 295: 207–210. Online: https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81419-9 (19.03.2018).

MONSALVE, R.I.; MENÉNDEZ-ARIAS, L.; LÓPEZ-OTIN, C.; RODRÍGUEZ, R. (1990): β-Turns as structural motifs for the proteolytic processing of seed proteins. FEBS Letters 263: 209–212. Online: https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81375-X (17.03.2018).

MUPONDWA, E.; LI, X.; WANASUNDARA, J.P.D. (2018): Technoeconomic Prospects for Commercialization of Brassica (Cruciferous) Plant Proteins. Journal of the American Oil Chemists' Society 95: 903–922. Online: https://doi.org/10.1002/aocs.12057 (27.11.2018).

MURÉN, E.; EK, B.; RASK, L. (1995): Processing of the 2S storage protein pronapin in Brassica napus and in transformed tobacco. European Journal of Biochemistry 227: 316–321. Online: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20391.x (16.03.2018).

MURRAY, E.D.; BARKER, L.D.; MAURICE, T.J.; MYERS, C.D. (1980): Process for isolation of proteins using food grade salt solutions at specified pH and ionic strength. US Patent 4208323A.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. (1990): Carbohydrates of Canola and Rapeseed. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 211–220.

NACZK, M.; AMAROWICZ, R.; SULLIVAN, A.; SHAHIDI, F. (1998): Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. Food Chemistry 62: 489–502. Online: https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00198-2 (20.11.2017).

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Hrsg.) (2018): PubChem Open Chemistry Database. Online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637775#section=Top (sinapic acid) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280385 (sinapine) (23.11.2018).

NIETZEL, T.; DUDKINA, N.V.; HAASE, C.; DENOLF, P.; SEMCHONOK, D.A.; BOEKEMA, E.J.; BRAUN, H.-P.; SUNDERHAUS, S. (2013): The Native Structure and Composition of the Cruciferin Complex in Brassica napus. The Journal of Biological Chemistry 288: 2238–2245. Online: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356089 (06.12.2017).

NIEWIADOMSKI, H. (1990): Rapeseed: chemistry and technology. Amsterdam: Elsevier.

NITECKA, E.; RAAB, B.; SCHWENKE, K.D. (1986): Chemical modification of proteins. Part 12. Effect of succinylation on some physico-chemical and functional properties of the albumin fraction from rapeseed (Brassica napus L.). Nahrung 30: 975–985. Online: https://doi.org/10.1002/food.19860301003 (29.05.2018).

NITECKA, E.; SCHWENKE, K.D. (1986): Functional properties of plant proteins. Part 8. Effect of succinylation on some functional properties of the main globulin fraction from rapeseed (Brassica napus L.). Nahrung 30: 969–974. Online: https://doi.org/10.1002/food.19860301002 (29.05.2018).

OWEN D.F. (1973): Detoxification and isolation of rapeseed protein by aqueous saline extraction and isoelectric protein precipitation. US Patent 3758452.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. (2013): A review on protein–phenolic interactions and associated changes. Food Research International 51: 954–970. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009 (29.08.2018).

PAULSON, A.T.; TUNG, M.A. (1989): Thermally induced gelation of succinylated canola protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 37: 319–326. Online: https://doi.org/10.1021/jf00086a010 (03.06.2018).

PERERA, S.P.; MCINTOSH, T.C.; WANASUNDARA, J.P.D. (2016): Structural Properties of Cruciferin and Napin of Brassica napus (Canola) Show Distinct Responses to Changes in pH and Temperature. Plants (Basel, Switzerland) 5: 64–74. Online: https://doi.org/10.3390/plants5030036 (13.10.2016).

PICKARDT, C.; WEISZ, G.M.; EISNER, P.; KAMMERER, D.R.; NEIDHART, S.; CARLE, R. (2011): Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production. Procedia Food Science 1: 1417–1424. Online: https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.210 (30.08.2018).

PLIETZ, P.; DRESCHER, B.; DAMASCHUN, G. (1987): Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11S seed globulins. International Journal of Biological Macromolecules, 9, 161–165., zitiert nach: SCHWENKE, K.D. (1990): Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (Brassica napus L.) and related plant proteins. Die Nahrung, 34, 225–240. Online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199832 (07.11.2017).

PLIETZ, P.; DAMASCHUN, G.; SCHWENKE, K.D.; SCHLESIER, B. (1986): Small-angle X-ray scattering investigations on seed proteins. Nahrung 30: 245–250. Online: https://doi.org/10.1002/food.19860300309 (17.01.2018).

PLIETZ, P.; DAMASCHUN, G.; MÜLLER, J.J.; SCHWENKE, K.D. (1983): The structure of 11-S globulins from sunflower and rape seed. A small-angle X-ray scattering study. European Journal of Biochemistry 130: 315–320. Online: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07154.x (15.01.2018).

PRUKSASRI, S.; NGUYEN, T.-H.; HALTRICH, D.; NOVALIN, S. (2015): Fractionation of a galacto-oligosaccharides solution at low and high temperature using nanofiltration. Separation and Purification Technology 151: 124–130. Online: https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.015 (12.12.2018).

PUUMALAINEN, T.J.; PUUSTINEN, A.; POIKONEN, S.; TURJANMAA, K.; PALOSUO, T.; VAALI, K. (2015): Proteomic identification of allergenic seed proteins, napin and cruciferin, from cold-pressed rapeseed oils. Food Chemistry 175: 381–385. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.084 (27.11.2018).

QUINN, L.; GRAY, S.G.; MEANEY, S.; FINN, S.; KENNY, O.; HAYES, M. (2017): Sinapinic and protocatechuic acids found in rapeseed: isolation, characterisation and potential benefits for human health as functional food ingredients. Irish Journal of Agricultural and Food Research 56: 104–119. Online: https://doi.org/10.1515/ijafr-2017-0012 (04.08.2018).

RAWEL, H.M.; KROLL, J.; SCHRÖDER, I. (1998): Reactions of isothiocyanates with food proteins: Influence on enzyme activity and tryptical degradation. Food 42: 197–199. Online: https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(199808)42:03/04<197::AID-FOOD197>3.0.CO;2-B (27.08.2018).

RICHTER, G. (1998): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen: Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels. 6. Aufl., Stuttgart: Thieme.

RICO, M.; BRUIX, M.; GONZALEZ, C.; MONSALVE, R.; RODRIGUEZ, R. (1996): H-1 NMR assignment and global fold of napin BnIb, a representative 2S albumin seed protein. BIOCHEMISTRY 35: 15672–15682. Online: https://doi.org/10.1021/bi961748q (14.03.2018).

RIMBACH, G.; NAGURSKY, J.; ERBERSDOBLER, H.F. (2015): Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger. 2. Aufl., Berlin: Springer. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-46280-5 (09.10.2017).

RODRIGUES, I.M.; CARVALHO, M.G.V.; ROCHA, J.M. (2017): Increase of protein extraction yield from rapeseed meal through a pretreatment with phytase. Journal of the Science of Food and Agriculture 97: 2641–2646. Online: https://doi.org/10.1002/jsfa.8087 (26.08.2018).

RODRIGUES, I.M.; COELHO, J.F.J.; CARVALHO, M.G.V.S. (2012): Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. Journal of Food Engineering 109: 337–346. Online: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.027 (26.08.2018).

ROHN, S.; RAWEL, H.M.; RÖBER, M.; KROLL, J. (2005): Reactions with phenolic substances can induce changes in some physico-chemical properties and activities of bromelain – the consequences for supplementary food products. International Journal of Food Science & Technology 40: 771–782. Online: https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01011.x (29.08.2018).

ROTH, F.X. (2014): Schweinefütterung. In: KIRCHGEßNER, M. (Hrsg.): Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. 14. Aufl., Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 243–355.

RUBINO, M.I.; ARNTFIELD, S.D.; NADON, C.A.; BERNATSKY, A. (1996): Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. Food Research International 29: 653–659. Online: https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)89643-3 (17.05.2017).

SARI, Y.W.; MULDER, W.J.; SANDERS, J.P.M.; BRUINS, M.E. (2015): Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkalo and potential enzymatic assistance. Biotechnology Journal 10: 1138–1157. Online: https://doi.org/10.1002/biot.201400569 (06.09.2018).

SASTRY, M.C.S.; RAO, M.S.N. (1990): Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (helianthus annuus) seed. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 2103–2110. Online: https://doi.org/10.1021/jf00102a001 (30.08.2018).

SCHMIDT, I.; RENARD, D.; RONDEAU, D.; RICHOMME, P.; POPINEAU, Y.; AXELOS, M.A.-V. (2004): Detailed physicochemical characterization of the 2S storage protein from rape (Brassica napus L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 5995–6001. Online: https://doi.org/10.1021/jf0307954 (14.03.2018).

SCHÖNBUCHER, A. (2002): Thermische Verfahrenstechnik: Grundlagen und Berechnungsmethoden für Ausrüstungen und Prozesse. Berlin: Springer.

SCHWASS, D.E.; FINLEY, J.W. (1984): Heat and alkaline damage to proteins: Racemization and lysinoalanine formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32: 1377–1382. Online: https://doi.org/10.1021/jf00126a040 (06.09.2018).

SCHWENKE, K.D.; DAHME, A.; WOLTER, T. (1998): Heat-induced gelation of rapeseed proteins: Effect of protein interaction and acetylation. Journal of the American Oil Chemists' Society 75: 83–87. Online: https://doi.org/10.1007/s11746-998-0015-x (04.10.2016).

SCHWENKE, K.D. (1990): Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (Brassica napus L.) and related plant proteins. Nahrung 34: 225–240. Online: https://doi.org/10.1002/food.19900340307 (07.11.2017).

SCHWENKE, K.D.; RAAB, B.; PLIETZ, P.; DAMASCHUN, G. (1983): The structure of the 12 S globulin from rapeseed (Brassica napus L.). Nahrung 27: 165–175. Online: https://doi.org/10.1002/food.19830270208 (17.01.2018).

SCHWENKE, K.D.; RAAB. B.; SCHULTZ, M. (1975): On seed proteins. VI. Conformational analysis of globulins and albumins from sunflower seed (Helianthus annuus L.) and rape seed (Brassica napus L.) by means of circular dichroism in the far ultraviolet region (German). Studia Biophysica, 51, 161–172. zitiert nach: SCHWENKE, K.D. (1990): Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (Brassica napus L.) and related plant proteins. Die Nahrung, 34, 225–240. Online: https://doi.org/10.1002/food.19900340307 (07.11.2017).

SCOFIELD, S.R.; CROUCH, M.L. (1987): Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from Brassica napus. Journal of Biological Chemistry 262: 12202–12208. Online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3040733 (15.03.2018).

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, A.; BRYDEN, W.L. (2000): Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. Nutrition Research Reviews 13: 255–278. Online: https://doi.org/10.1079/095442200108729098 (27.08.2018).

SERRAINO, M.R.; THOMPSON, L.U. (1984): Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32: 38–40. Online: https://doi.org/10.1021/jf00121a010 (18.10.2016).

SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (1999): Seed Proteins. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (Hrsg.): Seed proteins. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–10.

SIGER, A.; CZUBINSKI, J.; DWIECKI, K.; KACHLICKI, P.; NOGALA-KALUCKA, M. (2013): Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in Brassica napus L. seed meal extracts. Cancer 119: 1130–1138. Online: https://doi.org/10.1002/ejlt.201300077 (02.08.2018).

SIKORSKI, Z.E. (2001a): Functional Properties of Proteins in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E. (Hrsg.): Chemical & functional properties of food proteins. Lancaster: Technomic Pub, 113–135.

SIKORSKI, Z.E. (2001b): Chemical Reactions in Proteins in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E. (Hrsg.): Chemical & functional properties of food proteins. Lancaster: Technomic Pub, 191–215.

SLOMINSKI, B.A.; CAMPBELL, L.D.; GUENTER, W. (1994): Carbohydrates and dietary fiber components of yellow- and brown-seeded canola. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42: 704–707. Online: https://doi.org/10.1021/jf00039a020 (22.11.2018).

SMULIKOWSKA, S.; PASTUSZEWSKA, B.; MIECZKOWSKA, A.; OCHTABIŃSKA, A. (1997): Chemical composition, energy value for chickens, and protein utilization in rats of rapeseed expeller cakes produced by different pressing technologies. Journal of Animal and Feed Sciences 6: 109–121. Online: https://doi.org/10.22358/jafs/69509/1997 (28.10.2018).

SONNEWALD, U. (2014): Stoffwechselphysiologie. In: KADEREIT, J.W.; KÖRNER, C.; KOST, B.; SONNEWALD, U. (Hrsg.): Strasburger − Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften. 37. Aufl., Berlin: Springer, 337–446. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-642-54435-4_19 (14.08.2018).

SØRENSEN, H. (1990): Glucosinolates: Structure–Properties–Function. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 149–172.

STABNIKOW, W.N.; LYSJANSKI, V.M.; POPOW, W.D.; REDKO, F.A. (1983): Verfahrenstechnische Grundlagen der Lebensmitteltechnik: Prozesse und Apparate in der Lebensmittelproduktion. Leipzig: VEB Fachbuchverlag Leipzig.

STANGL, G.I. (2014): Zusammensetzung von Nahrung und Tier. In: KIRCHGEßNER, M.: Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratug und Praxis. 14. Aufl., Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 19–26.

STICHER, O. (2007): Phenolische Verbindungen. In: HÄNSEL, R.; STICHER, O. (Hrsg.): Pharmakognosie – Phytopharmazie. 8. Aufl., Berlin: Springer, 1141–1314. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-540-34281-6_26 (23.07.2018).

TAN, S.H.; MAILER, R.J.; BLANCHARD, C.L.; AGBOOLA, S.O. (2011): Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties. Journal of Food Science 76: R16–R28. Online: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01930.x (05.10.2016).

TAN, S.H.; MAILER, R.J.; BLANCHARD, C.L.; AGBOOLA, S.O. (2014a): Emulsifying properties of proteins extracted from Australian canola meal. LWT - Food Science and Technology 57: 376–382. Online: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.040 (15.05.2018).

TAN, S.H.; MAILER, R.J.; BLANCHARD, C.L.; AGBOOLA, S.O.; DAY, L. (2014b): Gelling properties of protein fractions and protein isolate extracted from Australian canola meal. Food Research International 62: 819–828. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.055 (28.05.2018).

TANDANG-SILVAS, M.R.G.; FUKUDA, T.; FUKUDA, C.; PRAK, K.; CABANOS, C.; KIMURA, A.; ITOH, T.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S.; MARUYAMA, N. (2010): Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. Biochimica et biophysica acta 1804: 1432–1442. Online: https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016 (21.01.2018).

TEH, S.-S.; BEKHIT, A.E.-D.; CARNE, A.; BIRCH, J. (2014): Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. Journal of Food Measurement and Characterization 8: 92–104. Online: https://doi.org/10.1007/s11694-013-9168-x (28.05.2018).

THEODORIDOU, K.; YU, P. (2013): Effect of processing conditions on the nutritive value of canola meal and presscake. Comparison of the yellow and brown-seeded canola meal with the brown-seeded canola presscake: Effect of processing conditions on the nutritive value of canola meal and canola presscake. Journal of the Science of Food and Agriculture 93: 1986–1995. Online: https://doi.org/10.1002/jsfa.6004 (29.05.2018).

THIYAM, U.; CLAUDIA, P.; JAN, U.; ALFRED, B. (2009): De-oiled rapeseed and a protein isolate: Characterization of sinapic acid derivatives by HPLC-DAD and LC-MS. European Food Research and Technology 229: 825–831. Online: https://doi.org/10.1007/s00217-009-1122-0 (04.08.2018).

THOMPSON, L.U. (1990): Phytates in Canola/Rapeseed. In: SHAHIDI, F. (Hrsg.): Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition and processing technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 173–192.

THRÄN, D.; ARENDT, O.; ADWIRAAH, H.; KALTSCHMITT, M. (2016): Nebenprodukte, Rückstände und Abfälle. In: KALTSCHMITT, M.; HARTMANN, H.; HOFBAUER, H. (Hrsg.): Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren. 3. Aufl., Berlin: Springer, 273–323. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-47438-9_6 (04.11.2018).

THUNEKE, K.; REMMELE, E.; NEULING, U.; KALTSCHMITT, M. (2016): Produktion und Nutzung von Pflanzenölkraftstoffen: Produkte und energetische Nutzung. In: KALTSCHMITT, M.; HARTMANN, H.; HOFBAUER, H. (Hrsg.): Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren. 3. Aufl., Berlin: Springer, 1414–1445. Online: https://doi-1org-100001df613ef.pisces.boku.ac.at/10.1007/978-3-662-47438-9_16 (04.11.2018).

TRIPATHI, M.K.; MISHRA, A.S. (2007): Glucosinolates in animal nutrition: A review. Animal Feed Science and Technology 132: 1–27. Online: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.003 (12.08.2018).

VAN DOOSSELAERE, P. (2013): Production of Oils. In: HAMM, W.; HAMILTON, R.J.; CALLIAUW, G. (Hrsg.): Edible Oil Processing. 2. Aufl., Oxford: Wiley-Blackwell, 55–96.

VAUCK, W.R.A.; MÜLLER, H.A. (2000): Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik. 11. Aufl., Stuttgart: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie.

VOESTE, T.; WEBER, K. (2004): Liquid – Solid Extraction: Extraction without Chemical Reaction. In: Anon (Hrsg.): Ullmann's Processes and Process Engineering. Bd. 1: Separation Processes. Weinheim: Wiley-VHC, 338–345.

VON DER HAAR, D.; MÜLLER, K.; BADER-MITTERMAIER, S.; EISNER, P. (2014): Rapeseed proteins – Production methods and possible application ranges. OCL - Oilseeds and fats 21: D104, 1–8. Online: https://doi.org/10.1051/ocl/2013038 (04.10.2016).

WANASUNDARA, J.P.D. (2011): Proteins of Brassicaceae Oilseeds and their Potential as a Plant Protein Source. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51: 635–677. Online: https://doi.org/10.1080/10408391003749942 (23.11.2017).

WANASUNDARA, J.P.D.; ABEYSEKARA, S.J.; MCINTOSH, T.C.; FALK, K.C. (2012): Solubility Differences of Major Storage Proteins of Brassicaceae Oilseeds. Journal of the American Oil Chemists' Society 89: 869–881. Online: https://doi.org/10.1007/s11746-011-1975-9 (15.01.2018).

WANASUNDARA, J.P.D.; MCINTOSH, T.C.; PERERA, S.P.; WITHANA-GAMAGE, T.S.; MITRA, P. (2016): Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids 23: D407, 1–15. Online: https://doi.org/10.1051/ocl/2016028 (04.10.2016).

WANG, C.; WU, J.; BERNARD, G.M. (2014): Preparation and characterization of canola protein isolate–poly(glycidyl methacrylate) conjugates: A bio-based adhesive. Industrial Crops & Products 57: 124–131. Online: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.024 (16.11.2018).

WESTPHAL, G.; GERBER, G.; LIPKE, B. (2003): Proteine - nutritive und funktionelle Eigenschaften. Berlin: Springer.

WILDE, P.J. (2000): Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. Current Opinion in Colloid & Interface Science 5: 176–181. Online: https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00056-X (25.06.2018).

WILLIAMS, M.A.; HRON, R.J. (1996): Obtaining Oils and Fats from source materials. In: HUI, Y.H. (Hrsg.): BAILEY´S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS. Bd. 4: Edible Oil and fat products: processing technology. New York: John Wiley & Sons, 61–155.

WITHANA-GAMAGE, T.S.; HEGEDUS, D.D.; QIU, X.; MCINTOSH, T.; WANASUNDARA, J.P.D. (2013): Structural and physicochemical property relationships of cruciferin homohexamers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 5848–5859. Online: https://doi.org/10.1021/jf400559x (21.01.2018).

WU, J.; MUIR, A.D. (2008): Comparative Structural, Emulsifying, and Biological Properties of 2 Major Canola Proteins, Cruciferin and Napin. Journal of Food Science 73: C210–C216. Online: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00675.x (27.04.2018).

XU, L.; DIOSADY, L.L. (2000): Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. Food Research International 33: 725–731. Online: https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00062-4 (26.04.2017).

XU, L.; DIOSADY, L.L. (2002): Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. Food Research International 35: 23–30. Online: https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00159-9 (11.05.2017).

YANG, C.; WANG, Y.; VASANTHAN, T.; CHEN, L. (2014): Impacts of pH and heating temperature on formation mechanisms and properties of thermally induced canola protein gels. Food Hydrocolloids 40: 225–236. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.011 (03.06.2018).

YOSHIE-STARK, Y.; WADA, Y.; SCHOTT, M.; WÄSCHE, A. (2006): Functional and bioactive properties of rapeseed protein concentrates and sensory analysis of food application with rapeseed protein concentrates. LWT - Food Science and Technology 39: 503–512. Online: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.006 (20.06.2018).

YOSHIE-STARK, Y.; WADA, Y.; WÄSCHE, A. (2008): Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. Food Chemistry 107: 32–39. Online: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.061 (10.10.2016).

ZAYAS, J.F. (1997): Functionality of Proteins in Food. Berlin: Springer.

ZUM FELDE, T.; BAUMERT, A.; STRACK, D.; BECKER, H.C.; MÖLLERS, C. (2007): Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (Brassica napus L.) and development of NIRS calibration equations. Plant Breeding 126: 291–296. Online: https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01342.x (04.08.2018).

Anhang

Tabelle A 1: Rohdaten der Versuchsreihen 1 - 3

Vers.R.	Probe	TS [%]	Asche [%]	Asche in TS [%]	Protein [%]	Protein in TS [%]	Zucker [%]	Zucker in TS [%]	Säuren [%]	Säuren in TS [%]	Ausb. TS [%]	Ausb. Asche [%]	Ausb. Protein [%]	Ausb. Zucker [%]	Ausb. Säuren [%]
	RPK	91,72	6,00	6,54	31,60	34,45	26,70	29,12	8,75	9,54					
1 - Einzelfällungen															
60 min	Extrakt	5,44	0,89	16,25	2,51	46,10	1,08	19,77	0,33	6,09	44,92	111,66	60,11	30,51	28,67
	Pellet pH 5,5	10,26	0,90	8,77	6,47	63,06	0,78	7,64	0,79	7,73	19,33	25,81	35,39	5,07	15,68
	Pellet pH 5,5 gew.	12,23	0,30	2,45	9,30	76,04	0,30	2,44	0,68	5,56	14,02	5,21	30,95	1,18	8,17
	Pellet pH 3,0	14,16	0,87	6,14	8,53	60,24	0,91	6,42	0,87	6,12	21,40	19,99	37,41	4,72	13,72
	Pellet pH 3,0 gew.	16,39	0,44	2,68	12,22	74,56	0,51	3,09	0,98	5,99	16,85	6,88	36,46	1,79	10,58
180 min	Extrakt	5,83	0,95	16,27	2,78	47,68	1,07	18,31	0,36	6,17	47,26	117,55	65,41	29,72	30,59
	Pellet pH 5,5	7,51	0,92	12,25	3,94	52,46	0,55	7,35	0,69	9,22	13,08	24,37	19,91	3,30	12,64
	Pellet pH 5,5 gew.	7,40	0,22	2,97	4,47	60,41	0,31	4,15	0,63	8,49	7,63	3,46	13,37	1,09	6,79
	Pellet pH 3,0	15,07	0,66	4,38	9,76	64,76	0,77	5,12	0,80	5,31	24,89	16,58	46,79	4,38	13,86
	Pellet pH 3,0 gew.	16,85	0,32	1,90	11,16	66,23	0,57	3,40	1,09	6,45	18,14	5,34	34,88	2,12	12,27
2 - Feinfällungsreihe															
180 min	Extrakt	6,02	0,95	15,75	2,79	46,35	1,06	17,61	0,37	6,16	52,61	126,66	70,81	31,82	8,90
	Pellet pH 7,0	8,12	0,82	10,10	2,99	36,82	0,83	10,17	1,07	13,13	8,69		9,30	3,01	3,11
	Pellet pH 5,4	11,29	0,56	4,96	8,09	71,66	0,69	6,09	0,32	2,82	11,28		23,46	2,36	0,69
	Pellet pH 5,3	13,77	0,56	4,07	10,52	76,40	0,76	5,55	0,26	1,88	5,33		11,82	1,02	0,19
	Pellet pH 5,2	15,61	0,47	3,01	12,23	78,35				0,00	2,35		5,34		
	Pellet pH 5,1	16,85	0,66	3,92	12,32	73,12				0,00	2,54		5,39		
3 - Vorfällungsversuche															
60 min	Extrakt	5,10	0,84	16,42	2,22	43,53	0,98	19,17	0,35	6,96	38,96	97,84	49,23	25,65	28,43
	Pellet pH 6,5	6,42	0,82	12,79	2,90	45,17	0,60	9,32	0,69	10,72	10,56	20,66	13,85	3,38	11,87
	Pellet pH 5,0	12,35	0,70	5,64	8,20	66,40	0,75	6,10	0,35	2,85	11,66	10,06	22,46	2,44	3,48
	Pellet pH 5,0 gew.	15,96	0,24	1,53	13,66	85,59	0,71	4,46	0,31	1,96	8,08	1,89	20,08	1,24	1,66
120 min	Extrakt	5,57	0,90	16,13	2,50	44,88	1,06	19,12	0,37	6,66	44,56	109,94	58,05	29,33	31,13
	Pellet pH 6,5	6,69	0,99	14,82	2,58	38,57	0,76	11,34	0,83	12,39	10,73	24,31	12,01	4,19	13,94
	Pellet pH 5,0	14,96	0,83	5,57	11,13	74,40	0,82	5,46	0,32	2,16	13,59	11,59	29,36	2,55	3,09
	Pellet pH 5,0 gew.	17,08	0,24	1,42	12,99	76,05	0,47	2,74	0,25	1,46	11,34	2,46	25,02	1,07	1,73
180 min	Extrakt	5,70	0,93	16,33	2,53	44,39	1,26	22,18	0,38	6,60	46,45	115,96	59,84		
	Pellet pH 6,5	7,19	0,95	13,28	2,91	40,47	0,87	12,07	0,83	11,56	12,24	24,84	14,37		
	Pellet pH 5,0	15,50	0,86	5,55	11,22	72,39	0,95	6,13	0,33	2,11	13,22	11,23	27,78		
	Pellet pH 5,0 gew.	22,47	0,22	0,99	18,84	83,85	0,81	3,59	0,25	1,11	11,19	1,70	27,22		

Tabelle A 2: Rohdaten Versuchsreihe 4

	TS [%]	Protein [%]	Protein in TS [%]	Ausb. TS [%]	Ausb. Protein [%]
Extrakt (120 min)	4,73	2,02	42,84	44,60	55,45
Konzentrat	10,48	5,61	53,52		
Permeat	2,75	0,40	14,41	18,34	7,67
DF-Konzentrat I	9,99	5,90	59,10		
DF-Permeat I	1,00			8,55	
DF-Konzentrat II	10,19	6,18	60,68	19,84	34,95
DF-Permeat II	0,72			1,94	
Pellet pH 3,5	27,37	16,06	58,68	16,50	28,10
Überstand pH 3,5	4,71	2,00	42,40	6,78	8,34
Überstand pH 3,5 (1 % PVPP)	4,72				
Überstand pH 3,5 (10 % PVPP)	4,87	2,08	42,76		

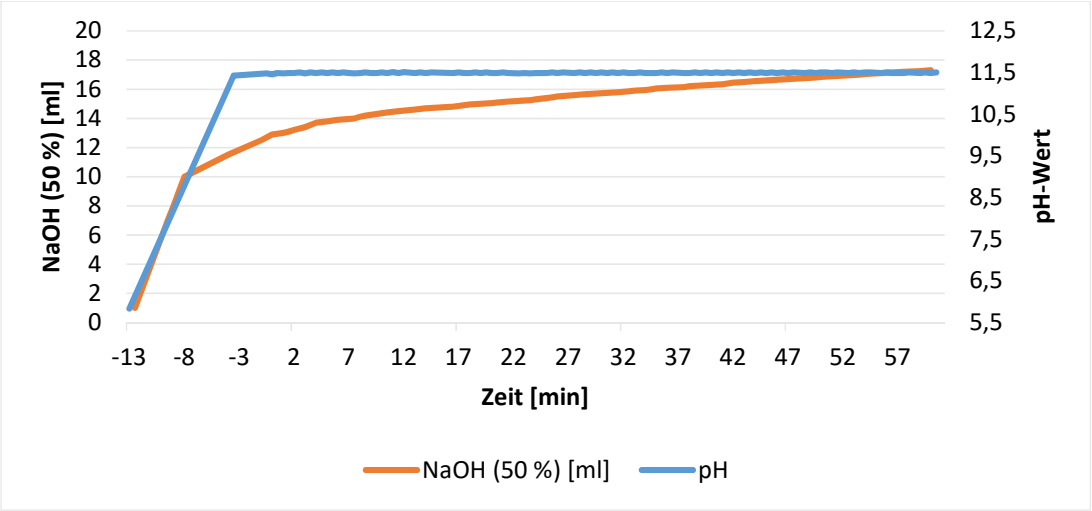

Abbildung A 1: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 1, 60 min

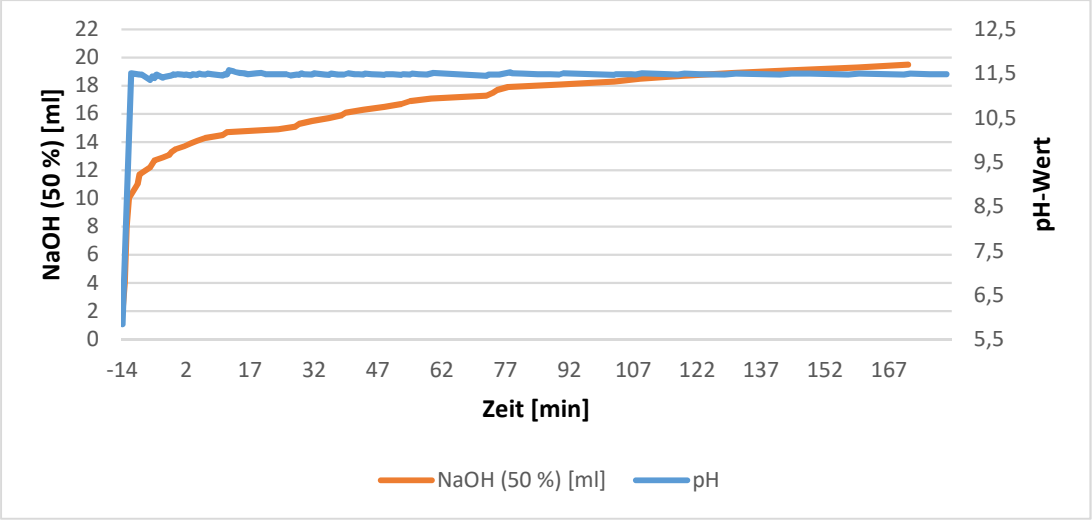

Abbildung A 2: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 1, 180 min

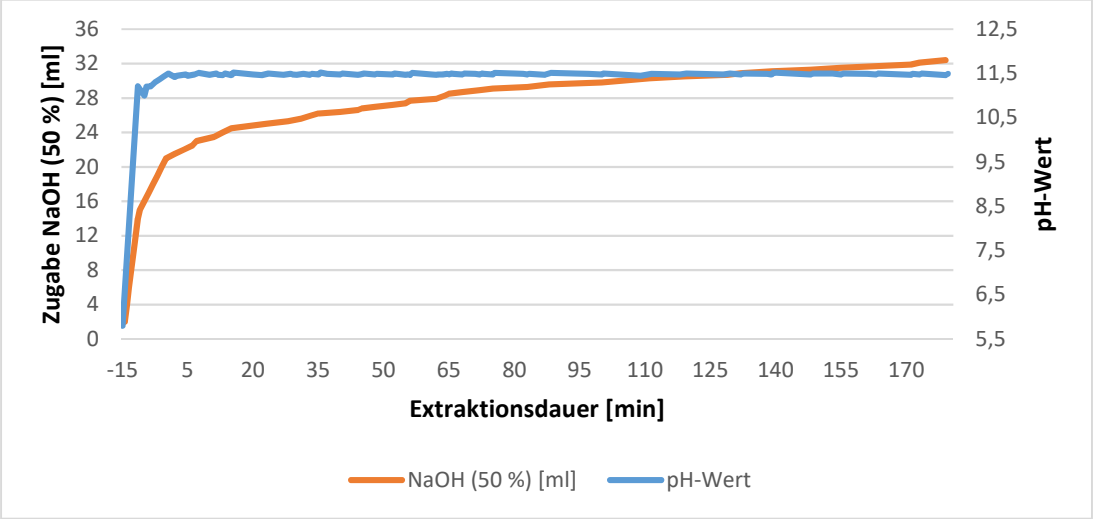

Abbildung A 3: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 2, 180 min

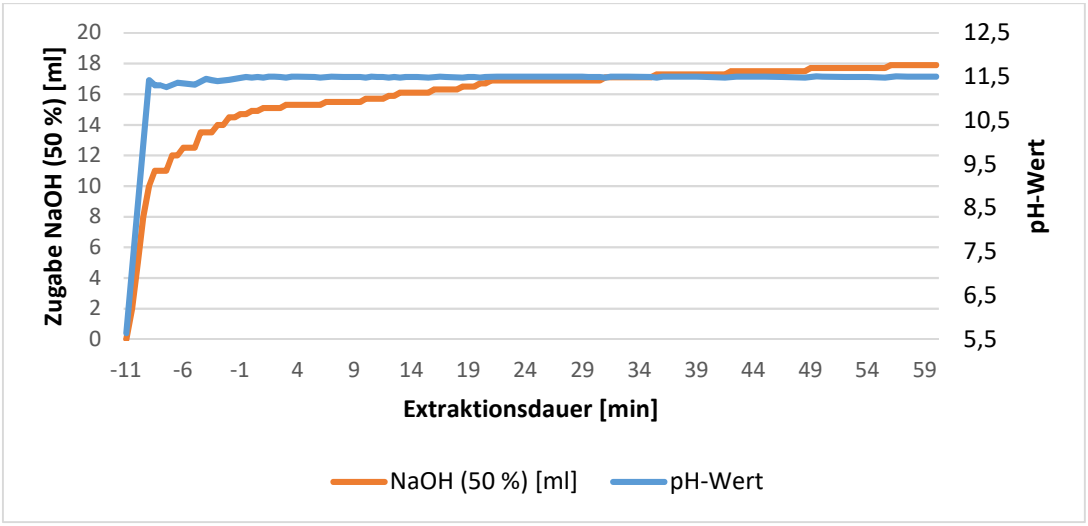

Abbildung A 4: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 3, 60 min

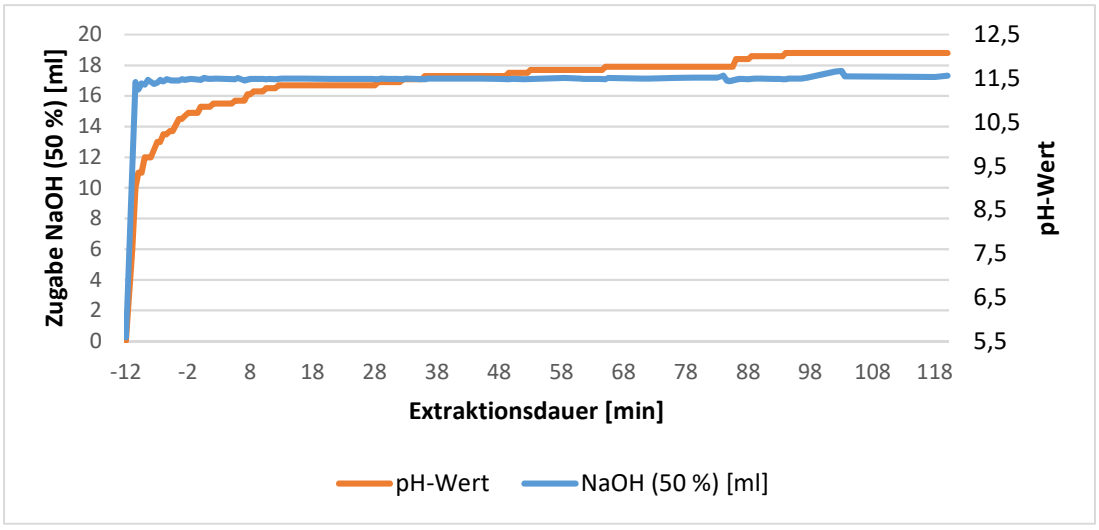

Abbildung A 5: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 3, 120 min

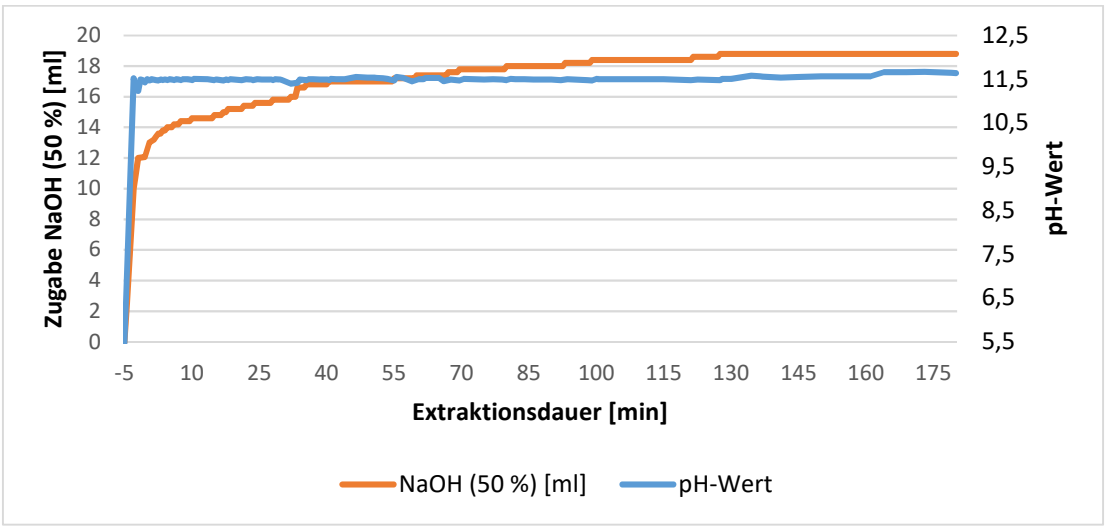

Abbildung A 6: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 3, 180 min

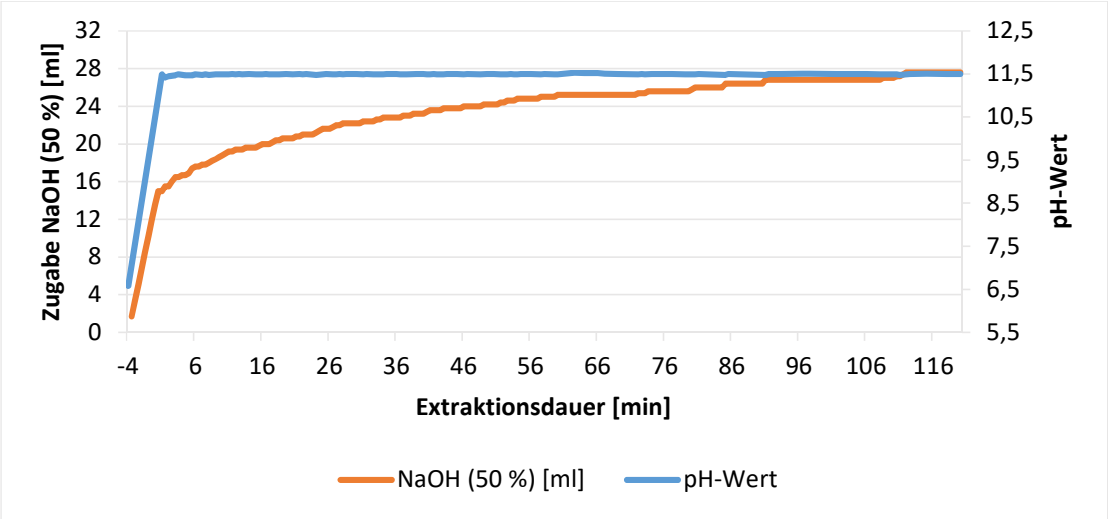

Abbildung A 7: Extraktionsverlauf Versuchsreihe 4, 120 min

Product Specification

MICRODYN NADIR
ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES

NADIR® UP010 P
Ultrafiltration Membrane

NADIR® UP010 is a 10,000 Dalton molecular weight cut off (M.W.C.O.) polyethersulfone ultrafiltration membrane that is used in many different applications ranging from food and dairy process applications to industrial water purification. UP010 membrane sheet is available in dry flat sheet rolls and is FDA compliant.

Membrane Characteristics

Membrane Chemistry	Backing Material	Nominal M.W.C.O (Da)	Thickness (µm)
Polyethersulfone (PES)	Polypropylene	10,000	210 - 250

Permeability LMH/bar (GFD/psi)[a]	PVP K17 Retention (%)[b]	pH Range	Chlorine Tolerance[c]
≥ 50.0 (≥ 2.0)	54.0 – 75.0	0.0 – 14.0	200 ppm (sanitization) at pH ≥ 10.5

a Test conditions: Clean water, 4 bar (58 psi), 20°C (68°F), crossflow operation. Membrane specifications may change without notice as design revisions occur.
b Test conditions: 2% PVP K17, 4 bar (58 psi), 20°C (68°F), crossflow operation.
c For daily short term cleaning: maximum 50°C (125°F), 30 min.

Important Information

Standard Sizes: NADIR flat sheet membrane is available in an A4 sample size of 210 mm x 297 mm (8.27 in x 11.69 in) and in a nominal roll size of 150 m x 1016 mm (492 ft x 40.0 in). Custom lengths may be available on request.

Initial Flush: MICRODYN-NADIR recommends flushing membrane for 30 minutes and discarding permeate during the flush prior to operation.

Storage: Membrane shipped dry should be stored away from direct sunlight in a cool, dry place. Please see *Membrane Storage Guide – Flat Sheet Membrane* (TSG-O-011).

MICRODYN NADIR
ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES
A MANN + HUMMEL Company

Europe
Germany: +49 611 962 6001
Italy: +39 0721 1796201
info@microdyn-nadir.de

Americas
USA: +1 805 964 8003
Brazil: +55 11 3378 7500
info@microdyn-nadir.com

Asia
China: + 86 592 677 5500
Singapore: +65 6457 7533
infochina@microdyn-nadir.cn

Solving Unmet Needs with **Customized** Products

Revised Oct. 2, 2018

Abbildung B 1: Datenblatt der verwendeten UF-Membran (Quelle: MICRODYN-NADIR, 2018)

Zugelassenes neuartiges Lebensmittel	Spezifikation
	Schwermetalle: Eisen (Fe): < 1 000 µg/kg Kupfer (Cu): < 100 µg/kg **Verunreinigungen:** Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) Benzo(a)pyren: < 2 µg/kg Es ist eine Behandlung mit Aktivkohle erforderlich, um zu gewährleisten, dass bei der Herstellung von Rapsöl mit hohem Anteil an unverseifbaren Bestandteilen keine polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) angereichert werden.
Rapssamenprotein	**Definition:** Rapssamenprotein ist ein wässriger, proteinreicher Extrakt aus Rapssamen-Presskuchen aus nicht genetisch veränderten Samen von *Brassica napus* L. und *Brassica rapa* L. **Beschreibung:** weißes bis cremefarbenes, sprühgetrocknetes Pulver Gesamtprotein: ≥ 90 % Lösliches Protein: ≥ 85 % Feuchtigkeit: ≤ 7,0 % Kohlenhydrate: ≤ 7,0 % Fett: ≤ 2,0 % Asche: ≤ 4,0 % Ballaststoffe: ≤ 0,5 % Gesamt-Glucosinolate: ≤ 1 mmol/kg **Reinheit:** Gesamtphytat: ≤ 1,5 % Blei: ≤ 0,5 mg/kg **Mikrobiologische Kriterien:** Hefen und Schimmelpilze insgesamt: ≤ 100 KBE/g Aerobe Keimzahl: ≤ 10 000 KBE/g Gesamtzahl Coliforme: ≤ 10 KBE/g *Escherichia coli*: in 10 g nicht nachweisbar Salmonellen: in 25 g nicht nachweisbar

Abbildung C 1: Spezifikationen für Rapssamenprotein als zugelassene neuartige Lebensmittelzutat. Auszug der EU-Durchführungsverordnung 2017/2470, Amtsblatt der Europäischen Union L351/183 (Quelle: EU, 2017, S. 183)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.