KMU-innovativ -KMUi-BÖ03: PISUM – Starter-Co-Kultur für die Erbsenfermentation, um Alternativen zu Milchprodukten nachhaltig, sensorisch und nutritiv herzustellen

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Berlin
Förderkennzeichen: 031B1308B
Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2022 – 31.01.2025 (verlängert bis 31.04.25)

Das Ziel des PISUM-Projekts war die Entwicklung von Starterkulturen, die in der Lage sind, ein Substrat auf Erbsenproteinbasis zu joghurtähnlichen Produkten zu fermentieren. Im Gegensatz zur traditionellen Milchjoghurtherstellung stellen pflanzliche Substrate eine Reihe besonderer Herausforderungen dar. Vor allem enthält Erbsenprotein einen hohen Anteil an Aldehyden, die in Milch weitgehend fehlen, was zu ausgeprägten bohnigen und grasigen Fehlaromen führt. Die Beseitigung dieser sensorischen Mängel ist entscheidend für die Herstellung pflanzlicher Joghurts mit akzeptableren, milchähnlichen Eigenschaften. Daher besteht ein klarer Bedarf an der Identifizierung neuartiger Kombinationen von Mikrobenstämmen, die sowohl die Bildung von Fehlaromen mindern als auch die Entwicklung wünschenswerter „milchähnlicher“ sensorischer Eigenschaften unterstützen.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben wir gezielte Screening-Methoden entwickelt, um sowohl Milchsäurebakterien als auch Hefen auf Eigenschaften zu untersuchen, die für die Fermentation von Joghurt auf Erbsenbasis relevant sind. Dazu gehörten die Toleranz gegenüber Fermentationstemperaturen und die Fähigkeit, Aldehyde zu entfernen oder zu reduzieren. Darüber hinaus wurden Bakterienstämme auf ihre Säuerungsfähigkeit und Hefestämme auf ihre Neigung zur Alkoholproduktion untersucht, eine unerwünschte Eigenschaft in joghurtähnlichen Produkten.

Insgesamt wurden 47 Milchsäurebakterienstämme (darunter 29 neu isolierte Stämme) und 89 Hefestämme (darunter 4 neu isolierte Stämme) untersucht. Auf Grundlage ihrer Leistungsfähigkeit wurden fünf Bakterienstämme und vier Hefestämme als vielversprechendste Kandidaten für die Joghurtherstellung ausgewählt. Anschließend wurden Prototyp-Joghurts sowohl unter Verwendung von Milchsäurebakterien allein als auch in Mischfermentationen mit Hefe hergestellt, und die resultierenden Produkte wurden sowohl hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung als auch ihrer sensorischen Eigenschaften bewertet.

Unter den getesteten Bakterienstämmen wurde *Streptococcus thermophilus* B-22017 als wesentlich für eine gleichmäßige und ausreichende Säuerung des Erbsenproteinsubstrats identifiziert. *Lactobacillus helveticus* und *Lactobacillus acidophilus* erwiesen sich als die wirksamsten Partnerstämme in Kombination mit *S. thermophilus*. In Bezug auf die Hefeleistung wurden die günstigsten Ergebnisse mit einer mesophilen Hefe in einem zweistufigen Fermentationsprozess erzielt, der aus 6 Stunden bei 30 °C und anschließend 16 Stunden bei 40 °C bestand. Die anfänglich niedrigere Temperatur begünstigte die Geschmacksverbesserung durch Aldehydreduktion, während die anschließende höhere Temperatur die Alkoholbildung begrenzte und die Entwicklung unerwünschter Aromen im Zusammenhang mit einer verlängerten Hefeaktivität verhinderte. Unter den getesteten Hefen erwies sich *Pichia stipitis* Y-23117 als der vielversprechendste Stamm.

Zusammenfassend hat das PISUM-Projekt gezeigt, wie wichtig es ist, eine Vielzahl verschiedener Mikrobenstämme auf funktionelle Eigenschaften zu untersuchen, die für die Herstellung von pflanzlichem Joghurt relevant sind. Die Ergebnisse unterstreichen das Potenzial sorgfältig

ausgewählter Bakterien-Hefe-Kombinationen zur Verbesserung des Geschmacks und der Fermentationsleistung in Substraten auf Erbsenproteinbasis und stellen einen bedeutenden Schritt in Richtung der Nachbildung des sensorischen Profils von traditionellem Milchjoghurt dar.

Erfolgsbericht

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
Technische Universität Berlin	031B1308B

Vorhabenbezeichnung: KMU-innovativ -KMUi-BÖ03: PISUM – Starter-Co-Kultur für die Erbsenfermentation, um Alternativen zu Milchprodukten nachhaltig, sensorisch und nutritiv herzustellen

Laufzeit des Vorhabens: 01.11.2022 – 31.01.2025 (verlängert bis 31.04.25)

Berichtszeitraum: 01.11.2022 – 31.04.2025

Berlin, 15.12.2025

Ort, Datum und Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Ausgangssituation und Aufgabenstellung 5

2. Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse 5

AP 1 „Auswahl geeigneter Erbsensamen und Bestimmung des Erbsensamenmikrobioms“..... 5

AP1.2 „Entwicklung geeigneter erbsenproteinhaltiger Nährmedien und Bestimmung hochauflösender genetischer Marker“ 5

AP1.3 „Bestimmung isolierter endo- und epiphytischer “Erbsenmikroorganismen” 6

AP 2 „Untersuchung von kommerziell erhältlichem Erbsensubstrat“ 6

AP 2.1 „Untersuchung der Erbsenproteinkomposition und -qualität mit lebensmittelchemischen und sensorischen Methoden“ 6

AP 2.2 „Untersuchung der initialen Menge an pflanzlichen Sekundärmetaboliten mit antinutritiven Eigenschaften und Evaluierung von Vorbehandlungen zu deren Reduktion“ 7

AP 4 „Evaluierung der Eignung von Milchsäurebakterien aus der TU Berlin Stammsammlung für die Starter-Co-Kultur“..... 8

AP 4.1 „Analyse der Eignung von Mikroorganismen der TU Berlin Stammsammlung für die Ansäuerung eines erbsenbasierten Mediums“ 9

AP 4.2 „Durchführung von Probefermentationen mit ausgewählten Stämmen aus der TU Berlin Stammsammlung und sensorische Evaluierung der fermentierten Proben“ 18

AP 4.3 „Analyse der Biosynthese von erwünschten Metaboliten und aromaaktiven Substanzen“ 22

AP 5 Finale Analysen und Herstellung der Erbsenjoghurtalternative-Entwicklungsmuster..... 25

5.1 Auswahl optimaler Starter- Co-Kulturen und Herstellung von Joghurtalternative-Entwicklungsmuster 25

5.2 Bio-/chemische und sensorische Analyse der Entwicklungsmuster 25

3. Nutzen..... 26

4. Fazit und Ausblick..... 27

5. Veröffentlichungen und Schutzrechte 27

6. Referenzen 28

1. Ausgangssituation und Aufgabenstellung

Die Nachfrage nach pflanzenbasierten Lebensmitteln hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Verbraucher:innen wünschen sich zunehmend Alternativen zu tierischen Produkten, die nicht nur ernährungsphysiologisch hochwertig und nachhaltig hergestellt, sondern auch sensorisch attraktiv sind (PBFA Team, 2024). Besonders im Segment der pflanzlichen Joghurtalternativen zeigt sich, dass der Markt derzeit stark von Sojaprodukten dominiert wird (Grand View Research, 2023), deren ökologische Bilanz kritisch diskutiert wird. Andere pflanzliche Ausgangsstoffe wie Mandel, Kokos oder Hafer werden zwar zunehmend genutzt, bieten aber im Hinblick auf Nachhaltigkeit, Proteingehalt und landwirtschaftliche Anbaubedingungen keine umfassende Lösung (Pointke et al., 2022). Die gelbe Spalterbse (*Pisum sativum L.*) stellt dagegen einen besonders geeigneten Rohstoff dar. Sie zeichnet sich durch einen hohen Proteingehalt, einen geringen Fettanteil sowie wertvolle Aminosäuren, Vitamine und komplexe Kohlenhydrate aus (García Arteaga et al., 2021; Urbano et al., 2003). Darüber hinaus erbringt sie wichtige agrarökologische Leistungen: Stickstofffixierung, Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit, Reduktion von Treibhausgasen und Förderung der Biodiversität (Loveday, 2019). Damit vereint die Erbse sowohl ernährungsphysiologische als auch ökologische Vorteile. Trotz dieser Potenziale gibt es bislang wenige marktfähige erbsenbasierte Joghurtalternativen. Ein wesentlicher Grund liegt in technologischen und sensorischen Herausforderungen: Produkte aus Erbsenprotein weisen häufig eine unerwünschte „Bohnigkeit“, Bitterkeit oder grasige *off-flavor* auf (Trindler et al., 2022). Zudem gelingt es herkömmlichen Starterkulturen, die auf Milchsubstraten optimiert sind, nur unzureichend, die spezifische Matrix der Erbse zu verwerten und ein für Joghurt typisches Aroma- und Texturprofil zu erzeugen. Somit besteht eine klare Lücke zwischen dem Potenzial der Erbse und der tatsächlichen Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger erbsenbasierter Fermentprodukte. Vor diesem Hintergrund entstand die Aufgabenstellung des Projekts PISUM: Es sollte eine maßgeschneiderte Starter-Co-Kultur entwickelt werden, die in der Lage ist, Erbsen- oder Ackerbohnenbiomasse effizient zu fermentieren und gleichzeitig sensorische Schwächen zu überwinden.

2. Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse

AP 1 „Auswahl geeigneter Erbsensamen und Bestimmung des Erbsensamenmikrobioms“

AP1.2 „Entwicklung geeigneter erbsenproteinhaltiger Nährmedien und Bestimmung hochauflösender genetischer Marker“

Hefeeignung zur Herstellung veganer Lebensmittel: Um das Wachstum von Hefen auf veganen Substraten zu bewerten, wurde das tierische Pepton im Standardmedium YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) durch pflanzliche Alternativen – Sojapepton und Erbsenproteinisolat – ersetzt. Die Hefestämme wurden in diesen modifizierten Medien kultiviert und mit dem Standardmedium verglichen. Alle Stämme wuchsen erfolgreich in beiden Alternativen, ohne Unterschiede in der Wachstumsrate zu zeigen. Daher kann die Isolation von Hefen aus Erbsenproben mit diesem tierfreien YPD-Medium durchgeführt werden.

Bedingungen zur Hefeisolation: Zur Isolation von Hefen, die mit Erbsen assoziiert sind, werden Erbsenproben in YPD-Brühe (mit Sojapepton) mit 0,01 % Chloramphenicol und 0,01 % Chlortetracyclin (Koburger & Rodgers, 1978) inokuliert. Die Kulturen werden unter anaeroben Bedingungen bei 15–18 °C inkubiert, um das Wachstum von Bakterien und filamentösen Pilzen zu unterdrücken. Die Inkubation erfolgt bis zur sichtbaren Trübung, jedoch höchstens zwei Monate. Anschließend werden die Proben auf YPD-Agarplatten mit denselben Antibiotika ausplattiert, und

einzelne Hefekolonien werden zur Identifizierung auf frische Platten überführt. Verschiedene Teile der Erbsen (Hülse, Erbse, zerdrückte Erbse usw.) werden verwendet, um sowohl epiphytische als auch endophytische Hefen zu isolieren.

Genetische Marker zur Hefeidentifizierung: Isolierte Hefekolonien werden mittels ITS-PCR unter Verwendung der Primer ITS1 und ITS4 identifiziert (White et al., 1990). Die PCR-Produkte werden anschließend von einem externen Unternehmen (Microsynth) gereinigt und sequenziert. Die erhaltene Sequenz wird anschließend mit einer Datenbank verglichen, um die Art zu identifizieren.

AP1.3 „Bestimmung isolierter endo- und epiphytischer "Erbsenmikroorganismen"

Die Hefeisolierung aus Erbsen wurde mit denselben Erbsenproben versucht, die unser Partner VF Nutrition GmbH zuvor zur Isolierung von Milchsäurebakterien verwendet hatte. Nach über zwei Monaten Inkubation in pflanzlichem YPD-Medium mit Antibiotika bei 18 °C (wie in AP1.2 beschrieben) konnte kein Hefewachstum beobachtet werden; es entwickelten sich lediglich filamentöse Pilze. Da zu diesem Zeitpunkt (Spätsommer) keine frischen, unverdorbenen Erbsenproben verfügbar waren, konzentrierte sich der Fokus stattdessen auf die Isolierung von Hefestämmen aus fermentierten Lebensmitteln.

AP 2 „Untersuchung von kommerziell erhältlichem Erbsensubstrat"

AP 2.1 „Untersuchung der Erbsenproteinkomposition und -qualität mit lebensmittelchemischen und sensorischen Methoden"

Zu Beginn wurden 11 kommerziell erhältliche Proteinkonzentrate und -isolate hinsichtlich ihrer Eignung untersucht (siehe Tabelle 1). Dazu wurden die aromaaktiven Substanzen mittels Headspace-GC-FID (Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion) bestimmt. Die Aromaprofile zeigen unterschiedliche Mengen an unerwünschten *off-flavor* Verbindungen, wie Aldehyden, Ketonen und Furanen (siehe Abbildung). Anhand dieser Daten und anderen Faktoren wie der Verfügbarkeit wurde das Erbsenprotein 5 und Ackerbohnenprotein 10 für die Fermentationsversuche ausgewählt.

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Proteinkonzentrate und -isolate.

Nr.	Quelle	Proteingehalt [%]	Herkunft
1	Erbse	86,5	Nordamerika
2	Erbse	79,0	Europa
3	Erbse	85,0	Europa
4	Erbse	80,0	Europa
5	Erbse	86,0	Nordamerika
6	Erbse	86,0	Nordamerika
7	Erbse	80,0	Nordamerika
8	Ackerbohne	88,0	China
9	Ackerbohne	90,0	China
10	Ackerbohne	88,0	Europa
11	Ackerbohne	87,6	Europa

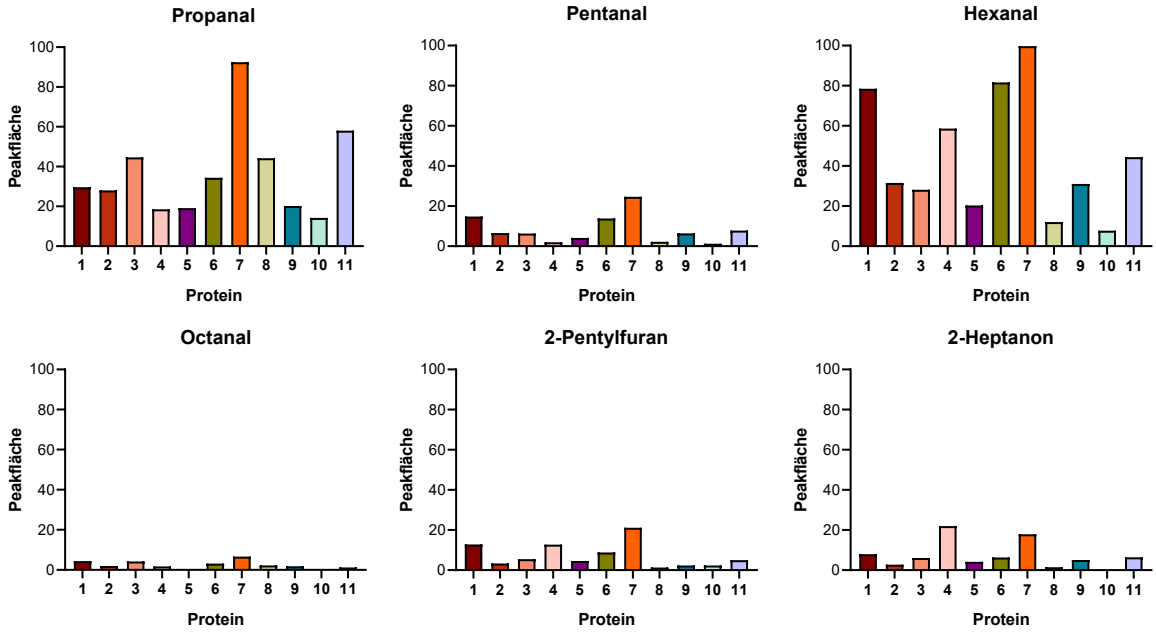

Abbildung 1: Peakfläche von aroma-aktiven Substanzen in ausgewählten Proteinkonzentraten und -isolaten.

AP 2.2 „Untersuchung der initialen Menge an pflanzlichen Sekundärmetaboliten mit antinutritiven Eigenschaften und Evaluierung von Vorbehandlungen zu deren Reduktion“

Durch ihre Fähigkeit mit Mineralstoffen, wie Eisen und Zink, Komplexe zu bilden und somit deren Bioverfügbarkeit zu beeinträchtigen, gilt Phytinsäure als antinutritive Substanz. Da es möglich ist, den Gehalt durch Fermentation oder Vorbehandlungen zu reduzieren, wurde Phytinsäure in den in AP 2.1 aufgeführten Proteinen, sowie in vorbehandelten Erbsensubstraten analysiert. Die Quantifizierung von Phytinsäure (Phytat) erfolgte photometrisch als freigesetzter Phosphor durch Phytase und alkalische Phosphatase (Phytic Acid Assay Kit von Megazyme). Die untersuchten Proteine enthalten durchschnittlich etwa 2 g/100 g Trockenmasse Phytinsäure. Erbsenprotein Nummer 6 weist den signifikant höchsten Gehalt auf (siehe Abbildung). Es konnte weder durch Fermentation noch durch Einweichen und Autoklavieren eine signifikante Verringerung des Phytinsäuregehaltes in wässrigen Erbsenproteinsuspensionen erreicht werden.

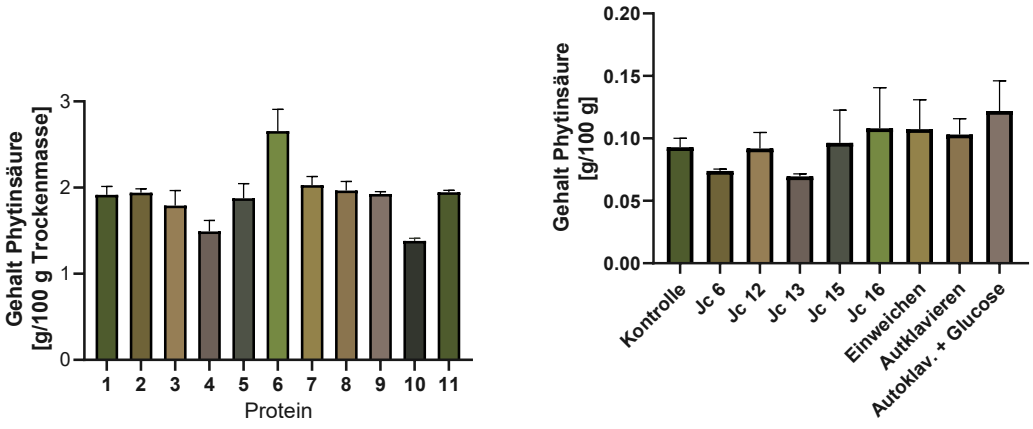

Abbildung 2: Gehalt an Phytinsäure in ausgewählten Erbsen- und Ackerbohnenprotein-konzentraten und -isolaten (links) und in wässrigen Erbsenproteinsuspensionen nach unterschiedlicher Behandlung (rechts). Jc: Fermentation mit unterschiedlichen Mikroorganismen.

AP 4 „Evaluierung der Eignung von Milchsäurebakterien aus der TU Berlin Stammsammlung für die Starter-Co-Kultur“

Die Stammkollektion der TU Berlin umfasste 15 Milchsäurebakterienstämme (LAB) mit Potenzial für die Fermentation von pflanzlichem Joghurt, drei weitere Stämme wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Um die Vielfalt der Stämme für das Screening zu erweitern, wurden LAB auch aus 11 fermentierten Produkten isoliert: bulgarische und kaspische Joghurtstarter, mesophile Joghurts (Filmjölk und Viili), Kefir, Parmesankäse, Natto, Rettich-Kimchi, Sauerkraut, Sauerteig und Kombucha. Zur Isolierung wurde jedes Produkt 1:10 in steriler 0,9 %iger Peptonlösung verdünnt, gemischt, um die Zellen zu suspendieren, und vor dem Ausplattieren weiter verdünnt (1:100 und 1:1000). Anaerobe Stämme wurden auf MRS-Agar (für Lactobacilli) oder M17-Agar (für Streptococci) kultiviert und anaerob inkubiert. Fakultativ anaerobe Bakterien wurden auf LB (für *Bacillus* subtilis) oder TSB mit Hefeextraktzusatz (für Lactococci und Leuconostoc) unter aeroben Bedingungen isoliert. Insgesamt wurden 29 weitere Stämme isoliert, sodass insgesamt 47 Stämme zur Verfügung standen. Eine vollständige Liste der Stämme und ihrer Quellen ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der untersuchten Bakterienstämme hinsichtlich ihrer für die Joghurtfermentation relevanten Eigenschaften. TUBGT CC bezieht sich auf die Kultursammlung des Fachbereichs Brau- und Getränketechnologie der Technischen Universität Berlin, während DSMZ für das Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen steht. Die übrigen mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Stämme wurden im Rahmen des PISUM-Projekts isoliert, und ihre Isolationsquellen sind entsprechend beschrieben.

TUBGT code	Spezies	Quelle
TUBGT-B-22031*	*Bacillus subtilis*	Natto
TUBGT-B-22006*	*Bacillus subtilis*	Probiotischer kombucha
TUBGT-B-22002	*LacticaseiBacillus casei*	TUBGT
TUBGT-B-22014	*LacticaseiBacillus paracasei*	TUBGT
TUBGT-B-22015	*LacticaseiBacillus paracasei*	TUBGT
TUBGT-B-22016	*LacticaseiBacillus paracasei*	TUBGT
TUBGT-B-22020*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Kefir
TUBGT-B-22021*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Kefir
TUBGT-B-24012*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Parmesankäse
TUBGT-B-24013*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Parmesankäse
TUBGT-B-24014*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Sauerteig
TUBGT-B-24017*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Parmesankäse
TUBGT-B-24018*	*LacticaseiBacillus paracasei*	Parmesankäse
TUBGT-B-22029*	*LacticaseiBacillus rhamnosus*	Sauerteig
TUBGT-B-24020*	*LacticaseiBacillus rhamnosus*	Sauerteig
TUBGT-B-22026*	*LactiplantiBacillus plantarum*	Sauerkraut
TUBGT-B-22032	*LactiplantiBacillus plantarum*	TUBGT
TUBGT-B-24015*	*LactiplantiBacillus plantarum*	Sauerteig
TUBGT-B-24019*	*LactiplantiBacillus plantarum*	Sauerteig
TUBGT-B-24010	*LactoBacillus acidophilus*	DSMZ
TUBGT-B-24009	*LactoBacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*	DSMZ
TUBGT-B-22028*	*LactoBacillus helveticus*	Bulgarischer Joghurtstarter
TUBGT-B-22030*	*LactoBacillus helveticus*	Viili
TUBGT-B-24011	*Lactococcus lactis subsp. diacetilactis*	DSMZ
TUBGT-B-22018*	*Lactococcus lactis subsp. Lactis*	Joghurtstarter aus dem Kaspischen Meer
TUBGT-B-22019*	*Lactococcus lactis subsp. Lactis*	Filmjölk

TUBGT-B-22008	*LentilactoBacillus buchneri*	TUBGT
TUBGT-B-22024*	*Leuconostoc mesenteroides*	Rettich-Kimchi
TUBGT-B-22025*	*Leuconostoc mesenteroides*	Rettich-Kimchi
TUBGT-B-22003	*LevilactoBacillus brevis*	TUBGT
TUBGT-B-22004	*LevilactoBacillus brevis*	TUBGT
TUBGT-B-22010	*LevilactoBacillus brevis*	TUBGT
TUBGT-B-22011	*LevilactoBacillus brevis*	TUBGT
TUBGT-B-22012	*LevilactoBacillus brevis*	TUBGT
TUBGT-B-24016*	*LevilactoBacillus brevis*	Sauerteig
TUBGT-B-22005	*LevilactoBacillus parabrevis*	TUBGT
TUBGT-B-24024*	*LiquorilactoBacillus ghanensis*	Kombucha
TUBGT-B-24021*	*LiquorilactoBacillus nagelii*	Kombucha
TUBGT-B-24022*	*LiquorilactoBacillus nagelii*	Kombucha
TUBGT-B-22001	*LoigolactoBacillus backii*	TUBGT
TUBGT-B-22007	*LoigolactoBacillus backii*	TUBGT
TUBGT-B-24023*	*Oenococcus oeni*	Kombucha
TUBGT-B-22009	*Pediococcus claussenii*	TUBGT
TUBGT-B-22017*	*Streptococcus thermophilus*	Bulgarischer Joghurtstarter
TUBGT-B-22022*	*Streptococcus thermophilus*	Kefir
TUBGT-B-22023*	*Streptococcus thermophilus*	Kefir
TUBGT-B-22027*	*Streptococcus thermophilus*	Viili

AP 4.1 „Analyse der Eignung von Mikroorganismen der TU Berlin Stammsammlung für die Ansäuerung eines erbsenbasierten Mediums“

Für das bakterielle Screening wurden Milchsäurebakterien und Hefen auf drei wesentliche Parameter untersucht: Temperaturtoleranz, Fähigkeit zur Ansäuerung des erbsenbasierten Mediums und zur Entfernung von Aldehyden.

Hohe Temperaturtoleranz: Hohe Temperaturtoleranz ist ein wichtiger Faktor bei der Joghurtherstellung, da die Fermentation in der Regel bei Temperaturen über 40 °C stattfindet. Daher wurde das Wachstum bei 40 °C als wesentliches Kriterium für die Stammauswahl angesehen. Um diese Eigenschaft zu bewerten, wurde das Wachstum jedes Stammes sowohl bei 30 °C (als Referenz) als auch bei 40 °C gemessen, indem die OD-Veränderungen in artspezifischen Flüssigmedien überwacht wurden. Die verschiedenen verwendeten Medien waren M17 für *Streptococcus*-Arten, TSB mit 1 % Hefeextrakt für *Lactococcus*- und *Leuconostoc*-Arten, LB für *Bacillus*-Arten und MRS für die übrigen getesteten Arten. Die für jeden Stamm bei 30 und 40 °C gemessene maximale OD ist in Abbildung 3 dargestellt.

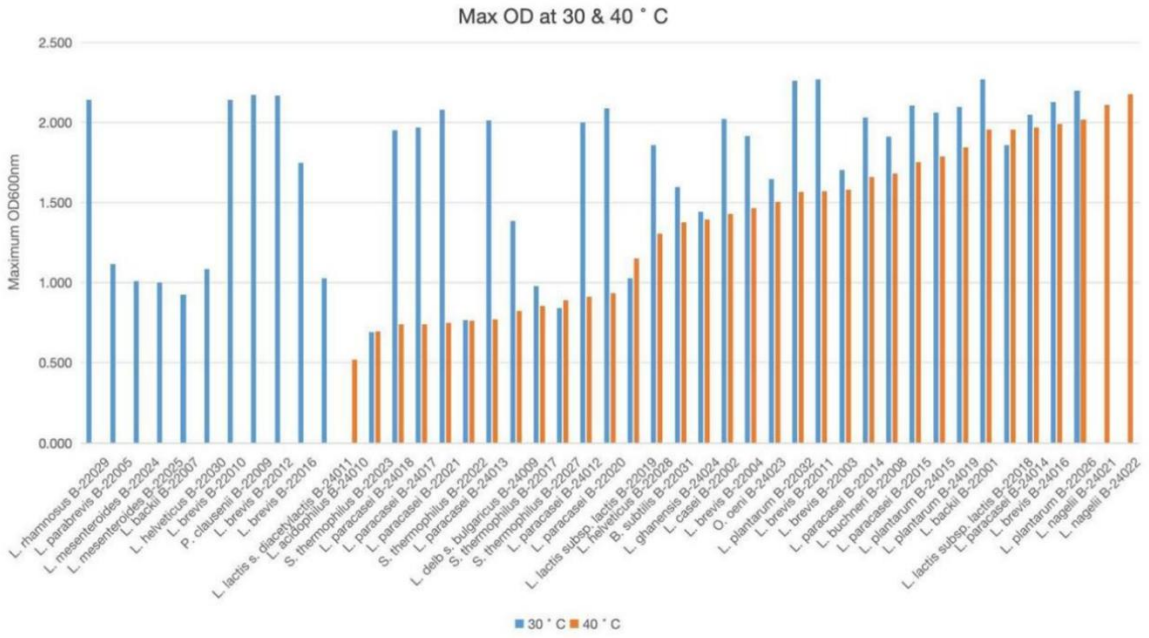

Abbildung 3: Messung der maximalen optischen Dichte (600 nm) von Bakterienstämmen, die bei 30 °C (blau) und 40 °C (orange) inkubiert wurden.

Von den getesteten Stämmen wuchsen 36 bei 40 °C, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Intensität. Die übrigen Stämme wuchsen bei dieser Temperatur nicht, was angesichts ihrer Herkunft aus mesophilen Produkten wie Villi und Sauerteig zu erwarten war. Wärmeempfindliche Stämme wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Ansäuerung eines Mediums auf Erbsenbasis: Ein relativer Vergleich der Fähigkeit der einzelnen Stämme, ein Medium auf Erbsenbasis zu versauern und folglich ein Gel zu bilden, wurde mit einer von Genet et al. (2023) adaptierten Methode bewertet. Es wurde ein Erbsenprotein-Basismedium in Kombination mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (keine, 1 und 2 % Saccharose, 1 % Glukose und 1 % Fruktose) verwendet. Das Medium wurde mit jedem Stamm beimpft und 16 Stunden lang bei 40 °C bebrütet. Die Säuerungsfähigkeit und -stärke wurde durch Umdrehen der Platte bewertet. Wenn keine Ansäuerung auftrat, sind die Vertiefungen nach dem Umdrehen leer; wenn sich das Gel nach dem Klopfen der Platte in die Vertiefung bewegt, wurde es als schwache Gelbildung eingestuft, und wenn es keine Verschiebung innerhalb der Vertiefung gibt, wurde das Gel als stark eingestuft. Ein relativer Vergleich der Versauerungskapazität der einzelnen Stämme ist in Abbildung 4 zusammengefasst.

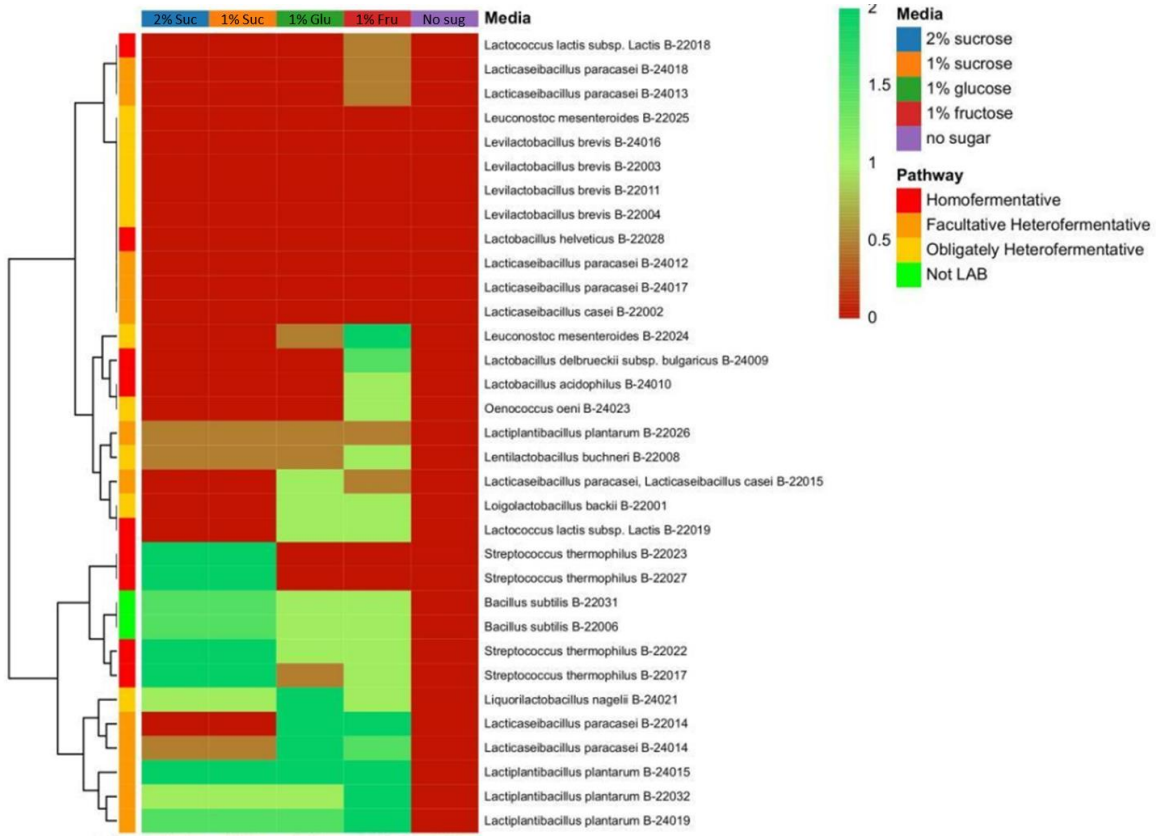

Abbildung 4: Heatmap zur Darstellung der Säuerungsleistung und der Gelbildungskapazität der verwendeten Stämme in verschiedenen Zuckerquellen.

Diese Heatmap zeigt die relative Versauerungskapazität verschiedener Bakterienstämme in verschiedenen Zuckermedien (2 % Saccharose, 1 % Saccharose, 1 % Glukose, 1 % Fruktose und kein Zucker). Die Ansäuerung wird durch einen Farbverlauf dargestellt, der von rot (keine Ansäuerung) bis grün (starke Ansäuerung) reicht. Insgesamt zeigten 24 der 34 getesteten Stämme einen gewissen Grad an Versauerung, wobei mehrere Stämme von *L. brevis*, *L. mesenteroides* und *O. oeni* unter den getesteten Bedingungen eine schwache oder keine Versauerung aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei den verschiedenen Stämmen von *L. plantarum* und insbesondere *S. thermophilus* eine stärkere Ansäuerung beobachtet, vor allem in glukose- und saccharosehaltigen Medien. Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde entschieden, dass mindestens ein *S. thermophilus*- oder ein *L. plantarum*-Stamm erforderlich ist, um eine Joghurtfermentation erfolgreich durchzuführen.

Fähigkeit zur Entfernung von Aldehyden: Aldehyde sind die Hauptkategorie von Verbindungen, die für das bohnige und grasige Aroma von Erbsen und damit auch von Erbsenprotein verantwortlich sind. Um einen Joghurt zu produzieren, der Milchjoghurt ähnelt, müssen diese Verbindungen entfernt werden. Die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Aldehyde aus dem Medium zu entfernen, wurde durch die Messung von Hexanal (dem wichtigsten Aldehyd im Erbsenprotein) mit Hilfe einer von Kozaeva et al. (2022) beschriebenen kolorimetrischen Methode getestet. Jeder Stamm wurde kurz in einem geeigneten Nährmedium, das 0,2 g/L Hexanal enthielt, bis zu 24 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Hexanalkonzentration wurde nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden Inkubation gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 1 zeigen den prozentualen Abbau von Hexanal nach 6 Stunden Inkubation, dem Zeitpunkt, an dem die Unterschiede zwischen den Stämmen am deutlichsten waren.

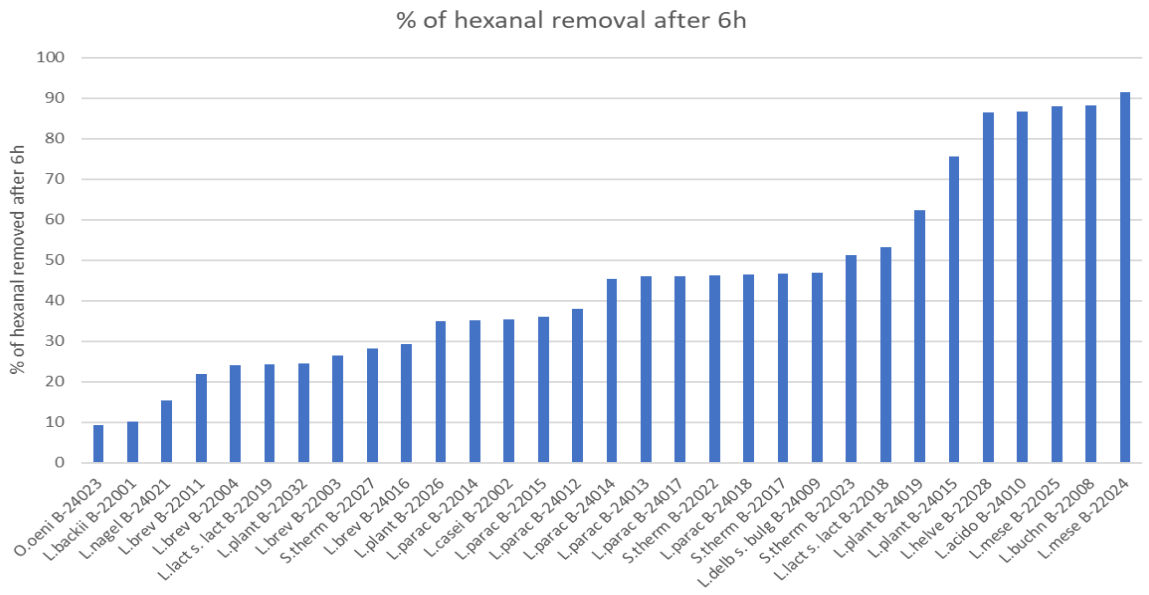

Abbildung 5: Prozentualer Anteil des von den einzelnen Stämmen nach 6 Stunden Inkubation entfernten Hexanals

Neun Stämme waren in der Lage, mehr als 50 % des Hexanals innerhalb von 6 Stunden nach der Bebrütung zu entfernen. Fünf dieser Stämme erreichten mehr als 80 %, was auf ein großes Potenzial zur Verringerung des bohnigen Geschmacks der Erbsenprotein-Joghurtbasis hinweist. Zu diesen Stämmen, die am besten abschnitten, gehörten *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. mesenteroides* und *L. buchneri*. Darüber hinaus zeigte ein *L. plantarum*-Stamm (B-24015) vielversprechende Ergebnisse, indem er über 75 % Hexanal entfernte und gleichzeitig eine starke Säuerungskapazität aufwies (Abbildung 5).

Der Hexanaltest wurde durch Messung der Hexanalkonzentration unter realen Fermentationsbedingungen validiert. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Stämme mit unterschiedlichen Leistungen ausgewählt (siehe AP 4.3)

Um die Auswahl der Stämme weiter einzugrenzen, wurden Fermentationen in kleinem Maßstab (50 ml) durchgeführt, um die Säuerungskapazität der Stämme *S. thermophilus* und *L. plantarum* in Kombination mit den wirksamsten Aldehyd-entfernenden Stämmen zu vergleichen. Unter diesen zeigte *S. thermophilus* – insbesondere der Stamm B-22017 – die konsistenteste Säuerungsleistung und produzierte Joghurts mit pH-Werten zwischen 4,41 und 4,47, unabhängig von der verwendeten Co-Kultur. Andere *S. thermophilus*-Stämme übersäuerten entweder (pH ≈ 4,3) oder erreichten den Zielbereich nicht (pH < 4,5). *L. plantarum*-Stämme erreichten nur in Kombination mit *L. acidophilus* einen pH-Wert < 4,5, mit Ausnahme der Stämme B-24015. Folglich wurden *S. thermophilus* B-22017 und *L. plantarum B-24015* als Säuerungsstämme ausgewählt.

Die Joghurts wurden auch auf Fehlaromen untersucht. Die mit *L. mesenteroides* und *L. buchneri* fermentierten Joghurts wiesen essigsaure und ranzige Noten auf, was wahrscheinlich auf ihren heterofermentativen Stoffwechsel zurückzuführen ist, bei dem Essigsäure und Ethanol entstehen. Diese Stämme wurden daher von weiteren Tests ausgeschlossen.

Hefe-Screening

Obwohl Hefe normalerweise nicht mit der Joghurtherstellung in Verbindung gebracht wird, besitzt sie mehrere Eigenschaften, die sie für die Verbesserung des Geschmacks von pflanzlichen Joghurts

sehr geeignet machen könnten. Pflanzliche Joghurts zeichnen sich oft durch einen anhaltenden Bohnengeschmack aus, der auf die verwendete Proteinquelle zurückzuführen ist. Während Milchsäurebakterien dazu beitragen können, diese Fehlaromen zu reduzieren, sind Hefen möglicherweise noch wirksamer, da sie dafür bekannt sind, Aldehyde zu entfernen, die für grasige und grüne Noten in Produkten wie Bier, Wein, Brot, Kakao und Kaffee verantwortlich sind. Neben der Entfernung von Aldehyden können Hefen auch den Geschmack verbessern, indem sie wünschenswerte Verbindungen wie Diacetyl und Ester produzieren. Um dieses Potenzial zu untersuchen, haben wir 89 Hefestämme untersucht, um diejenigen zu identifizieren, die sich am besten für die Verwendung in Kombination mit Milchsäurebakterien eignen. Diese Liste umfasst 4 Stämme, die aus fermentierten Produkten isoliert wurden, wie in AP 1.2 beschrieben. Eine Liste aller für das Screening ausgewählten Hefestämme ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der Hefestämme, die auf ihre Eigenschaften bei der Joghurtgärung untersucht wurden. TUBGT CC bezieht sich auf die Kultursammlung des Fachbereichs Brau- und Getränketechnologie der Technischen Universität Berlin, während DSMZ für das Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen steht. Die übrigen mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Stämme wurden im Rahmen des PISUM-Projekts isoliert, und ihre Isolationsquellen sind entsprechend beschrieben.

TUBGT code	**Spezies**	**Quella**
TUBGT-Y-24037	*Brettanomyces anomalus*	TUM
TUBGT-Y-24038	*Brettanomyces bruxellensis*	TUM
TUBGT-Y-24039	*Brettanomyces bruxellensis*	TUM
TUBGT-Y-24040	*Brettanomyces bruxellensis*	TUM
TUBGT-Y-23121	*Brettanomyces naardenensis*	TUBGT
TUBGT-Y-22003	*Candida intermedia*	DSMZ
TUBGT-Y-23041	*Cyberlindnera misumaiensis*	TUBGT
TUBGT-Y-24042	Cyberlindnera saturnus	TUM
TUBGT-Y-23064	*Debaryomyces hansenii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23136	*Dekkera bruxellensis*	TUBGT
TUBGT-Y-24057*	*Geotrichum candidium*	Camembert-Käse
TUBGT-Y-22002	*Hanseniaspora guilliermondii*	DSMZ
TUBGT-Y-22017	*Hanseniaspora uvarum*	DSMZ
TUBGT-Y-23036	*Hanseniaspora uvarum*	Apple juice, Luxembourg
TUBGT-Y-23037	*Hanseniaspora uvarum*	Apple juice, Luxembourg
TUBGT-Y-23038	*Hanseniaspora uvarum*	Apple juice, Luxembourg
TUBGT-Y-23068	*Kazachstania servazzii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23068	*Kazachstania servazzii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23093	*Kluyveromyces lactis*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23079	*Kluyveromyces lactis*	Comercial
TUBGT-Y-23170*	*Kluyveromyces lactis*	Camembert-Käse
TUBGT-Y-24055*	*Kluyveromyces lactis*	Camembert-Käse
TUBGT-Y-23001	*Kluyveromyces marxianus*	TUM
TUBGT-Y-23118	*Kluyveromyces marxianus*	TUM
TUBGT-Y-22068	*Lachancea spp. (Lallemand)*	Kommerziell
TUBGT-Y-23090	*Lachancea thermotolerans*	Boden
TUBGT-Y-23108	*Meyerozyma caribbica*	Ecuador
TUBGT-Y-23154	*Meyerozyma caribbica*	Ecuador
TUBGT-Y-23107	*Naganishia diffluens*	Ecuador
TUBGT-Y-23122	*Pachysolen tannophilus*	TUBGT
TUBGT-Y-24044	*Pichia fermentans*	TUM
TUBGT-Y-23140	*Pichia kluyveri*	Ecuador
TUBGT-Y-23141	*Pichia kluyveri*	Ecuador
TUBGT-Y-23143	*Pichia kudravzevii*	Ecuador
TUBGT-Y-23144	*Pichia kudravzevii*	Ecuador
TUBGT-Y-23145	*Pichia kudravzevii*	Ecuador
TUBGT-Y-23146	*Pichia kudravzevii*	Ecuador
TUBGT-Y-23104	*Pichia kudriavzevii*	Ecuador
TUBGT-Y-23086	*Pichia Manshurica*	Boden, Tiergarten

TUBGT-Y-22016	*Pichia membranifaciens*	DSMZ
TUBGT-Y-22016	*Pichia membranifaciens*	TUM/DSM
TUBGT-Y-23139	*Pichia membranifaciens*	TUBGT
TUBGT-Y-23117	*Pichia Stipitis*	TUBGT
TUBGT-Y-22061	*Saccharomyces arboricola (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-22062	*Saccharomyces cariocanus (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-23006	*Saccharomyces cerevisiae*	TUM
TUBGT-Y-22055	*Saccharomyces cerevisiae* (Cerberus)	TUBGT
TUBGT-Y-22057	*Saccharomyces cerevisiae* (Ebbegarden Kveik I)	TUBGT
TUBGT-Y-22058	*Saccharomyces cerevisiae* (Farmland saison)	TUBGT
TUBGT-Y-23017	*Saccharomyces cerevisiae* (Farmstead saison)	TUBGT
TUBGT-Y-22044	*Saccharomyces cerevisiae* (Granvin)	TUBGT
TUBGT-Y-22043	*Saccharomyces cerevisiae* (Hornindal I)	TUBGT
TUBGT-Y-22056	*Saccharomyces cerevisiae* (Hornindal II)	TUBGT
TUBGT-Y-22053	*Saccharomyces cerevisiae* (Hydra)	TUBGT
TUBGT-Y-22045	*Saccharomyces cerevisiae* (Leardal)	TUBGT
TUBGT-Y-22048	*Saccharomyces cerevisiae* (Ontario farmhouse)	TUBGT
TUBGT-Y-22059	*Saccharomyces cerevisiae* (Uber weizen)	TUBGT
TUBGT-Y-22047	*Saccharomyces cerevisiae* (Voss)	TUBGT
TUBGT-Y-22060	*Saccharomyces cerevisiae* (Weizen II)	TUBGT
TUBGT-Y-22049	*Saccharomyces cerevisiae* (Wild thing)	TUBGT
TUBGT-Y-22078	*Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus*	TUM
TUBGT-Y-23015	*Saccharomyces cerevisiae var. chevalieri*	Fermentis
TUBGT-Y-22032	*Saccharomyces eubayanus (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-22063	*Saccharomyces jurei (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-22064	*Saccharomyces kudriavzevii (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-22065	*Saccharomyces mikatae (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-23046	*Saccharomyces paradoxus*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-22066	*Saccharomyces uvarum (T)*	TUBGT
TUBGT-Y-22067	*Saccharomycodes ludwigii*	TUM
TUBGT-Y-23075	*Saccharomycodes ludwigii*	Kombucha
TUBGT-Y-23076	*Saccharomycodes ludwigii*	Kombucha
TUBGT-Y-24041	*Schizosaccharomyces pombe*	TUM
TUBGT-Y-23147	*Starmerella bacillaris*	Ecuador
TUBGT-Y-23011	*Torulaspora delbrueckii*	Masato
TUBGT-Y-23042	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23043	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23044	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23045	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23065	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23066	*Torulaspora delbrueckii*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-22019	*Wickerhamomyces anomalus*	VLB
TUBGT-Y-23047	*Wickerhamomyces anomalus*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23067	*Wickerhamomyces anomalus*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23094	*Wickerhamomyces anomalus*	Boden, Tiergarten
TUBGT-Y-23100	*Wickerhamomyces anomalus*	TUBGT
TUBGT-Y-23105	*Wickerhamomyces anomalus*	Ecuador
TUBGT-Y-23109	*Wickerhamomyces anomalus*	Ecuador
TUBGT-Y-24056*	*Yarrowia lipolytica*	Camembert-Käse
TUBGT-Y-23132	*Zygosaccharomyces bailii*	TUBGT

Temperaturtoleranz: Die Temperaturtoleranz von Hefestämmen ist ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von Fermentationsprozessen, die auch Bakterien einschließen, da die optimale Wachstumstemperatur für die Joghurtproduktion nicht immer mit der Aktivität der Hefe übereinstimmt. Diese Diskrepanz ist jedoch nicht unbedingt einschränkend, da verschiedene Strategien eingesetzt werden können, um sicherzustellen, dass beide Mikroorganismengruppen ausreichend aktiv bleiben – auch wenn nicht gleichzeitig. Unterschiedliche Temperaturpräferenzen können sogar vorteilhaft sein, da sie beispielsweise eine gezielte Kontrolle der Hefeaktivität zur Minimierung unerwünschter Alkoholbildung ermöglichen. Zur Bewertung der Hitzetoleranz wurde ein Tropfentest durchgeführt: 5 µL Hefekulturen, normalisiert auf eine OD_{600}, wurden auf Petrischalen aufgetragen und bei 30 °C, 37 °C, 40 °C und 43 °C inkubiert. Das Wachstum wurde bewertet, indem die Koloniegröße bei jeder Temperatur mit der Kontrolle bei 30 °C verglichen

wurde, wobei natürliche Unterschiede in Form, Farbe und Größe der Kolonien zwischen den Stämmen berücksichtigt wurden (Abbildung 6).

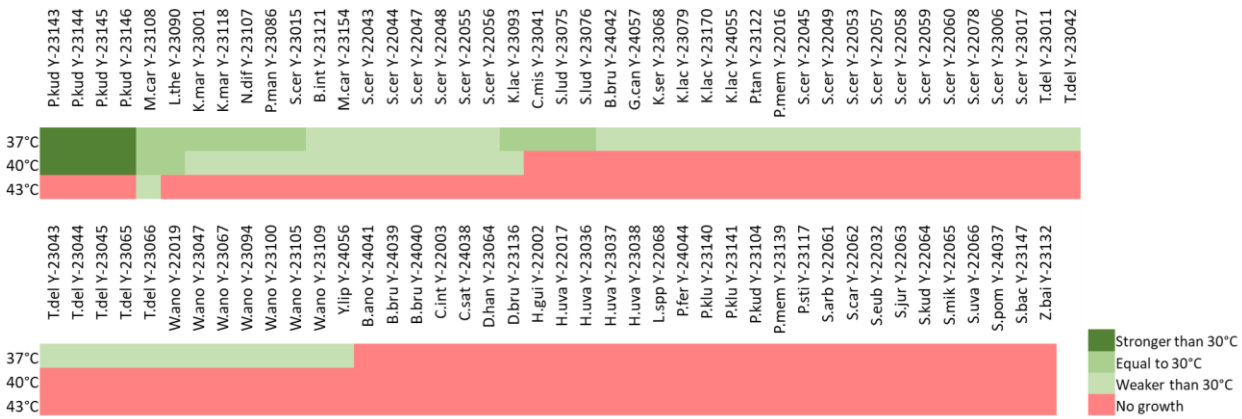

Abbildung 6: Zusammenfassung des beobachteten Wachstums auf der Platte für jeden Hefestamm im Vergleich zum Wachstum bei 30 °C (A). Beispiel einer Tropfentestplatte mit unterschiedlichen Wachstumsraten je nach Stamm (B).

Hohe Temperaturen schränkten das Hefewachstum erheblich ein. Selbst bei 37 °C wurde das Wachstum bei 29 Stämmen vollständig unterdrückt. Bei 40 °C konnten 18 Stämme ein gewisses Wachstum beibehalten, wenn auch häufig in geringerem Maße als bei 30 °C. Bemerkenswert ist, dass vier Stämme von *Pichia kudriavzevii* bei 40 °C ein verstärktes Wachstum aufwiesen, das ihr Wachstum bei der Kontrolltemperatur übertraf. Das Wachstum bei 43 °C war extrem eingeschränkt, wobei nur ein einziger Stamm - ein ecuadorianisches Isolat von *M. caribbica* - in der Lage war, unter diesen extremen Bedingungen zu wachsen. Das Verständnis der Hefetoleranz ermöglicht die Bestimmung optimaler Fermentationsbedingungen.

Fähigkeit zur Entfernung von Aldehyden: Aldehyde sind die Hauptkategorie von Verbindungen, die für das bohnige und grasige Aroma von Erbsen und damit auch von Erbsenprotein verantwortlich sind. Um einen Joghurt zu produzieren, der Milchjoghurt ähnelt, müssen diese Verbindungen entfernt werden. Die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Aldehyde aus dem Medium zu entfernen, wurde anhand von Hexanal (dem wichtigsten Aldehyd in Erbsenprotein) mit Hilfe einer kolorimetrischen Methode getestet, die von Kozaeva et al. (2022) beschrieben wurde. Jeder Stamm wurde kurz in einem geeigneten Nährmedium, das 0,2 g/L Hexanal enthielt, bis zu 24 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Hexanalkonzentration wurde nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden Inkubation gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 7 zeigen den prozentualen Abbau von Hexanal nach 6 Stunden Inkubation, dem Zeitpunkt, an dem die Unterschiede zwischen den Stämmen am deutlichsten waren.

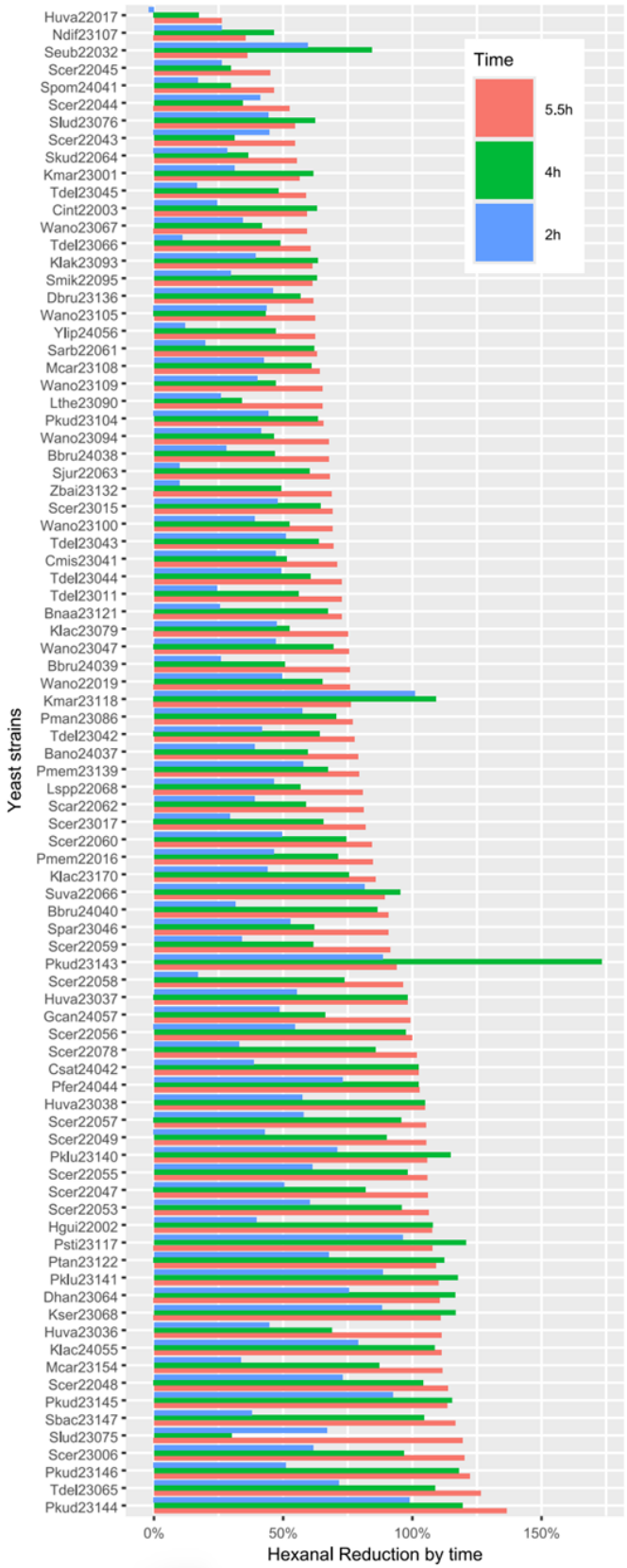

Abbildung 7: Prozentualer Anteil des von den einzelnen Hefestämmen zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 5,5 Stunden entfernten Hexanals. Die Stämme wurden in YPD, das 0,2 g/L Hexanal enthielt, bei 30 °C inkubiert.

Die Hefestämme zeigten eine starke Hexanal-Entfernungsfähigkeit. 94 % der Stämme entfernten innerhalb von 5,5 Stunden Inkubation mehr als die Hälfte, 40 % mehr als 80 % und 36 % mehr als 90 % des verfügbaren Hexanals. Im Gegensatz dazu entfernten nur 29 % der Bakterienstämme nach 6 Stunden Inkubation mehr als 50 %, 16 % mehr als 80 % und nur 3 % mehr als 90 %. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von Hefestämmen als wirksame Mittel zur Reduzierung von Fehlaromen bei der Fermentation von pflanzlichem Joghurt.

Basierend auf ihrer Leistung wurden die 18 vielversprechendsten Hefestämme für Gärungsversuche im kleinen Maßstab ausgewählt, um das Risiko der Alkoholproduktion zu bewerten. Darunter befanden sich 12 hochtemperaturempfindliche und 6 hochtemperaturtolerante Stämme.

Risiko der Alkoholproduktion: Da die meisten Hefen unter sauerstoffarmen Bedingungen Alkohol produzieren können, war es wichtig zu prüfen, ob die ausgewählten Stämme den Joghurt alkoholisch machen könnten. Um dies zu testen, wurden kleine Joghurtfermentationen (100 ml) mit den Hefestämmen zusammen mit den Referenzmilchsäurebakterien *S. thermophilus* B-22017 und *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-24009 zur Säuerung durchgeführt. Es wurden zwei Fermentationsmethoden verwendet: (1) ein zweistufiger Prozess für mesophile Hefen (6 Stunden bei 30 °C, gefolgt von 16 Stunden bei 40 °C) und (2) eine einzige 16-stündige Co-Fermentation bei 40 °C für thermophile Hefen. Die resultierenden Joghurts wurden auf ihren pH-Wert und Alkoholgehalt untersucht. Die pH-Werte lagen zwischen 4,17 und 4,44, was darauf hindeutet, dass die Zugabe von Hefe die Säuerung durch die Milchsäurebakterien nicht beeinträchtigte. Die endgültigen Alkoholgehalte sind in Abbildung 8 dargestellt.

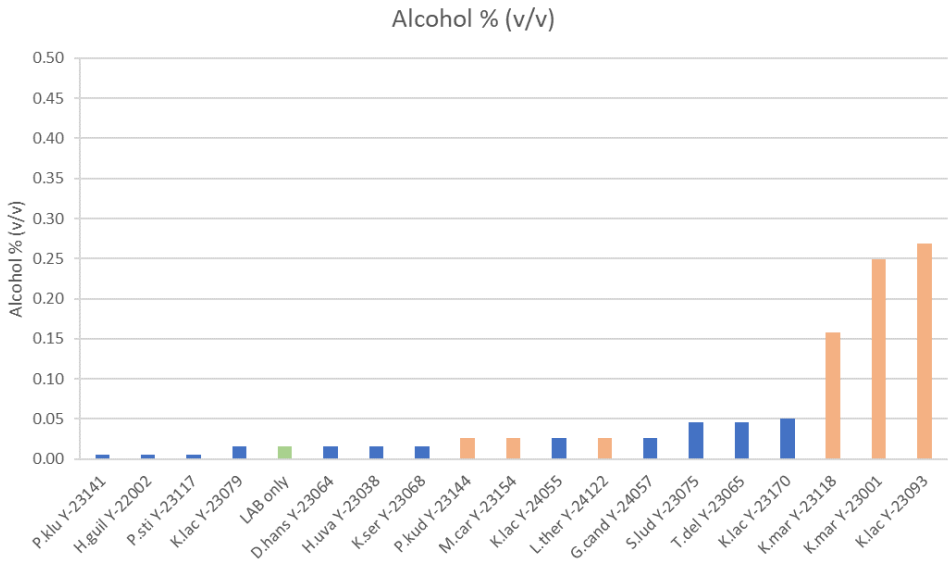

Abbildung 8: Alkoholgehalt am Ende der Joghurtfermentation mit mesophilen (blau) und thermophilen Hefen (orange) und einer Referenz ohne Hefe (grün).

Die ausgewählten Stämme zeigten keine hohe Alkoholproduktion, nur drei Stämme produzierten mehr als 0,05 % (v/v), wobei der Höchstwert bei 0,27 % lag. Bemerkenswert ist, dass nur thermophile Stämme mehr als 0,05 % (v/v) produzierten, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass sie aufgrund ihrer Toleranz gegenüber 40 °C während der gesamten 16-stündigen Fermentation metabolisch aktiv bleiben. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden vier Stämme

mit guter Hexanal-Entfernungskapazität und Restalkoholgehalten von null bis gering (vergleichbar mit der Referenz ohne Hefe) für weitere Versuche ausgewählt. Dazu gehörten zwei mesophile Stämme, *K. servazzi* Y-23068 und *P. stipitis* Y-23117, sowie zwei thermophile Stämme, *P. kudriavzevii* Y-23144 und *M. caribbica* Y-23154, um besser zu verstehen, wie sich die Fermentationsbedingungen auf die sensorischen Eigenschaften des Joghurts auswirken.

AP 4.2 „Durchführung von Probefermentationen mit ausgewählten Stämmen aus der TU Berlin Stammsammlung und sensorische Evaluierung der fermentierten Proben“

Auf Grundlage der Ergebnisse der Screening-Experimente wurden 6 Bakterien- und 4 Hefestämme für Fermentationen im größeren Maßstab ausgewählt.

Joghurtfermentation mit ausgewählten Milchsäurebakterien

Ausgewählte Bakterienstämme wurden unter Fermentationsbedingungen getestet, die stets sowohl einen säuernden Stamm als auch einen Hexanal entfernenden Stamm umfassten, wie in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt. Die Fermentationen wurden in zwei Runden durchgeführt, um die Anzahl der Proben für die sensorische Bewertung überschaubar zu halten.

Tabelle 5: In der ersten Fermentationsrunde getestete Stammkombinationen und jeweiliger pH-Wert am Ende der Fermentation.

Stamm 1	Stamm 2	pH
S. thermophilus B-22017	*L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* B-24009	4.53
S. thermophilus B-22017	*L. buchneri* B-22008	4.57
S. thermophilus B-22017	*L. acidophilus* B-24010	4.47
L. plantarum B-24015	*L. buchneri* B-22008	4.89
L. plantarum B-24015	*L. acidophilus* B-24010	4.55

Der pH-Wert der meisten Proben lag nahe am Zielwert von 4,5, mit Ausnahme der Kombination aus *L. plantarum* und *L. buchneri*. *S. thermophilus* zeigte eine stärkere Säuerungskapazität als *L. plantarum*.

Die Proben wurden anschließend von einem Sensorikpanel hinsichtlich wichtiger sensorischer Eigenschaften bewertet (Abbildung 9). Die mit *L. acidophilus* fermentierten Proben wurden als stärker bohnen- und essigartig bewertet, insbesondere in Kombination mit *L. buchneri*, welcher auch mit *S. thermophilus* schlecht abschnitt. Im Gegensatz dazu ergab die Kombination von *S. thermophilus* und *L. acidophilus* die Joghurtalternative mit dem ausgewogensten Aromaprofil, das sich durch schwächere Bohnen- und Grasnoten, stärkere Butternoten und einen insgesamt milderen Geschmack auszeichnete – abgesehen von einer höheren Säure, die mit dem niedrigeren pH-Wert übereinstimmt.

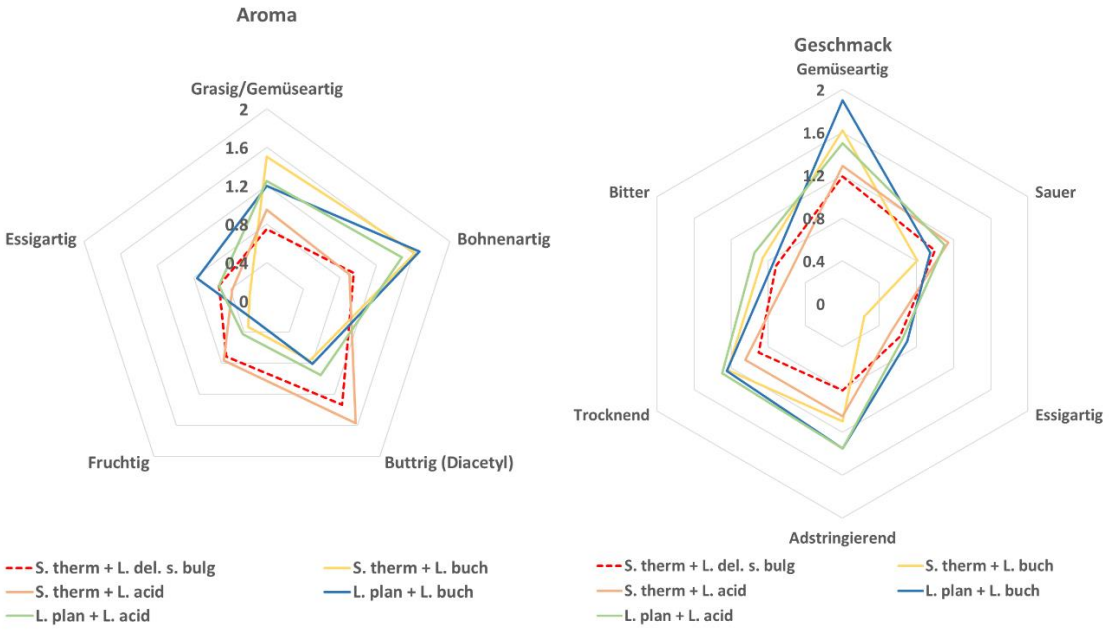

Abbildung 9: Spider-Plot-Vergleich der Intensität jedes sensorischen Attributs aus dem ersten Versuch.

Für den zweiten Fermentationsversuch wurden die Kombination mit der besten Leistung und die Referenz zum Vergleich wiederholt, zusammen mit drei neuen Stammkombinationen, darunter eine Kombination beider säuernder Stämme, da *L. plantarum* ebenfalls eine wirksame Hexanal-Entfernung zeigte. Die Stammkombinationen und die entsprechenden pH-Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Der pH-Wert der meisten Proben lag unter dem Zielwert von 4,5, mit Ausnahme der Kombination aus *L. plantarum* und *L. helveticus*, die eine minimale Säuerung aufwies und daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde.

Tabelle 6: In der zweiten Fermentationsrunde getestete Stammkombinationen und jeweiliger pH-Wert am Ende der Fermentation.

Stamm 1	Stamm 2	pH
S. thermophilus B-22017	*L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* B-24009	4.39
S. thermophilus B-22017	*L. acidophilus* B-24010	4.28
S. thermophilus B-22017	*L. helveticus* B-22028	4.39
S. thermophilus B-22017	*L. plantarum* B-24015	4.38
L. plantarum B-24015	*L. helveticus* B-22028	7.07

Die Ergebnisse der sensorischen Bewertung sind in Abbildung 10 dargestellt. Im zweiten Versuch übertrafen die neuen Stammkombinationen die beste Mischung aus dem ersten Versuch. Sowohl *S. thermophilus* mit *L. helveticus* als auch *S. thermophilus* mit *L. plantarum* zeigten eine starke Verringerung von Fehlaromen wie Bohnen- und Grasnoten, während sie die buttrigen Eigenschaften verstärkten. Diese Proben wiesen auch eine mildere Bitterkeit, Essignoten und eine insgesamt geringere Säure auf. Die Kombination aus *S. thermophilus* und *L. helveticus* wurde vom Panel besonders bevorzugt. Die chemischen Profile aller Proben sind in Abschnitt 4.3 dargestellt.

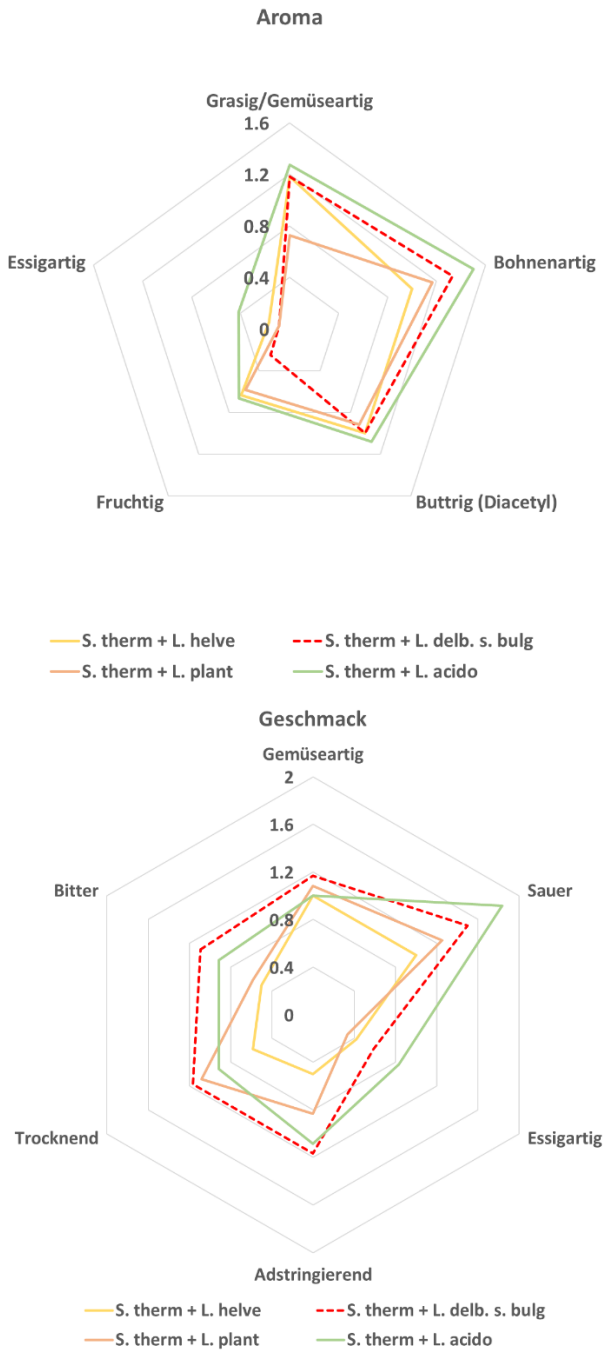

Abbildung 10: Spider-Plot-Vergleich der Intensität jedes sensorischen Attributs aus dem zweiten Versuch.

<u>Joghurtfermentation mit ausgewählten Hefen und Milchsäurebakterien</u>

Parallel dazu wurde ein Experiment durchgeführt, um den Einfluss von Hefe auf die sensorischen Eigenschaften von pflanzlichem Joghurt zu untersuchen. Da Hefen keine Milchsäure produzieren und daher kein Gel bilden können, wurden bei allen Fermentationen Milchsäurebakterien hinzugefügt. Die Referenzstämme *S. thermophilus* B-22017 und *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-24009 wurden durchgehend verwendet, wobei nur der Hefestamm variierte. Die mesophilen Hefen *K. servazzi* Y-23068 und *P. stipitis* Y-23117 wurden in einer zweistufigen Fermentation (6 Stunden bei 30 °C, gefolgt von 16 Stunden bei 40 °C) getestet, während die thermophilen Hefen *P. kudriavzevii* Y -23144 und *M.*

caribbica Y-23154 wurden zusammen mit den Milchsäurebakterien 16 Stunden lang bei 40 °C fermentiert. Die endgültigen pH-Werte waren bei allen Proben konsistent und lagen zwischen 4,3 und 4,42 (Tabelle 7).

Tabelle 7: Untersuchte Stammkombinationen aus Hefen und Milchsäurebaktieren und Hefen und jeweiliger pH-Wert zum Fermentationsende.

Hefestamm	Milchsäurebakterien	Fermentations-bedingungen	pH
-	*S. therm.* B-22017 + *L. delb. s. bulg.* B-24009	16 h 40 °C	4,30
P. stipitis Y-23117	*S. therm.* B-22017 + *L. delb. s. bulg.* B-24009	6 h 30 °C → 16 h 40 °C	4,42
K. servazzii Y-23068	*S. therm.* B-22017 + *L. delb. s. bulg.* B-24009	6 h 30 °C → 16 h 40 °C	4,35
M. caribbica Y-23154	*S. therm.* B-22017 + *L. delb. s. bulg.* B-24009	16 h 40 °C	4,39
P. kudriavzevii Y-23144	*S. therm.* B-22017 + *L. delb. s. bulg.* B-24009	16 h 40 °C	4,42

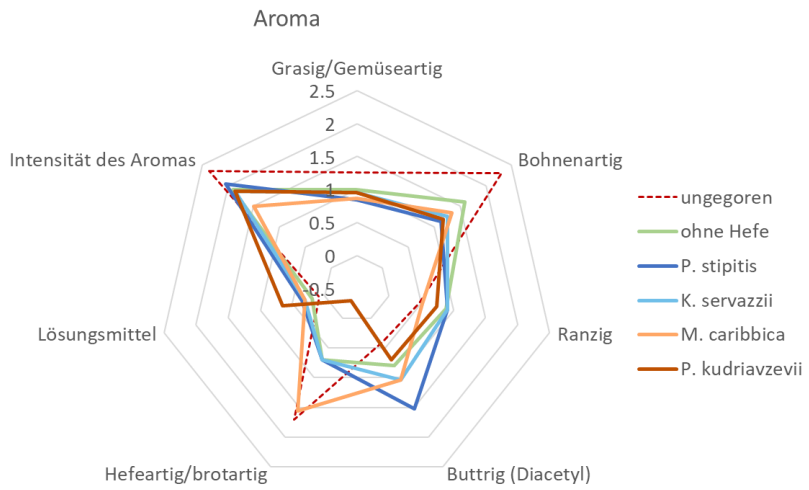

Abbildung 11: Spider-Plot zur Beschreibung der Aroma-Eigenschaften von pflanzlichen Joghurts, die mit Hefe und Milchsäurebakterien fermentiert wurden. Es werden nur die Hefestämme genannt, da die Bakterienstämme in allen fermentierten Proben gleich sind.

Die Ergebnisse der sensorischen Bewertung sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Zugabe von Hefe verbesserte das sensorische Profil, indem sie die bohnigen und grasigen Aromen reduzierte, da alle hefehaltigen Proben besser abschnitten als diejenigen, die nur mit Milchsäurebakterien (LAB) fermentiert wurden. Die meisten Hefestämme wiesen auch höhere Diacetylwerte auf. Obwohl die Alkoholproduktion vernachlässigbar war (<0,01 % v/v), führte die Zugabe von Hefe zu Hefe-, Brot- und Fermentationsnoten – besonders deutlich bei *M. caribbica*, wahrscheinlich aufgrund ihrer Thermotoleranz und ihrer anhaltenden Aktivität während der Inkubation. Dieser Effekt wurde bei *P. kudriavzevii* nicht beobachtet, obwohl ihre stärkeren lösungsmittelartigen Noten möglicherweise

andere Aromen überdeckt haben. Insgesamt schien die Verwendung mesophiler Hefestämme am besten geeignet zu sein, da sie die sensorischen Vorteile von Hefe bieten und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen kontrollieren können.

AP 4.3 „Analyse der Biosynthese von erwünschten Metaboliten und aromaaktiven Substanzen“

Validierung des Hexanaltests

Da der Hexanal-Entfernungs-Assay auf der Grundlage einer von Kozaeva et al. (2022) beschriebenen Methodik modifiziert wurde, war es wichtig, den Assay zu validieren, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Daher wurde eine Auswahl von Stämmen, die sowohl eine starke als auch eine schwache Fähigkeit zur Hexanalentfernung aufwiesen, zur Beimpfung einer Erbsenproteinjoghurtbasis mit 2 % Saccharose verwendet. Die Fermentationen wurden bei 40°C gehalten, und der pH-Wert wurde in den ersten 6 Stunden stündlich und dann erneut nach 24 Stunden überwacht. Für die GC-Analyse des Aldehydgehalts wurden nach 6 und 24 Stunden Proben entnommen. Die ausgewählten Stämme waren *L. buchneri* B-22008 und *B. subtilis* B-22031 als starke, *S. thermophilus* B-22017 als mäßiger und *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B-24009 und *O. oeni* B-24023 als schwache Hexanalentferner. Die Quantifizierung von Hexanal unter Fermentationsbedingungen bestätigte die zuvor im Hexanal-Entfernungstest beobachteten Ergebnisse. *B. subtilis* B-22031 und *L. buchneri* B-22008 verringerten den Hexanal-Gehalt in der Joghurtbasis am deutlichsten. *S. thermophilus* B-22017 zeigte zwar anfänglich eine gute Hexanal-Entfernung nach 6 Stunden, doch stieg der Hexanal-Gehalt nach 24 Stunden an, was darauf hindeutet, dass dieser Stamm über längere Fermentationszeiten Hexanal produzieren kann; daher wird eine sorgfältige Kontrolle der Fermentationsdauer bei Verwendung dieses Stammes empfohlen. Bei den anderen Aldehyden zeigte *S. thermophilus* B-22017 die höchste Entfernungskapazität, während die anderen Stämme keine signifikanten Veränderungen aufwiesen. Dieser erhöhte Abbau kann teilweise auf die höhere Stoffwechselaktivität von *S. thermophilus* B-22017 zurückgeführt werden, wie der niedrigere End-pH-Wert zeigt. Dieses Experiment bestätigte erfolgreich die Ergebnisse des Hexanal-Entfernungsexperiments und ermöglichte eine sichere Auswahl der Stämme auf der Grundlage dieser Ergebnisse.

Joghurtfermentation mit ausgewählten Milchsäurebakterien

Es erfolgte eine chemische Analyse der in den sensorischen Tests verwendeten Proben (Abbildung 9) durchgeführt. Dazu wurde die Konzentration an Milchsäure nach Derivatisierung mittels GC-FID quantifiziert und flüchtige Verbindungen wurden mittels HS-GC-MS bestimmt. Die wichtigsten aromaaktiven Verbindungen, die mit den bewerteten sensorischen Eigenschaften in Zusammenhang stehen, sind in den Abbildungen 12–14 dargestellt.

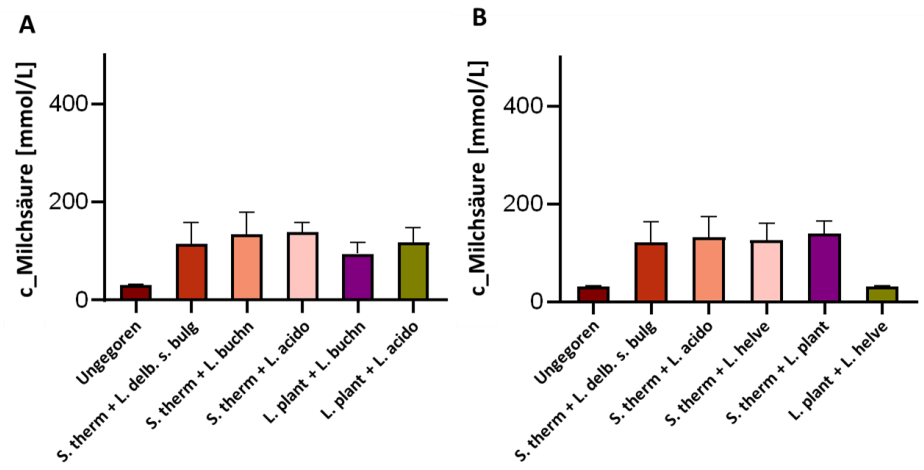

Abbildung 12: Konzentration an Milchsäure der ersten (A) und zweiten (B) Fermentationsrunde ausgewählter Milchsäurebakterien.

Insgesamt ist die Milchsäurekonzentration in allen Proben ähnlich, mit Ausnahme der Mischung aus *L. plantarum* + *L. buchneri* in der ersten Runde, die weniger Milchsäure produzierte, was mit ihrem höheren pH-Wert übereinstimmt. Im zweiten Versuch zeigte die Kombination aus *L. plantarum* + *L. helveticus* keine Säuerung, was durch das Ausbleiben eines Anstiegs der Milchsäure im Vergleich zur nicht fermentierten Kontrolle bestätigt wurde.

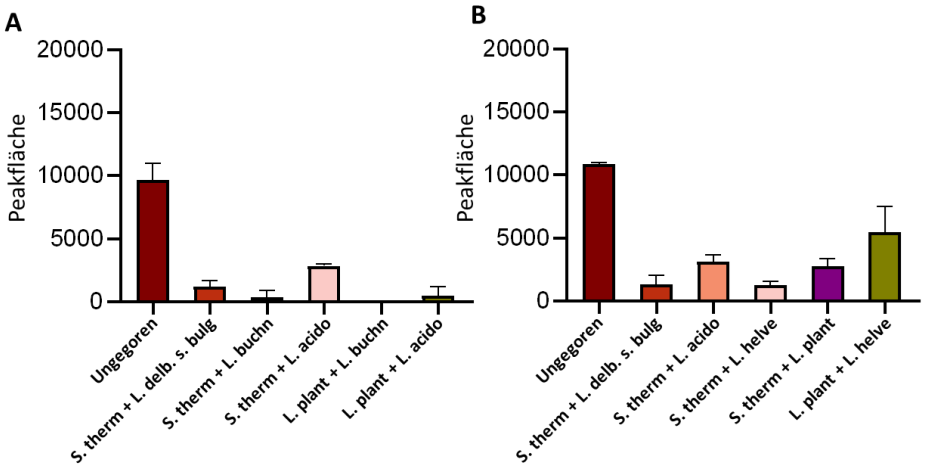

Abbildung 13: Hexanalgehalt der ersten (A) und zweiten (B) Fermentationsrunde ausgewählter Milchsäurebakterien.

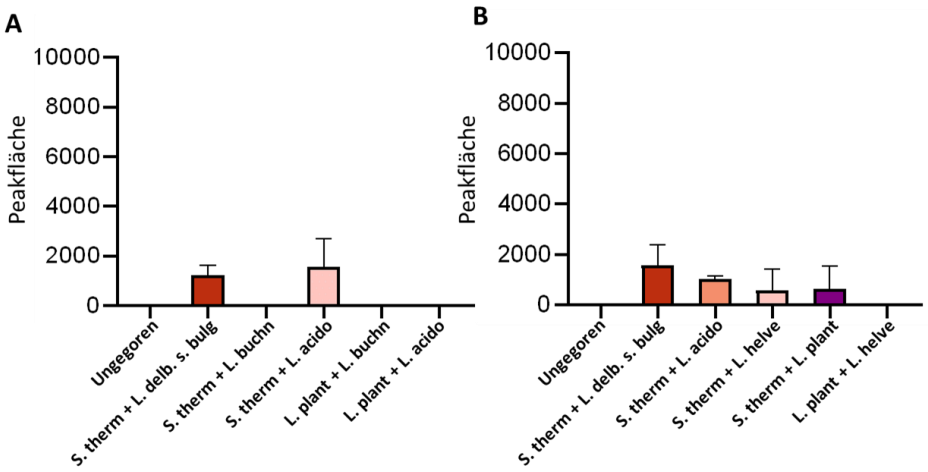

Abbildung 14: Diacetylgehalt der ersten (A) und zweiten (B) Fermentationsrunde ausgewählter Milchsäurebakterien.

Die Analyse zeigt, dass alle Stammkombinationen den Hexanalgehalt wirksam reduzierten (Abbildung 13). Interessanterweise wies die Mischung aus *S. thermophilus* + *L. acidophilus* im ersten Versuch den höchsten verbleibenden Hexanalgehalt auf, obwohl sie das schwächste Bohnenaroma aufwies. Dies könnte auf erhöhte Diacetylwerte (Abbildung 14) und entsprechende Butternoten (Abbildung 9) zurückzuführen sein, die den bohnenartigen/grasigen Charakter überdeckten. Im zweiten Versuch behielt diese Mischung eine ähnliche Hexanalreduktion bei, produzierte jedoch weniger Diacetyl, wodurch das Bohnenaroma möglicherweise zum Vorschein kam. Die Kombination aus *S. thermophilus* und *L. helveticus* wies einen der niedrigsten Hexanal- und Diacetylgehalte auf, was zu einem milderen Aroma führte, das wahrscheinlich zu ihrer höheren sensorischen Präferenz beitrug.

Joghurtfermentation mit ausgewählten Hefen und Milchsäurebakterien

Ebenso wurden die Analysen für die Joghurtalternativen mit der Kombination aus Milchsäurebakterien und Hefen durchgeführt. In den Abbildungen sind nur die Namen der Hefen angegeben, da die Milchsäurebakterien in allen Proben identisch waren (siehe Tabelle 7). Der Milchsäuregehalt variierte zwischen den Proben nicht stark (180-200 mmol/L), was zeigt, dass die Hefe keinen starken Einfluss auf die Milchsäureproduktion hat.

Alle mikrobiellen Kombinationen entfernten Hexanal wirksam aus dem Substrat, wobei die Zugabe von Hefe diesen Effekt noch verstärkte. Insbesondere im Fall von *P. kudriavzevii* wurde kein Hexanal nachgewiesen (Abbildung 15), was mit dem in der sensorischen Prüfung beobachteten reduzierten Bohnenaroma übereinstimmt (Abbildung 11). Die Diacetyl-Ergebnisse stimmten nicht vollständig mit den sensorischen Wahrnehmungen überein, da die hefefreie Probe die höchsten Diacetylwerte aufwies, aber schwächere Butteraromen. Da es sich um eine Einfachbestimmung handelt, konnten die geringen Unterschiede jedoch nicht auf Signifikanz untersucht werden. Eine andere mögliche Erklärung ist die Störung durch stärkere Bohnenaromen. Insgesamt zeigten die mesophilen Hefen – insbesondere *P. stipitis* – das größte Potenzial als Zusatzkulturen bei der Fermentation einer pflanzlichen Joghurtalternative.

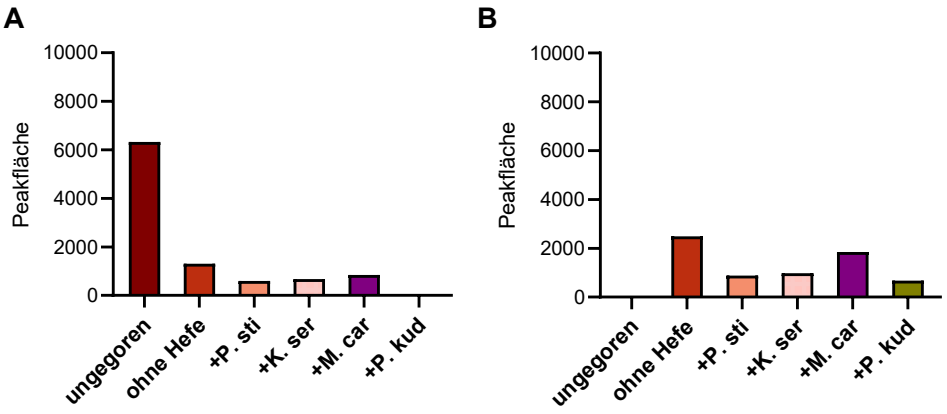

Abbildung 15: Menge an Hexanal (A) und Diacetyl (B) im nicht fermentierten Substrat und fermentierten Proben in Kombination mit Hefen.

AP 5 Finale Analysen und Herstellung der Erbsenjoghurtalternative-Entwicklungsmuster

5.1 Auswahl optimaler Starter- Co-Kulturen und Herstellung von Joghurtalternative-Entwicklungsmuster

Aus Basis mehrerer Fermentationsversuche (siehe Zwischenberichte) wurden drei Starter-Co-Kulturen für die Entwicklungsmuster ausgewählt. Zu P1 und P11 wurde *S. thermophilus* 22017 als Basisstamm kombiniert. Zusätzlich wurde auch die Kombination aller drei Stämme sowie das Susbtrat auf Ackerbohnenproteinbasis untersucht. Im Verlauf ist Mix 1 aufgrund nicht ausreichender Zellzahlen und mangelnder Ansäuerung ausgeschlossen worden (siehe Abschlussbericht von VF Nutrition).

Tabelle 8: Übersicht der ausgewählten Co-Kulturen von Milchsäurebakterien für das *backslopping*.

Mix	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3
1	*S. thermophilus* 22017	P1 *L. lactis* ssp. *cremoris*	-
2	*S. thermophilus* 22017	P11 *L. rhamnosus*	-
3	*S. thermophilus* 22017	P11 *L. rhamnosus*	P1 *L. lactis* ssp. *cremoris*

5.2 Bio-/chemische und sensorische Analyse der Entwicklungsmuster

Zur Bewertung der fermentativen Stabilität und Anpassung der Starter-Co-Kulturen an die Erbsenbasis wurden *backslopping*-Experimente mit den Entwicklungsmustern über mehrere Monate durchgeführt. Dabei dienten jeweils 2 % der Fermentate der vorherigen Runde als Inokulum für die nächste. Wie durch die beobachtete pH-Absenkung erwartet, zeigen alle fermentierten Proben eine vergleichbare Bildung von Milchsäure nach mehreren Monaten *backslopping* (siehe Abbildung).

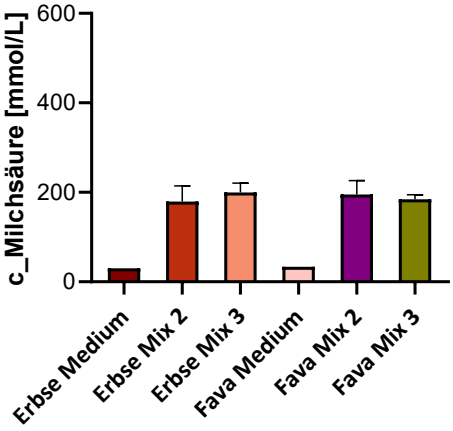

Abbildung 16: Konzentration an Milchsäure im Medium und fermentierten Proben mit verschiedenen Co-Kulturen von Milchsäurebakterien basierend auf Erbsen- oder Ackerbohnenprotein (*backslopping*).

Die Menge an Hexanal und Diacetyl ist in Abbildung dargestellt. Die fermentierten Proben weisen einen vergleichbaren Hexanalabbau und Diacetylbildung zu den vorherigen Fermentationsversuchen auf. Dabei unterscheiden sich Mix 2 und 3 nicht, was auf die nicht erfolgreiche Population von P1 zurückzuführen ist. In den erbsenbasierten Proben ist die Menge an Diacetyl tendenziell höher als in denen auf Ackerbohnenbasis (Fava). Dies zeigt, dass die gewählten Starter-Co-Kulturen auch über wiederholte Fermentationszyklen eine Verbesserung des Aromaprofils bewirken und für eine kontinuierliche Produktion geeignet sind.

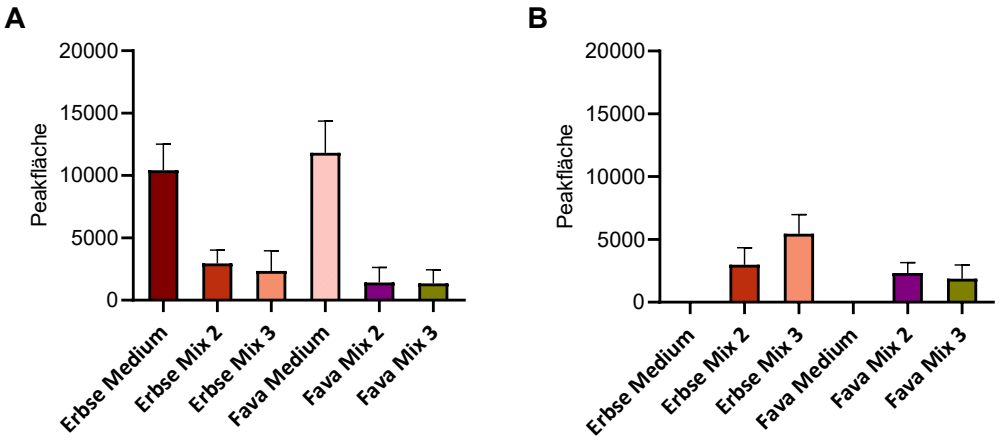

Abbildung 17: Menge an Hexanal (A) und Diacetyl (B) im Medium und fermentierten Proben mit verschiedenen Co-Kulturen von Milchsäurebakterien basierend auf Erbsen- oder Ackerbohnenprotein (*backslopping*).

3. Nutzen

Die Ergebnisse des PISUM-Projekts unterstreichen den Wert der Erforschung verschiedener mikrobieller Quellen bei der Entwicklung von Joghurt unter Verwendung eines unkonventionellen

Substrats wie Erbsenprotein. Über die traditionellen Milchsäurebakterien hinaus haben wir Hefearten in den Fermentationsprozess integriert und gezeigt, dass diese nicht nur die Produktqualität verbessern, sondern durch sorgfältige Kontrolle der Fermentationsbedingungen auch effektiv gesteuert werden können.

Insgesamt wurden 139 Mikrobenstämme eingehend untersucht, wodurch ein umfangreicher Datensatz zu physiologischen und metabolischen Eigenschaften entstand. Aus dieser Arbeit konnten wir Schlüsselparameter identifizieren, die in direktem Zusammenhang mit der Leistung der Mikroben unter Joghurtfermentationsbedingungen und den daraus resultierenden sensorischen Eigenschaften des Endprodukts stehen. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Vorteile eines Hochdurchsatzansatzes zur Untersuchung mikrobieller Reaktionen in alternativen Joghurtsystemen.

Unter den getesteten Kombinationen waren Starterkulturen, die *Streptococcus thermophilus* B-22017 und entweder *LactoBacillus helveticus* B-22028 oder *LactoBacillus acidophilus* B-24010 enthielten, am erfolgreichsten bei der Herstellung von Joghurt, der in Geschmack und Textur dem traditionellen Milchjoghurt sehr ähnlich war. Darüber hinaus verbesserte die Zugabe von Hefe, insbesondere *Pichia stipitis* Y-23117, unter kontrollierten Fermentationsbedingungen das sensorische Profil weiter, indem unerwünschte Noten reduziert und die Gesamtbalance verbessert wurden.

Diese Ergebnisse liefern mehrere vielversprechende Starterkulturenformulierungen, die sich für weitere Untersuchungen und Optimierungen im industriellen Maßstab eignen und praktische Lösungen für die Herausforderungen im Zusammenhang mit der Skalierung der pflanzlichen Joghurtherstellung bieten.

4. Fazit und Ausblick

Das PISUM-Projekt hat gezeigt, dass die Einbeziehung verschiedener mikrobieller Quellen, darunter Hefe, die Fermentation von Erbsenjoghurt erheblich verbessern kann, indem sowohl die sensorischen Eigenschaften als auch die Kontrollierbarkeit des Prozesses verbessert werden. Durch ein Hochdurchsatz-Screening von 139 mikrobiellen Stämmen wurden Schlüsselparameter identifiziert, die das Verhalten der Mikroorganismen mit der Fermentationsleistung des Joghurts und den Eigenschaften des Endprodukts in Verbindung bringen.

Aus dieser Arbeit gingen mindestens drei vielversprechende Starterkulturen-Kombinationen hervor, die ein großes Potenzial für die industrielle Anwendung bieten. Diese Kulturen können durch die Feinabstimmung der Fermentationsbedingungen weiter optimiert werden, um sie besser an die Anforderungen der Großproduktion anzupassen. Darüber hinaus erwies sich der in diesem Projekt entwickelte Ansatz zum Screening von Mikroorganismen als äußerst effektiv und reproduzierbar und bietet einen robusten Rahmen für die Bewertung weiterer Stämme und die Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit den sensorischen Eigenschaften der resultierenden Joghurts.

5. Veröffentlichungen und Schutzrechte

Konferenzbeiträge (Poster):

Schwarze J, Grebenteuch S, Rohn S, Magalhães FMC, Gibson B, Birke A. Starter-Co-Kultur für die Erbsenfermentation zur Herstellung einer Joghurtalternative. 61. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), 04.-06. März 2024, Kassel.
[Abstract abgedruckt in: Proceedings of the German Nutrition Society 2024; 30: 110]

Schwarze J, Grebenteuch S, Magalhães FMC, Gibson B, Birke AS, Rohn S. Starter-Co-Kulturen für die Erbsenfermentation zur Herstellung von Joghurtalternativen. 30. Arbeitstagung des Regionalverbands Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, anlässlich der 30-jährigen Jubiläen des Regionalverbandes und des Landesverbandes Berlin-Brandenburg des Bundesverbandes der Lebensmittelchemiker/-innen im öffentlichen Dienst e.V., 14./15. März 2024, Berlin.
[Abstract abgedruckt in: Lebensmittelchemie 2024; 78: S1-136]

Schwarze J, Grebenteuch S, Magalhães FMC, Gibson B, Birke AS, Rohn S. Starter-Co-Kultur zur Herstellung einer Joghurtalternative auf Basis von Erbsen. 52. Deutsche Lebensmittelchemietage, 16.-18. September 2024, Freising.
[Abstract abgedruckt in: Lebensmittelchemie 2024; 78: S3-144]

Schwarze J, Grebenteuch S, Magalhães FMC, Gibson B, Birke AS, Rohn S. Starter-Co-Kulturen für eine Joghurtalternative auf Erbsenbasis. 2. Nationaler Leguminosen Kongress, 07.-10. Oktober 2024, Leipzig.
[Abstract abgedruckt in: Konferenzband 2. Nationaler Leguminosen-Kongress 2024; 117]

Schwarze J, Magalhães FMC, Gibson B, Birke A, Rohn S. Einfluss der Starter-Co-Kultur für die Erbsenfermentation. 62. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE), 12.-14. März 2025, Kassel.
[Abstract abgedruckt in: Proceedings of the German Nutrition Society 2025; 31: 110]

Schwarze J, Magalhães FMC, Gibson B, Kellermann R, Rohn S. Einfluss von Citrat auf das Aromaprofil bei der Fermentation von Erbsenprotein. 53. Deutsche Lebensmittelchemietage, 22.-24. September 2025, Halle.
[Abstract abgedruckt in: Lebensmittelchemie 2025]

Konferenzbeiträge (Präsentation):

Magalhães F, Huth A, Riecken L, Schwarze J, Kellermann R, Rohn S, Gibson B. Yeast-assisted flavour improvement in pea protein-based yoghurt via controlled fermentation strategies. ISSY38-Konferenz.

Wissenschaftliche Publikationen:

Schwarze J, Birke A, Kellermann R, Rohn S, Gibson S, Magalhães F. Selection of starter cultures for plant based yogurt-fermentation. In Vorbereitung.

6. Referenzen

García Arteaga, V., Kraus, S., Schott, M., Muranyi, I., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). Screening of Twelve Pea (Pisum sativum L.) Cultivars and Their Isolates Focusing on the Protein Characterization, Functionality, and Sensory Profiles. *Foods*, *10*(4), 758. https://doi.org/10.3390/foods10040758

Genet, B. M., Xiao, H., Christensen, L. F., Laforce, I. N., Mohammadifar, M. A., Bang-Berthelsen, C. H., & Hansen, E. B. (2023). Selection of proteolytic LAB starter cultures for acidification of soy based dairy alternatives. Lwt, 184, 115082.

Grand View Research. (2023). *Plant-based Yogurt Market (2024—2030)*.

Koburger JA, Rodgers MF. Single or Multiple Antibiotic-Amended Media to Enumerate Yeasts and Molds 1. J Food Prot. 1978 May;41(5):367-369. doi: 10.4315/0362-028X-41.5.367. PMID: 30795141.

Kozaeva, E., Mol, V., Nikel, P. I., & Nielsen, A. T. (2022). High-throughput colorimetric assays optimized for detection of ketones and aldehydes produced by microbial cell factories. *Microbial Biotechnology*, *15*(9), 2426-2438.

Loveday SM. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. Annu Rev Food Sci Technol. 2019 Mar 25;10:311-339. doi: 10.1146/annurev-food-032818-121128. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30649962.

PBFA Team. (2024). Consumer Demand Reshapes Plant-Based Food Landscape: What New Data Really Says About the Industry. *Plant Based Foods Association*.

Pointke, M., Albrecht, E. H., Geburt, K., Gerken, M., Traulsen, I., & Pawelzik, E. (2022). A Comparative Analysis of Plant-Based Milk Alternatives Part 1: Composition, Sensory, and Nutritional Value. *Sustainability*, *14*(13), 7996. https://doi.org/10.3390/su14137996

Trindler, C., Annika Kopf-Bolanz, K., & Denkel, C. (2022). Aroma of peas, its constituents and reduction strategies – Effects from breeding to processing. *Food Chemistry*, *376*, 131892. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131892