

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Sachbericht zum Verwendungsnachweis (Teil I)

Zuwendungsempfänger: Rheinische Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn, Regina-Pacis-Weg 3,
53113 Bonn

Förderkennzeichen: 031B0956Q

Vorhabenbezeichnung:

Nachhaltige Proteinzutaten – Untersuchungen zum chemischen Aufbau der Proteinzutaten für die Proteindatenbank

Laufzeit des Vorhabens:

01.04.2021 – 31.03.2024

Berichtszeitraum:

01.04.2021 – 31.03.2024

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0956Q gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Freising, 13.11.2024

Teil 1: Kurzbericht

Der Markt für alternative Proteinquellen hat in den letzten Jahren einen beachtlichen Aufschwung erlebt, vor allem aufgrund eines gesteigerten Umweltbewusstseins und aktuellen Klimadiskussionen. Trotz dieser wachsenden Nachfrage stellt sich die Substitution tierischer Proteine durch pflanzliche Alternativen als komplexe Aufgabe dar. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlichen technofunktionellen und sensorischen Eigenschaften pflanzlicher Proteine im Vergleich zu ihren tierischen Pendanten in Milch, Ei oder Molke. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, bietet der Markt eine breite Palette an Proteinkonzentraten und -isolaten an. Diese Produkte unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Herstellungsverfahren und anschließenden Modifikationen, was ihre Eignung für spezifische Anwendungen beeinflusst. Zur Beurteilung der Substitutionsfähigkeit pflanzlicher Proteine werden deren technofunktionelle Eigenschaften sowohl in der Forschung als auch in der Industrie eingehend untersucht. Diese Eigenschaften umfassen alle physikalischen und chemischen Charakteristiken, die für die gesamte Lebensmittelproduktionskette relevant sind. Die Bestimmung dieser Eigenschaften erfolgt meist durch anwendungsspezifische Methoden, was oft zu schwer vergleichbaren Ergebnissen in der Fachliteratur führt. Zusätzlich beeinflussen intrinsische und extrinsische Faktoren die technofunktionellen Eigenschaften der Proteinzutaten. Zu den intrinsischen Faktoren zählen die Aminosäuresequenz und die Proteinstruktur. Das Herstellungsverfahren beeinflusst wiederum die Konformität, das Molekulargewicht und andere wichtige Eigenschaften der Proteine. Darüber hinaus spielen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur und Wechselwirkungen mit anderen Lebensmittelbestandteilen eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der endgültigen Eigenschaften der Proteinzutaten.

Diese komplexen Zusammenhänge verdeutlichen die Herausforderungen, aber auch die Möglichkeiten, die sich bei der Entwicklung und Anwendung pflanzlicher Proteine in der modernen Lebensmittelindustrie ergeben. An dieser Stelle setzt das Gesamtziel des Projekts „Nachhaltige Proteinzutaten“ an. In dem durch die Universität Bonn durchgeführten Teilvorhaben galt es kommerzielle Proteinzutaten auf ihre chemische Zusammensetzung als auch auf ihre technofunktionellen Eigenschaften hin zu untersuchen und diese Parameter in eine Proteindatenbank zu implementieren. Die Universität Bonn ist kurz nach Projektstart zum 01.04.2024 dem Verbund beigetreten. Zu diesem Zeitpunkt bestand schon ein mit den Industriepartnern abgestimmtes Konzept zur Proteindatenbankstruktur und die notwendigen Analysenzielgrößen wurden bereits festgelegt. Folgende Zielgrößen wurden an der Universität Bonn analysiert: Trockenmasse, Fettgehalt, Gehalt an proteinogenen Aminosäuren, minimale Gelbildungskonzentration und Schaumeigenschaften.

Über die ganze Projektlaufzeit wurden 91 kommerzielle Proteinzutaten beschafft und im Rahmen des Projektes analysiert. Die Proteinzutaten wurden vor ihrer Analyse pseudonymisiert und erst dann zur Analyse freigegeben. Die chemische Zusammensetzung aller Proteinzutaten wurde bis Ende der Projektlaufzeit vollständig analysiert und in die Proteindatenbank übertragen. Bevor mit den Analysen begonnen wurde, wurde eine Literaturrecherche zu den möglichen und am häufigsten eingesetzten Analysemethoden durchgeführt. Gemeinsam mit den Industriepartnern wurde sich auf standardisierte Methoden geeinigt und zu den Analyseparametern, für die keine standardisierten Methoden existierten, Standardanalysemethoden entwickelt. Alle diese Methoden wurden zu Protokollen (Standard Operation Procedure, SOP) zusammengefasst und in die Datenbank integriert.

Die Untersuchung der Schaumeigenschaften von Proteinen durchlief im Laufe des Projekts mehrere methodische Anpassungen. Zunächst wurde eine Methode in Anlehnung an Phillips et al. (1987) verwendet [1], bei der 5 % Protein in Wasser dispergiert und in einer Universalküchenmaschine aufgeschlagen wurde. Dabei wurden Schaumaktivität, -stabilität und -dichte gemessen. Vorversuche zeigten interessante Erkenntnisse wie die Proportionalität zwischen Probenmenge und Schaumvolumen sowie den Einfluss von pH-Wert und Natriumchlorid auf die Schaumeigenschaften. Aufgrund von Messungenauigkeiten und

mangelnder Reproduzierbarkeit wurde zwischenzeitlich auf den Dynamic Foam Analyzer 100 von Krüss umgestellt, der eine automatisierte Messung mittels Luftstroms ermöglicht. Jedoch traten auch hier Messschwierigkeiten auf, insbesondere bei der Messung der Schaumstruktur und bei Proben mit einem hohen Anteil nicht gelöster Bestandteile. Schließlich kehrte man zur ursprünglichen Methode zurück, verbesserte diese jedoch durch den Einsatz einheitlicher Geräte an verschiedenen Standorten sowie durch eine intensive Schulung der Mitarbeitenden. Diese finale Methode wurde dann zur Messung aller Proteinzutaten bei pH 4 und 7 verwendet. Die Entwicklung verdeutlicht die Herausforderungen bei der Standardisierung von Schaummessungen und die Notwendigkeit, Methoden an spezifische Probeneigenschaften anzupassen. Interessanterweise ist bei Betrachtung der Analyseergebnisse aller Proteinzutaten zu erkennen, dass kein einheitlicher Trend zu verzeichnen ist. So konnten große Unterschiede in den Schaumeigenschaften von Proteinzutaten gemessen werden, welche aus dem gleichen Rohstoff (z.B. Erbse) stammten. Diese Unterschiede können auf die unterschiedliche Herstellung bzw. Gewinnung der Proteinzutaten zurückgeführt werden.

Abschließend wurde eine Proteindatenbank mit einer Vielzahl von Proteinzutaten sowie ihren chemischen und funktionellen Eigenschaften aufgebaut, deren Ziel eine Verstetigung ist, um der Industrie ein Werkzeug zur Verfügung stellen zu können, das eine Produktentwicklung effizienter und zielführender gestaltet.

Das Verbundvorhaben wurde durch die wertvolle Unterstützung eines Industriekonsortiums maßgeblich vorangetrieben. Die Industriepartner engagierten sich auf vielfältige Weise im Projekt. Sie nahmen regelmäßig an Projekttreffen teil, wodurch ein kontinuierlicher Austausch und eine enge Abstimmung gewährleistet werden konnten. Durch Applikationen der in der Datenbank erfassten Proteine konnten die Industriepartner ihre eigenen Produktentwicklungen maßgeblich vorantreiben. Dies erweiterte den Umfang und die Praxisrelevanz der durchgeführten Forschung erheblich. Ein besonders wichtiger Aspekt ihrer Mitwirkung war die Bewertung des Anwendungspotenzials der entwickelten Datenbank. Durch ihre Expertise und Marktkenntnisse konnten die Industriepartner wertvolle Einschätzungen zur praktischen Umsetzbarkeit und kommerziellen Relevanz der Forschungsergebnisse liefern. Diese umfassende Einbindung der Industrie trug wesentlich dazu bei, dass die Projektergebnisse nicht nur wissenschaftlich fundiert, sondern auch praxisnah und marktorientiert sind, was die Chancen für eine erfolgreiche Umsetzung in kommerzielle Anwendungen deutlich erhöht.

Die Universität Bonn koordinierte das Gesamtvorhaben. Dies umfasste die Organisation von Projektmeetings, die Abstimmung der Konsortialpartner untereinander – hier insbesondere die Zusammenarbeit zwischen dem Fraunhofer IVV und der Universität Bonn – aber auch die Zusammenarbeit zwischen Forschungspartnern und Industriepartnern, die Dissemination der Forschungsergebnisse auf verschiedenen Veranstaltungen (z.B. Kongressen, Messen, NewFoodSystems Aktivitäten) sowie den Aufbau von potentiellen Verwertungskonzepten für die Proteindatenbank.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Sachbericht zum Verwendungsnachweis (Teil II)

Zuwendungsempfänger: Rheinische Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn, Regina-Pacis-Weg 3,
53113 Bonn

Förderkennzeichen: 031B0956Q

Vorhabenbezeichnung:

Nachhaltige Proteinzutaten – Untersuchungen zum chemischen Aufbau der Proteinzutaten für die Proteindatenbank

Laufzeit des Vorhabens:

01.04.2021 – 31.03.2024

Berichtszeitraum:

01.04.2021 – 31.03.2024

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0956Q gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Freising, 13.11.2024

Teil 2: Eingehende Darstellung

Inhaltsverzeichnis

Teil 2: Eingehende Darstellung	2
AP 0 Koordination und Management	2
AP 1 Entwicklung einer ersten funktionsfähigen Proteindatenbank anhand vorhandener Daten aus Wissenschaft und Forschung	6
AP 3 Ermittlung geeigneter Analytik (Methoden und Kenngrößen) für nachhaltige Proteinzutaten mittels Literaturrecherche	6
AP 4 Definition der Zielgrößen und der analytischen Methoden	11
AP 5 Beschaffung und Bewertung nachhaltiger Proteine	15
Referenzen	20

Teil 2: Eingehende Darstellung

Die Umstellung von tierischen auf nachhaltige alternative Proteine gewinnt insbesondere vor dem Hintergrund der aktuellen Klimadiskussionen zunehmend an Bedeutung für die Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. Obwohl bereits eine Vielzahl vorwiegend pflanzlicher Proteinzutaten auf dem Markt erhältlich sind, sind ihre Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten noch relativ begrenzt und teilweise unzureichend erforscht. Dies erschwert es Herstellern von Lebens- und Futtermitteln, die richtige Proteinquelle für ihre Anwendung zu wählen. Neue Proteinzutaten aus vielversprechenden Quellen wie Insekten oder Mikroalgen sind entweder noch nicht kommerziell verfügbar oder nur zu hohen Preisen erhältlich. Es fehlt bislang an einem systematischen Überblick über die breite Palette an Proteinquellen, insbesondere im Bereich der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. Wichtige Kriterien wie funktionelle Eigenschaften, Sensorik, Verdaulichkeit, Preis und Verfügbarkeit werden bisher nicht systematisch erfasst. Unerschlossene Potenziale zur Verbesserung der sensorischen, funktionalen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften liegen sowohl in der Modifikation als auch in der gezielten Formulierung optimierter Proteinmischungen.

Das übergeordnete Ziel des Projekts "Nachhaltige Proteinzutaten" bestand daher darin, maßgeschneiderte, nachhaltige Proteine und Proteinmischungen für die Lebensmittel- und Futtermittelindustrie zu entwickeln. Die Hauptziele des Gesamtvorhabens beinhalteten die Entwicklung einer umfassenden Proteindatenbank, die als Grundlage für die Auswahl von Proteinkombinationen für spezifische Anwendungszwecke dient, sowie die gezielte Anwendung zur Proteinanreicherung in Lebensmitteln und Futtermitteln.

Das Ziel des Teilprojekts „Untersuchungen zum chemischen Aufbau der Proteinzutaten für die Proteindatenbank“ der Universität Bonn war die Methodenentwicklung für ausgewählte chemische und physikalisch-chemische Analysen der Proteinzutaten sowie die Ermittlung der entsprechenden Daten. Diese Zusammenarbeit lief in sehr enger Abstimmung mit dem Projektpartner Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV). Während der gesamten Projektzeit wurden 91 Proteinzutaten über das Fraunhofer IVV von verschiedenen Lieferanten beschafft und für die Datenbank analysiert. Die Proteinzutaten weisen eine große Heterogenität auf und stammen aus 23 variierenden Quellen.

AP 0 Koordination und Management

Das Gesamtvorhaben bestand aus sechs Arbeitspaketen und Meilensteinen, die Universität Bonn war in vier dieser Arbeitspakete integriert. Zudem übernahm die Universität Bonn die Gesamtkoordination des Vorhabens. Das Projektkonsortium traf sich alle 6 Monate, um über die Projektergebnisse zu diskutieren und den Projektverlauf zu monitoren. Zwischendurch fanden Arbeitsmeetings in persona wie auch via Zoom/Teams statt. Insbesondere zwischen dem Fraunhofer IVV und der Universität Bonn war die Abstimmung sehr intensiv aufgrund der Vernetzung der Arbeiten. Die Universität Bonn traf sich auch regelmäßig mit der HAW Hamburg, um die Arbeiten im Bereich der Sensorik zu begleiten. Bezüglich der Anwendungsversuche der Proteinzutaten in Lebensmittelapplikationen fanden entsprechend der Produktkategorien (Fleisch-, Wurstalternativen, Milchproduktalternativen, Futtermittel) jeweils ein Kick-off Workshop statt. Dazwischen sprach Frau Prof. Weisz regelmäßig mit den einzelnen Industriepartnern, um über deren Projektfortschritt auf dem Laufenden zu bleiben. Bei Auftreten von Schwierigkeiten bei der Bearbeitung des Arbeitsplans bzw. es zu Konflikten zwischen den beteiligten Partnern gekommen war, wurden geeignete Maßnahmen zur Lösung der Probleme (z.B. bi- und trilaterale Telefonate) ergriffen.

Folgende feste Jour-Fixe Zeiten wurden über die Projektlaufzeit eingehalten:

- Wöchentlicher Jour-Fix zwischen der Universität Bonn und dem Fraunhofer IVV zur Programmierung/Anpassung der Datenbank und zur Analyse der Proteinzutaten
- Ca. alle drei Monate ein Austausch zwischen Universität Bonn und HAW Hamburg zum Stand der sensorischen Arbeiten
- Ca. alle 3-6 Monate ein Austausch zwischen der Universität Bonn und den Industriepartnern

Während der ganzen Projektzeit wurden 7. Verbundtreffen abgehalten. Diese Termine fanden an den folgenden Tagen statt:

- 1. Verbundtreffen: Am 16. April 2021 (online-Meeting)
- 2. Verbundtreffen: Am 2. Juli 2021 (online-Meeting)
- 3. Verbundtreffen: Am 3. März 2022 (online-Meeting)
- 4. Verbundtreffen: Am 23. September 2022 in Nürnberg
- 5. Verbundtreffen: Am 30. März 2023 in Karlsruhe (Max-Rubner-Institut)
- 6. Verbundtreffen: Am 26. September 2023 in Bonn (Universität Bonn)

Hinzu kamen, wie oben beschrieben noch diverse Arbeitstreffen zwischen den jeweiligen Partnern.

Das Vorhaben bzw. der Vorhabenverlauf wurde zudem von Seiten der Koordination auf jedem Konsortialmeeting des gesamten Verbundes vorgestellt.

Die Universität Bonn hat erst zum 2. Verbundtreffen das Vorhaben übernommen. Das Kick-off Meeting wurde durch das Fraunhofer IVV, das zuvor die Koordination innehatte geleitet.

Das 2. Verbundtreffen fand am 2. Juli 2021 statt. Nachdem der aktuelle Stand der Proteinbeschaffung vorgestellt worden war, wurden erste Ergebnisse zur Zusammensetzung und zu den physikochemischen Eigenschaften der Proteinzutaten präsentiert. Im nächsten Teil des Treffens ging es um den aktuellen Stand der Datenbank, gefolgt von einer ausführlichen Diskussion darüber, ob die Applikation als Zielgröße in der Datenbank implementiert werden sollte. Weiterhin wurde über den aktuellen Stand bei der Zielgrößendefinition im Bereich Sensorische Eigenschaften sowie über Neuigkeiten aus dem Innovations-Hub berichtet. Im letzten Teil wurde dann ausführlich über sinnvolle Nachhaltigkeitsfaktoren für die Datenbank diskutiert.

Das 3. Verbundtreffen fand am 3. März 2022 per Microsoft Teams statt. Zur Eröffnung wurde die aktuelle Entwicklung der Datenbank und der Stand der Analyse der Zielgrößen präsentiert. Fokusthemen waren dabei die rheologische Charakterisierung der Proteinzutaten, Untersuchungen zu den Hydratationseigenschaften ausgewählter Proteinpulver und Herausforderungen bei der Bestimmung der Schaumeigenschaften. Weitere Schwerpunkte waren der aktuelle Stand bei der Bestimmung der sensorischen Eigenschaften und die Präsentation erster Planungen aus den Arbeitstreffen zu Applikationsversuchen für die Datenbank in Kooperation mit den Industriepartnern. Zum Abschluss gab es noch einen Überblick über sonstige Aktivitäten seitens der Industrie.

Am 23. September 2022 fand in Nürnberg das 4. Verbundtreffen statt. Eröffnet wurde es, mit einem Überblick über den aktuellen Projektstand und einem Update zu den bis dahin durchgeführten Analysen. Anschließend wurde die Rechenfunktion, eines der bisher größten Funktionsupdates der Proteindatenbank, vorgestellt. Über die Themen ernährungsphysiologische Eigenschaften und Chemical Score wurde auf eines der nächsten Themen hingearbeitet, nämlich die Kombination von Proteinzutaten. Weitere Kernpunkte waren die Vorstellung der Ergebnisse zu den sensorischen Eigenschaften sowie der Planungsstand bei der

Bestimmung der Nachhaltigkeitsfaktoren. Abgeschlossen wurde das Verbundtreffen erneut mit verschiedenen Beiträgen der Industriepartner.

Das 5. Verbundtreffen fand am 30. März 2023 am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe statt. Zur Eröffnung wurde ein Rückblick auf die öffentlichkeitswirksamen Arbeiten des letzten halben Jahres gegeben und der aktuelle Stand bei der Analyse der Zielgrößen präsentiert. Außerdem wurde anhand verschiedener Methoden der Standortvergleich Universität Bonn/IVV vorgestellt. Neben dem Entwicklungsstand der Datenbank wurden anschließend neue Ergebnisse aus dem Bereich der Sensorik und erste Arbeiten zur Bestimmung der Nachhaltigkeitsfaktoren erläutert. Über unterschiedliche Posterbeiträge wurden zudem die Arbeiten einzelner Industriepartner vorgestellt. Zum Abschluss gab es eine rege Diskussion über die wissenschaftliche und wirtschaftliche Verwertung der Datenbank.

Am 26. September 2023 fand in Bonn das 6. Verbundtreffen statt. Es begann wie üblich mit einem Überblick über den aktuellen Stand des Projekts und einem Update zu den bisher durchgeführten Analysen. Während bei den vorherigen Verbundtreffen der Schwerpunkt auf der reinen Datenerfassung lag, wurden dieses Mal bereits statistische Auswertungen präsentiert und der Versuch unternommen, die chemische Zusammensetzung mit den technofunktionellen Eigenschaften zu verknüpfen, da zu diesem Zeitpunkt bereits ein Großteil der angestrebten Analysen durchgeführt worden war. Weitere Schwerpunkte waren der Einfluss des pH-Werts und der Salzkonzentration auf ausgewählte funktionelle Eigenschaften.

Anschließend wurde ausführlich über die Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften durch die Kombination unterschiedlicher Proteinzutaten berichtet. Es wurde gezeigt, dass durch die Untersuchung der Schaumeigenschaften eindrucksvoll bewiesen werden konnte, dass die Schaumeigenschaften gezielt durch die Kombination unterschiedlicher Proteinzutaten beeinflusst werden können und zusätzlich die Proteinqualität, insbesondere die Aminosäurezusammensetzung, positiv modifiziert werden kann. Das Verbundtreffen wurde mit Beiträgen zur Sensorik, den Nachhaltigkeitsfaktoren und verschiedenen Beiträgen der Industriepartner fortgesetzt.

Zum Abschluss wurden die Erstellung der Projektberichte und der Nachweis der finanziellen Abrechnung erläutert, da jeder Projektpartner das Projekt eigenständig beendet und nicht jeder eine Verlängerung beantragt hatte.

Im Rahmen des Projektes wurden ebenfalls diverse Arbeitstreffen zwischen den jeweiligen Industriepartnern und der Koordinationsstelle abgehalten. Hierzu wurde Arbeitstreffen zur Applikation, der Einbindung von Nachhaltigkeitsfaktoren und der Verwertungsstrategie der Datenbank abgehalten. Um das Arbeitstreffen Applikation zu strukturieren, wurden die Industriepartner in verschiedene Produktkategorien für die Applikationsversuche der Proteine in Endprodukte eingeteilt.

Basierend auf den Interessen der Partner wurden folgende Gruppen gebildet: Gruppe 1 beschäftigte sich mit Wurstwaren, Gruppe 2 mit Milchalternativen und Fruchtzubereitungen, und Gruppe 3 mit Fleischalternativen.

Am 08.12.2021 fand der erste Abstimmungsworkshop der Gruppe Wurstwaren statt. Teilnehmer waren die Universität Bonn, die Scheid AG und die VAN HEES GmbH. Zu einem späteren Zeitpunkt trafen sich Döhler, Hydrosol, Zentis und die Universität Bonn, um das Thema Applikation der Proteine in Milchalternativen und Fruchtzubereitungen zu diskutieren. Am 15.12.2021 fand das Treffen der Gruppe Fleischalternativen statt, bei dem endori, Hydrosol und Südzucker vertreten waren.

Die Workshops folgten einem ähnlichen Aufbau. Zunächst wurde versucht, sich auf ein gemeinsames Vorgehen zu einigen. Dies beinhaltete, dass die einzelnen Firmen Standardrezepturen entwickelten und dann einzelne Proteinzutaten auswählten, die aufgrund ihrer Zusammensetzung für die jeweiligen Applikationen interessant sein könnten. Die Zutaten wurden vom IVV bestellt und den Partnern für die

anschließenden Versuche zur Verfügung gestellt. Diese Informationen wurden von der Universität Bonn an das IVV weitergeleitet.

Bekanntmachung des Projekts und der Projektergebnisse:

NewFoodSystems-interne Veranstaltungen:

Das Projekt wurde vorgestellt auf dem NewFoodSystems Day 2022 in Nürnberg, war Teil der Buga 2023 und war Bestandteil der beiden Leguminosenworkshops zusammen mit der FH Münster (FoodLab).

Externe Veranstaltungen - wissenschaftlich:

Die Forschungspartner, Fraunhofer IVV, HAW Hamburg und Universität Bonn, stellten das Projekt auf vielen, verschiedenen wissenschaftlichen Veranstaltungen und Messen vor.

In diesem Teil des Berichts sei nur auf die Aktivitäten der Universität Bonn hingewiesen. Die anderen Forschungspartner gehen in ihren Abschlussberichten direkt darauf ein.

- 15.09.2021: Entwicklung einer Proteindatenbank, IVLV-Freisinger Tage, Pflanzliche Lebensmittel
- 11.05.2022: Rwandan German FoodTec Webinar III – Advances in Food Technology – Plant Proteins – Promising Ingredients for Food Industry
- 16.09.2022: Von Soja bis Alge – Entwicklung einer Proteindatenbank zur Katalogisierung von Proteinzutaten. Fachtagung Gesellschaft deutscher Lebensmitteltechnologien.
- 16.03.2023: Minisymposium im Rahmen des DGE-Kongresses „Pflanzenbasierte Ernährung im Fokus“
- 09.05.2023: Potential pflanzlicher Proteine als funktionelle Zutaten für die Lebensmittelherstellung - Entwicklung einer Proteindatenbank. UFOP – Fachkommission Humanernährung.
- 12.10.2023: Hans-Eisenmann Forum. Potenzial und Herausforderungen pflanzlicher Proteine als funktionelle Zutaten für die Lebensmittelherstellung.
- 24.1.2023: Allergenes Potenzial pflanzlicher Lebensmittelproteine und Erstellung einer Proteindatenbank

Weitere externe Veranstaltungen:

- 12.05 – 13.05.2022: Bonner Wissenschaftsnacht
- 09.07.2023: Wissenschaftsfestival im Hofgarten, Bonn
- 27.09. – 29.09. Vertifarm in Dortmund

Wissenschaftliche Publikationen (eingereicht und akzeptiert):

- Etzbach, L., Gola, S., Küllmer, F., Acir, I.H., Wohlt, D., Ignatzy, L.M., Bader-Mittermaier, S., Schweiggert-Weisz, U. (2024) Opportunities and Challenges of Plant Proteins as Functional Ingredients for Food Production. Proceedings of the National Academy of Sciences (in press).
- Ignatzy, L.M., Gola, S., Schweiggert-Weisz, U. (2024) Hydratationseigenschaften von Proteinzutaten für die Lebensmittelherstellung - Methoden zur Bestimmung der Wechselwirkungen von pulverförmigen Proteinzutaten mit Wasser, FOOD-Lab International

Wissenschaftliche Publikationen (in Vorbereitung):

- Combination of protein ingredients - effects on foaming and emulsifying properties. Future Foods (Special Issue im Rahmen der 3rd NIZO-Konferenz Plant Protein Functionality) Universität Bonn/TUM, IVV; Einreichung: Deadline bis dato noch nicht bekannt.
- Scheuer, L., Gola, S., Schweiggert-Weisz, U., Bauer, A., Ehlerding, F., Früh, S., Brandt, P., Detzel, A.) Characterization of Commercial Pea Protein Ingredients: Assessing Physico-Chemical Properties, Sensory Attributes, and Sustainability Factors (Universität Bonn, TUM, Fraunhofer IVV, HAW Hamburg, ifeu; Einreichung Frühjahr 2025).
- Artikel in der Ernährungsumschau zusammen mit AlProPlant und Pr:ins. Pflanzliche Proteinzutaten im Spannungsfeld zwischen Technofunktionalität, Ernährungsphysiologie und ökologischer Nachhaltigkeit (eingereicht am 15.10.2024)

AP 1 Entwicklung einer ersten funktionsfähigen Proteindatenbank anhand vorhandener Daten aus Wissenschaft und Forschung

Im Rahmen regelmäßig stattfindender Treffen, meist wöchentlich, wurde eine erste Architektur der Datenbank entwickelt. Diese Treffen fanden am Fraunhofer IVV, Standort Dresden, statt. Die Universität Bonn verfolgte den Fortschritt und leistete einen Beitrag zur Gestaltung und Funktion der Datenbank durch Anregungen und Diskussionen. Zusätzlich war die Universität Bonn dafür zuständig, den Projektpartner Scheid AG, der mit seinem Blick auf die industrielle Anwendung einen wichtigen Beitrag zur Datenbankgestaltung leistete, und dass Fraunhofer IVV zusammenzubringen.

AP 3 Ermittlung geeigneter Analytik (Methoden und Kenngrößen) für nachhaltige Proteinzutaten mittels Literaturrecherche

Ergänzend zu der Methodenrecherche am Fraunhofer IVV wurde an der Universität Bonn die Literaturrecherche zu den folgenden Methoden durchgeführt:

a) Proteingehalt

Für die Bestimmung des Rohproteingehalts existieren zwei etablierte Methoden. Zum einen die Bestimmung des Rohproteingehalts anhand des Gesamtstickstoffgehalts nach Dumas (Dumas, 1831) [3], [4] und die Bestimmung des Rohproteingehalts anhand des Stickstoffgehalts nach Kjeldahl [5].

Für die Bestimmung nach Dumas wird das Probenmaterial mit reinem Sauerstoff katalytisch verbrannt und es bilden sich Stickoxide aus den jeweiligen stickstoffhaltigen Verbindungen der Probe. Die gebildeten Stickoxide werden mittels Kupfer zu molekularem Stickstoff bei erhöhten Temperaturen reduziert, welcher mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor detektiert. Die Berechnung erfolgt über eine externe Kalibrierung z.B. mit EDTA.

Bei der Kjeldahl-Methode wird die Probe mit Schwefelsäure unter Zugabe eines Katalysators aufgeschlossen. Dabei wird der Stickstoff, der gebunden als freie Aminosäuren, Proteine, Ammoniumsalze oder Vitamine vorliegen kann, oxidativ aufgeschlossen und in Ammoniumsulfat überführt. Nach Neutralisation der so erhaltenen Probe wird über eine Wasserdampfdistillation das Ammoniak in eine borsäurehaltige Vorlage eingeleitet. Das so entstehende Ammonium kann dann wiederum per Säure-Base-Titration quantifiziert werden.

Sowohl mit der Dumas als auch mit der Kjeldahl-Methode wird der Stickstoff aus den Proben nachgewiesen und kann unter der Berücksichtigung eines durchschnittlichen Stickstoffanteils in Proteinen (meist 6,25) auf

den Proteingehalt umgerechnet werden und das Ergebnis wird dann in „Gesamtstickstoff, berechnet als Protein“ bzw. „Gesamtprotein N*F“ angegeben. Vorteile der Dumas-Methode liegen in der automatisierten, schnellen Messung, und dem reduzierten Einsatz von giftigen Chemikalien.

b) Fettgehalt

Die Bestimmung des Fettgehalts erfolgt im Allgemeinen gravimetrisch nach saurer Hydrolyse nach der Methode von Weibull-Stoldt [6] und es stehen unterschiedliche AOAC-Methoden zur Verfügung. Laut AOAC 963.15-1973, Getreideprodukte, kann der Rohfettgehalt nach Soxhlet-Extraktion mit Petrolether erfolgen [7]. Auch laut AOAC 991.36-1996 (Fleisch) wird der Fettgehalt gravimetrisch nach Soxhlet-Extraktion in siedendem Petrolether durchgeführt [8]. Beide Methoden haben allerdings den Nachteil, dass das gebundene Fett hierbei nicht erfasst wird. Nach §64 LFGB/AOAC 963.15-1973 für Kakaoprodukte erfolgt die Fettbestimmung ebenfalls gravimetrisch nach Soxhlet-Extraktion, jedoch wird zuvor ein Säureaufschluss nach Weibull-Stoldt [6] durchgeführt. Hier erfolgt vor der Extraktion eine saure Hydrolyse der Probe in entweder 4 M HCl für 60 Minuten oder 4,4 M HCl für 15 Minuten.

c) Stärkegehalt

Zum quantitativen Nachweis von Stärke haben sich drei Methoden etabliert. Dabei handelt es sich um reduktometrische, polarimetrische und enzymatische Verfahren, die in unterschiedlichen §64 Methoden Anwendung finden.

Reduzierende Zucker können reduktometrisch nach Luff-Schorl bestimmt werden. Stärke jedoch muss zunächst in seinen reduzierenden Zucker Glucose hydrolytisch gespalten werden, um diese dann bestimmen zu können. Bei Zugabe unter Siedehitze von Luffscher Lösung (definierte Kupfer(II)-Ionen-haltige, carbonatalkalische Lösung) findet mit den enthaltenen Cu^{2+} -Ionen eine Redoxreaktion statt. Der Überschuss der nicht reduzierten Kupferionen wird anschließend mit Iodlösung rücktitriert. Zur Auswertung werden tabellierte, empirisch bestimmte Werte herangezogen. Da die Redoxreaktion nicht stöchiometrisch abläuft, handelt es sich um eine Konventionsmethode (vgl. [9]) [10]. Diese Methode erfasst somit als Summenparameter alle reduzierend wirkenden Zucker.

Bei der polarimetrischen Bestimmung wird Stärke ebenfalls mit HCl hydrolysiert. Nach einer definierten Zeit wird die spezifische Drehung gemessen. Auf die gleiche Weise wird eine Lösung, aus der die Stärke entfernt wurde, vermessen und der ermittelte Blindwert vom Hauptwert abgezogen. Die Hydrolyse läuft bei diesem Versuch nicht vollständig ab, sodass verschiedene, optisch aktive Produkte entstehen. Nach der Entfernung von Proteinen kann der Drehwinkel ermittelt werden. Auch hier handelt es sich um eine Konventionsmethode [10], wobei nur die strikte Einhaltung der vorgegebenen Parameter zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Für die enzymatische Bestimmung wird Stärke mit AGS bei pH 4,6 zu D-Glucose gespalten. Diese wird bei pH 7,6 mit Hexokinase (HK) und Adenosintriphosphat (ATP) zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert. Durch die G-6-P-Dehydrogenase wird G-6-P oxidiert und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP), das Coenzym, wird zu NADPH reduziert. Die Absorption des stöchiometrisch zum Glucosegehalt gebildeten NADPH wird photometrisch durch Extinktionsmessungen bei 340 nm (Hg 334 nm oder 365 nm) bestimmt. Für eine quantitative Hydrolyse der Stärke muss das pH-Optimum der AGS von 4,6 eingehalten werden, zudem ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur zu beachten. Das Optimum liegt bei 55-60 °C. Der Stärkegehalt kann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden [11], [12].

Wie bereits beschrieben, ist resistente Stärke dem Abbau durch Enzyme nicht zugänglich [13]. Um Stärke enzymatisch nachweisen zu können, muss diese deshalb gegebenenfalls erst in eine lösliche Form überführt

werden. Dies kann unter anderem durch das Lösen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und HCl [11] oder durch eine Verkleisterung [14] erreicht werden.

d) Aminosäurezusammensetzung

Die Verfahren zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung einer Proteinprobe sind ausführlich in der European Pharmacopoeia 5.0, Kapitel 2.2.56 [15] beschrieben. Typischerweise wird die Aminosäureanalytik chromatografisch unter Verwendung von Vor- oder Nachsäulenderivatisierungen durchgeführt. Die am häufigsten verwendete Methode basiert auf Ionenaustauschchromatographie in Kombination mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung. Eine ebenfalls weit verbreitete Methode kombiniert die OPA/FMOC-Cl Vorsäulenderivatisierung mit der klassischen Reversed-Phase HPLC. Diese Methode hat den Vorteil, dass die resultierenden Aminosäurederivate sowohl mit einem UV/Vis- oder Diodenarraydetektor als auch mit einem Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden können, wobei letzterer eine deutlich höhere Empfindlichkeit bietet und somit die Nachweisgrenze erheblich senken kann. Auch für die Probenvorbereitung existieren verschiedene Ansätze, die in der European Pharmacopoeia [15] beschrieben sind. Die häufigste Methode ist die saure Hydrolyse in 6M HCl. Um alle essentiellen Aminosäuren bestimmen zu können, ist jedoch zusätzlich eine basische Hydrolyse, beispielsweise zur Bestimmung von Tryptophan, erforderlich. Bei der sauren Hydrolyse werden einige Aminosäuren teilweise oder vollständig zerstört. Asparagin und Glutamin werden in ihre jeweiligen korrespondierenden Säuren umgewandelt und daher meist als Summenparameter angegeben. Methionin kann während der Hydrolyse oxidiert werden, und Cystein wird normalerweise als Cystin detektiert, welches jedoch zerstört oder wieder zu Cystein reduziert werden kann. Daher ist es sinnvoll, diese Aminosäuren durch vorherige Oxidation in stabilere Formen zu überführen, beispielsweise mit Perameisensäure vor der sauren Hydrolyse. Um weitere Effekte während der Hydrolyse, wie die Halogenierung von Tyrosin, zu verhindern, wird der Salzsäure vor der Hydrolyse bis zu 1% Phenol (w/w) zugesetzt.

e) Minimale Gelbildungskonzentration (MGK)

Zur Bestimmung der MGK haben sich über die Jahre 2 Methoden etabliert. Zum einen die Bestimmung der MGK nach thermischer Induktion [16] und zum anderen die Ermittlung der MGK nach Glucono-1,5-lacton (GDL-)induzierter Gelbildung in Anlehnung an Britten und Giroux [17]. In beiden Fällen werden Proteinsuspensionen von 2- 20% (w/V) in demineralisiertem Wasser angesetzt. Für die thermische Induktion werden die Proben für 60 Minuten bei 95°C erhitzt und nach raschem Abkühlen für 2h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Bei der GDL-induzierten Gelbildung wird der Probe je nach gewünschtem pH eine definierte Menge GDL hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Lagerung bei 5°C für 16h. Bei beiden Methoden wird die MGK als Konzentration definiert, bei der die Probe nicht aus dem Reagenzglas fließt.

f) Hydratationseigenschaften

Im Zuge einer Masterarbeit wurden Methoden zur Bestimmung der Hydratationseigenschaften von Proteinpulvern recherchiert und experimentell etabliert. Unterschieden wurde hier zwischen Benetzbarkeit, Dispergierbarkeit und Löslichkeit. Die unterschiedlichen Methoden sollen im Folgenden kurz mit Auszügen aus der Abschlussarbeit vorgestellt werden.

Untersuchungen zur Benetzbarkeit

1. Bestimmung der Immersionsbenetzung: Für die Bestimmung der Benetzungszeit existieren verschiedene Methoden. Die Standardmethode ist im IDF Standard 87:1979 festgelegt [18]. Darüber hinaus hat die GEA

Group [19] eine alternative Standardmethode entwickelt, die in den Studien von Ji, Cronin et al. (2015) und Ji, Fitzpatrick et al. (2016) verwendet wird [20], [21]. Zudem kann die Benetzungszeit mithilfe eines speziellen Probenaufbringmechanismus bestimmt werden, der auf den Prinzipien der Standardmethoden basiert.

2. Bestimmung des kapillaren Anstiegs: Zunächst wird ein Aliquot von 3,0 g des Proteinpulvers für 3 Stunden bei 103 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Gleichzeitig wird ein leeres Glas-Kapillarröhrchen mit einem Durchmesser von 10 bzw. 20 mm getrocknet, abgekühlt und gewogen. Ein Ende des Röhrchens wird dann mit einem Filterpapier verschlossen, indem das Filterpapier auf die Öffnung gelegt und die überstehenden Ränder stramm nach unten gefaltet und mit einer Reagenzglasklammer fixiert werden.

Das getrocknete Proteinpulver wird gründlich durchmischt, bevor ein Aliquot von 2,0 g nach folgendem Verfahren in das Röhrchen eingefüllt wird: Ein Trichter wird auf die offene Öffnung des Röhrchens gesetzt, um die Hälfte der Probe einzufüllen. Dann wird die Unterseite des Röhrchens zehnmal gleichmäßig aus einer konstanten Höhe von 20 mm auf eine harte Oberfläche geklopft. Dieser Vorgang wird mit der restlichen Pulvermenge wiederholt. Nach dem Entfernen des Trichters wird das Röhrchen am Ständer befestigt. Eine Glasschale wird mit 200 mL demineralisiertem Wasser bei einer Temperatur von 22,5 °C gefüllt und unter dem am Ständer befestigten Röhrchen platziert. Die Halterung wird so weit abgesenkt, dass das Röhrchen 15 mm unter die Wasseroberfläche eintaucht. Nach 10 Minuten wird das Röhrchen aus dem Wasser entfernt und 30 Sekunden abtropfen gelassen, bevor es samt Filter gewogen wird. Der Filter wird dann entfernt und eventuell haftendes Pulver mit demineralisiertem Wasser abgespült. Der Filter wird erneut 30 Sekunden abtropfen gelassen und anschließend gewogen. Zwischen den Messungen wird das Röhrchen gereinigt und im Trockenschrank getrocknet. Die von der Probe aufgenommene Flüssigkeitsmenge ergibt sich durch Einsetzen der ermittelten Gewichte in folgende Formel:

$$m_W = m_G - (m_R + m_F)$$

3. Bestimmung der Wasseradsorption durch Kondensation: Die zu untersuchenden Proteinpulver werden für 120 h bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten von 11 bis 75 % gelagert. Zunächst werden jeweils 4,00 g der Probe in eine Wägeschale eingewogen und bei 103 °C für 3 h im Trockenschrank getrocknet. Für jedes Proteinpulver sind zwei Uhrglasschalen im Trockenschrank zu trocknen, im Exsikkator abzukühlen und auszuwiegen. Das Gewicht wird notiert. Während die Proben trocknen, werden die unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten eingestellt, indem mithilfe von Salzen und 100 mL demineralisiertem Wasser gesättigte Lösungen hergestellt werden [21]. Die gesättigten Lösungen werden jeweils in eine Glasschale gefüllt, welche auf den Boden eines Exsikkators gestellt wird. Wenn die Proben und die Uhrglasschalen getrocknet sind, werden jeweils 1,00 g des Proteinpulvers so auf den Uhrglasschalen verteilt, dass eine möglichst große Kontaktfläche mit der jeweils eingestellten Atmosphäre entsteht. Anschließend sind die Uhrglasschalen zusammen mit einem Hygrometer auf den Einlegeboden im Exsikkator zu platzieren. Nach Verschließen des Exsikkators ist dieser für 2 min zu vakuumieren. In den nächsten 120 h erfolgt alle 24 h eine Erfassung des Gewichts der Uhrglasschalen. Das abgelesene Gewicht wird notiert, der Exsikkator wieder verschlossen und erneut ein Vakuum angelegt. Die Menge des adsorbierten Wassers lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$m_{ads} = (m_{t=120h} - m_{t=0}) - m_U$$

Untersuchungen zur Dispergierbarkeit

Bestimmung des Dispergierbarkeits-Index: Die Vorgehensweise basiert auf der Standardmethode nach ISO 17758 | IDF 087:2014 [22], die bereits in mehreren Arbeiten Anwendung gefunden hat [21], [23], [24]. 50 mL demineralisiertes Wasser mit einer Temperatur von 25 °C werden in ein 600-mL-Becherglas gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass das Becherglas oberhalb der Wasseroberfläche trocken bleibt. Das Becherglas wird auf einen Ständer gestellt, die Wassertemperatur gemessen und eine Glasplatte so auf der Öffnung des Becherglases platziert, dass sich eine Kante der Glasplatte möglichst nah am Rand des Becherglases befindet. Ein Aliquot von 5,00 g des Proteinpulvers wird gleichmäßig auf der Glasplatte verteilt und durch die obere größere Öffnung des Trichters fixiert. Dazu muss dieser mit der großen Einfüllöffnung nach unten zeigend so über der Probe platziert werden, dass sich das gesamte Proteinpulver innerhalb der Öffnung befindet. An der unteren Auslauföffnung wird der Trichter so unter Zuhilfenahme einer Klammer am Ständer fixiert, dass die Glasplatte weggezogen werden kann und das Proteinpulver auf die Wasseroberfläche fällt. Mit Betätigen der „Start“-Taste auf der Stoppuhr beginnt die Messung. Zeitgleich ist innerhalb von 2,5 s die Glasplatte unterhalb des Trichters wegzuziehen. Innerhalb der folgenden 7,5 s (10 s auf der Stoppuhr) wird das Becherglas vom Ständer genommen und ein Spatel so in die Flüssigkeit eingetaucht, dass er den Boden des Becherglases berührt. In den nächsten 15 s (25 s auf der Stoppuhr) werden mit dem Spatel 25 vollständige Rührbewegungen ausgeführt, bevor der Ansatz für 30 s stehen gelassen wird. Sobald die Stoppuhr 55 s anzeigt, muss der Inhalt des Becherglases auf das Analysensieb gegossen und das Filtrat aufgefangen werden. Nach einer Filtration für 30 s (1,25 min auf der Stoppuhr) ist das Analysensieb zu entfernen und das aufgefangene Filtrat drei- bis viermal zu schwenken, um abgesetztes Sediment aufzuwirbeln. Unmittelbar im Anschluss erfolgt eine Überführung des Filtrats in einen Erlenmeyerkolben, der mit einem Stopfen zu verschließen ist. Nach Schütteln des Inhaltes werden 8–12 g des Filtrats unter Zuhilfenahme von Seesand auf dem elektronischen Feuchtigkeitsbestimmer getrocknet. Hierbei sind sowohl das aufgegebene Gewicht des Filtrats als auch das Endgewicht nach dem Trocknen zu notieren. Nach Beenden der Messung erfolgt die Berechnung des Dispergierbarkeits-Index DI anhand der Formel:

$$DI = \frac{50 * T}{100 - (W - T)} * \frac{100}{P}$$

Durch eine 3-wöchige Dienstreise der Masterandin von Bonn ans Fraunhofer IVV war es möglich, die Bestimmung der Dispergierbarkeit mittels Laserlichtstreuung am Mastersizer durchzuführen.

Untersuchungen zur Löslichkeit

Bestimmung des Unlöslichkeits-Index. Die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise beruht auf der Standardmethode zur Bestimmung des UI nach IDF Standard 129 A:1998 | ISO 8156:1987 [25] [24], [26]. Ein Aliquot von 6,0 g des Proteinpulvers wird zusammen mit 100 mL demineralisiertem Wasser und 2–3 Tropfen 1-Octanol in den Behälter des Thermomix gegeben und für 90 s auf Stufe 6 gemischt. Der Ansatz wird für 15 min stehen gelassen, das gebildete Sediment mit einem Spatel dispergiert und der Inhalt gleichmäßig auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Anschließend wird für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand bis 5 mL über dem Sediment dekantiert, das Zentrifugenröhrchen wieder bis zur 50-mL-Marke aufgefüllt, das gebildete Sediment mit einem Spatel dispergiert und der Ansatz erneut für 5 min zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation wird der gesamte Überstand entfernt, das Sediment in eine trockene Petrischale mit bekanntem Gewicht überführt und über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Am nächsten Tag ist die Petrischale inklusive Rückstand auszuwiegen. Die Masse des nicht gelösten Pulvers lässt sich mittels dieser Formel berechnen:

$$m_R = m_{PS+R} - m_{PS}$$

g) Schaumeigenschaften

Für die Bestimmung der Schaumeigenschaften hat sich am IVV eine Methode nach Phillips et al. [1] etabliert. Hierzu wird eine 5 %-ige Proteinsuspension bei definiertem pH-Wert in einer Planetenrührmaschine aufgeschlagen. Die Schaumeigenschaften werden dann unterteilt in die Schaumkapazität oder -aktivität und die Schaumstabilität. Die Schaumkapazität gibt hierbei eine Aussage über das im Schaum gebundene Gasvolumen, während die Schaumstabilität eine Aussage über das austretende Flüssigkeitsvolumen über einen bestimmten Zeitraum trifft (Drainage).

Neben dem Aufschlagen in einer Rührmaschine werden in der Literatur Methoden beschrieben, wo mit Einleitung eines Inertgases der Schaum generiert wird [27].

AP 4 Definition der Zielgrößen und der analytischen Methoden

Im Rahmen von AP 4 wurden verschiedene Methoden für die Analyse der obigen Zielgrößen experimentell untersucht. In diesem Bericht wird nicht auf die Entwicklung dieser Methoden, sondern lediglich auf die finalisierten Methoden zusammenfassend eingegangen.

a) Proteingehalt

Die Bestimmung des Rohproteingehalts erfolgte am IVV anhand des Gesamtstickstoffgehalts nach Dumas [2], [4], [28]. An der Universität Bonn wurden ausgewählte Proben ebenfalls mittels Dumas-Methode zum Zweck der Qualitätssicherung bestimmt. Der Vergleich zeigte keine signifikanten Abweichungen und bestätigte die Präzision des Verfahrens unter Vergleichsbedingungen (Abbildung 1).

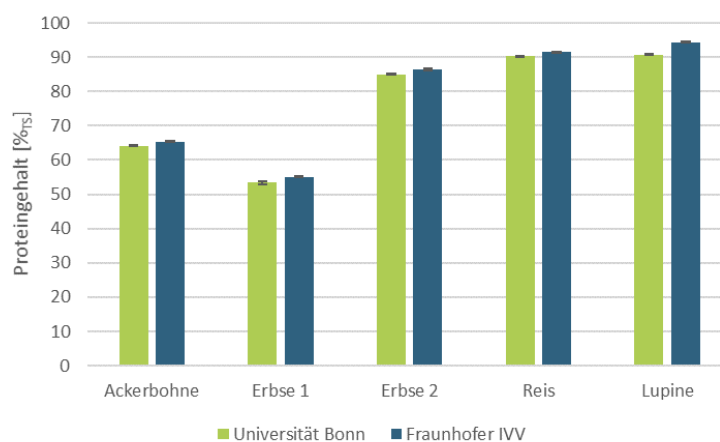


Abbildung 1: Proteingehalte ausgewählter Proteinzutaten analysiert am Standort Fraunhofer IVV und Universität Bonn – Vergleich der Dumas-Messungen

b) Fettgehalt

Die Fettgehalte wurden nach saurer Hydrolyse nach Weibull-Stoldt [6] in Anlehnung an die AOAC 963.15 bestimmt [7]. Im Gegensatz zur klassischen Variante, fand die Extraktion vollautomatisch im Soxtherm Schnell-Extraktionssystem der Firma C. Gerhardt GmbH & Co. KG statt. Da der Aufschluss der Proben sehr zeitintensiv ist und um den Umgang mit kochender Säure zu reduzieren, wurde im Rahmen einer Abschlussarbeit in Kooperation mit der Firma C. Gerhardt GmbH & Co. KG ein System zum automatisierten Säureaufschluss getestet. Die Ergebnisse dieser Abschlussarbeit zeigen, dass es durch den Einsatz des automatisierten Systems statistisch keine signifikanten Unterschiede der Messergebnisse gibt (Abbildung 2).

Dies macht den automatisierten Säureaufschluss zu einer interessanten Alternative für Projektpartner mit einem hohen Probendurchsatz.

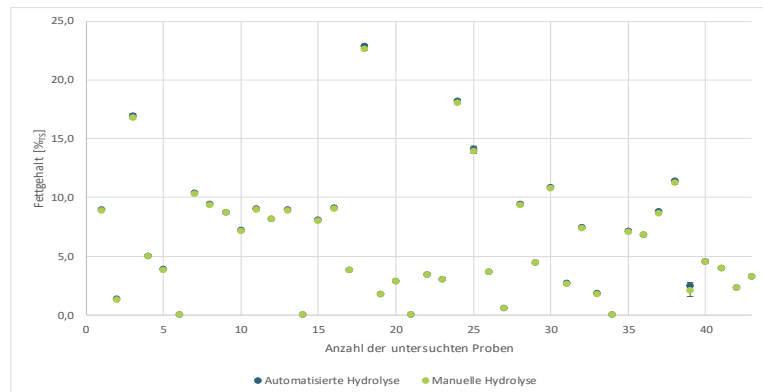


Abbildung 2: Vergleich der automatisiert und manuell durchgeführten sauren Hydrolyse nach Weibull-Stoldt

c) Aminosäurezusammensetzung

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfolgte an einer RP-HPLC mit automatisierter Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) zur Bestimmung der primären Aminosäuren und Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) zur Bestimmung der sekundären Aminosäuren (z.B. Prolin). Zur verlustfreien Erfassung aller essentiellen Aminosäuren aus den Proteinzutaten während der Probenvorbereitung mussten diese unter drei unterschiedlichen Aufarbeitungsschritten vorbereitet werden. Zur Erfassung der meisten Aminosäuren wurden die Proteinzutaten **sauer hydrolysiert**, wohingegen zur Bestimmung von Tryptophan eine **basische Hydrolyse** durchgeführt wurde. Die **saure Hydrolyse mit vorangegangener Oxidation** war notwendig zur Quantifizierung von Cystein (als Cysteinsäure) und Methionin (als Methioninsulfon). Anhand der basischen, sauren und der Kombination aus Oxidation mit der sauren Hydrolyse konnten so folgende Aminosäuren gemessen werden:

Alanin, Arginin, Cystein, Glycin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Thryptophan, Tyrosin und Valin. Auf Grund der extremen Aufschlussbedingungen während der Hydrolyse wird Arginin und Glutamin jeweils als Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Summenparameter erfasst. Die Methode wurde analog zur Methode des Projektpartners Südzucker AG aufgebaut um auch hier einen Methodenvergleich und damit auch die Präzision der Methode unter Vergleichsbedingungen gegenüber zu stellen. Zu diesem Vergleich wurde noch ein weiteres, externes Labor zur Analyse derselben ausgewählten Proben hinzugezogen. Der Vergleich der Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 3, zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Laboren.

Um den Chemikalienverbrauch zu reduzieren als auch die Probenvorbereitungszeit zu verkürzen, sollte die Methode im Rahmen einer Masterarbeit auf einen Mikrowellenaufschluss umgestellt werden. Leider zeigten die durchgeführten Versuche deutlich geringere Wiederfindungen aller Aminosäuren, weshalb der Ansatz „Nutzung der Mikrowelle für den Aufschluss“ verworfen wurde.

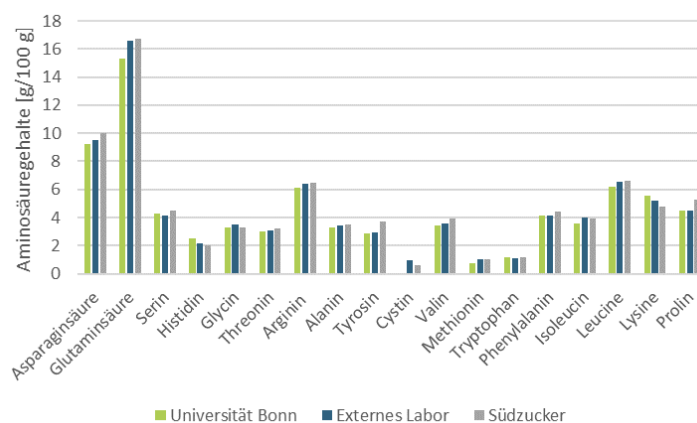


Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuregehalte einer Proteinzutat (Auswahl) analysiert an der Universität Bonn, der Südzucker AG und einem externen Analysenlabor

d) Minimale Gelbildungskonzentration

Die Bestimmung der minimalen Gelbildungskonzentration (MGK) erfolgte nach thermischer Induktion [16]. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden direkt im Reagenzglas in jeweils 5 mL demineralisiertem Wasser angesetzt. Nach Hinzugabe der Probe und des Wassers wurden die Reagenzgläser für eine Minute am Vortexmischer geschüttelt. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und mit NaOH bzw. HCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Reagenzgläser wurden verschlossen und dann für 60 Minuten bei 95°C im Schüttelwasserbad erhitzt und danach unter fließendem Wasser rasch abgekühlt (alternativ im Eiswasserbad). Im Anschluss wurden die Proben für 2 h bei 4°C gelagert. Als minimale Gelbildungskonzentration wurde die niedrigste Konzentration, bei der die Probe nicht aus dem Reagenzglas fließt, definiert. Zusätzlich wurde bei jeder Probe noch eine visuelle Bewertung hinzugefügt (flüssig, viskos, sehr viskos, minimale Gelbildungskonzentration, Gel). Wichtig ist eine Überprüfung mit dem Spatel im Reagenzglas ob die Probe tatsächlich geliert oder noch flüssig ist. Neben der minimalen Gelbildungskonzentration wurde auch die visuelle Beurteilung protokolliert, sowie Fotos der Proben mit in die Datenbank aufgenommen.

Zur Qualitätskontrolle der minimalen Gelbildungskonzentration wurde ebenfalls ein Vergleich zwischen dem Fraunhofer IVV und der Universität Bonn anhand ausgewählter Proteinzutaten durchgeführt, da die Methode einen gewissen subjektiven Einfluss des jeweiligen Labormitarbeitenden aufweist. Die Ergebnisse des Vergleiches zeigen jedoch, dass die vorher festgelegten Standard Operation Procedures (SOP) helfen hier die Varianzen gering zu halten (Abbildung 4).

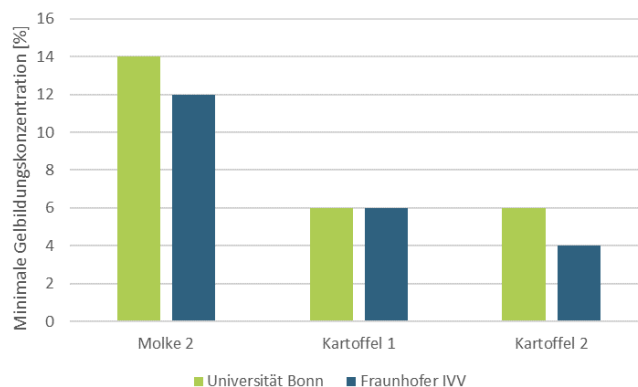


Abbildung 4: Vergleich ausgewählter Proteinzutaten zur Bestimmung der minimalen Gelbildungskonzentration zwischen dem Fraunhofer IVV und der Universität Bonn

e) Schaumeigenschaften

Die Schaumeigenschaften wurden zu Beginn, in Anlehnung an die Methode nach Phillips et al., ermittelt [1]. Die Herstellung der Schäume erfolgte durch Dispergieren des Proteins (5 % (w/w) in 100 mL demineralisiertem Wasser (ggf. pH-Wert einstellen, 15 min rühren). Dann erfolgte das Aufschlagen der Dispersion in z.B. einer Universalküchenmaschine Hobart N 50 oder vergleichbar (Stufe 3, 8 min). Die Bestimmung der Schaumaktivität erfolgte über Messung der Schaumhöhe (zur Berechnung des Schaumvolumens bei bekannter Schüsselgeometrie). Die Schaumaktivität kann anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Schaumaktivität}[\%] = \frac{\text{Volumen}_{\text{Schaum nach Aufschlagen}}}{\text{Volumen}_{\text{Proteinklösung vor Aufschlagen}}} * 100$$

Außerdem wurde für die Bestimmung der Schaumstabilität das Schaum- und Flüssigkeitsvolumen in einem zu to bis zur Markierung befüllten Messzylinder nach 60 Minuten gemessen. Die Berechnung der Stabilität erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Schaumstabilität bei RT} [\%] = \frac{\text{Schaumvolumen nach 60 min}[\text{mL}] * 100}{250 \text{ mL Schaum nach Aufschlagen}}$$

Für die Bestimmung der Schaumdichte als Zielgröße wurde ein Aliquot des Schaums in einen Messzylinder überführt und das Gewicht ermittelt.

Im Rahmen der Evaluierung der Messmethode wurden wichtige Methodenparameter variiert. So zeigte sich, dass die eingesetzte Probenmenge proportional zum entstehenden Schaumvolumen ist. Eine Verdoppelung des Probenvolumens führt also zu der doppelten Menge an Schaum (Abbildung 5), wodurch es möglich ist durch Erhöhung der Probenmenge die Messgenauigkeit positiv zu beeinflussen. Unterschiedliche Konzentrationen an Proteinzutat zeigten ebenfalls einen Einfluss auf die Struktur des entstehenden Schaums, so dass in Folge auch die Schaumdichte und Schaumstabilität beeinflusst wurde.

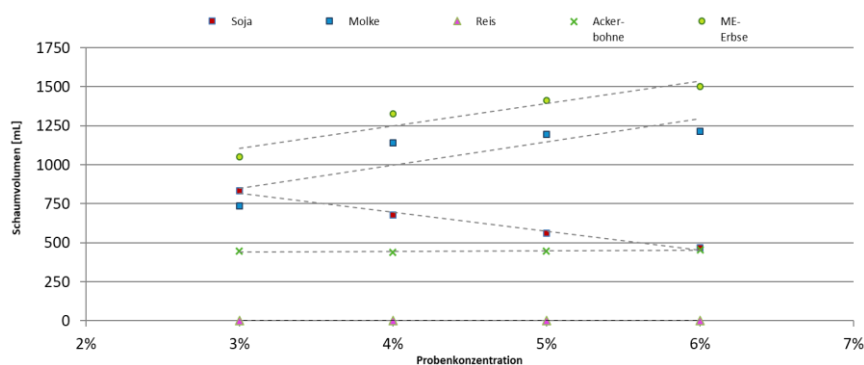


Abbildung 5: Abhängigkeit des Schaumvolumens von der Probenkonzentration

Messungen mit den in Abbildung 5 gelisteten Proteinen zeigten einen deutlichen Einfluss des pH-Wertes auf Schaumaktivität und -dichte. Hier zeigte sich bei den meisten, je saurer der pH-Wert desto höher wurde die Schaumaktivität und desto geringer wurde die Dichte. Im Bereich von pH 4-5, wo auch der isoelektrische Punkt vermutet wird, zeigte dieses Verhalten eine Ausnahme. Ebenso änderte die Zugabe von Natriumchlorid zu den Proteinsuspensionen dieses Verhalten. Bei Reisprotein verhielt es sich genau andersherum. Dadurch wurde nochmal bestätigt, dass es unerlässlich ist die Schaumeigenschaften unter unterschiedlichen Bedingungen zu bestimmen.

Da die Rührschüssel ein sehr großes Volumen hat und die Bestimmung der Schaumaktivität über Höhenmessung erfolgt, führt dies zu relativ hohen Messungenauigkeiten. Außerdem ist vor allem bei instabilen Schäumen der Umfüllvorgang zur Bestimmung der Schaumstabilität und –dichte kritisch, da die Schäume dabei zerstört werden können. Da außerdem sehr viele manuelle Handgriffe nötig sind, hat sich herausgestellt, dass die Reproduzierbarkeit bei Durchführung durch unterschiedliche Labormitarbeitende leidet. Beim 3. Verbundtreffen wurde daher in Abstimmung mit den Projektpartnern entschieden die Analysen der Schäume in Zukunft mit dem Dynamic Foam Analyzer 100 der Firma Krüss durchzuführen. Als Methode der Schaumerzeugung wurde das Einblasen eines Luftstroms gewählt. Hiermit ist es möglich den Schaum entweder per Luftstrom, per Inertgas oder durch Rühren zu erzeugen. Über Höhendetektion können so reproduzierbare Aussagen über Schaumkapazität und –stabilität getroffen werden. Durch ein zusätzliches Kamerasystem kann außerdem die Schaumstruktur hinsichtlich Blasengröße und –verteilung untersucht werden. Die Messung erfolgt vollkommen automatisiert. 76 der Proteinzutaten wurden bei pH 4 und 7 mittels dieser Methode gemessen.

Nach Vorstellung erster Ergebnisse beim 4. Verbundtreffen wurde im Nachgang entschieden mit dieser Methode noch die restlichen Proben jeweils bei pH 4 und 7 zu untersuchen und dann wieder auf die alte Messmethode über zu gehen. Trotz der vollständigen Automatisierung war besonders die Messung der Schaumstruktur aufgrund der hohen ermittelten Standardabweichungen nicht zufriedenstellend. Auch bei der Messung der Schaumhöhe kam es bei vielen Proben aufgrund des hohen Anteils nicht gelöster Probenbestandteile zu Fehlmessungen und damit vielen Proben, die mit dieser Methode nicht bestimmbar waren. In Summe waren 35 der 76 Proteinzutaten mit der Luftstrommethode nicht bestimmbar. Um die Messungen nach der alten Methode vergleichbarer zu machen, wurde der Universität Bonn vom Fraunhofer IVV eine baugleiche Küchenmaschine (Hobart N50) zur Verfügung gestellt. Durch diese Maßnahme und durch intensive Schulung der Mitarbeitenden wurden die vorher aufgetretenen Fehler minimiert. Bis zum Projektende wurden die Proteinzutaten mit der alten Methode auf ihre Schaumeigenschaften bei den pH-Werten 4 und 7 gemessen.

f) Hydratationseigenschaften

Aufgrund bereits ausgeschöpfter Ressourcen an der Universität Bonn, wurden die Hydratisierungseigenschaften am Fraunhofer IVV fertig gestellt. Die Methoden, die im Rahmen einer Masterarbeit an der Universität Bonn optimiert wurden, wurden dem Fraunhofer IVV bereits übergeben.

AP 5 Beschaffung und Bewertung nachhaltiger Proteine

Die Beschaffung und Verteilung der Proteine an die Projektpartner wurde vom Fraunhofer IVV übernommen. Zum Ende des Projektes standen der Universität Bonn 91 unterschiedliche Proteinzutaten zur Verfügung. Einige dieser Proben wurden aufgrund geringer Mengen an Probenmaterial nur auf Ihre Aminosäurezusammensetzung analysiert. Im nachfolgenden sollen die Ergebnisse der Universität Bonn aufgeführt werden.

a) Proteingehalt

Bis zum Projektende sind alle beschafften Proteinzutaten auf ihren Proteingehalt hin untersucht worden. Die untersuchten Proteinzutaten zeigen eine große Varianz in ihren Proteingehalten und schwanken zwischen 22,7 %_{TS} und 99,6 %_{TS} (Abbildung 6). Diese große Varianz zeigt die Vielfältigkeit der auf dem

Markt verfügbaren Proteinzutaten und gab dem Projekt die Möglichkeit, Proteinzutaten aus den drei Kategorien (Proteinmehle, -Proteinkonzentrate, -Proteinisolate) in einer großen Anzahl zu analysieren.

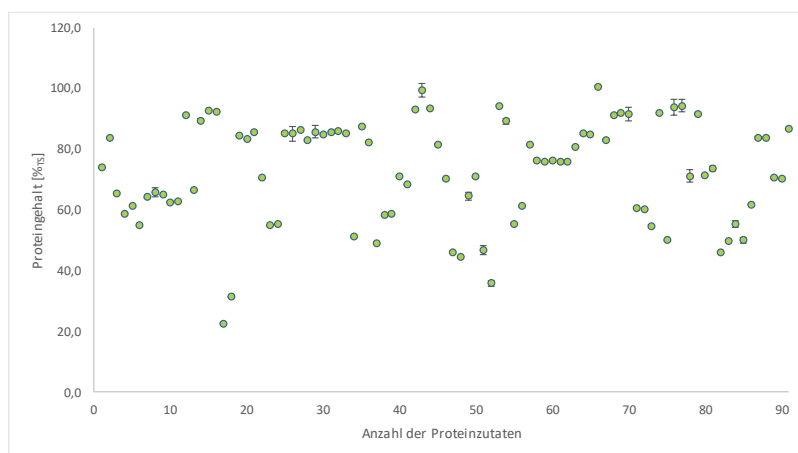


Abbildung 6: Proteingehalte der im Rahmen des Projekts untersuchten Proteinzutaten. Die Gehalte sind bezogen auf den Trockensubstanzgehalt [%_{TS}]

b) Fettgehalt

Der Fettgehalt der untersuchten Proben bezogen auf die Trockensubstanz lag im Bereich von 0,1 % bis zu 22,6 % (Abbildung 7).

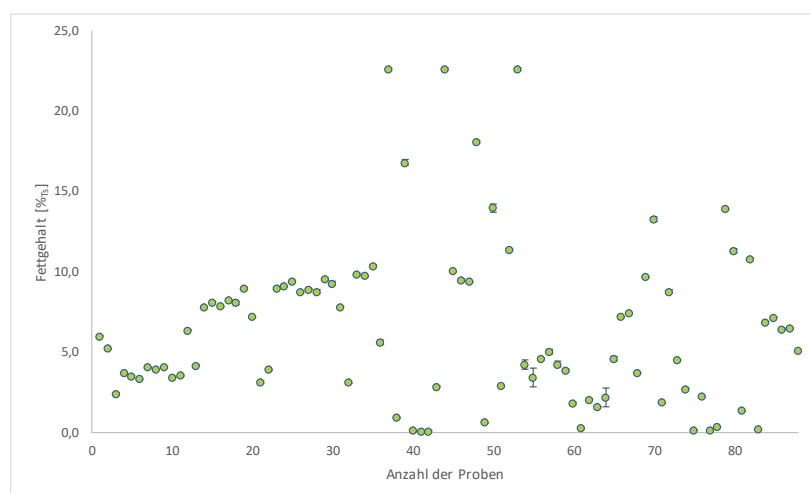


Abbildung 7: Fettgehalte der im Rahmen des Projekts untersuchten Proteinzutaten. Die Gehalte sind bezogen auf den Trockensubstanzgehalt [%_{TS}]

Sortiert man Proteinzutaten nach ihrer Quelle, aus der sie gewonnen wurden, wird deutlich, dass innerhalb einer Gruppe die Fettgehalte mehr als 20 % (Abbildung 8, Beispiel Hanf) oder auch bis über das 100-fache (Abbildung 8, Beispiel Soja) schwanken können. Dies liegt daran, dass diese Rohstoffe natürlicherweise einen hohen Fettgehalt mit sich bringen und dieser durch das Prozessieren der Rohstoffe bei der Herstellung der Proteinzutaten unterschiedlich abgereichert wird. Bei fettärmeren Rohstoffen zeigten sich geringere Abweichungen in den Fettgehalten. (Abbildung 8, Beispiel Weizen).

Der Median bezüglich des Fettgehaltes aller Proteinzutaten liegt bei 6,5 %_{TS} und der Interquartilsabstand der Daten liegt zwischen 3,1 und 9,1 %_{TS}. Interessant bei dieser Betrachtung ist, dass drei Proteinzutaten mit Fettgehalten von 18,1 %_{TS} (Kurzflügelgrille) und jeweils 22,6 %_{TS} (Kichererbse und Hanf) nach oben hin ausreißen.

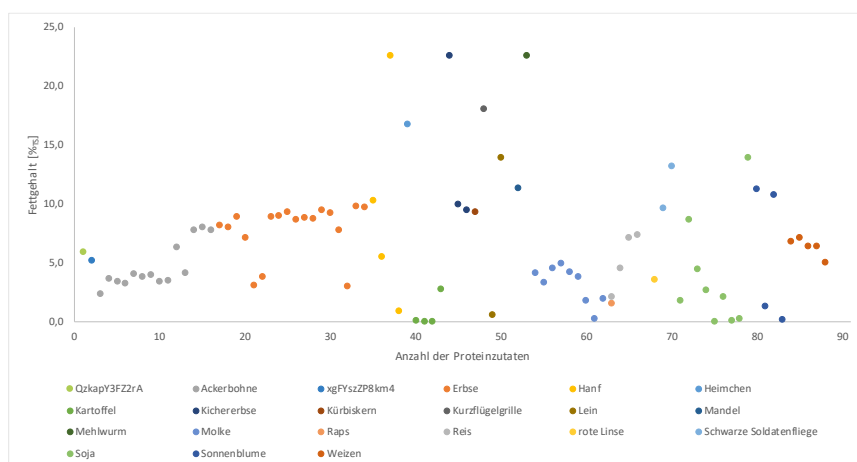


Abbildung 8: Fettgehalte der Proteinzutaten sortiert nach der Quelle, aus der diese gewonnen wurden. Die Gehalte sind bezogen auf den Trockensubstanzgehalt.

c) Aminosäurezusammensetzung

Bis zum Projektende wurden 90 Proteinzutaten auf ihre Aminosäurezusammensetzung mittels der in AP4 c) aufgeführten Hydrolysen analysiert. Die prozentuale Zusammensetzung der Aminosäuren im Protein der jeweiligen Proteinzutaten sind in nachfolgender Abbildung aufgeführt (Abbildung 9).

Eine etwas anschaulichere Darstellung der Verteilung der jeweiligen Aminosäuren in den Proteinzutaten soll Abbildung 10 liefern. Diese Abbildung zeigt auf, dass in allen Proteinzutaten die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin als auch die hydrophobe Aminosäure Tryptophan die limitierenden Aminosäuren sind. Die Gehalte für Cystein schwanken zwischen 0,13 bis 2,19 g/100g, für Methionin zwischen 0,27 bis 2,25 g/100g und für Tryptophan zwischen 0,28 bis 1,71 g/100g. Hierbei weist eines der beiden Chlorellapräparate die niedrigsten Cystein- als auch Tyrptophangehalte auf. Wohingegen der niedrigste Gehalt an Methionin in dem Mandelzutat nachgewiesen wurde. Weiterhin kann der Abbildung xx entnommen werden, dass für nahezu allen Proteinzutaten die Summe an Glutamin und Glutaminsäure die dominierende Aminosäure ist. Mit 1,07 g/100g weist auch hier das Chlorellapräparat den geringsten Summenwert aus Glutamin und Glutaminsäure auf. Der Höchstgehalt an Glutaminsäure wird in einem der Weizenzutaten nachgewiesen mit 31,99 g/100g.

Die Betrachtung der einzelnen Aminosäuregehalte in den jeweiligen Proteinzutaten gibt weiterhin Auskunft über die Unterschiede innerhalb der Zutaten, die aus denselben Rohstoffen gewonnen wurden. So zeigt sich, dass die prinzipielle Verteilung der Aminosäuren in den jeweiligen Zutaten vom Aminosäuremuster her ähnlich ist, jedoch die absoluten Gehalte stark schwanken können. Dies kann daran liegen, dass bei der Herstellung der Proteinzutaten unterschiedliche Spezies oder Varietäten zum Einsatz kamen oder die Herstellungsverfahren entsprechend unterschiedlich sind. Große Unterschiede zeigen sich vor allem bei den Aminosäuren Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin und Lysin (Abbildung 10).

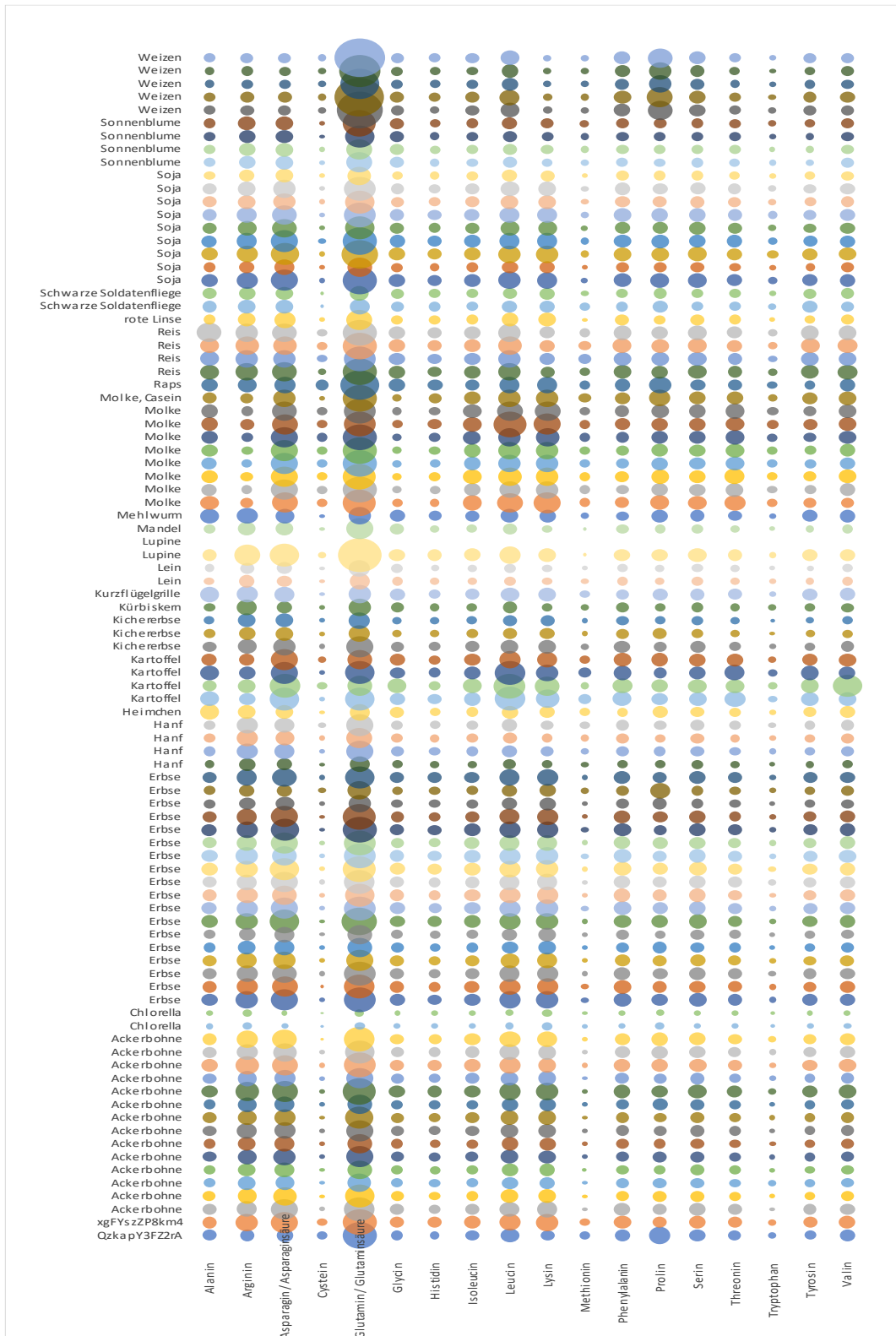


Abbildung 9: Prozentuale Aminosäureverteilung in den jeweiligen Proteinzutaten

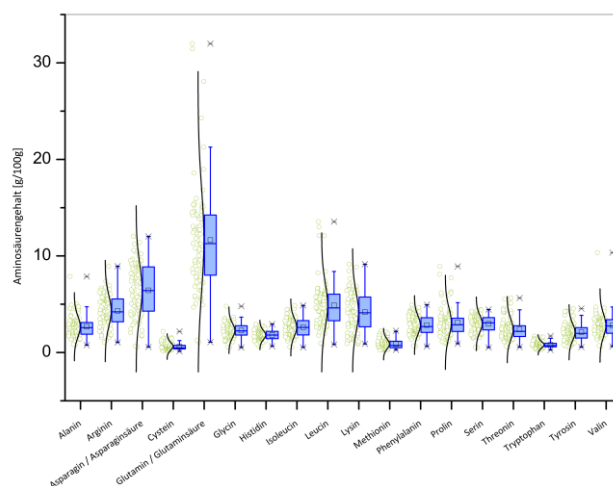


Abbildung 10: Box-Whisker-Plots der Aminosäuregehalte und die Verteilung dieser Gehalte

d) Minimale Gelbildungskonzentration

Bis zum Projektende wurden 79 Proteinzutaten bei pH 4 und 85 Proteinzutaten bei pH 7 auf ihre minimale Gelbildungskonzentration (MGBK) ohne Salzzugabe bestimmt. Die Bestimmung der minimalen Gelbildungskonzentration mit Salzzugabe konnte aus zeitlichen Gründen und aus Mangel an Ressourcen nicht mehr durchgeführt werden. Die Untersuchungen auf die minimale Gelbildungskonzentration benötigt viel Probenvolumen und es war leider nicht möglich immer ausreichend Probemenge von den jeweiligen Lieferanten zu erhalten. Zu den Proben, die nicht gemessen werden konnten, zählen: die zwei Algen-, zwei Erbsen-, zwei Weizen-, zwei Molke-, ein Soja-, ein Insekten-, ein Hanf und ein Lupinenpräparate.

Die Proteinzutaten wiesen bei einem eingestellten pH von 4 größtenteils MGBK zwischen 10 und 20 % (w/w) auf. Lediglich die drei Kartoffelzutaten und eine Leinzutat zeigten einen MGBK zwischen 2 und 4 %. Bei pH 7,0 lagen die durchschnittlichen MGBK im Bereich von 6 und 9 %. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei einem pH-Wert von 4,0 schon eine Denaturierung der Proteine durch die Absäuerung stattgefunden hat, weshalb durch die anschließende thermische Behandlung die Proteine nicht weiter aufgefaltet werden konnten und dadurch mehr Menge an Protein notwendig war um gelartigen Eigenschaften der Proteine zu erzeugen.

Es ist jedoch hervorzuheben, dass von 42 der 79 Proteinzutaten bei einem pH-Wert von 4 bis zu einer Konzentration von 20% (w/w) keine MGBK bestimmt werden konnte. Bei einem pH-Wert von 7 konnten bei 29 Proteinzutaten (von den untersuchten 85 Zutaten) keine MGBK ermittelt werden. Bei drei Zutaten (Ackerbohne, Lupine, Erbse) konnte sowohl bei pH 4 als auch bei pH 7 keine MGBK ermittelt werden.

e) Schaumeigenschaften

Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Krüss DFA 100 wurden zum Ende des Projektes nicht mehr dargestellt und nach Abstimmung mit den Projektpartnern aufgrund ihrer geringen Aussagekraft auch nicht mehr in die Datenbank übernommen. Somit sind hier nur noch die Ergebnisse mittels der Aufschlagmethode aufgeführt. Bis zum Projektende wurden 79 Proben bei pH 4 und einer Salzzugabe von jeweils 1 und 2 % auf ihrer Schaumeigenschaften hin analysiert worden. Bei einem pH-Wert von 7 wurden 84 Proben analysiert unter Zugabe von 1%, 2 % Salz und auch ohne Salzzugabe.

Die meisten Proteinzutaten wiesen Schaumaktivitäten im Bereich von 0 bis 1000 % auf. Ein paar wenige Zutaten wiesen Schaumaktivitäten über 1000 % und bis über 2500 % auf. Bei diesen Zutaten handelt es sich um eine Ackerbohnen- und drei Kartoffelzutaten. Weiterhin zeigten zwei Soja- und eine Rapszutat unter bestimmten Bedingungen ebenfalls Schaumaktivitäten von über 1000 %. Für viele der Proben ist eine Abnahme durch die Steigerung der Salzzugabe zu verzeichnen. Bei der Betrachtung der Schaumaktivität ist zu erkennen, dass Proben aus der gleichen Quelle nicht die gleiche Schaumaktivität aufwiesen. Dieser Unterschied kann wie beim Beispiel Kartoffel einen Faktor um das 20-fache ausmachen.

Die Schaumdichte hingegen zeigt keine so großen Unterschiede. Die meisten Proben wiesen eine Schaumdichte im Bereich von 100 bis 300 g/L auf, wobei die höchste Dichte immer bei pH 7 ohne Salzzugabe der jeweiligen Probe gemessen wurde. Eine Weizenzutat hingegen wies bei pH-Wert 7 unabhängig vom Salzgehalt Schaumdichten von über 400 g/L auf und eine Erbsenzutat von über 500 g/L bei pH 7 ohne Salzzugabe. Durch Salzzugabe wurde die Dichte erniedrigt und dazu wurden niedrigere Dichten bzw. keine Dichten bei pH 4 gemessen im Vergleich zu den jeweiligen Messbedingungen bei pH 7. Dies verdeutlicht eine pH als auch salzabhängige Bildung der Schaumdichte.

Die Schaumstabilität unterteilt sich ungefähr in zwei Bereiche. Entweder bilden die Proben keine stabilen Schäume oder ihre Stabilität lag zwischen 80 bis 100 %. Lediglich ca. 15 % der Messungen zur Schaumstabilität unter den diversen Bedingungen wiesen Werte zwischen 20 und 80 % auf.

Die Untersuchungen zu den Schaumeigenschaften zeigten auf, dass die Proteinzutaten sich erheblich voneinander unterscheiden als auch Proteinzutaten aus den gleichen Quellen große Unterschiede aufwiesen.

Referenzen

- [1] L. G. Phillips, Z. Haque, and J. E. Kinsella, 'A Method for the Measurement of Foam Formation and Stability', *Journal of Food Science*, vol. 52, no. 4, pp. 1074–1077, Jul. 1987, doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb14279.x.
- [2] J. B. Dumas, 'Procedés de l'analyse organique', *Ann. Chim. Phys.*, no. 47, pp. 198–205, 1831.
- [3] AOAC 968.06, 'Protein (Crude) in animal feed. Dumas method'. 1969.
- [4] BVL L 01.00-60, 'Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Stickstoffgehaltes in Milch und Milchprodukten - Verfahren nach Dumas'. Dec. 2002.
- [5] AOAC 2001.11, 'Protein (crude) in animal feed, Forage (plant)'. 2005.
- [6] W. Stoldt, 'Fettbestimmung in Lebensmitteln', *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, vol. 45, no. 2, pp. 41–46, 1949.
- [7] AOAC 963.15, 'Fat in Cacao Products - Soxhlet Extraction Met'. 1973.
- [8] AOAC 991.36, 'Fat(Crude) in Meat and Meat Products - Solvent'. 1996.
- [9] BVL L 07.00-21, 'Reduktometrische Bestimmung der Summe reduzierender Kohlenhydrate und anderer reduzierender Stoffe nach Hydrolyse in Fleischerzeugnissen'. Sep. 2010.
- [10] R. Matissek, G. Steiner, and M. Fischer, *Lebensmittelanalytik*. in Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-34829-7_1.
- [11] H. -O. Beutler, 'Enzymatische Bestimmung von Stärke in Lebensmitteln mit Hilfe der Hexokinase-Methode', *Starch Stärke*, vol. 30, no. 9, pp. 309–312, Jan. 1978, doi: 10.1002/star.19780300906.
- [12] D. Keppler and K. Decker, *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., vol. VI. Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel: Chemie, 1984.
- [13] H. N. Englyst, S. M. Kingman, and J. H. Cummings, 'Classification and measurement of nutritionally important starch fractions', *Eur J Clin Nutr*, vol. 46 Suppl 2, pp. S33-50, Oct. 1992.
- [14] J. Lopez-Hernandez, M. J. Gonzalez-Castro, M. E. Vazquez-Blanco, M. L. Vazquez-Oderiz, and J. Simal-Lozano, 'HPLC Determination of Sugars and Starch in Green Beans', *Journal of Food Science*, vol. 59, no. 5, pp. 1048–1049, Sep. 1994, doi: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb08186.x.
- [15] Council of Europe, *European pharmacopoeia*, vol. 5th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.

- [16] S. K. Sathe, S. S. Deshpande, and D. K. Salunkhe, 'Functional Properties of Winged Bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] Proteins', *Journal of Food Science*, vol. 47, no. 2, pp. 503–509, Mar. 1982, doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb10112.x.
- [17] M. Britten and H. J. Giroux, 'Acid-induced gelation of whey protein polymers: effects of pH and calcium concentration during polymerization', *Food Hydrocolloids*, vol. 15, no. 4–6, pp. 609–617, Jul. 2001, doi: 10.1016/S0268-005X(01)00049-2.
- [18] Y. Fang, C. Selomulya, and X. D. Chen, 'On Measurement of Food Powder Reconstitution Properties', *Drying Technology*, vol. 26, no. 1, pp. 3–14, Dec. 2007, doi: 10.1080/07373930701780928.
- [19] GEA Group, 'A 5a Wettability: GEA Niro Method No. A 5a'. Jan. 2024. Accessed: Jul. 09, 2024. [Online]. Available: <https://www.gea.com/en/assets/170137/>
- [20] J. Ji, J. Fitzpatrick, K. Cronin, A. Crean, and S. Miao, 'Assessment of measurement characteristics for rehydration of milk protein based powders', *Food Hydrocolloids*, vol. 54, pp. 151–161, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.09.027.
- [21] J. Ji, K. Cronin, J. Fitzpatrick, M. Fenelon, and S. Miao, 'Effects of fluid bed agglomeration on the structure modification and reconstitution behaviour of milk protein isolate powders', *Journal of Food Engineering*, vol. 167, pp. 175–182, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.01.012.
- [22] ISO/TS 17758 | IDF/RM 87, 'Bestimmung der Dispergierbarkeit und Benetzbarkeit von Instantmilchpulver'. Jun. 2014.
- [23] I. Boiarkina, N. Depree, W. Yu, D. I. Wilson, and B. R. Young, 'Rapid particle size measurements used as a proxy to control instant whole milk powder dispersibility', *Dairy Sci. & Technol.*, vol. 96, no. 6, pp. 777–786, Feb. 2017, doi: 10.1007/s13594-016-0302-5.
- [24] T. Fournaise, J. Burgain, C. Perroud, J. Scher, C. Gaiani, and J. Petit, 'Impact of formulation on reconstitution and flowability of spray-dried milk powders', *Powder Technology*, vol. 372, pp. 107–116, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.powtec.2020.05.085.
- [25] ISO 8156 | IDF 129, 'Dried milk and dried milk products - Determination of insolubility index'. 2005.
- [26] Codex Alimentarius Commission, 'Report of the 20th Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling', 1995. [Online]. Available: <https://www.fao.org/4/v9021e/v9021e00.htm>
- [27] S. Damodaran, 'Structure-Function relationship of food proteins', in *Protein Functionality in Food Systems*, 0 ed., CRC Press, 1994. doi: 10.1201/9781482293517.
- [28] DIN EN ISO 16634-2:2016-11, 'Lebensmittelerzeugnisse - Bestimmung des Gehaltes an Gesamtstickstoff mit dem Verbrennungsverfahren nach Dumas und Berechnung des Gehaltes an Rohprotein - Teil 2: Getreide, Hülsenfrüchte und gemahlene Getreideerzeugnisse'.