

Herstellung von Rapsproteinprodukten für die Fischernährung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieurin

(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. Halime Nihat Adem

geb. am 17.10.1984 in Razgrad, Bulgarien

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Lothar Mörl

Prof. Dr. Carsten Schulz

Dr.-Ing. Frank Pudel

eingereicht am: 02.11.2012

Promotionskolloquium am: 18.03.2013

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Doktorandin in der Forschungseinrichtung Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg (PPM) e.V. begleitend zu meiner Anstellung bei der Gesellschaft für Marine Aquakultur (GMA) mbH in Büsum im Rahmen eines Verbundvorhabens mit der GMA mbH und des PPM e.V..

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Carsten Schulz und Herrn Dr.-Ing. Frank Pudel für die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Projektbearbeitung. Für die fachliche Betreuung sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich recht herzlich.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Lothar Mörl für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit und seinen steten wissenschaftlichen Rat.

Herrn Dr.-Ing. Ralf-Peter Tressel, Herrn Dr.-Ing. Karl-Heinz Leidt und Herrn MSc. Jesus Palomino Oviedo danke ich für fachliche Diskussionen jeglicher Art, die sehr hilfreich beim Vorantreiben meiner Forschungen waren.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen vom PPM möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Weiterer Dank gilt den Kollegen vom GMA für die hervorragende Zusammenarbeit und den wertvollen wissenschaftlichen Austausch.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemischen Apparatebau möchte ich meinen Dank zum Ausdruck bringen.

Frau Prof. Dr. Krassimira Idakieva danke ich herzlich für die fachliche und moralische Unterstützung.

Dem Europäischen Fischereifond und dem Zukunftsprogramm Fischerei des Landes Schleswig-Holsteins danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung, Motivation und Geduld bedanken.

Die vorliegende Dissertation wurde ermöglicht durch:



Europäischer Fischereifond (EFF)
Zukunftsprogramm Fischerei des Landes Schleswig-Holsteins



Gesellschaft für Marine Aquakultur (GMA) mbH



Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg (PPM) e.V.



Institut für Apparate- und Umwelttechnik (IAUT)

Meiner Mutter gewidmet

Kurzzusammenfassung

Englisch:

The continuously diminishing fish meal supplies are forcing aquaculture industry to look for new sustainable plant protein sources, which could replace the limited marine resource. The high biological value due to its well-balanced amino acid profile, the market availability and lower price of rapeseed meal make the rapeseed protein an attractive protein source as fish meal alternative. The protein-rich rapeseed meal has great potential as an alternative protein source for the fish nutrition. However, its utilizability in fish feeds is limited by antinutritional plant compounds.

To achieve higher fish meal replacement levels, the rapeseed meal has to be processed into protein products. Therefore, this thesis work undertook investigations on the preparation of rapeseed proteins and developed manufacturing process of high quality rapeseed protein products, which can be used in fish nutrition. From the point of view of development of new gentle meal processing and protein extraction procedures with high yield and quality, suitable rapeseed protein processing methods have been studied, which take into account the specific characteristics of rapeseed protein.

Technological processes for the production of rapeseed protein concentrates, fractionated rapeseed protein products such as albumin and globulin concentrates and rapeseed protein isolates were developed.

The production processes have been evaluated regarding to the protein quality and yield. The protein products derived from the investigated processing techniques have been characterized with respect to their nutritional value and product properties. The potential of the obtained rapeseed protein products as fish meal substitute in aquafeeds was evaluated, especially in the nutrition of rainbow trout, the rapeseed protein concentrate was identified as an excellent fishmeal alternative.

Deutsch:

Die zunehmend knapp werdenden Fischmehlvorräte zwingen die Aquakulturindustrie zur Suche nach neuen nachhaltigen Futterrohstoffen. Die hohe biologische Wertigkeit aufgrund der ausgewogenen und hochwertigen Aminosäurezusammensetzung, die Verfügbarkeit und die hohe Preiswürdigkeit der Rapsschrote machen die Rapsproteine als Fischmehlalternativa für die nachdrücklich proteinbedürftige Aquakulturindustrie sehr attraktiv. Die proteinreichen Rapsschrote haben hohes Potenzial als alternative Proteinquelle für die Fischernährung. Allerdings ist ihre Einsetzbarkeit im Fischfutter aufgrund der antinutritiven Pflanzeninhaltsstoffe beschränkt.

Um höhere Fischmehlaustauschraten zu erreichen, sollen die Rapsschrote zu Proteinprodukten verarbeitet werden. In dieser Arbeit wurden die Herstellungsverfahren von hochwertigen Rapsproteinprodukten untersucht, welche als Proteinrohstoff im Aquafeed verwendet werden. Es wurden geeignete Verfahren für die Proteingewinnung aus Raps unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung von neuen proteinschonenden Saatverarbeitungstechnologien und qualitäts- und ausbeuteorientierten Proteinextraktionsverfahren untersucht, welche die Besonderheiten der Rapsproteine berücksichtigen.

Technologische Verfahren zur Gewinnung von Rapsproteinkonzentraten, fraktionierten Rapsproteinprodukten wie Globulin- und Albuminkonzentraten und Rapsproteinisolaten wurden erarbeitet.

Die Herstellungsverfahren wurden hinsichtlich der Proteinqualität und -ausbeute bewertet. Die gewonnenen Proteinprodukte aus den untersuchten Verarbeitungsmethoden wurden hinsichtlich ihrer ernährungsphysiologischen Eigenschaften und Produkteigenschaften charakterisiert und als Fischmehlsubstitut für die Fischernährung evaluiert. Besonders das Rapsproteinkonzentrat wurde für die Ernährung von Regenbogenforellen als hervorragende Fischmehlalternative identifiziert.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	II
KURZZUSAMMENFASSUNG	V
NOMENKLATUR.....	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Motivation	1
1.2. Kenntnisstand über den Einsatz des Rapsproteins in der Fischernährung.....	4
1.3. Zielstellung.....	7
2. STAND DES WISSENS.....	10
2.1. Chemische Zusammensetzung der Rapssaat	10
2.2. Nutritive Inhaltsstoffe	11
2.2.1. Speicherfett.....	11
2.2.2. Speicherprotein.....	12
2.3. Antinutritive Inhaltsstoffe	14
2.3.1. Glucosinolate.....	14
2.3.2. Phytinsäure	17
2.3.3. Phenolische Verbindungen (Sinapine und Tannine)	18
2.4. Kommerzielle Rapsverarbeitung	21
2.4.1. Zentrale Ölmühlen.....	23
2.4.2. Dezentrale Ölmühlen.....	25
2.5. Verfahren zur Proteingewinnung aus Raps.....	25
3. EXPERIMENTELLE ARBEITEN	30
3.1. Analysemethoden.....	30
3.1.1. Trockensubstanz	30
3.1.2. Rohproteingehalt	30
3.1.3. Rohfettgehalt	30
3.1.4. Rohfasergehalt.....	30
3.1.5. Rohaschegehalt.....	30

3.1.6.	Stickstofffreie Extrakt (NfE)-Gehalt	31
3.1.7.	Salzgehalt	31
3.1.8.	Glucosinolatgehalt.....	31
3.1.9.	Phytinsäuregehalt	31
3.1.10.	Sinapinsäuregehalt.....	31
3.1.11.	Tannin-Gehalt.....	32
3.1.12.	Myrosinaseaktivität	32
3.1.13.	Aminosäurezusammensetzung	33
3.1.14.	Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE	33
3.2.	Charakterisierung der Produkteigenschaften	35
3.2.1.	Thermodynamische Eigenschaften (Proteindenaturierung) mittels DSC.....	35
3.2.2.	Technofunktionelle Eigenschaften (Proteinlöslichkeit) mittels PDI	35
3.2.3.	Anwendungstechnische Eigenschaften (Korngrößenverteilung) mittels HELOS- Partikelgrößenanalyse.....	35
3.2.4.	Oberflächeneigenschaften (Oberflächenstruktur) mittels Rasterelektronenmikroskops (REM)	36
3.3.	Versuchsmaterial.....	36
3.4.	Versuchs- und Verfahrensplanung.....	37
3.5.	Versuchsdurchführung.....	38
3.5.1.	Konditionierung.....	38
3.5.2.	Pressung.....	39
3.5.3.	Presskuchenzerkleinerung	39
3.5.4.	Hexanextraktion	39
3.5.5.	Desolventisierung	40
3.5.6.	Ethanolextraktion	42
3.5.7.	Schrotvermahlung	42
3.5.8.	Proteinextraktion	43
3.5.9.	Trennung der Proteinlösung	43
3.5.10.	Ultrafiltration/Diafiltration	44
3.5.11.	Präzipitation.....	44
3.5.12.	Trocknung	45
3.5.12.1.	Sprühtrocknung	45
3.5.12.2.	Gefriertrocknung	45

4. UNTERSUCHUNGEN ZUR HERSTELLUNG VON RAPSPROTEINPRODUKTEN.....	46
4.1. Herstellung von Rapsproteinkonzentrat	46
4.1.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens.....	46
4.1.1.1. Schrotaufbereitung	46
4.1.1.2. Proteinaufbereitung	53
4.1.1.3. Ausbeutekalkulation	60
4.1.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften	62
4.1.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe	62
4.1.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren.....	63
4.1.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen	65
4.1.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften.....	66
4.1.3.1. Thermodynamische Eigenschaften.....	66
4.1.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften	68
4.2. Herstellung von Globulin- und Albuminkonzentraten	71
4.2.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens.....	71
4.2.1.1. Schrotaufbereitung	71
4.2.1.2. Proteinaufbereitung	72
4.2.1.3. Ausbeutekalkulation	76
4.2.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften	79
4.2.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe	79
4.2.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren.....	80
4.2.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen	82
4.2.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften.....	83
4.2.3.1. Thermodynamische Eigenschaften.....	83
4.2.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften	84
4.3. Herstellung von Rapsproteinisolat.....	87
4.3.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens.....	87
4.3.1.1. Schrotaufbereitung	87
4.3.1.2. Proteinaufbereitung	87
4.3.1.3. Ausbeutekalkulation	97
4.3.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften	103
4.3.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe	103
4.3.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren.....	104
4.3.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen	105
4.3.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften.....	106
4.3.3.1. Thermodynamische Eigenschaften.....	106
4.3.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften	107

5. OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN HINSICHTLICH DER PROTEINAUSBEUTE	108
6. BEWERTUNG DES ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHEN POTENZIALS VON HERGESTELLTEN RAPSPROTEINPRODUKTEN FÜR DIE FISCHERNÄHRUNG.....	112
6.1. Vergleich der Nährstoffzusammensetzung von Rapsproteinprodukten und Fischmehl	112
6.2. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Rapsproteinprodukten und Fischmehl	113
6.3. Fischmehlaustausch durch Rapsproteinprodukte.....	114
7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	121
ANHANG	126
Abbildungsverzeichnis	126
Tabellenverzeichnis	129
Literaturverzeichnis	131
Publikationsliste	143
Lebenslauf.....	144

Nomenklatur

Lateinische Buchstaben

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
c	Konzentration	g/l
d	Durchmesser	μm
FQ	Futterquotient	g/g
H	Enthalpie	J/g
K	Fulton'scher Konditionsfaktor	-
M	Molare Masse	g/mol
m	Masse	kg
Myro-U	Myrosinaseaktivität	$\mu\text{mol/g min}$
PDI	Protein-Dispersibilitäts-Indexes	%
PER	Proteinwirkungsverhältnis	-
pH	Potentia hydrogenii	-
SWR	Spezifische Wachstumsrate	%/Tag
t	Zeit	min
T	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$

Griechische Buchstaben

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
κ	Leitfähigkeit	mS/cm
ρ	Dichte	kg/m^3

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent Lignin
AK	Albuminkonzentrat
ALA	Alanin
ANF	Antinutritive Faktor
APS	Amoniumpersulfat
ARG	Arginin

AS	Aminosäure
ASP	Asparaginsäure
CYS	Cystein
Da	Dalton
DF	Diafiltration
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTTK	Desolventizer-Toaster-Trockner-Kühler
E	Extraktion
EU	Europa
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
FDA	Food and Drug Administration
GK	Globulinkonzentrat
GLU	Glutaminsäure
GLY	Glycin
GRAS	Generally Recognized As Safe
H ₂ O	Wasser
HIS	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i. Tr.	In der Trockenmasse
IFFO	Fishmeal and Fish Oil Organisation
ILE	Isoleucin
IP	Isoelektrischer Punkt
ITC	Isothiocyanaten
k.A.	Keine Angaben
L	Lösung
LEU	Leucin
LYS	Lysin
M	Marker
M	Molar
M+C	Methionin + Cystein
Max	Maximum
MET	Methionin
MF	Mikrofiltration
Min	Minimum
N	Normalität
n.a.	Nicht analysiert

n.d.	Nicht definiert
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NfE	Stickstofffreie Extrakt
NH ₃	Ammoniak
OM	Organische Masse
p%	Prozentuale Abweichung
PG	Proteingehalt
PHE	Phenylalanin
PL	Phospholipid
PMM	Protein Micellar Mass
ppm	Parts per Million
PRO	Prolin
R	Rückstand
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RES	Rapsextraktionsschrot
RP	Rohprotein
RPI	Rapsproteinisolat
RPK	Rapsproteinkonzentrat
S	Sedimentationskoeffizient
SA	Sinapinsäure
SAE	Sinapinsäure und Sinapinsäureester
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SER	Serin
SG	Sinapoylglucose
SIN	Sinapin
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TAG	Triacylglycerol
TEMED	N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine
THR	Threonin
TRP	Tryptophan
TS	Trockensubstanz
TYR	Tyrosin

UF	Ultrafiltration
USDA	United States Department of Agriculture
UV/VIS TLC	Ultraviolet-Visible Thin-Layer Chromatography
V	Versuch
VAL	Valin
VDLUFA	Association of German Agricultural Analytic and Research Institutes
VOT	Vinyloxazolidinethionen
W	Waschung
WS	Wirbelschicht

Tiefgestellte Indizes

Index	Bezeichnung
A	Ausgangsmaterial
d	Denaturierung
Lsg	Lösung
n.p.	Nicht präzipitiert
P	Produkt
theor.	theoretisch
TS	Trockensubstanz
10,3	10 % der Partikel
50,3	50 % der Partikel
90,3	90 % der Partikel

Hochgestellte Indizes

Index	Bezeichnung
—	Mittelwert

Mathematische Symbole

Symbol	Bedeutung
Δ	delta, Unterschied
$ $	Absoluter Betrag

1. Einleitung

1.1. Motivation

Infolge des drastischen Anstiegs der Fischfangquoten in den vergangenen Jahrzehnten wurden die Fischbestände stark reduziert. Nach Angaben der FAO sind im Jahr 2009 57,4 % der Fischbestände maximal ausgenutzt. 29,9 % der Fischbestände sind überfischt und 12,7 % sind noch nicht im kritischen Zustand. Folglich befinden sich 87 % der Fischbestände im Risikobereich, deshalb ist eine Reduzierung des Fischfangs streng erforderlich, damit sich die Fischbestände erholen (FAO, 2011). Seit einigen Jahren wurde ein Rückgang der Weltmeeresfischproduktion beobachtet, welche bei etwa 90 Millionen Tonnen pro Jahr liegt (FAO, 2010). Allerdings konnten die Wildfänge den Fischbedarf der wachsenden Weltbevölkerung nicht decken. Die steigende Nachfrage für Fisch und die Gefahr vor der Überfischung der Meere bei weiterer Ausbeutung der Fischbestände führte zur starken Entwicklung der Aquakultur, welche die Versorgung der Weltbevölkerung mit hochwertigem Eiweiß aus Fisch sichern soll. Die Aquakultur kann als Lösung der Ernährungsproblematik für die Versorgung mit Fischprodukten angesehen werden, ohne den marinen Fischbeständen nachhaltig zu schaden. Sie ist der sich am schnellsten entwickelnde Lebensmittelsektor, dessen jährliche Wachstumsrate seit den 1970er Jahren mit durchschnittlich fast 9 % sehr hoch liegt (Anderson, 2011). Mit über 55 Millionen Tonnen Aquakulturproduktion im Jahr 2009 stammen 47 % der weltweiten Seafood-Versorgung aus Aquakulturen. Während der weltweite Pro-Kopf-Verbrauch von Fisch im Jahr 1961 9,0 kg betrug, wurde im Jahr 2009 durchschnittlich 17,2 kg Fisch pro Person konsumiert (FAO, 2010). Im Angesicht der Überfischung von vielen Fischarten in den Weltmeeren und der gleichzeitigen Erhöhung des Fischbedarfs infolge der steigenden Nachfrage nach Fisch bei zunehmender Weltbevölkerung ist die weitere Entwicklung der Aquakultur erforderlich. Demzufolge wird dieser Wirtschaftszweig in Zukunft weiterhin stark an Bedeutung gewinnen.

Einen wesentlichen Faktor für das erfolgreiche Wachstum und die Intensivierung der Aquakulturproduktion stellt das Fischfutter dar. Traditionell wird das Fischmehl als Proteinquelle in der Fischernährung eingesetzt. Durch das Wachstum der Aquakultur und den dadurch gestiegenen Bedarf an Fischfutter erhöht sich die Nachfrage nach Fischmehl. Nach IFFO Statistikangaben stieg die Fischmehlverwendung in der Aquakulturindustrie in den

letzten Jahren drastisch, sodass im Jahr 2009 63 % des weltweit produzierten Fischmehls für die Fischfutterproduktion verwendet wurden (Abbildung 1-1).

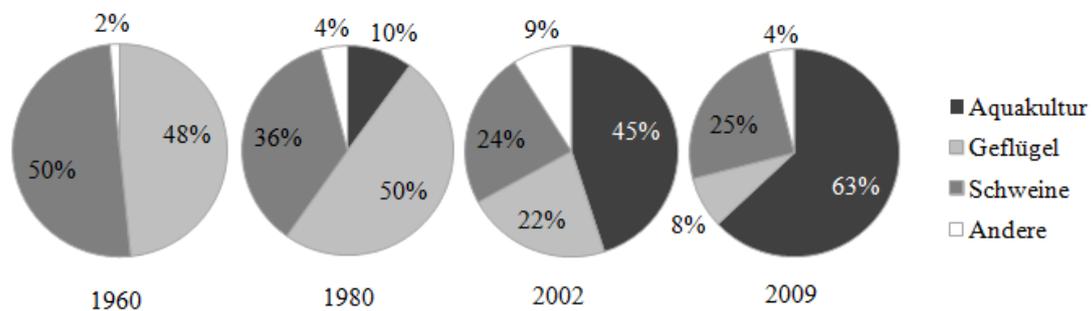


Abbildung 1-1: Entwicklung der Verteilung des Fischmehlverbrauches (Jackson, 2011; Shepherd, 2007)

Da das Fischmehl aus Fischarten, welche nicht für den menschlichen Verzehr geeignet sind, produziert wird, hängt seine Produktionsmenge von den Fischbeständen ab. Folglich ist nicht mit einer Ausweitung der Fischmehlproduktion zu rechnen. Die Fischfänge für die industrielle Verwertung, zu der auch die Fischmehlproduktion gehört, sind in den letzten Jahren rückläufig geworden. Daher ist das Fischmehl eine limitierte Proteinquelle. Laut IFFO ist die weltweite Fischmehlerzeugung mit etwa 5 Millionen Tonnen in den letzten Jahren gegenüber den 90er Jahren (6-7 Millionen Tonnen) zurückgegangen (IFFO, 2009). Infolge der zunehmenden Knappheit und der steigenden Nachfrage sind die Fischmehlpreise in den letzten Jahren stark gestiegen, so dass das Fischmehl im Jahr 2010 für 1500 €/t vermarktet wurde (indexmundi, 2011). Demgemäß entfällt ein Großteil der Gesamt-Betriebskosten (bis zu 70 %) der Aquakultur-Farmen auf das Fischfutter, in dem Fischmehl ein wesentlicher Bestandteil ist (Rumsey, 1993; El-Sayed, 2004).

Der steigende Bedarf an Fischmehl im Aquafeed, bedingt durch die Entwicklung der Aquakulturindustrie, bedeutet neben höheren Produktionskosten, auch eine weitere Erschöpfung der speziell für die Fischmehlproduktion gefangenen Fischarten, was negative Auswirkung auf die davon abhängigen Arten hat. Für ein Kilogramm Zuchtfisch (marine Fischarten) sind etwa vier Kilogramm Wildfang nötig, welcher zu Fischmehl oder –öl verarbeitet wird (Naylor, et al., 2001). Die Fischmehlproduktion trägt zur Abnahme der Fischbestände bei. Die intensive Fischerei vor allem auf Anchovis wegen der Fischmehlproduktion führt zu einer starken Beeinträchtigung des Ökosystems peruanischer und chilenischer Küstengewässer. Für den Anchovis-Fang werden sehr feinmaschige Netze verwendet. Dadurch werden aber auch Jungfische anderer Arten gefangen, so dass

eine ausreichende Reproduktion dieser Fischarten nicht mehr möglich ist. Infolge dessen wird das Nahrungsangebot der Seevögel und der Meeressäuger verringert (Euronatur, 2005).

Für die nachhaltige Zukunft der Aquakultur sollen die oben aufgeführten Probleme gelöst werden. Da die stark zunehmende Aquakulturproduktion (Abbildung 1-2) einen hohen Bedarf an hochwertigem Fischfutter erfordert, ist zu erwarten, dass der Verbrauch an Fischmehl für Fischfutter in den kommenden Jahren weiter zunehmen wird. Dadurch wird aber die Ökologie der Fischpopulation in vielen Regionen geschädigt. Außerdem werden sich die Produktionskosten der Zuchtfische, bedingt durch die hohen Handelspreise des Fischmehls, weiterhin erhöhen. Deshalb haben sich die Suche nach alternativen Proteinquellen aus pflanzlicher Herkunft und die Aquakulturforschung zur Futtermittelproblematik in den letzten Jahren intensiviert. Durch den Austausch der tierischen Proteinträger gegen pflanzliche ist eine Verringerung der Fischmehlanteils im Aquafeed zu erzielen. Somit können auch der Einfluss der weltweiten Fischbestände auf die Entwicklung der Aquakulturindustrie minimiert und gleichzeitig die Wildbestände geschont werden.

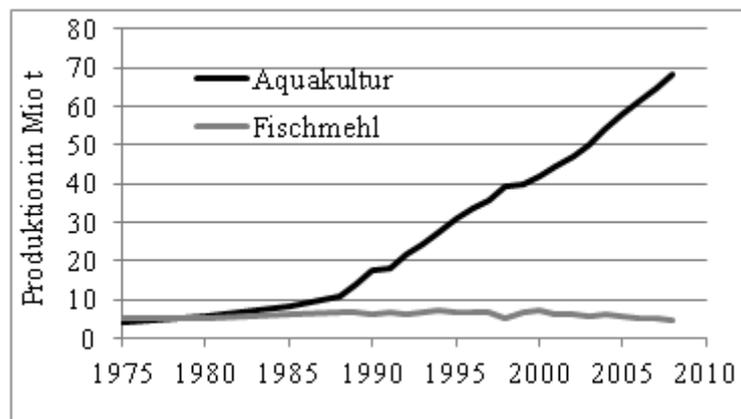


Abbildung 1-2: Entwicklung der Aquakultur- und Fischmehlproduktion (IFFO, 2009)

Die prognostizierte Steigerung der Aquakulturproduktion kann nur bei ausreichender Futtermittelbereitstellung erreicht werden. Die Beiprodukte der Rapssaatverarbeitung stellen eine sehr attraktive Proteinquelle als Ersatz für die marinen Ressourcen dar. Sie besitzen einen relativ hohen Proteingehalt und eine ausgewogene und hochwertige Aminosäurezusammensetzung, was das Interesse an Rapsprodukten als Fischmehlersatz für die Futtermittelindustrie begründet. Aufgrund der global steigenden Nachfrage nach Ölsaaten nimmt die Rapsverarbeitung weltweit zu. Im Jahr 2009 erreichte die weltweite Rapsproduktionsmenge 61,6 Mio t (FAOSTAT, 2010). Außerdem liegt der Marktpreis des Rapsextraktionsschrotes bzw. des Canolaschrotes (Canola ist die Bezeichnung für kanadische

Rapssorten), dessen Preisentwicklung über die Jahre 1998 bis 2011 relativ stabil blieb, weit unter dem von Fischmehl, wie der Abbildung 1-3 zu entnehmen ist. Die hohe biologische Wertigkeit infolge des gut balancierten Aminosäureprofils, die hohe Marktverfügbarkeit und die niedrigen Rohstoffpreise für Raps auf dem Weltmarkt sind eine wichtige Voraussetzung für die zukünftigen Einsatzmöglichkeiten der Rapsproteine als Futterrohstoff in der Fischernährung.

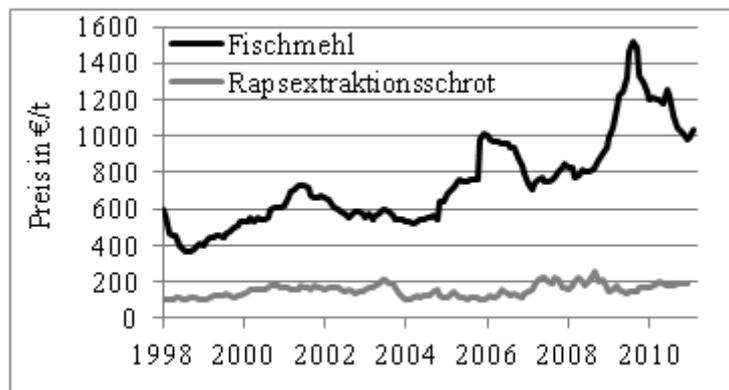


Abbildung 1-3: Preisentwicklung des Fischmehls und des Rapsextraktionsschrotes (Indexmundi, 2011; Canolacouncil, 2011)

In zahlreichen Forschungsarbeiten wird die Substitution des Fischmehlanteils in den Fischfuttermitteln durch die unterschiedlich verarbeiteten Nebenprodukte der Rapsverarbeitung wie Schrot, Kuchen und sogar isoliertes Rapsprotein diskutiert, was das große Interesse des Aquakultursektors an dem Rapsextraktionsschrot ausdrückt. Im nachfolgenden Unterkapitel 1.2 werden die Erkenntnisse aus diesen Studien dargelegt.

1.2. Kenntnisstand über den Einsatz des Rapsproteins in der Fischernährung

In den letzten Jahren wurde die Aquakulturforschung zur Futtermittelproblematik intensiviert. Die zunehmende Ausweitung der Aquakultur zwingt dazu alternative kostengünstige Proteinquellen in Futtermittelformulierungen einzusetzen. Es wurde bereits ein Teil des Fischmehls durch Canolamehl in vielen aquatischen Farmen vor allem in Canada wegen der hohen Schrotverfügbarkeit ausgetauscht. Das Canolaschrot wird üblicherweise in Futtermitteln für unterschiedliche Fischarten wie Wels, Karpfen, Tilapia, Bass, Barsch, Dorade, Steinbutt und Garnelen verwendet (Newkirk, 2009).

Bereits im Jahr 1983 wurden Forschungen zur Fischmehlsubstitution durch das Canolamehl in der Regenbogenforellen-Ernährung durchgeführt. Austauschraten bis zu 20 % wurden

untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Parameter wie Gewichtszunahme, Futtermittelverwertung und organoleptische Eigenschaften von den Versuchsfuttermischungen nicht beeinträchtigt wurden. Dagegen wurde die Schilddrüsen-Funktion negativ beeinflusst. Durch den 20%-igen Fischmehlaustausch konnte eine Reduzierung der Futterkosten in Höhe von \$ 18,70 (US) pro metrischer Tonne erreicht werden (Hardy, 1983). Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass diese Kostenschätzung nach den damaligen Fischmehlpreisen durchgeführt wurde und sich folglich von der heutigen Marktpreissituation wesentlich unterscheidet. Hilton et al. studierte den Einfluss des Canolamehls auf die Wachstumsleistung von juvenilen Regenbogenforellen. Die Autoren beurteilten das Canolaschrot als Futtermittelbestandteil in diesem Lebensstadium bei juvenilen Regenbogenforellen für ungeeignet, vor allem wegen der negativen Auswirkung des Canolaschrotes auf die Schilddrüse der Fische. Ein Fischmehlaustausch konnte durch Supplementation von Arginin, Lysin, Zink oder Energie ebenfalls nicht erreicht werden (Hilton, 1986).

Das Canolaschrot ist seit über 20 Jahren als Futtermittelbestandteil in der Lachs- und Forellen-Ernährung etabliert (Higgs, 1996). Das Canolaschrot kann bis zu 20 % im Futtermittel für Lachse verwendet werden. Aber es ist erstrebenswert die Fischmehlaustauschrate bedingt durch die begrenzte Fischmehlverfügbarkeit und die wachsende Nachfrage für diese besonders geschätzte Fischart zu erhöhen (Newkirk, 2009).

Lim et al. berichteten, dass die Futtermittelformulierungen des Wels bis zu 31 % Canolaschrot beinhalten kann, ohne negative Effekte auf die Wachstumsleistung zu beobachten (Lim, 1998). Das Canolaschrot und Rapsschrot konnten auch als Futterrohstoff in der Ernährung von Tilapia bei Austauschraten von 25 % verwendet werden (Abdul-Aziz, 1999). Die Studie von Glencross zeigte, dass eine Substitution von Canolamehl in Futtermitteln für nordische Meerbrasse bis zu 60 % ohne Leistungseinbußen möglich ist (Glencross, 2003).

Ebenfalls wurden isolierte Rapsproteine in Form von Konzentraten als Fischmehlalternative in der Fischernährung getestet. Eine Fischmehlaustauschrate von 75 % konnte durch Einsatz eines Rapsproteinkonzentrates in der Ernährung von Regenbogenforellen erreicht werden (Drew, 2004).

Eine Literaturstudie zum aktuellen Stand des Einsatzes vom Canolaschrot/Rapsschrot als alternative Proteinquelle in Fischfuttermitteln hat Enami vorgenommen (Tabelle 1-1) (Enami, 2011).

Tabelle 1-1: Überblick über die durchgeführten Fischfütterungsversuche unter Einsatz von Rapsschrot/Canolaschrot (Enami, 2011)

Untersuchte Faktoren	Autoren	Untersuchte Fischart	
		Wissenschaftliche Name	Trivialname
Scheinbare Verdaulichkeit			
	Wu et al. (2006)	<i>Sparus latus</i>	Yellowfin seabream
	Zhou et al. (2004)	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Yellow croaker
	Burel et al. (2000c)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
		<i>Psetta maxima</i>	Turbot
	Allan et al. (2000)	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Australian silver perch
	Luo et al. (2009)	<i>Synechogobius hasta</i>	
	Luo et al. (2008)	<i>Eriocheir sinensis</i>	Chinese mitten crab
	Tibbetts et al. (2006)	<i>Gadus murhua</i>	Atlantic cod
	Tibbetts et al. (2004)	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Juvenile haddock
	Sklan et al. (2004)	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia
	Cheng and Hardy (2002)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Verdaulichkeit			
	Glencross et al. (2003a,b)	<i>Pagrus auratus</i>	Red seabream
	Pavasovic et al. (2007)	<i>Cherax quadricarinatus</i>	Redclaw crayfish
	Drew et al. (2007)	-	Finfish
	Allan and Booth (2004)	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Silver perch
	Mwachireya et al. (1999)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Leistung			
	Zhang et al. (2008)	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Large yellow croaker
	Lim et al. (1998)	<i>Ictalurus punctatus</i>	Channel catfish
	Satoh et al. (1998)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon
	Erdogan and Olmez (2009)	<i>Pterophyllum scalare</i>	Anfel fish
	Yigit and Olmez (2009)	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia (fry)
	Suarez et al. (2009)	<i>Litopenaeus vannamei</i>	White shrimp
	Viegas et al. (2008)	<i>Piaractus masopotamicus</i>	Pacu juvenile
	Santigosa et al. (2008)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trout
		<i>Sparus aurata</i>	Seabream
	Przybyl et al. (2006)	<i>Acipenser ruthenus</i>	Starlet
	Lanari and D'Agaro	-	Sea bass
	Afzal-Khan et al. (2008)	<i>Labeo rohita</i>	Rohu fingerling
	Booth and Allan (2003)	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Juv. Silver perch
	Brown et al. (2003)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
	Thiessen et al. (2003)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
	Galdioli et al. (2002)	<i>Prochilodus lineatus</i>	Curimbata fingerling
	Soares et al. (2001)	<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia
	Cruz-suarez et al. (2001)	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	Blue shrimp

Fortsetzung der **Tabelle 1-1**

Untersuchte Faktoren	Autoren	Untersuchte Fischart	
		Wissenschaftliche Name	Trivialname
	Webster et al. (2000)	<i>Morone chrysops x M.saxatilis</i>	Sunshine bass
	Burel et al. (2000b)	<i>Psetta maxima</i>	Turbot
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
	Soares et al. (2000)	<i>Leporinus macrocephalus</i>	Piavucu fingerling
	Lim et al. (1997)	<i>Penaeus vannamei</i>	Juvenile shrimp
	Buchanan et al. (1997)	<i>Penaeus monodon</i>	Juvenile prawn
	Webster et al. (1997)	<i>Ictalurus punctatus</i>	Channel catfish
Schilddrüsenstatus			
	Burel et al. (2001)	<i>Oncorhynchusmykiss</i>	Rainbow trout
	Burel et al. (2000a)	<i>Psetta maxima</i>	Turbot
	Pradet-Balade et al. (1999)	<i>Psetta maxima</i>	Turbot
Phosphorverfügbarkeit			
	Sajjadi and Carter (2004)	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon
	Riche and Brown (1999)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
	Riche and Brown (1996)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Aminosäureverfügbarkeit			
	Gaylor et al. (2004)	<i>Morone chrysops x M.saxalitis</i>	Hybrid striped bass
	Sales and Britz (2003)	<i>Haliotis midae</i>	South African abalone
	Sales and Britz (2002)		
Unspezifische Abwehr und oxidativer Stress			
	Sitja-Bobadilla et al. (2005)	<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream
Physiologische und biochemische Parameter			
	Shafaeipour et al. (2008)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout

1.3. Zielstellung

Die bei der Rapsverarbeitung anfallenden Nebenprodukte haben hohes Potenzial als alternative Proteinquelle für die Fischernährung. Wie in der Tabelle 1-1 veranschaulicht, wurden viele in Aquakultur gezüchtete Fischarten auf ihre Futterakzeptanz eines auf Rapsschrot basierenden Fischfuttermittels getestet. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass unterschiedliche Austauschraten in Abhängigkeit von der Fischart und der Schrotqualität erreicht wurden. Es wurde festgestellt, dass die antinutritiven Inhaltsstoffe der Rapsmehle wie Glucosinolate, Phytinsäure, Sinapinsäure, unverdauliche Kohlenhydrate und andere sich negativ auf die Wachstumsleistung und den Gesundheitsstatus der Fische auswirken können

und somit den Einsatz des Rapsschrotanteils im Fischfutter beschränken (Francis, 2001). Um höhere Fischmehlaustauschraten zu erreichen, sollen neue Rapsschrot-Verarbeitungstechnologien zur Erhöhung des Proteingehalts und zur Eliminierung bzw. Reduzierung der antinutritiven Komponenten untersucht werden, bevor das Rapsproteinprodukt als Rohstoff im Fischfutter verwendet wird.

Die Zielstellung der Arbeit beinhaltet die Entwicklung von Verfahren zur Gewinnung von hochwertigen Rapsproteinprodukten, deren Potenzial als Fischmehlalternative in Futtermitteln für Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss* W.), Karpfen (*Cyprinus carpio* L.), Wels (*Silurus glanis* L.) und Steinbutt (*Psetta maxima* L.) untersucht wird. Im Rahmen der Themenbearbeitung werden unterschiedliche Rapsproteinpräparate unter Einsatz von verschiedenen Verarbeitungstechniken hergestellt. Allerdings sollen gleichzeitig die antinutritiven Komponenten gesenkt werden, um die nutritive Qualität der hergestellten Rapsproteinprodukte für die Fischernährung nicht negativ zu beeinflussen. Die gewonnenen Rapsproteinprodukte müssen der ernährungsphysiologischen Bedarfssituation der Fische genügen.

Im Rahmen der Arbeit wird über die Herstellungsverfahren von unterschiedlichen Rapsproteinkonzentrationen und -fraktionen diskutiert und das Nährpotenzial der erzeugten Rapsproteinprodukte als Proteinträger im Aquafeed erläutert.

Um festzustellen, welches Proteinpräparat das höchste Potenzial für die Fischernährung besitzt, wird der Einsatz sowohl von dem Rapsproteinkonzentrat mit einem Proteingehalt von 60 bis 70 Mass.-% i. Tr. als auch dem Rapsproteinisolat mit einem Proteingehalt von 90 Mass.-% i.Tr. als Rohstoff in den Futtermittelformulierungen untersucht. Diese Produkte unterscheiden sich in ihrem Nährwert und ihrer Herstellungstechnologie. Außerdem werden die Rapsproteine einer Fraktionierung unterzogen, sodass Globulin- und Albuminkonzentrate hergestellt werden. Sie werden als Proteinträger im Fischfutter evaluiert. Nach unserem Wissen wurden bis jetzt keine Fütterungsversuche mit einzelnen Rapsproteinfraktionen durchgeführt.

Die Arbeit befasst sich mit den folgenden Themenschwerpunkten:

- Erarbeitung bzw. Optimierung von Verfahren zur Herstellung von Produkten mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und einzelnen Rapsproteinfraktionen. Charakterisierung der Prozesskette zur Herstellung von

- Rapsproteinkonzentraten
- Globulin- und Albuminkonzentraten
- Rapsproteinisolaten
- Bewertung der gewonnenen Rapsproteinprodukte
 - Chemische Charakterisierung der einzelnen Proteinproben (Bestimmung der Nährstoffzusammensetzung, der Aminosäurezusammensetzung und des Anteils antinutritiver Inhaltsstoffe)
 - Charakterisierung der einzelnen Proteinproben (Bestimmung der Zusammensetzung der Proteinprodukte, Bestimmung der thermodynamischen Eigenschaften u.a.)

2. Stand des Wissens

2.1. Chemische Zusammensetzung der Rapssaat

Raps (*Brassica napus*) gehört zur Familie der Kreuzblütler (Cruciferen). Das Rapskorn setzt sich aus einer dünnen Schale und dem nährstoffreichen Kern zusammen. Der Schalenanteil der Körner hängt von der Saatsorte ab und liegt zwischen 15 % und 20 % (Cramer, 1989; Shahidi, 1990). Die Schalen der Rapskörner bestehen überwiegend aus Polysacchariden (22-24 %) und Ligninen (29-35 %). Die Hauptspeicherstoffe der Rapskörner sind mit 40 % bis 50 % Öl, welches in zahlreichen Oleosomen (auch als Oil-bodies bezeichnet) in den Zellen des Saatkerns gespeichert ist, und mit 18 % bis 25 % Proteinen, welche sich in den wesentlich größeren Aleuronkörnern (Protein-bodies) mit eingelagerten Phytinkörnern befinden (Hofsten, 1974; Anjou, 1977; Yiu, et al., 1982; Kozłowska, 1988). Die Menge wie auch die Zusammensetzung dieser Hauptinhaltsstoffe ist sorten- und standortabhängig und variiert demnach stark (UFOP, 2007).

Der Aufbau und die chemische Zusammensetzung der Rapskörner der 00-Rapssorte sind in der Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Aufbau und chemische Zusammensetzung der Rapssaat der 00-Sorte (Bertram, 1986)

Anteil / Inhaltsstoff in %	Gehalt
Schalen	12-16
Keimling	84-88
Öl (davon polare Lipide)	38-45 (1)
Rohprotein (N x 6,25)	20-22
Lösliche Kohlenhydrate	5-6
Unlösliche Kohlenhydrate (Ballaststoffe)	12-15
Phytinsäure	3-4
Glucosinolate	0,03 (max. 20 µmol/g Schrot)
Phenolische Verbindung (Sinapin u.a.)	0,5-2
Wasser	9-12

2.2. Nutritive Inhaltsstoffe

Die beiden wertgebenden nutritiven Inhaltsstoffe der Rapssamen sind das Öl und die Proteine. Da das Untersuchungsgebiet der vorliegenden Arbeit die Gewinnung von Rapsproteinen ist, wird daher in Folgenden auf Proteine fokussiert.

2.2.1. Speicherfett

Das Speicherfett wird in den Oleosomen in den Zellen des Rapskerns gespeichert. Die Oleosomen sind kugelförmige Triacylglycerol (TAG)-Teilchen mit einem Durchmesser von 0,65 μm , welche von einer 2,5 nm dicken Monoschicht (Oleosomenmembran) umgeben sind, die aus 80 % Phospholipiden (PL) und 20 % eingebettetem Protein (Oleosin) bestehen. Etwa 20 % der Aminosäurereste des Oleosins sind in der Monoschicht fixiert, 30 % errichten die TAG Matrix und 50 % sind auf der Oberfläche angelagert (Abbildung 2-1) (Tzen, et al., 1992; Tzen, et al., 1993). Die Membranproteine verhindern aufgrund ihrer Struktur das Koaleszieren der Öltröpfchen und tragen zu der Stabilität der Oleosome durch die Protein-Phospholipid Membran bei (Natsch, 2006).

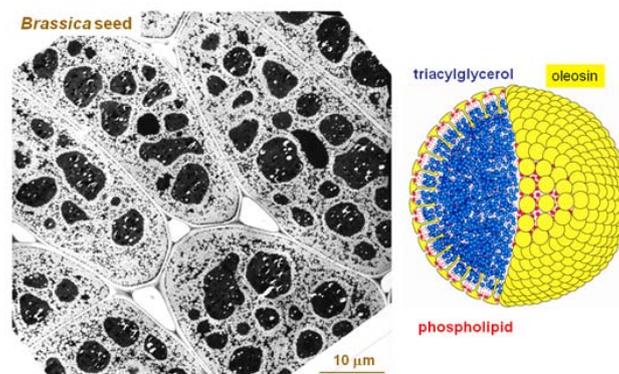


Abbildung 2-1: Oil-bodies (Ölkörper) in Saatkern. Links: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer Brassica-Samenzelle, welche große und auffällige Speicherprotein-bodies und kleine und zahlreiche Oil-bodies zeigt. Rechts: Modell eines Ölkörpers, welches eine Matrix von Triacylglycerols (blau) enthält, welche von einer Schicht von Phospholipiden (rot) und Strukturproteine (Oleosine) (gelb) umschlossen sind (Huang, 2011).

Das Membranprotein (Oleosin) hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Nach Tzen et al. liegt der theoretische isoelektrische Punkt des Oleosins bei 6,0 bzw. nach Huang et al. bei 6,2 (Huang, et al., 1993). Der Anteil des Oleosins am Gesamtproteingehalt liegt zwischen 7-8 % (Tzen, et al., 1990) und 20-25 % (Murphy, et al., 1989). Die Oleosine sind gekennzeichnet durch ihre Unlöslichkeit in wässrigen Medien. Daher sind sie durch wässrige

Proteinextraktionsverfahren technologisch nicht gewinnbar (Tzen, et al., 1992; Murphy, 1993a; Murphy, 1993b).

2.2.2. Speicherprotein

Die Speicherproteine der Rapssaat sind in den Aleuronkörpern mit einem Durchmesser von 1 μm bis 10 μm fixiert (Yiu, et al., 1982). Bei Rapssaat stellen die Speicherproteine etwa 90 % des Stickstoffanteils der Saat dar (Eklund, et al., 1971).

Die Rapssamenproteine bestehen aus zwei Hauptfraktionen. Das sind 2-S- und 12-S-Proteine. Die 2-S-Proteine (Albumine) sind als Napin bekannt und entsprechend die 12-S-Proteine (Globuline) als Cruziferin. Das Verhältnis der Proteinfractionen Cruziferin zu Napin im Rapskorn hängt von der Varietät ab und liegt bei 0,7 bis 2,0 (Gueguen, et al., 2002). Das Cruziferin/Napin-Verhältnis für 00-Rapssorten beträgt 1,1 bis 1,3 (Malabat, et al., 2003). Nach Murphy stellen die Globuline etwa 40 %, die Albumine etwa 40 % und das Oleosin ca. 10 % der Gesamtproteine in der Saat dar (Murphy, 1993a). Wanasundara et al. machen Angaben über den Cruziferinanteil in Rapssaatproteinen in Höhe von 32-53% an und 20-45% für Napin (Wanasundara, et al., 2010).

Im Folgenden werden kurz die wesentlichen Charakteristiken der beiden Hauptproteinfractionen dargelegt.

Napin ist ein 2 S-Albumin mit einer Molmasse von 12 kDa bis 17 kDa (Schwenke, et al., 1973; Mieth, et al., 1983; Natsch, 2006). Charakteristisch für Napin ist die helikale Struktur. In der Sekundärstruktur sind die Peptidketten des Napins 40 % bis 46 % als α -Helix und 12 % als β -Faltblattstruktur aufgebaut. Napin besteht aus einer größeren mit einer Molmasse von 9 kDa und einer kleineren mit 4 kDa Molmasse Polypeptidkette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Napin zeichnet sich mit einem hohen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren und der Aminosäure Lysin aus (Ericson, et al., 1986; Schwenke, 1990; Wanasundara, et al., 2010). Der isoelektrische Punkt von Napin schwankt je nach unterschiedlicher Spezies zwischen einem pH-Wert von 9 und pH 11 (Lønnerdal, et al., 1972; Schwenke, et al., 1973; Mieth, et al., 1983). Schmidt et al. ermittelten, dass das aus Rapssamen-Mehl (Saatsorte Express) mittels Extraktion und nachfolgender chromatographischer Reinigung isolierte Napin einen isoelektrischen Punkt von pH 10,7 und eine Molmasse von 13.919 g/mol (daher ca. 14 kDa) hat (Schmidt, et al., 2004).

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Napin eine allergene Wirkung aufweisen kann (Monsalve, et al., 1997; Puumalainen, et al., 2006).

Cruziferin ist ein oligomeres 12 S-Globulin mit einer Molmasse von 300-320 kDa. Es kann je nach pH-Wert und Ionenstärke von 12 S zu 7 S oder 2-3 S dissoziieren oder in umgekehrter Richtung von 7 S zu 12 S assoziieren (Abbildung 2-2).



Abbildung 2-2: Milieuabhängige Dissoziation und entsprechend Assoziation von 12 S Rapsproteinen (Schwenke, et al., 1983)

Cruziferin besteht aus sechs Untereinheiten (hexametrisch), welche als zwei Trimere angeordnet sind (Delseny, et al., 1999). Jede Untereinheit ist aus kleineren Komponenten mit sauren α -Polypeptiden (schwere α -Kette) sowie basischen β -Polypeptiden (leichte β -Kette) zusammengesetzt, welche über Disulfidbrücken verbunden sind. Die SDS-PAGE von 12 S Globulin unter reduzierenden Bedingungen liefert vier Banden. Die detektierten Banden haben Molmassen bei ca. 18.500 Da ($\beta 2$), 21.000 Da ($\beta 1$), 27.000 Da ($\alpha 2$) und 31.000 Da ($\alpha 1$). Die elektrophoretischen Untersuchungen unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigen, dass das 12 S Globulin aus drei Hauptgruppen aus Polypeptiden mit Molmassen im Bereich von 60-52 kDa (A-Gruppe), 37-35 kDa und 31-29 kDa (entsprechend B1 und B2-Gruppen) und 24-22 kDa (C-Gruppe) besteht. Bei reduzierenden Bedingungen zerfällt die Hauptgruppe A zu kleineren Polypeptiden mit niedrigen Molmassen. Die B- und C-Gruppen bleiben unverändert (Raab, et al., 1986; Dalgarrondo, et al., 1986; Wanasundara, et al., 2010).

Im Gegenteil zu Napin hat die Sekundärstruktur des Cruziferins einen geringen Gehalt an α -Helix-Struktur (10 %) und einen hohen Gehalt an β -Faltblatt-Konformation (50 %) (Zirwer, et al., 1985). Schwenke ermittelte den isoelektrischen Punkt des Cruziferins bei einem pH-Wert von 7,2 (Schwenke, 1990). Andere Studien weisen darauf hin, dass der isoelektrische Punkt des Cruziferins in dem pH-Bereich von 4 bis 8 liegt (Lønnerdal, et al., 1972).

Wenn die beiden Rapsproteine nach ihrer Löslichkeit in wässrigen Medien, das heißt nach der klassische Einteilung nach Osborne (Osborne, 1924) klassifiziert werden sollen, dann unterscheiden sich die beiden Proteinfraktionen als wasserlösliche Albumine und bei einer bestimmten Ionenstärke (Salzlösungen) lösliche Globuline.

Bei den üblichen Verfahren der Ölsaatenproteinisolierung werden die Speicherproteine der Saaten, die Albumine und Globuline, gewonnen (Wäsche, 2002).

2.3. Antinutritive Inhaltsstoffe

2.3.1. Glucosinolate

Die Glucosinolate (Thioglucoside) sind sekundäre Inhaltsstoffe bei Raps. Die Glucosinolate bestehen aus einer Glucoseeinheit, einer schwefelhaltigen Gruppierung mit dem Agluconrest R und einer Sulfatgruppe. Je nach dem Agluconrest unterscheiden sich die einzelnen Glucosinolatderivate (Kroll, et al., 2007). Die dominierenden Glucosinolatderivate in der Rapssaat sind Progoitrin und Gluconapin und 4-Hydroxyglucobrassicin (Sang, et al., 1984; Pei-wu, et al., 2005; El-Beltagi, et al., 2010).

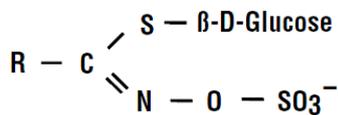


Abbildung 2-3: Struktur der Glucosinolate (Kroll, et al., 2007)

R = Alkyl-, Alkenyl-, Aryl-, Indolylstruktur

Die allgemein akzeptable maximale Glucosinolat-Konzentration in der Rapssaat der Sorte 00-Winterraps in Deutschland und in der EU liegt zwischen 18 und 25 $\mu\text{mol/g}$ in (UFOP, 2008). Nach aktuellen Forschungen schwankt der Glucosinolatgehalt der in Deutschland gezüchteten Rapsamen zwischen 10 und 15 $\mu\text{mol/g}$ je nach Saatsorte (Schumann, 2004).

Die Glucosinolate werden im wässrigen Medium durch das saateigene Enzym Myrosinase (Thioglucoside glucohydrolases) hydrolysiert. Die Myrosinase ist ein wärmlabiles Enzym. Die Aktivierungsenergie der Myrosinaseinaktivierung liegt bei einem Wert von 120 kJ/mol (Wäsche, 2002). Die Myrosinase ist in der nativen Saat räumlich von den Glucosinolaten getrennt. Erst nach einer Zerstörung der Zellstruktur, z.B. während der Saatverarbeitung, kommt die Myrosinase mit den Glucosinolaten in Kontakt und dies führt zur Glucosinolatspaltung. Aus der Hydrolyse der Glucosinolate entstehen D-Glucose und instabile Aglukone, welche sich zu Isothiocyanaten (ITC), Thiocyanaten, Nitrilen, Epithionitrilen und Vinyloxazolidinethionen (VOT) zersetzen (Härtel, 2002). Diese Abbauprodukte können den ernährungsphysiologischen Wert von Rapsproteinprodukten reduzieren (Bell, 1984), weil sie goitrogene Wirkung (VOT), mutagene Wirkungen (VOT), cytotoxische Wirkungen (ITC), hepatotoxische Effekte (Nitrile, Epithionitrile), intensive Aroma- und Geschmackseigenschaften besitzen. Außerdem können die Spaltprodukte auf

Grund ihrer starken Elektrophilie mit Proteinen reagieren und deren Eigenschaften wie Löslichkeit, IP, hydrophobische Eigenschaften und Molgewicht verändern. Die Abbauprodukte der Glucosinolate können kovalente Veränderungen und damit Schädigungen von Aminosäuren verursachen, was den biologischen Wert des Proteins vermindert (Kroll, et al., 2007; UFOP, 2007).

Der Abbau der Glucosinolate kann nicht nur durch die Myrosinase während der Rapsverarbeitung sondern auch durch hohe Temperaturen und durch Aktivität der Darmflora verursacht werden (Mawson, et al., 1993). Bei Fischen aus Gebieten mit gemäßigttem Klima, wie der Regenbogenforelle ist die Bedeutung der Darmflora vernachlässigbar im Vergleich zu der von Landtieren. Folglich kann die hydrolytische Aktivität der Darmflora auf die Glucosinolate ausgeschlossen werden (Burel, et al., 2001).

Die Glucosinolate selbst haben keine biologische Aktivität. Die eigentlichen antinutritiven Stoffe sind ihre Abbauprodukte, welche goitrogene Aktivität aufweisen. Diese Verbindungen verursachen eine Hypothyreose in den meisten Wirbeltieren und führen zur Reduzierung der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Die Wirkmechanismen dieser bioaktiven Verbindungen sind eng mit der Synthese von T3 und T4 verbunden. Insbesondere konkurrieren die Thiocyanatanionen mit dem aktiven Transport von Jod für die Schilddrüse. Daher hemmen sie die Aufnahme von Jod in der Schilddrüse. Die Auswirkung der Hypothyreose bei den Fischen bewirkt eine verringerte Stoffwechselrate, Lethargie, einen geringen Appetit und anschließend ein schlechtes Wachstum (Mawson, et al., 1994a; Mawson, et al., 1994b; Glencross, 2003). Die konkrete Auswirkung der Glucosinolate auf die juvenile Regenbogenforelle wurde von Burel et al. untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Werte der beiden Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) bei Einsatz von Rapsschrot gesunken sind. In anderen Arbeiten ermittelten die Autoren, dass bei Steinbutt nur das Thyroxin (T4) abgenommen hatte. Nachfolgende Arbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Supplementierung von Jod, T3 oder Schilddrüsen-stimulierendes Hormon einen begrenzten Einfluss auf die antinutritive Wirkung der Glucosinolate in dem Rapsextraktionsschrot hat. Beim Fischwachstum rechnen Burel et al. bei Glucosinolat-Konzentrationen oberhalb 3.7 µmol/g Futtermittel mit Leistungseinbußen. Der Steinbutt scheint höhere Gehalte an Glucosinolaten im Futtermittel zu tolerieren als die Regenbogenforelle. Probleme können ab 3.6-4.4 µmol/g Futtermittel entstehen. (Burel, et al., 2000a; Burel, et al., 2000b; Burel, et al., 2001). Nach Higgs et al. können 30 % Schrotkonzentrationen im Futtermittel für juvenile Chinook-Lachse

bei einem maximalen Glucosinolatgehalt im Fischfutter von 2,65 $\mu\text{mol/g}$ erreicht werden, wenn 5 ppm T3 gleichzeitig verabreicht werden (Higgs, et al., 1983). Andere Autoren geben hierbei Glucosinolat-Konzentrationen zwischen 1–2 $\mu\text{mol/g}$ Futtermittel als kritischen Wert an (Yurkowski, et al.; Hardy, 1983; Leatherland, et al., 1987).

Außer, dass die Glucosinolate die Schilddrüsenfunktion beeinträchtigen, üben sie negative Auswirkungen auf die Futterakzeptanz wegen ihres bitteren Geschmacks aus (Bell, 1993; Mawson, et al., 1994b).

Daher ist aus ernährungsphysiologischer Sicht bezüglich des Einsatzes von Rapsschroten bzw. Rapsproteinprodukten in der Fischernährung die Reduzierung der Glucosinolate sowie der Myrosinaseinaktivierung empfehlenswert.

Durch Wärmebehandlung kann die Myrosinase inaktiviert werden. Methoden wie trockenes Erhitzen, konvektive Erhitzung mit Luft, Erhitzen in Wasser, Dampf-Blanchierung sind in der Literatur diskutiert. Dabei wird die hydrothermische Behandlung als effektivere Methode angesehen. Allerdings tritt eine Proteindenaturierung während der Myrosinaseinaktivierung ein (Eapen, 1968; Sørensen, 1990; Wäsche, 2002; Natsch, 2006).

Zur Entfernung der Glucosinolate aus Rapsschroten sind einige Verfahren in der Literatur beschrieben. Die analytischen Methoden zur Bestimmung der Glucosinolate beruhen auf einer Extraktion mit Methanol oder Ethanol. Zum Beispiel für eine HPLC- Analyse extrahierten Buchner et al. die Glucosinolate aus dem Rapssaat mit 70 %-igem Methanol bei 75 °C für 10 min (Verhältnis Saat:Methanol-Lösung 1:10) (Buchner, et al., 1987). Ebenfalls verwendete Rudolph eine 70 %-ige Methanollösung zur Glucosinolatextraktion für die HPLC-Analyse. Er empfiehlt die Verwendung von einem Ultraschallbad (Rudolph, 1995). Eine Extraktion mit 80 %-igem Methanol, 30 min Sieden, der Glucosinolate aus dem Rapsextraktionsschrot wurde von Lange et al. durchgeführt (Lange, et al., 1987).

Naczki et al. berichteten über eine 2-Phasen-Lösungsmittelextraktion zur Reduzierung des Glucosinolatgehalts im Rapsextraktionsschrot. Die erste Extraktionsphase wurde mit 10% NH_3 in Methanol oder in 95 %-igem Methanol und die zweite Phase mit Hexan durchgeführt. Der Glucosinolatgehalt wurde auf Spurenkonzentration reduziert. Allerdings wurde durch die Behandlung eine Verschlechterung der Löslichkeitseigenschaften des Rapsschrotes beobachtet (Naczki, et al., 1985). Eine Reduktion der Glucosinolate kann durch eine Ultrafiltration der Proteinlösungen dank seines niedrigeren Molekulargewichts im

Vergleich zu den Rapsproteinen erreicht werden (Tzeng, et al., 1990; Ser, et al., 2008). Die Anwendung von organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Methanol und Aceton ist eine wirksame Möglichkeit zum Entfernen von Glucosinolaten aus dem Rapsschrot (Mawson, et al., 1995).

2.3.2. Phytinsäure

Die Phytinsäure (Myo-Inosithexaphosphat) ist ein sekundärer Inhaltsstoff und kommt in Konzentrationen von 2-4 % in den Rapssamen vor (Reddy, et al., 1982). Sie dient als Phosphatspeicher in der Pflanze und enthält mehr als zwei Drittel des pflanzlichen Phosphats (Erdmann, 1979; Reddy, et al., 1982; Rickard, et al., 1997; Lickfett, et al., 1999). Phytinsäure ist vor allem als Calcium-, Magnesium- oder Kalium-Salz vorhanden. Die Salze der Phytinsäure werden allgemein als Phytate bezeichnet.

Die Phytinsäure kann die Mineralstoffe wie Calcium, Eisen, Zink, Mangan, Magnesium und Kupfer binden. Folglich kann dadurch ihre Bioverfügbarkeit herabgesetzt bzw. verhindert werden. Aufgrund dieser negativen ernährungsphysiologischen Wirkung wird die Phytinsäure als antinutritiv betrachtet. Außerdem ist die Phytinsäure in der Lage, mit Proteinen zu reagieren und ihren isoelektrischen Punkt und ihre funktionellen Eigenschaften wie Löslichkeit und Schaumeigenschaften zu verändern (Kroll, 1991; Harland, et al., 1995; Pippig, et al., 1995; Pietsch, et al., 1995).

In der Literatur wurde beschrieben, dass der Phytinsäure durch Ultrafiltration der Proteinlösung abgetrennt werden kann (Kroll, 1991). Die Gehalte an Phytinsäure können auch durch eine Schälung der Saat reduziert werden (Kracht, et al., 2004). Die enzymatische Behandlung mit Phytasen wird als eine effektive Methode zur Phytatentfernung diskutiert (Mainz, et al., 2004).

Die Phytate sind für monogastrische Tiere sehr begrenzt verdaulich. Das gilt auch für Fische aufgrund des Fehlens des Verdauungsenzyms Phytase, welches einen effizienten Phytatabbau während der Verdauung gewährleisten soll (Hughes, et al., 1998; Jackson, et al., 1996). Da der Phosphor im Rapsextraktionsschrot überwiegend als Phytat vorliegt, ist daher die Bioverfügbarkeit des Phosphors für die meisten Fische beschränkt. Pflanzen enthalten neben dem Phytat auch Phytasen und die Enzyme werden im Verdauungsbrei wirksam, spalten Phytat und verbessern so die Verdaulichkeit des Pflanzen-Phosphors. Allerdings dürfte die

pflanzeigene Phytase in den Extraktionsschroten aufgrund der Wasserdampf- und Hitzeeinwirkung während der Rapsverarbeitung inaktiviert sein. Daher ist der Extraktionsschrot-Phosphor für Fische nicht verdaulich (Weiß, et al., 2004).

Außerdem ist wegen der Komplexbildung der Phytate mit Proteinen und Aminosäuren ihre Verfügbarkeit und Verdaulichkeit für Monogastrier einschließlich Fischen beschränkt (Spinelli, et al., 1983; Liu, et al., 1998; Sugiura, et al., 2001). Es wurde berichtet, dass der Einsatz von Phytate enthaltenden Rohstoffen im Fischfutter negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Futtermittelverwertung der meisten gezüchteten Fischarten wie Karpfen, Tilapia, Forelle und Lachs ausüben haben (Francis, 2001; Portz, et al., 2004). Die Salmonide können höhere Phytat-Gehalte (5-6 g/kg) im Vergleich zu Karpfen tolerieren. Die Autoren empfehlen die Phytat-Konzentration im Fischfutter unter 5 g/kg zu halten (Francis, 2001).

Der Einsatz des Phytat spaltenden Enzyms Phytase verbessert die Phosphor-Verfügbarkeit und daher die Verdaulichkeit des Pflanzen-Phosphors. Der Phosphor ist in dieser Form den Fischen erst nach Phytatspaltung durch das Enzym zugänglich. Daher kann durch den Phytasezusatz zu dem Fischfutter auf Basis Rapsschrot der mineralische Phosphorzusatz vermindert werden. Parallel wird durch Phytase auch die Freisetzung anderer Mineralstoffe (z.B. Calcium, Magnesium, Spurenelemente), aber auch von Proteinen und Aminosäuren bewirkt (Oliva-Teles, et al., 1998; Weiß, et al., 2004; Cao, et al., 2008; Agbo, 2008).

Forster et al. stellten fest, dass die Phytase die Verfügbarkeit vom Phytatphosphor und folglich die nutritive Qualität der Rapsproteinkonzentrate für die Regenbogenforellen-Ernährung verbessern kann (Forster, et al., 1999). Ebenfalls empfahl Sajjadi eine Phytase-Ergänzung des Rapsschrot basierten Fischfutters zur Erhöhung der Phosphorverfügbarkeit bei dem atlantischen Lachs (Sajjadi, et al., 2003). Es wurde ebenso beobachtet, dass eine verbesserte Futteraufnahme des atlantischen Lachses durch Phytase-Einsatz erreicht wurde (Carter, et al., 1999).

2.3.3. Phenolische Verbindungen (Sinapine und Tannine)

Die phenolischen Inhaltsstoffe sind eine Stoffgruppe mit antinutritiven Eigenschaften. Die phenolischen Verbindungen umfassen phenolische Säuren und die Tannine.

Die Phenolsäuren kommen im Raps in freier, veresterter und unlöslich-gebundener Form vor. Die Sinapinsäure stellt den Hauptanteil der freien Phenolsäuren dar. Die freie Sinapinsäure

selbst kommt nur in geringen Mengen vor. Der überwiegende Anteil der Phenolsäuren (etwa 80 %) liegt in veresterter Form vor. Sinapinsäure macht dabei sowohl unter den veresterten als auch unter den freien Phenolsäuren mit 70-85% den größten Anteil aus. Dabei dominiert der Cholinester der Sinapinsäure, das Sinapin (Sinapoylcholin), mit einem Anteil von 70 % (Bouchereau, et al., 1991; Kolodziejczyk, et al., 1999) bis 80 % (Dabrowski, et al., 1984; Pokorny, et al., 1994) unter allen vorkommenden Sinapinsäureestern im Raps (Naczka, et al., 1998).

Der Gesamtgehalt an Phenolsäuren im Rapsmehl variiert zwischen 1,1 und 1,8 % je nach Saatsorte und ist viel höher als bei anderen Ölsaatschroten (Shahidi, et al., 1992). Enami gibt Werte von 0,78 % und 1,00 % für den Sinapingehalt im iranischen und entsprechend kanadischen Rapsschrot an (Enami, 2011).

Diese Verbindungen verursachen einen bitteren Geschmack, die adstringierenden Eigenschaften und auch die dunkle Farbe des Rapsschrotes. Darüber hinaus können Phenolsäuren und ihre Oxidationsprodukte Komplexe mit Proteinen bilden und dadurch den ernährungsphysiologischen Wert von Rapsproteinen reduzieren. Der Bitterstoff Sinapin kann die Futteraufnahme hemmen. Sinapin ist Ursache für den auftretenden Fischgeruch in Eiern von Legehennen nach Fütterung mit Rapsschrot. Dieser Geruch ist mit der Akkumulation von Triäthylamin in den Eiern verbunden. Es wird diskutiert, dass Rapssinapine die Triäthylaminoxidase in Hühnern durch Komplexbildung hemmen und die Bildung des geruchlosen Triäthylaminoxids verhindern (Thies, 1994; Lühs, et al., 2000).

Die Tannine sind polyphenolische Verbindungen und kommen im Rapsmehl mit einem Gehalt von 1,5 bis 4,0 % vor. Die Tannine sind in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: hydrolysierbare und nicht-hydrolysierbare (kondensierte) Tannine. Tannine können Komplexe mit Rapsproteinen eingehen und dadurch den hohen ernährungsphysiologischen Wert der Proteine vermindern und die Verdaulichkeit der Proteine reduzieren. Ebenfalls können sie die Verdauung ungünstig beeinflussen, indem sie durch ihre komplexbildenden Eigenschaften die Aktivität der Verdauungsenzyme hemmen (Lühs, et al., 2000; Lipša, 2010). Tannine bilden auch Vernetzungen zwischen Proteinen und anderen Makromolekülen und machen sie unverfügbar für die Verdauung (Griffiths, 1991). Diese hemmenden Aspekte, in Verbindung mit einem adstringierenden Geschmack stellen die antinutritiven Eigenschaften der Tannine dar (Pettersson, 2000).

Aufgrund der Komplexbildung können die phenolischen Substanzen sowohl die funktionellen Eigenschaften als auch die Farbe der Proteinprodukte negativ beeinflussen (Natsch, 2006).

Tannine sind vorwiegend in der Schale, phenolische Säuren darunter auch Sinapine überwiegend im Cotyledon gespeichert (Fenton, et al., 1980). Daher kann durch Schälung der Rapssaat der Gehalt an kondensierten Tanninen reduziert werden. Allerdings wurde beobachtet, dass die Schälung den Gehalt an Tanninsäure erhöht (Minkowski, 2002). Matthäus konnte den Gehalt an kondensierten Tanninen je nach Rapssorte um 26,0-81,2 % durch den Schälprozess senken (Matthäus, 1998). Eine Reduktion des Sinapingehaltes bis zu 90 % wurde durch Extraktion mit 70 %-igem Ethanol oder auch mit einer Aceton-Methanol-Wasser-Mischung erreicht (Dabrowski, et al., 1984). Tayaranian erreichte die Reduktion des Sinapins bei Abnahme des Sinapingehaltes bis zu 98 % durch einen Wassergehalt von 20 % und einer Zugabe von 4 % Na_2CO_3 , in Abhängigkeit von einem Druck (30 bar), einer Temperatur (90 °C) und einer Verweilzeit 45 min (Tayaranian, 1991). Es wurde auch versucht, durch züchterische Methoden den Gehalt an phenolischen Verbindungen zu reduzieren (Zum Felde, 2005; Weier, 2006).

Es gibt relativ wenige Forschungsarbeiten, welche über den Einfluss der Phenolsäuren, vor allem der Sinapine und der Sinapinsäure, und der Tannine als antinutritive Inhaltsstoffe auf die Fischgesundheit berichten. Allerdings ist bekannt, dass Konzentrationen an kondensierten Tanninen in Futterpflanzen zwischen 0,5 und 5 % einen positiven Effekt auf die Tiergesundheit ausüben. Allerdings wird bei höheren Konzentrationen (>5 %) die Nahrungsaufnahme der Tiere behindert und die Verdaulichkeit des Futters beeinträchtigt (Aerts, et al., 1999). Das Rapsextraktionsschrot enthält kondensierte Tannine von 0,43 bis 0,77 % je nach Saatsorte (Shahidi, et al., 1989). Folglich ist darauf zu schließen, dass die kondensierten Tannine im Rapsschrot keine wachstumshemmende Wirkung ausüben sollten.

Über die Auswirkung der Tannine auf den Gesundheitsstatus und die Wachstumsleistung der Fische sind wenige Informationen verfügbar. Becker et al. untersuchten die Auswirkungen der Tanninsäure (hydrolyisierbares Tannin) und des Quebracho-Tannins (kondensiertes Tannin) auf Karpfen in einer Konzentration von 2 % des Sojamehl- und Fischmehl-basierten Fischfutters. Die Fütterungsversuche zeigten, dass das Quebracho-Tannin keinen Einfluss auf die Futterraufnahme, die Gewichtszunahme, die durchschnittliche metabolische Wachstumsrate und den Sauerstoffverbrauch während der Versuchszeit von 84 Tagen hatte. Die Schlachtkörperzusammensetzung wurde auch nicht von dem Quebracho-

Tannin beeinflusst. Andererseits wurde durch die Tanninsäure eine negative Auswirkung nach dem 28. Versuchstag konstatiert. Eine Ablehnung der Versuchsfuttermischung begann an dem 28. Tag und an dem 40. Tag wurde das Futtermittel komplett abgelehnt. Der Fütterungsversuch wurde unterbrochen. Die durchschnittliche metabolische Wachstumsrate war signifikant niedriger bei dieser Testgruppe. Ebenfalls wurde eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Toxizität der Tanninsäure höher als die des Quebracho-Tannins für Karpfen ist. Daher sollen die Tannin (besonders hydrolisierbares Tannin)-enthaltenden Proteinquellen aus pflanzlicher Herkunft mit Einschränkung als Fischfutterrohstoff verwendet werden (Becker, et al., 1999). Laut dieser Untersuchungen können Karpfen 20 g kondensierte (Quebracho) Tannine per 1 kg Fischfutter tolerieren. Allerdings besteht die Frage, inwieweit ein gereinigtes Handelstannin in Ölsaaten natürlich vorkommendes Tannin simulieren kann. Es wurde gezeigt, dass Ackerbohnenmehl mit hohem Gehalt an kondensierten Tanninen eine niedrigere in-vitro-Verdaulichkeit im Vergleich zu Soja aufwies. Außerdem wurde vermutet, dass der Tanningehalt (24 g/kg) im Kopra die Ursache für die Wachstumsdepression in Tilapia und Rohu bei einem Kopraeinsatz im Fischfutter von 250 g/kg bzw. 200 g/kg Kopra war (VKM, 2009).

2.4. Kommerzielle Rapsverarbeitung

In den letzten Jahrzehnten ist das wissenschaftliche und wirtschaftliche Interesse am Rapsanbau und an seiner Verarbeitung stark angestiegen. Die Rapspflanze ist entscheidend für die Ernährung der Weltbevölkerung als besonders wertvolles Speiseöl, aber auch für die Energieerzeugung als erneuerbare Energieressource und für die Biodieselherstellung als nachwachsende Rohstoffquelle. Aufgrund der global steigenden Nachfrage nach Ölsaaten für die menschliche Ernährung und der industriellen Verwertung steigt die Rapsverarbeitung weltweit an, sodass im Agrarjahr 2010/11 die weltweite Rapsproduktionsmenge eine Größe von ca. 60,4 Mio t nach Angaben des US-Landwirtschaftsministeriums (USDA) erreicht (Abbildung 2-4). Im aktuellen Wirtschaftszeitraum 2010/2011 wurden weltweit 23,3 Mio t Rapsöl und 34,9 Mio t Rapsschrot erzeugt. Mit seinem ca. 35 %-igen Proteingehalt und der ausgewogenen Aminosäurezusammensetzung stellt das Rapsschrot ein erhebliches Potenzial für den internationalen Aquakulturmarkt als alternative Proteinressource dar.

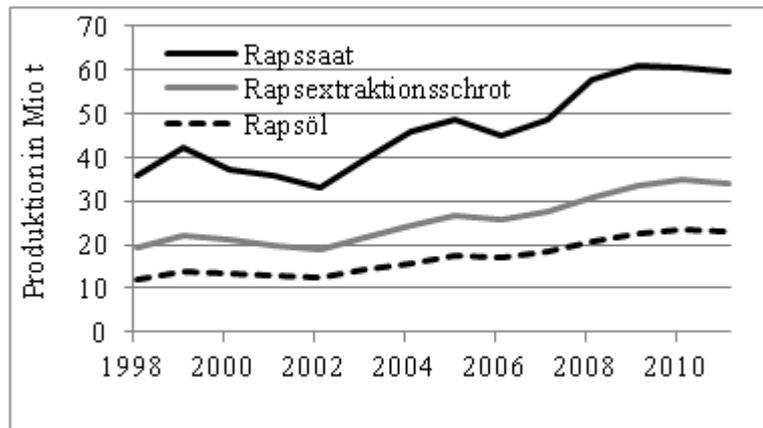


Abbildung 2-4: Weltweite Produktion der Rapssaat, des Rapsextraktionsschrotes und des Rapsöles (USDA, 2011)

Die Tendenz der Steigerung der Rapssaatverarbeitung ist auch in Deutschland zu beobachten (Abbildung 2-5). Deutschland ist der viertgrößte Rapssaatproduzent in der Welt laut Angaben von FAOSTAT für das Jahr 2009 (FAOSTAT, 2011) und der weltweit größte Biodieselhersteller und -verbraucher (Indexmundi, 2011). Daher stehen wesentliche Mengen an proteinreichem Rapsschrot aus der heimischen Rapsverarbeitung zur Verfügung, welches Potenzial zum Schließen der Eiweißlücke für die heimische Aquakultur hat.

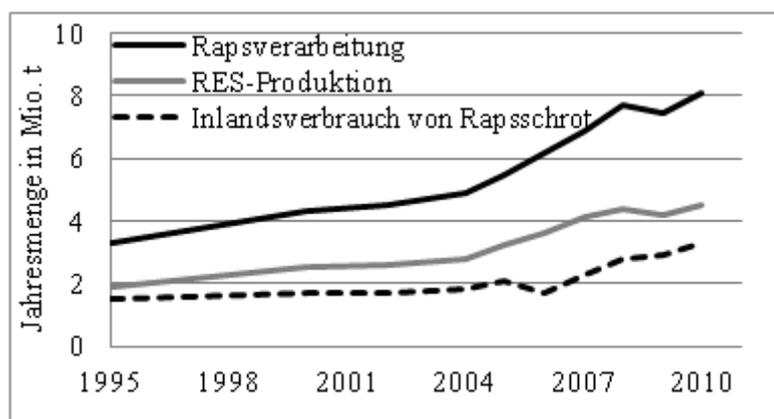


Abbildung 2-5: Rapsverarbeitung in Deutschland (Weiß, 2008; UFOP, 2011)

Die Rapsverarbeitung in Deutschland ist nach zentralen und dezentralen Ölmühlen unterteilt. Da die Technologie der Rapsverarbeitung auf die Ölausbeute und Ölqualität ausgerichtet ist, ist es erforderlich Auswirkungen der Verfahrensschritte der Ölgewinnung auf die Proteinqualität darzustellen. Die zentralen und dezentralen Ölgewinnungsanlagen unterscheiden sich in ihrer Verfahrenstechnologie und in ihrer Verarbeitungskapazität.

2.4.1. Zentrale Ölmühlen

In den zentralen Ölmühlen (industriellen Ölmühlen, Großanlagen) wird die Ölsaatenverarbeitung mit hoher Verarbeitungskapazität von 1.000 bis zu 4.000 t Ölsaat pro Tag durchgeführt (TFZ, 2011). Da die Rapsverarbeitung auf die Ölgewinnung orientiert ist, sind Verarbeitungstechnologien zum Erreichen von maximaler Ölausbeute in den zentralen Ölmühlen etabliert worden. Die konventionelle Verarbeitung von Rapssaat zu Speiseöl erfolgt über fünf Hauptschritte. Dazu gehören:

- Aufbereitung der Saat (Zerkleinern und Konditionieren unter Wärmezufuhr)
- Heißpressung
- Lösungsmittlextraktion mit n-Hexan
- Desolventisierung (Austreiben des Lösemittels) des Extraktionsschrotes
- Raffination des Rohöls nach destillativer Entfernung des Lösemittels.

Als Endprodukt wird ein raffiniertes Rapsöl gewonnen. Der vereinfachte Verfahrensablauf der Rapssaatverarbeitung in den zentralen Ölmühlen ist in der Abbildung 2-6 schematisch dargestellt. Auf die einzelnen Verfahrensschritte soll hier nicht näher eingegangen werden. Die Vorgehensweise zur konventionellen Rapsölgewinnung ist in der Fachliteratur eingehend beschrieben (Unger, 1990; Salunkhe, et al., 1992; Bockisch, 1993; Widmann, 1994a; Guderjan, 2006; Natsch, 2006).

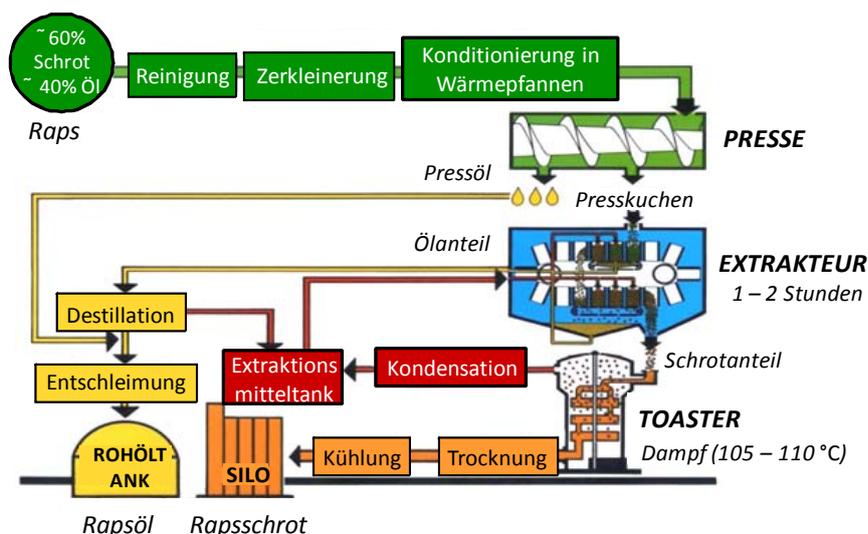


Abbildung 2-6: Schema der konventionellen Rapssaatverarbeitung (Verband Deutscher Ölmühlen) (Jeroch, 2008)

Als Nebenprodukt der Rapsölgewinnung fällt das entfettete Rapsextraktionsschrot an, welches nach der Hexanextraktion in sogenannten Desolventizer-Toaster-Trockner-Kühlern (DTTK) detoxifiziert wird. Derzeit werden ca. 90 % der in Deutschland verarbeiteten

Rapssaaten nach dem in der Abbildung 2-6 illustrierten Verfahren zu Rapsöl verarbeitet (Jeroch, 2008). Ebenfalls findet die Rapsverarbeitung des Hauptanteils der weltweiten Rapsbestände nach diesem Verfahren statt (Spragg, et al., 2007; Newkirk, 2009). Somit dominiert das Rapsextraktionsschrot unter den Beiprodukten der weltweiten Rapsverarbeitung.

Für die Proteinextraktion aus dem Rapsextraktionsschrot ist der Toastprozess der Rapsverarbeitung aufgrund der hohen Arbeitstemperaturen (bis zu 120°C) und langen Verweilzeiten (bis zu 90 min) sehr kritisch. Infolge der hohen Temperaturbelastung und gleichzeitiger hoher Feuchtigkeit des Gutes in den DTTK wird die Löslichkeit der Proteine aufgrund der verstärkten Proteindenaturierung deutlich reduziert, was sich in den niedrigen PDI-Werten des getoasteten Schrotes widerspiegelt und wodurch die künftige Proteinextraktion aus dem Schrot erschwert wird. Außerdem wird während der Desolventisierung das chemisch labile Glucobrassicin aus der Gruppe der Indolglucosinolate zerstört und bildet mit Proteinen und Fasern dunkle Farbkomplexe aus, wodurch sich die Proteinqualität verändert (Sørensen, et al., 2000).

Pastuszezwska et al. untersuchten den Einfluss von Toasttemperatur und -zeit sowie des Dampfdruckes auf die Proteinzusammensetzung, -löslichkeit und die physiologische Proteinwertigkeit im Mehl und Presskuchen. Es zeigte sich, dass an erster Stelle die Temperatur steht, gefolgt von der Verweilzeit im Desolventiser-Toaster ist sie der entscheidende Einflussfaktor. Nach den Autoren kann ein Schrot mit einer Proteinlöslichkeit von 55-60 % für qualitatives hochwertiges Futterschrot gehalten werden. Weist dagegen die Proteinlöslichkeit weniger als 45 % auf, dann spricht man über ein übertoastetes Schrot mit geringem Nährwert (Pastuszezwska, et al., 2003).

Während des Toastprozesses können irreversible Schädigungen der Proteine eintreten, d.h. es tritt ein Verlust an Bioverfügbarkeit und Funktionalität auf. Newkirk et al. bestätigten, dass die Desolventisierung/Toastung eine Reduktion der verfügbaren Aminosäuren (besonders von Lysin) verursacht und außerdem ihre Verdaubarkeit vermindert (Newkirk, et al., 2003). Schumann und Schöne untersuchten den Einfluss des Toastgrades bezüglich der Temperatur und der Verweilzeit auf den Aminosäuregehalt (als Referenzaminoäure diente Lysin) entsprechend den Grad der Proteinschädigungen in Abhängigkeit von dem Toastgrad (Schöne, et al., 2007; Schumann, et al., 2007). Die Qualität von Rapsextraktionsschroten nach unterschiedlich starkem Toasten unterschied sich wesentlich. Die stärker getoasteten Rapsschrote wiesen eine niedrigere Lysinkonzentration sowie eine geringere

Lysinverfügbarkeit auf. Die Autoren wiesen darauf hin, dass für eine hohe Proteinverdaulichkeit bzw. hohe praecaecale Verdaulichkeit der Aminosäuren eine stärkere Toastung der Rapsextraktionsschrote vermieden werden soll.

2.4.2. Dezentrale Ölmühlen

In den kleineren, dezentralen Ölgewinnungsanlagen mit Verarbeitungskapazitäten zwischen 0,5 und 25 t Ölsaaten pro Tag erfolgt die Ölgewinnung vorwiegend über das Kaltpressverfahren und anschließende mechanische Reinigung des Öles durch Fest-Flüssig-Trennung (TFZ, 2011). Daher werden in dezentralen Anlagen durch schonende Ölsaatenverarbeitung sogenannte kaltgepresste Pflanzenöle hergestellt, die keine Raffinationsschritte durchlaufen (Widmann, 1994b). Durch das Kaltpressverfahren in den dezentralen Ölmühlen wird Rapsöl für die Nutzung vor allem im Non-Food-Bereich insbesondere für die Biodieselerzeugung gewonnen (Stotz, et al., 2005). Die Ölgewinnung mittels Kaltpressen beinhaltet drei Verfahrensschritte darunter Vorbehandlung der Ölsaat, Ölgewinnung und Ölreinigung. Die Entölung erfolgt ausschließlich auf mechanischem Wege, meist mittels Schneckenpressen. Bei dem Kaltpressverfahren fällt das fettreiche Nebenprodukt mit ca. 8-20% Rohfett je nach Intensität des Pressens an, welches als Rapskuchen bezeichnet wird (Widmann, 1994a; Remmele, 2007).

Des Weiteren wird Rapsöl in einzelnen Ölmühlen durch Heißpressverfahren gewonnen. Dabei erfolgt die Ölgewinnung aus der Rapssaat durch zweimaliges Pressen bei jeweils vorgeschalteter Hitze-Konditionierung des Pressgutes. Der Preßrückstand wird Expeller genannt und weist einen niedrigeren Restölgehalt im Vergleich zu dem Rapskuchen aber einen höheren im Vergleich zu dem lösungsmittlextrahierten Rapsschrot auf (Jeroch, 2008).

2.5. Verfahren zur Proteingewinnung aus Raps

Aufgrund der unterschiedlichen physiko-chemischen strukturbedingten Eigenschaften der Hauptproteinfraktionen bei Raps, Albuminen und Globulinen, sind unterschiedliche Technologien für ihre Gewinnung erforderlich. Außerdem sollen die antinutritiven sekundären Inhaltsstoffe der Rapssaat bei der Verfahrensplanung beachtet werden. Zusätzlich haben die industriell eingesetzten Rapsverarbeitungstechnologien zur Ölgewinnung eine negative Auswirkung auf die Qualität des entölte Schrotes. Dadurch werden für die Proteingewinnung entscheidende funktionelle und nutritive Eigenschaften wie

Proteinlöslichkeit, Gehalt an verfügbaren Aminosäuren und deren Verdaulichkeit u.a. sehr ungünstig beeinflusst. In Anbetracht der oben aufgeführten Aspekte befinden sich derzeit keine Verfahren für die Gewinnung und Herstellung von Proteinprodukten auf Basis Raps in der industriellen Anwendung.

In vielen Publikationen sind verschiedene Vorschläge zur Rapsproteingewinnung bezüglich der Proteinaufbereitung beschrieben. Es wurde eine Proteingewinnung durch alkalische Extraktion mit Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung und anschließende Präzipitation mit verdünnter Säure dokumentiert. Dabei unterschieden sich die berichteten Extraktionsmethoden in

- dem pH-Wert der Proteinextraktion,
- der NaOH-Konzentration,
- der Temperatur,
- dem Verhältnis Feststoff : Wasser,
- den Parametereinstellungen während des Zentrifugationsschrittes,
- der Art der Säure als Präzipitationsmittel und
- dem pH-Wert der Proteinpräzipitation.

Diese Parameter stellen die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Proteingewinnung dar (Klockeman, et al., 1997; Aluko, et al., 2001; Aluko, et al., 2005; UFOP, 2007; Lulu, et al., 2008; Aider, et al., 2011). Nach der Säurepräzipitation kann der Zentrifugationsüberstand, der die nicht-säure-fällbaren Proteine enthält, ultrafiltriert werden (Ghodsvali, et al., 2005).

Das PMM-Verfahren, aus dem englischen protein micellar mass, beinhaltet vier Hauptverfahrensschritte: Extraktion, Ultrafiltration, Verdünnung und Präzipitation. Das entölte Rapsmehl wurde einer Extraktion mit Natriumchlorid (NaCl)-Lösung unterzogen. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Ultra- und Diafiltration konzentriert und entsprechend aufgereinigt. Das Retentat wurde mit kaltem Wasser verdünnt, um die Ionenstärke der konzentrierten Proteinlösung zu senken und damit die Präzipitation der salzlöslichen Proteine zu begünstigen. Burges schlug einen Verdünnungsfaktor von 1 bis 6 zur Ausfällung der aufgereinigten salzextrahierten Proteine durch Bildung von Proteinmizellen vor. Anschließend wurden die Proteinmizellen durch Zentrifugation abgetrennt und gefriergetrocknet. Mit dem PMM-Verfahren kann die Konzentration von

antinutritiven Komponenten wie z.B. Glucosinolate und deren Abspaltprodukte reduziert werden. (Burgess, et al., 1991; Ismond, et al., 1992; Tan, et al., 2011).

Ein patentiertes Verfahren zur Herstellung von Rapsproteinkonzentraten beinhaltet folgende Hauptverfahrensschritte: Konditionierung, Schälung, mechanische Behandlung, Pressung und Flockierung, Lösemittel-Entölung mit n-Hexan, Flash-Desolventisierung, wässrig-alkoholische Extraktion, Detoxifizierung, Trocknung und anschließende Vermahlung. Das Verfahren schließt eine wässrige Proteinextraktion aus. Die Proteinkonzentrierung wird durch den Schälprozess, die Entölung und die wässrig-alkoholische Extraktion realisiert. Die Abreicherung von Proteinbegleitstoffen ist besonders durch die wässrig-alkoholische Extraktion vorgesehen. Das nach diesem Verfahren gewonnene Rapsproteinprodukt weist einen Proteingehalt von etwa 60 % auf (Pickardt, et al., 2010).

Ebenfalls wurden Verfahren zur simultanen Gewinnung von Öl- und Proteinprodukten aus Raps auf der Basis von wässrigen Extraktionen untersucht. Die wässrige Ölgewinnung basiert hauptsächlich auf der Verdrängung des Öls aus den offenen Zellverbänden. Die Ergebnisse der Versuche zeigten, dass aufgrund der Emulsionsbildung während der intensiven Vermischung mittels Ultra-Turrax oder Hochdruckhomogenisator zum Erreichen von vollständigem Zellaufschluss geringe Ölausbeuten (63 % bis zu max. 72 %) im Vergleich zu dem mechanischen Pressverfahren (Ölausbeute 80-85 %) erreicht wurden. Außerdem wurde beobachtet, dass sich die Proteine auf alle bei der Ölgewinnung anfallenden Fraktionen verteilen. Aufgrund der nicht ausreichenden Ölgewinnung wurde die Proteingewinnung aus der teilentönten Rapsmehlfraktion nicht betrachtet. Daher wurde das Verfahren der simultanen Öl- und Proteingewinnung aus vollfettetem Raps nicht weiter umgesetzt (Wäsche, 2002).

Eine nach der PMM-Methode basierte Verfahrensbeschreibung zur Herstellung von Rapsproteinisolaten wurde von der kanadischen Firma Burcon NutraScience Corp. bekannt gegeben. Das durch mehrere Patente geschützte Verfahren beschreibt die Proteingewinnung aus schonend hergestelltem Rapsschrot. Die Canola/Rapssaat wurde wärmebehandelt, um das Enzym Myrosinase zu inaktivieren. Nachfolgend wurde die Saat geschält und gepresst. Die Presskuchen wurden anschließend durch Gegenstrom-Hexanextraktion entölt. Das entölte Rapsschrot wurde in einem Vakuum-Desolventizer schonend detoxifiziert. Danach wurde das Rapsschrot einer Proteinextraktion mit Salz (NaCl)-Lösung unterzogen. Nach der Separation der beiden Phasen wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration aufgereinigt. Die Proteinlösung nach dem Ultrafiltrationsschritt enthielt sowohl Cruciferin als auch Napin. Die

Proteinlösung wurde nachfolgend pasteurisiert, gekühlt und verdünnt, wodurch die Globulinfraktion als Micellen (Protein micellaren Masse, PMM) ausgefällt wurde. Durch Zentrifugation wurden die Proteinmizellen aus der Lösung separiert. Anschließend wurden sie wieder aufgelöst und sprühgetrocknet. Als Endprodukt wurde Puratein® (Proteingehalt > 90 %) gewonnen, welches aus Globulinen der Cruciferinfraktion (min 80 %) besteht. Der Überstand, der die Albumine der Napinfraktion enthält, wurde nachfolgend durch einen zweiten Ultrafiltrationsschritt weitergereinigt. Das Retentat wurde sprühgetrocknet und somit ein Supertein™ genanntes Proteinprodukt (Proteingehalt > 90 %) gewonnen, das reich an Albuminen (min 80 %) ist. Burcon hat im Jahr 2010 von der US-Lebensmittelbehörde (Food and Drug Administration FDA) die Marktzulassung für die Rapsproteinisolate Puratein und Supertein erhalten (ADM, 2010). Laut anderen Patentschriften von Burcon kann das oben beschriebene Verfahren auf die Produktion von Canola/Rapsproteinisolat umgestellt werden, das sich sowohl aus einer Cruciferin- sowie aus einer Napinfraktion zusammensetzt. Im Wesentlichen unterscheiden sich die beiden Verfahren darin, dass die aufkonzentrierte und aufgereinigte Proteinlösung nach dem ersten Ultrafiltrationsschritt direkt getrocknet wird, ohne eine Proteinfractionierung durchzuführen. Die Anwendung dieses Rapsproteinisolates ist für den Aquafeed-Bereich vorgesehen (Schweizer, et al., 2005).

Eine andere kanadische Firma MCN Bioproducts Inc. hält eine Vielzahl von Patenten zur Herstellung von Rapsproteinkonzentraten, wie CanPro IP, CanPro SP und CanPro FP. Das technologische Verfahren beinhaltet eine wässrige Proteinextraktion, enzymatische Behandlung zur Phytatentfernung, Präzipitation und Filtration. Das Produkt CanPro IP ist ein unlösliches Proteinkonzentrat mit reduziertem Phytatgehalt, welches einen Einsatz als Fischmehlalternative anstrebt. Das Konzentrat CanPro SP ist ein lösliches Proteinprodukt und CanPro FP ist ein faserreiches Proteinprodukt. Alle Proteinprodukte sind für den Feed-Bereich entwickelt (Maenz, et al., 2004; Newkirk, et al., 2006; Maenz, 2007; Newkirk, et al., 2009).

Verfahren zur Herstellung von Rapsproteinisolaten wurden von der Firma BioExx Specialty Proteins Ltd entwickelt und patentiert. Als Proteinprodukte werden ein 90 %-iges Proteinisolat (Isolexx®) und ein hydrolisiertes Proteinisolat (Vitalex®) mit einem Gehalt an Peptiden und Aminosäuren von 80 % aufgeführt. Die beiden Produkte wurden von der FDA als GRAS (Generally Recognized As Safe) eingestuft (Keller and Heckman LLP, 2011).

Rapsproteine werden bis heute nicht industriell hergestellt. Mehrere Verfahren zur Rapsproteinherstellung wurden durch Patentschriften von unterschiedlichen Unternehmen geschützt. Keines davon hat sich bis jetzt wirtschaftlich durchgesetzt und die industrielle Reife erreicht.

3. Experimentelle Arbeiten

3.1. Analysemethoden

Das Ausgangsmaterial, die hergestellten Zwischenprodukte und Rapsproteinprodukte wurden hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffzusammensetzung charakterisiert. In dem vorliegenden Unterkapitel sind die verwendeten Analysemethoden aufgeführt. Die Durchführung aller analytischen Messungen erfolgte in Doppelbestimmung.

3.1.1. Trockensubstanz

Die Trockensubstanz wurde mittels Sartorius MA 30 Feuchteanalysator bei 105°C bestimmt. Die in-situ gravimetrische Messmethode beruht auf der Erwärmung durch Infrarotstrahlung und der Ermittlung des Gewichtsverlusts.

3.1.2. Rohproteingehalt

Der Rohproteingehalt der Proben wurde über die Stickstoffbestimmung nach der Kjeldahlmethode in Anlehnung an die Verbandsmethode des VDLUFA (VDLUFA-Methodenbuch III, Kap. 4.1.1) bestimmt. Die Stickstoffbestimmungen wurden von akkreditierten Prüflaboratorien wie LUFA Nord-West Institut für Futtermittel und ÖHMI Analytik GmbH durchgeführt. Als Umrechnungsfaktor vom Stickstoffgehalt auf den Rohproteingehalt der Rapsproteinproben wurde 6,25 verwendet.

3.1.3. Rohfettgehalt

Die Bestimmung des Rohfettgehalts erfolgte in Anlehnung an die DIN EN-ISO 659 von 1998-10. (weitere Bestimmungsmethode: DGF - B - I5)

3.1.4. Rohfasergehalt

Die Bestimmung des Rohfasergehalts erfolgte nach der Verbandsmethode des VDLUFA (VDLUFA-Methodenbuch III, Kap. 6.1.1). Die Analysen wurden von dem akkreditierten Prüflabor LUFA Nord-West Institut für Futtermittel durchgeführt.

3.1.5. Rohaschegehalt

Der Rohaschegehalt wurde nach der Verbandsmethode des VDLUFA (VDLUFA-Methodenbuch III, Kap. 8.1) bestimmt. Die Untersuchungen zur Bestimmung des

Rohaschegehalts wurden von dem akkreditierten Prüflabor LUFA Nord-West Institut für Futtermittel durchgeführt. Aus dem Rohaschegehalt kann die organische Masse (OM) berechnet werden.

3.1.6. Stickstofffreie Extrakt (NfE)-Gehalt

Der stickstofffreie Extrakt (NfE)-Gehalt wurde rechnerisch ermittelt. Zur Berechnung des NfE-Gehalts wurden die Gehalte des Rohfetts, des Rohproteins und des Rohfasern von der organischen Masse abgezogen.

3.1.7. Salzgehalt

Zur Bestimmung des Salzgehaltes wurde die Methode DIN 38405-D1 von ÖHMI Analytik GmbH verwendet.

3.1.8. Glucosinolatgehalt

Die Bestimmung des Glucosinolatgehalts wurde nach der Methode EG 1864/90 L 170/28 durchgeführt. Die untersuchten Rapsproben wurden auf Glucosinolatgehalt von den Prüflaboratorien LUFA Nord-West Institut für Futtermittel und ÖHMI Analytik GmbH untersucht.

3.1.9. Phytinsäuregehalt

Der Phytinsäuregehalt wurde nach der Methode SAA A 004 bestimmt. Die Phytinsäurebestimmung wurde von der ÖHMI Analytik GmbH durchgeführt.

3.1.10. Sinapinsäuregehalt

Die Analytik der Sinapinsäure wurde nach der Hausmethode von der Fa. A.C.T. FOODS GmbH durchgeführt. Zur Bestimmung der Sinapinsäure bzw. der Sinapinsäure-Equivalente wurden die Proben einer mehrfachen Lösungsmittelkalextraktion (methanolische Lösung) unter Ultraschallanwendung unterzogen. Nach Filtration wurden die Extrakte per HPLC untersucht. Die Kalibrierung erfolgte mittels externen Sinapinsäure-Standard (Reinheit >97%) bei einer Wellenlänge von 330 nm. Die Zuordnung der Sinapinsäureester erfolgte anhand des Absorptionsspektrums sowie entsprechender Literaturangaben. Die Gehalte an Sinapoylglucose und Sinapin wurden über die Sinapinsäurekalibrierung berechnet und sind ebenso wie die nicht identifizierten Sinapinsäureester als Sinapinsäure-Equivalente

angegeben. Unter der Summe an Sinapinsäureestern (SAE) sind alle Verbindungen addiert, die mit Sinapinsäure vergleichbare Absorptionsspektren aufwiesen und als sinapinsäurehaltige Substanzen eingestuft werden können (A.C.T.FOODS, 2011).

3.1.11. Tannin-Gehalt

Der Tannine-Gehalt wurde nach der Methode ASU L 47.00-10 von ÖHMI Analytik GmbH bestimmt.

3.1.12. Myrosinaseaktivität

Bei dem katalytischen Abbau von Glucosinolaten entstehen äquimolare Mengen aus D-Glucose. Aus ihrer Konzentrationsänderung in angebrochenen Rapssamen wird die Myrosinaseaktivität in den Rapskörnern ermittelt. Nach Gleichung 3-1 lässt sich die Myrosinaseaktivität Myro-U berechnen:

$$\text{Myro-U} = \frac{m_{\text{Pufferlösung}} \cdot 10^6 \cdot (c_1 - c_0)}{\rho_{\text{Extrakt}} \cdot M_{\text{D-Glucose}} \cdot t_{\text{Reaktion}} \cdot m_{\text{Raps}}} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Myro-U = Myrosinaseaktivität in angebrochenen Rapskörnern in $\mu\text{mol/g min}$

$m_{\text{Pufferlösung}}$ = Einwaage Pufferlösung in g

c_1 = Konzentration an D-Glucose nach 10 min Reaktionszeit in g/l

c_0 = Konzentration an D-Glucose in angebrochenen Rapskörnern in g/l

ρ_{Extrakt} = Dichte Extrakt bei Raumtemperatur in kg/m^3 (Wert: $963,5 \text{ kg/m}^3$)

$M_{\text{D-Glucose}}$ = Molare Masse von D-Glucose in g/mol

t_{Reaktion} = Reaktionszeit in min (Wert: 10 min)

m_{Raps} = Einwaage angebrochene Rapskörner in g

Dazu wurden 5 g mittels Mörser angebrochene Rapssaat in einer Pufferlösung (pH=6; 1:10) suspendiert. Die Änderung der Konzentration an D-Glucose wurde nach Zugabe von Sinigrin (Sigma 7508) bestimmt. Hier wird der katalysierte Abbau von Sinigrin zu D-Glucose mittels des Enzyms Myrosinase gestartet. Die Hydrolysereaktion nach 10 Minuten Hydrolysedauer wurde durch Zugabe von Carrez-Lösung I und Carrez-Lösung II gestoppt, und danach wurde die Glukosekonzentration enzymatisch mittels eines D-Glucose UV-Tests der Firma Boehringer Mannheim / R-Biopharm AG und eines Photometers UVmini 1240 von der Firma Shimadzu bestimmt. Der Gehalt an nativer D-Glucose in angebrochenen Rapssamen (c_0)

wurde nach spontaner Inaktivierung der Myrosinase in angebrochener Rapssaat in siedendem Ethanol (reinst=99 %) enzymatisch mit obiger Methode bestimmt (Böhringer, 1989; Wäsche, 2002; Natsch, 2006).

3.1.13. Aminosäurezusammensetzung

Die Bestimmung von Aminosäuren erfolgte mittels HPLC-Methode. Die Aminosäuregehalte des Rapsproteinkonzentrates wurden von dem Prüflabor ÖHMI Analytik GmbH bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Rapsschroten und sowie Rapsproteinprodukten wurde ebenfalls von Evonik Industries AG durchgeführt. Zusätzlich wurden die Aminosäuregehalte der Albumin- und Globulinkonzentrate von der Arbeitsgruppe von Dr. Schöne an der Abteilung Untersuchungswesen der Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL) bestimmt.

3.1.14. Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE

Das Molekulargewicht der Rapsproteine wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass die Proteine in ihre Untereinheiten in einem Umfeld von 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0,1 M β -Mercaptoethanol, das die Disulfid-Brücken zwischen Polypeptidketten zerstört, zerfallen. Die so behandelten Proteine binden das SDS fest vor allem auf Grund der hydrophoben Wechselwirkungen. Es wurde festgestellt, dass die Menge des gebundenen Natriumdodecylsulfates immer konstant und gleich 1,4 g SDS pro 1 g Protein ist. Da das SDS an den Proteinmolekülen in einen Überschuss bindet, werden die Proteinmoleküle immer negativ geladen. Deshalb hängt ihre Mobilität im Gel zur Anode nur von ihrem Molekulargewicht ab, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Trennung der Proteine erfolgt nach der Größe, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere Proteine. Mit Hilfe der SDS-PAGE kann die Molmasse unbekannter Proteine durch Vergleich der Laufstrecke mit der der Markerproteine mit bekannten Molmassen abgeschätzt werden (Michov, 1995).

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Rapsproteine erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die SDS-PAGE wurde sowohl unter reduzierenden Bedingungen als auch unter nicht-reduzierenden (in diesem Fall fehlt das β -Mercaptoethanol) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidgehalt von 14 % und entsprechend Sammelgel von 5 % verwendet, deren Zusammensetzung in der folgenden Tabelle beschrieben ist.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Gele

Gel	Lösung	V in ml
14 %-iges Trenngel	Acryl-Bis-Lösung (30 %)	7,000
	Trenngelpuffer (1,5 M Tris/pH=8,8)	3,750
	Bidestilliertes Wasser	4,000
	SDS-Lösung (10 %)	0,080
	TEMED-Lösung (10 %)	0,080
	APS-Lösung (10 %)	0,080
5 %-iges Sammelgel	Acryl-Bis-Lösung (30 %)	0,425
	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/pH=6,8)	0,625
	Bidestilliertes Wasser	1,450
	TEMED-Lösung (10 %)	0,025
	APS-Lösung (10 %)	0,025

Der Apparat, vertikale Gelelektrophorese-Einheit CTV100YK von VWR für Gele von 10x10cm, wurde für die elektrophoretischen Untersuchungen unter reduzierenden Bedingungen verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 80 mA für ca. 1-2 Stunden durchgeführt. Die Molekulargewichtsmarker, Kalibrierungskit für SDS-PAGE Electran, 12,3 – 78 kDa der Firma VWR wurden verwendet. Nach der Trennung wurden die Gele mit Coomassieblau-Färbelösung gefärbt, anschließend mit einer Entfärbelösung entfärbt. Die Gele wurden dann mit Hilfe einer Dunkelkammer, Syngene InGenius LHR System mit Software Syngene – GeneSnap Version 7.08.N , photographiert. Die Gele wurden mittels des Software Syngene – Gene Tools Version 4.01(c) ausgewertet. Die relative Quantität der einzelnen Proteinbanden bzw. Proteinfractionen wurde mittels des Gene Tools – Software ermittelt.

Die elektrophoretischen Untersuchungen unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Idakieva an der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt. Ein Mini-Protean Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA wurde verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 50 V durch das Sammelgel und 100 – 120 V durch das Trenngel durchgeführt. Als Proteinmarker wurde die Protein-Standardmischung IV für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Bereich 12300-78000 g/mol) der Firma Merck verwendet.

3.2. Charakterisierung der Produkteigenschaften

3.2.1. Thermodynamische Eigenschaften (Proteindenaturierung) mittels DSC

Die thermoanalytische Charakterisierung der hergestellten Rapsproteine erfolgte mittels der Dynamischen Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry DSC). Für die Messungen wurde das Messgerät NETZSCH DSC 200 F3 Maia mit Proteus-Software für thermische Analyse Version 5.2.0 eingesetzt. Die Rapsproben wurden in 0,1 mol/l NaCl bei einer Konzentration von ca. 40 % gelöst. Eine Probenmenge von 10 bis 15 mg wurde in spezielle Aluminiumtiegel (Fa. Netzsch) eingefüllt. Die Messtiegel wurden vor der Messung hermetisch versiegelt. Die endotherme Wärmemenge der Proteindenaturierung wurde bei einer Aufheizrate von 2 K/min im Temperaturbereich zwischen 40 °C und 120 °C untersucht. Die Parameter der Hitzedenaturierung wie die Denaturierungstemperatur T_d und die spezifische Denaturierungsenthalpie ΔH_d sind anhand der Differentialkurve bestimmt. Die spezifische Denaturierungsenthalpie in J/g Probe wurde ermittelt, deren Wert in J/g Proteineinwaage rechnerisch durch Division mit dem Proteinhalt der Probe bestimmt wurde. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung des Probenmaterials.

3.2.2. Technofunktionelle Eigenschaften (Proteinlöslichkeit) mittels PDI

Zur Bestimmung des Protein-Dispersibilitäts-Indexes (PDI) wurde die Methode AOCS Ba 10b-09 in modifizierter Form angewandt. Diese Methode ist am PPM e.V. eine etablierte Methode zur Bestimmung des PDI-Wertes.

Nach der für Soja-Protein entwickelten Methode AOCS Ba 10b-09 können die Rapsproteine nicht hinreichend extrahiert werden. Deshalb wurde von PPM e.V. eine eigene Bestimmungsmethode mit einer 3-stufigen Extraktion entwickelt, die für Rapsextraktionsschrot deutlich höhere PDI-Werte als die Einheitsmethode AOCS Ba 10b-09 ergibt. Jede der drei Extraktionen wird mit unterschiedlichen Bedingungen bezüglich Salzgehalt und pH-Wert ausgeführt (Pudel, 2011).

3.2.3. Anwendungstechnische Eigenschaften (Korngrößenverteilung) mittels HELOS-Partikelgrößenanalyse

Die Partikelgrößenanalysen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Mörl, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, bestimmt. Aufgrund der Agglomeratbildung und der zu erwartenden geringen Partikelgröße des fein gemahlene Rapsextraktionsschrotes und der

infolge der Sprühtrocknung mikronisierten Rapsproteinprodukte wurden die Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung mithilfe der Laserdiffraktometrie durchgeführt. Dazu wurde das Messgerät HELOS der Firma Sympatec eingesetzt. Die Zuführung der Rapsproben zum Messgerät geschieht über das Dispergiersystem „RODOS“. Das trockene Pulver wurde mittels Druckluft dispergiert und in die Messzone gefördert.

3.2.4. Oberflächeneigenschaften (Oberflächenstruktur) mittels Rasterelektronenmikroskops (REM)

Die morphologische Untersuchung der erzeugten Rapsproteinprodukte wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (PHENOM Desktop-Elektronenmikroskop EM-10001 der Firma L.O.T.-Oriol Laser Optik Technologie GmbH & Co. KG) durchgeführt. Die Messungen wurden an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik, Institut für Apparate- und Umwelttechnik (IAUT) realisiert.

Die Rapsproben wurden mittels eines Leit-Tabs auf einen Aluminiumprobenteller fixiert und in einem Sputter Coater (Mini Sputter Coater SC7620) unter Vakuum mit Gold-Palladium bedampft. Die REM-Bilder wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungsfaktoren aufgenommen.

3.3. Versuchsmaterial

Als Versuchsmaterial wurde Rapssaat von der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ) eingesetzt. Als einheitliche Grundlage wurde die Liniensorte Lorenz verwendet. Die Inhaltsstoffzusammensetzung der Rapssaat ist in der Tabelle 3-2 dargestellt. Die Daten wurden von der Norddeutschen Pflanzenzucht übermittelt.

Tabelle 3-2: Inhaltsstoffzusammensetzung der Rapssorte Lorenz

Saatursprung	Feuchte [% i. Tr.]	Ölgehalt [% i. Tr.]	Proteingehalt [% i. Tr.]	Glucosinolate [μmol/g i. Tr.]	ADF [% i. Tr.]	ADL [% i. Tr.]
Lorenz HR 3165	6,5	50,3	20,2	15,4	13,6	7,4
Lorenz HR 3165	6,5	49,8	21,0	13,3	13,3	7,2
Lorenz HR 3165	6,5	50,2	20,6	12,4	13,3	7,2
Lorenz HR 3059	6,5	50,1	20,4	14,6	13,7	7,5
Lorenz HR 3059	6,4	49,2	21,2	14,8	13,2	7,2
Lorenz HR 3059	6,6	49,6	20,6	15,9	13,8	7,5

3.4. Versuchs- und Verfahrensplanung

Für die Bestimmung der nutritiven Qualität von Rapsproteinen für die Fischernahrung sollen Verarbeitungstechniken, welche die Herstellung von hochwertigen und möglichst nativen Rapsproteinen gewährleisten, eingesetzt werden. Eine Grundvoraussetzung für die Proteingewinnung ist ein schonend verarbeitetes Ausgangsmaterial, welches sich anschließend durch hohe Proteinlöslichkeit auszeichnet.

Die industrielle Rapsverarbeitung ist auf die Ölgewinnung orientiert und folglich sind Verarbeitungstechnologien zum Erreichen von maximaler Ölausbeute in den Ölmühlen etabliert worden. Während des Verarbeitungszyklus wird das Ausgangsmaterial thermisch beansprucht, was zur Veränderung der Proteinqualität des daraus erhaltenen Schrotes führt. Besonders kritisch für die Proteinextraktion aus dem in den Ölmühlen anfallenden Rapsextraktionsschrot ist der Toastprozess, da dieser unter hohen Temperaturen und langen Verweilzeiten durchgeführt wird und infolge dessen sich die Proteinqualität verändert. Die Hitze wirkt besonders auf die sekundäre Proteinstruktur, welche durch Bildung von Wasserstoff- und Di-Sulfidbrücken gekennzeichnet ist. Durch Hitze lösen sich die Brücken auf und Strukturen fallen zusammen. Somit werden die Proteine denaturiert.

Folglich treten während der herkömmlichen Rapsverarbeitung irreversible strukturelle Veränderungen der Proteine (Denaturierung) ein. Während der Toastung des Schrotes tritt ein Verlust an Bioverfügbarkeit und Funktionalität aufgrund der intensiven thermischen Belastung auf. Die hohe thermische Beanspruchung führt zur deutlichen Verringerung der Proteinlöslichkeit infolge der verstärkten Proteindenaturierung, wodurch die künftige Proteinextraktion aus dem Schrot erschwert wird. Ebenfalls tritt eine Reduktion der verfügbaren essentiellen Aminosäuren, besonders die Aminosäure Lysin, auf, da sie während der verstärkten Toastung abgebaut oder unlöslich gebunden werden. So sinkt die Proteinverdaulichkeit und damit Bioverfügbarkeit. Folglich wird sowohl die Proteinlöslichkeit als auch die biologische Wertigkeit des Proteins durch die Temperaturbelastung während des Desolventisierungs-/Toastprozesses negativ beeinflusst (Huber, et al., 2004; Schöne, et al., 2007).

Um möglichst native Rapsproteine mit hoher biologischen Wertigkeit zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Rapsprotein-Herstellungstechnologie ausgehend von der Rapssaat betrachtet. Die Verarbeitung der Rapssaat bis zum Rapschrot wurde nach möglichst industrienahen Verarbeitungsmethoden durchgeführt. Eine Einschränkung der

Proteindenaturierung und der damit verbundenen Funktionalitätsverluste während der eingesetzten Verarbeitungsmethoden wurde in den Vordergrund gestellt. Es wurde beachtet, dass während der Rapsverarbeitung bei möglichst niedrigeren Arbeitstemperaturen gearbeitet wird, um einer Proteindenaturierung vorzubeugen.

Insbesondere der Desolventisierungsprozess wurde unter proteinschonenden Bedingungen durchgeführt. Für diesen Zweck wurde ein Wirbelschicht (WS)-basiertes Desolventisierungsverfahren eingesetzt. Die Wirbelschichttechnologie bietet einen sehr intensiven Stoff- und Wärmeaustausch, was niedrigere Temperaturregime und geringere Verweilzeiten zur Hexanentfernung aus dem Rapschrot gegenüber den herkömmlichen Toasterverfahren ermöglicht. Somit wird eine proteinschonende Behandlung des Schrotes gewährleistet, welche durch hohe Proteinlöslichkeit charakterisiert ist und entsprechend deutlich höhere PDI-Werte als konventionell getoastete RES aufweist. Für nachfolgende Proteingewinnungsverfahren ist diese Eigenschaft von besonderer Bedeutung.

Die Herstellung von Rapsproteinprodukten wurde im Pilot-Maßstab durchgeführt, da für Fischfütterungsversuche mit entsprechender Versuchsdauer eine Rohstoffmenge von ca. 10 kg pro Rapsproteinprodukt benötigt wird. Das Verfahrenskonzept der Herstellung einzelner Rapsproteinprodukte ist im Abschnitt 4 erläutert. Die Versuchsdurchführung und die verwendeten Verfahrensschritte werden in dem nachfolgenden Unterkapitel beschrieben.

3.5. Versuchsdurchführung

3.5.1. Konditionierung

Die Wärmekonditionierung der Saat zur Myrosinase-Inaktivierung wurde in einem Schaufeltrockner (Typ D 600, DVA Deutsche Vakuumapparate Holland Merten GmbH) durchgeführt. Der Wärmeeintrag erfolgte durch den mit Wasserdampf beheizten Doppelmantel des Trockners (Heizmitteltemperatur von ca. 130°C). Mittels eines Schaufelwerks mit einer Drehzahl von 10 min⁻¹ wurde die Saat vermischt.

Die Konditionierung wurde chargenweise durchgeführt. 30 kg Rapssaar pro Charge (Feuchtegehalt=6 – 8 Mass.-%) wurden wärmebehandelt. Die Dauer der Wärmebehandlung beträgt 15 min und die Saatausgangstemperatur aus dem Trockner liegt bei ca. 80 °C.

3.5.2. Pressung

Die wärmebehandelte Rapssaat mit ca. 5 – 6 % Wassergehalt wurde zur Ölgewinnung in einer Schneckenpresse Typ Komet S87G der Firma Monforts verarbeitet. Einen Schneckentyp von R6 und eine Pressdüse mit einer Bohrung von 6 mm Durchmesser wurden verwendet. Während der Ölpressung wurde die Getriebestellung auf 4,3 eingestellt. Die Pressschneckendrehzahl betrug 27 min^{-1} . Für Saatterperatur, Presskopftemperatur und Ölablauftemperatur wurden Temperaturbereiche von 20 – 25, 45 – 55 und entsprechend 35 – 45 dokumentiert. Der Feuchtegehalt der Presskuchen variiert von 9 bis 10 %.

3.5.3. Presskuchenzerkleinerung

Vor dem nächsten Entölungsschritt wurden die Presskuchen in einer Riffelwalzen-Mühle Typ Haferboy Modell Vorbrecher der Firma Egon Sommer Maschinen- und Gerätebau auf ca. 5 mm grobzerkleinert. Es wurde eine einstufige Zerkleinerung mit einem Walzenabstand von 5 mm durchgeführt.

3.5.4. Hexanextraktion

Die Hexanextraktion wurde in der Pilotanlage zur Fest-Flüssig-Extraktion mit Miscella-Destillation der Firma Bio-Ingenieurtechnik GmbH realisiert.

Die Ölextraktion wurde als Perkolation im Chargen-Betrieb durchgeführt. Je Charge wurden 35-40 kg zerkleinerten Presskuchens eingesetzt. Für jede Extraktionsstufe wurden 70 l Hexan verwendet. Der eingesetzte Presskuchen (A) wurde in einem perforierten Einsatz (B) im Perkulationsbehälter (C) des Extraktors vom Solvent (D) (Hexan) bzw. Miscella (E) durchströmt (Abbildung 3-1). Die Extraktion wurde zwei Stunden lang bei 58-60 °C im Kreislaufbetrieb bei einer Lösungsmittelzirkulation von 500-550 kg/h zweistufig durchgeführt. Nach jeder Extraktionsstufe wurde die Miscella einer Lösungsmitteldestillation unterzogen. Das destillierte Hexan (ca. 50 l) wurde für die zweite Extraktion verwendet.

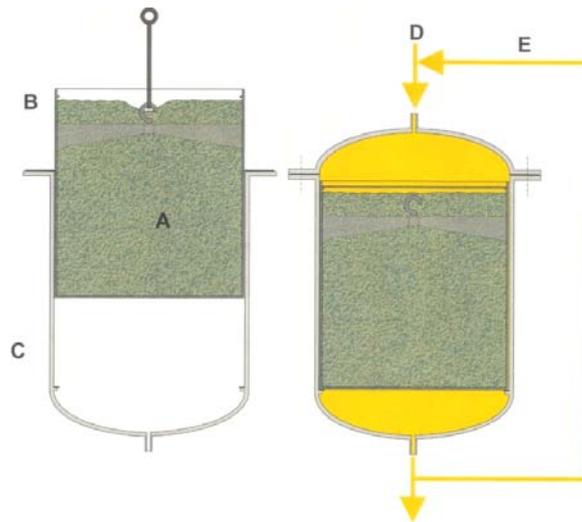


Abbildung 3-1: Schema der Festbettextraktion (Leidt, 2010)

3.5.5. Desolventisierung

Die anschließende Desolventisierung des Extraktionsgutes erfolgte mit einer neuentwickelten kleintechnischen Versuchsanlage zur Wirbelschicht-Desolventisierung von RES der Firma Dr. Weigel Anlagenbau GmbH (F/E-Projekt 2023902).

Die Desolventisierung wurde bei einer Betriebsart der Versuchsanlage durchgeführt (unten als Teilstromkondensation bezeichnet), bei der nur ein Teil des gesamten Kreislaufgasstroms in den Kondensator übergeht, wo dieser Teilstrom auf ca. 20 °C abgekühlt wird und dadurch die aus dem RES verdampften Hexan- und Wasseranteile sofort auskondensiert werden. Folglich baut sich im Laufe des Desolventisierungsprozesses eine Hexankonzentration im Kreislaufgasstrom auf.

Die Desolventisierung von RES wurde chargenweise durchgeführt. Zu Beginn des Versuches wurde die Anlage mit Stickstoff inertisiert und auf Betriebstemperatur (85-95°C) aufgewärmt. Die Chargenmenge RES (3 kg) wird aus dem Zugabebehälter „RES-Ein“ in den Wirbelschichtapparat geschleust. Im Wirbelschichtapparat wird das zu desolventisierende RES durch den vom Gebläse angetriebenen und vom Heizer aufgeheizten Kreislaufgasstrom fluidisiert. Anschließend wird das Kreislaufgas über den Filter geleitet, in dem mitgerissene Partikel abgeschieden werden. Entsprechend der Volumenzunahme durch Verdampfung der Feuchte bei der Desolventisierung entweicht ein Teil des Kreislaufvolumens über den Kühler und hier werden die kondensierbaren Bestandteile auskondensiert. Nach einer Desolventisierungsdauer von 15 min/Charge wird der Kreislaufgasstrom angehalten, der

Wirbelboden hochgeklappt und das desolventierte RES wird in den Behälter „RES-Aus“ ausgeschleust.

Das Schema der Versuchsanlage und das Schema der Desolventisierung mit Teilstromkondensation in der Versuchsanlage ist in der Abbildung 3-2 dargestellt.

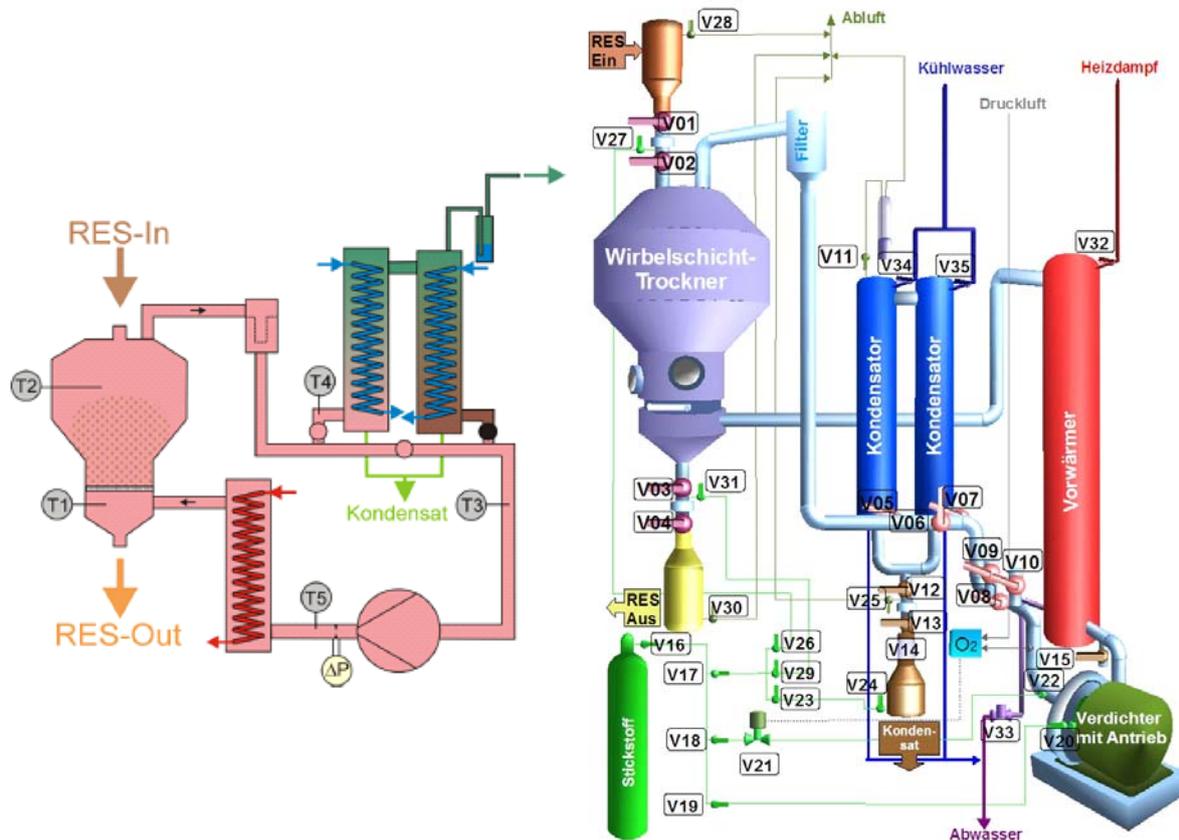


Abbildung 3-2: Schema der Versuchsanlage zur WS-Desolventisierung (rechts) und Schema der Desolventisierung mit Teilstromkondensation an der Versuchsanlage (links) (Leidt, 2008)

In der nachfolgenden Abbildung 3-3 sind die elektronisch registrierten Betriebsparameter für eine Versuchsperiode mit 10 Chargen (bezeichnet als Ch. in der Abbildung) bei oben genannten Bedingungen dargestellt. Die Bezeichnungen der Temperaturen entsprechen den Temperaturmessstellen in Abbildung 3-2.

Aus der Abbildung 3-3 ist zu erkennen, dass bei dieser diskontinuierlichen Fahrweise die Wirbelraum-Temperatur T(IR) 02, die unterhalb der Temperatur des Gases vor dem Wirbelboden T(IR) 01 liegt, nach der Einschleusung des RES um ca. 15 Grad abfällt und sich dann allmählich wieder dem Anfangswert annähert. Das Schrot wird im Temperaturbereich von 65 °C bis max. 80°C (T(IR) 02) behandelt.

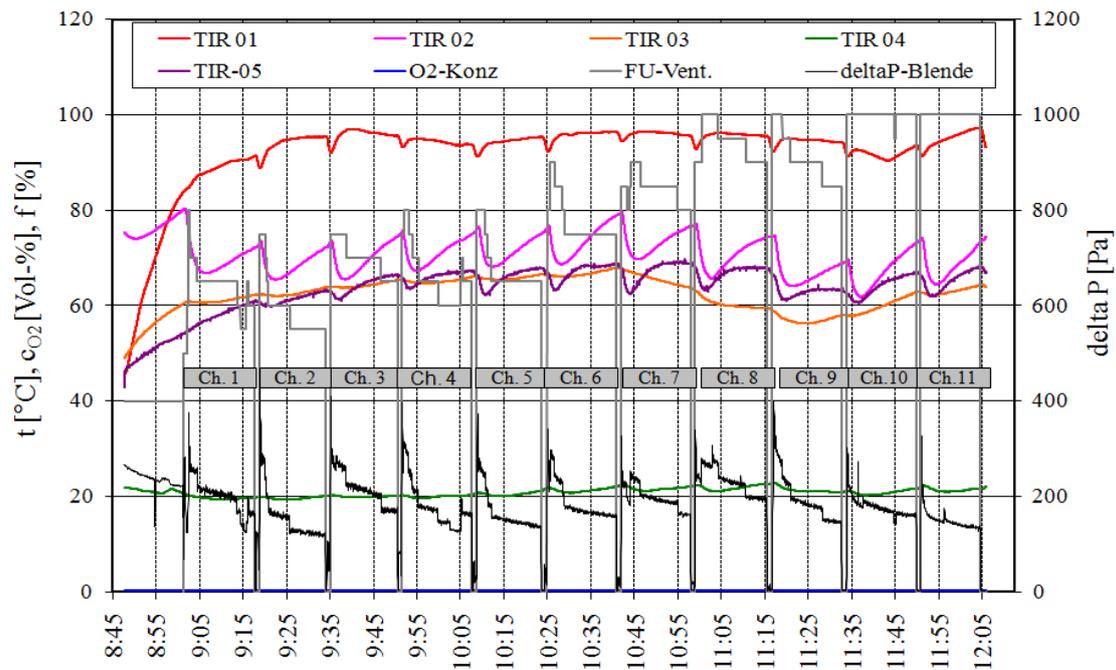


Abbildung 3-3: Versuchsverlauf der WS-Desolventisierung

3.5.6. Ethanolextraktion

Die ethanolische Extraktion zur Entbitterung des Rapsschrotes wurde in der Pilotanlage zur Fest-Flüssig-Extraktion mit der Miscella-Destillation der Firma Bio-Ingenieurtechnik GmbH durchgeführt. Die Entbitterungsversuche wurden mit der gleichen Betriebsweise wie die Entölung mit Hexan durchgeführt. Je Charge wurden 30-35 kg entöltes Rapsextraktionsschrot eingesetzt. Für jede Extraktionsstufe wurden 75 l 75 %-iges Ethanol verwendet. Die Extraktion wurde 35 Minuten lang bei 58-60 °C im Kreislaufbetrieb bei einer Lösungsmittelzirkulation von 500-550 kg/h vierstufig durchgeführt. Nach jeder Extraktionsstufe wurde die Miscella (Ethanol und gelöste Schrotinhaltsstoffe wie Öl, Zuckerbestandteile, Antinutritiva usw.) einer Lösungsmitteldestillation unterzogen. Das destillierte Ethanol wurde für die nächste Extraktionsstufe verwendet. Nach der Entbitterung ist das ethanolfeuchte Schrot zu desolventisieren. Die Desolventisierung erfolgt unter Umgebungsbedingungen.

3.5.7. Schrotvermahlung

Das Schrot wurde in einem Walzenstuhl Haferquetsche Rapsmaster 15S der Firma Egon Sommer Maschinen- und Gerätebau fein vermahlen. Es wurden drei Mahlstufen mit drei

Mahlspalten mit abnehmender Spaltweite realisiert, welche 1 mm für die erste Mahlstufe, 0,5 mm für die zweite und 0,2 mm für die dritte Mahlsstufe betragen.

3.5.8. Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurde ein Misch- und Temperierbehälter SWBR 160 E mit einem Rührwerk der Firma Apparatebau Burg GmbH eingesetzt. Für die Proteinextraktion wurde heißes Leitungswasser zwischen 40 und 45 Grad verwendet. Mittels des Doppelmantels des Rührwerkbehälters zum Durchleiten von Kühl- oder Wärmemedium Wasser wurde die Temperatur während der Proteinextraktion reguliert. Bei 40 min^{-1} wurde die Suspension gerührt. In 10-minütigen Zeitintervallen wurden die Extraktionsparameter wie Temperatur, pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit kontrolliert. Die genaueren Extraktionsbedingungen werden nachfolgend im Abschnitt 4 beschrieben.

3.5.9. Trennung der Proteinlösung

Für die Trennung der gelösten und ungelösten Bestandteile der Extraktionssuspension wurde die Labordekantierzentrifuge MDZ 004 verwendet. Die Trennbedingungen im Dekanter wurden so eingestellt, dass der Oberlauf (Proteinlösung) möglichst keine unlöslichen Feststoffe (Extraktionsrückstand) enthielt, da die Trennqualität von Begleitstoffen einen wesentlichen Einfluss auf den Proteingehalt ausübt. Entsprechend wurde die Drehzahl der Trommel auf 6500 min^{-1} , die Differenzdrehzahl auf 15 min^{-1} festgelegt; bei einem gleichzeitigen Massenstrom (ca. 15 kg/h) sowie der Verwendung eines Überlaufwehrs mit kleinem Innendurchmesser (38 mm).

Für eine nachfolgende Ultrafiltration ist die vollständige Abtrennung von ungelösten Feststoffen eine wesentliche Voraussetzung, da diese sich in den Membranporen einlagern können. Dadurch kann die Membranleistung verringert und folglich die Membranlebensdauer verkürzt werden. Deshalb ist eine anschließende separate Abtrennungsstufe erforderlich. Durch verschiedene Behandlungsstufen, vor allem bei der Feinvermahlung wegen der hohen Staubbildung, kann feines Zellmaterial vorhanden sein, welches sich in der Suspension befindet und nicht durch den Dekanter abgetrennt wird. Darum wurde die abdekantierte Proteinlösung durch einen $90 \mu\text{m}$ Siebansatz geleitet, um noch vorhandene Feststoffe und feines Zellmaterial zu beseitigen.

3.5.10. Ultrafiltration/Diafiltration

Die Ultrafiltration und auch die Diafiltration der Proteinlösung von der ersten Versuchsserie (Rapsproteinkonzentrat-Herstellung) wurden in einer zweistufigen UF-Anlage mit zwei in Reihe angeordneten Membranen (UF-Anlage UF-2Wi 4040 der Firma UFI-TEC) durchgeführt. Als Membranen wurden zwei UF-Spiral-Wickelmembranen 4040 mit einer Trenngrenze von 20 kDa und einem Spacer von 80 mil (Spira-Cel[®] Wickelmodul GY-UP020-4040F der Firma Microdyn Nadir) verwendet.

Die Proteinlösungen von der zweiten und dritten Versuchsserie (Globulin- und Albuminkonzentrat-Herstellung bzw. Rapsproteinisolat-Herstellung) wurden in einer einstufigen UF-Technikumsanlage (UF/MF Pilotanlage der Firma LTH Dresden) ultrafiltriert. Es wurde eine 38“-Wickelmodule Spira-Cel[®] DS-UP010-3838G 1 aus Polyethersulfon mit einer Trenngrenze von 10 kDa und einem Spacer von 80 mil für die zweite Versuchsserie eingesetzt. Eine 38“-Wickelmodule, 3838 HFK-328-HYT, aus Polyethersulfon mit einer Trenngrenze von 5 kDa und einem Spacer von 62 mil der Firma Koch Membrane Systems wurde für die dritte Versuchsserie verwendet.

Die Filtration wurde im Temperaturbereich zwischen 40-45 °C und einem Filtratdruck von ca. 4 bar (UF-Anlage UF-2Wi 4040) und ca. 1,4 (UF/MF Pilotanlage) durchgeführt.

3.5.11. Präzipitation

Die Präzipitation wurde bei einer pH-Wert von 4 und 11 durchgeführt (im Abschnitt 4.3.1.2 näher erläutert). Citronensäure Monohydrat 99,5% und Natriumhydroxid ≥ 98 % wurden als Präzipitationsreagenzien verwendet. Die zu präzipitierende Proteinlösung wurde in einem Behälter (30 l bzw. 50 l) mittels einem Rührwerk mit Propellerrührer (RED 10 mit Digitalanzeige der Firma Windaus Labortechnik) intensiv vermischt. Je nach Lösungsmenge wurden Drehzahlen von 550-1250 min^{-1} erreicht. Der pH-Wert der Lösung wurde auf den definierten Wert eingestellt und es wurde 30 Minuten lang unter ständiger Prüfung des pH-Wertes gerührt. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 4300 rpm und 10 °C (Heraeus Cryofuge 5500i Centrifuge der Firma Thermo Scientific) zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde entsorgt und der verbliebene Rückstand getrocknet.

3.5.12. Trocknung

3.5.12.1. Sprühtrocknung

Die Trocknung der ultrafiltrierten Proteinlösungen aus der 1. Versuchsserie wurde von der Firma NIG Nahrungs-Ingenieurtechnik GmbH durchgeführt. Die Trocknung erfolgte auf einem Sprühturm der Firma NIRO Atomizer. Die Eintritts- und Austrittstemperatur betragen 120-130 °C (Eintrittstemperatur) und 70-75 °C (Austrittstemperatur).

Die Proteinlösungen aus der 2. Versuchsserie wurden in einem Laborsprühtrockner der Firma Nubilosa getrocknet. Die Eingangstemperatur der Trocknungsluft wurde auf 160 °C und die Temperatur der Abluft auf 80 °C eingestellt. Die Zerstäubung der Produkte erfolgte mit einer Gleichstrom-Zweistoffdüse mit einem Durchmesser von 2 mm bei einem Zerstäubungsluftdruck von 5,5 Pa. Der Luftvolumenstrom betrug 100 m³/h. Eine Sprührate von ca. 2,5 kg/h wurde realisiert.

3.5.12.2. Gefriertrocknung

Diese Trocknungsart wurde für die 3. Versuchsserie (Rapsproteinisolat-Herstellung) verwendet. Für die Gefriertrocknung wurde der Sublimator 3x4x5 der Firma Zirbus Technology eingesetzt. Die eingestellten Versuchsparameter des Gefriertrocknungsprozesses sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Tabelle 3-3: Versuchsparameter der Gefriertrocknung

Trocknungsstufe	Dauer in h	Unterdruck in mbar	Temperatur in °C
Einfrierung	1		-25
	10	4	-25
Trocknung	10	2	-25
	10	0,5	-25
	10	0,1	-10
Nachtrocknung	10	0,1	0
	10	0,1	20

4. Untersuchungen zur Herstellung von Rapsproteinprodukten

4.1. Herstellung von Rapsproteinkonzentrat

4.1.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens

Die Entwicklung vom technologischen Verfahren zur Herstellung von Rapsproteinkonzentraten, welche sich aus Globulin und Albumin zusammensetzen, wird zunächst dargelegt. Das Verfahren beinhaltet einen technologischen Prozess zur wässrigen Proteinextraktion aus dem schonend verarbeitenden Rapsextraktionsschrot. Da die Zielrichtung Fischmehlersatz ist, ist das Verfahren so konzipiert, das ein Rapsproteinkonzentrat mit abgereicherten Antinutritiva liefert.

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die Verfahrensschritte zur Herstellung eines Rapsproteinkonzentrates diskutiert.

4.1.1.1. Schrotaufbereitung

Wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben wurde, sind die Spaltprodukte der Glucosinolat-Hydrolyse aufgrund ihrer Toxizität unerwünscht. Deshalb soll das glycosinolatspaltende Enzym Myrosinase inaktiviert werden. Der enzymatische Glucosinolat-Abbau ist stark vom Feuchtegehalt der Saat abhängig. Selbst bei einer relativ niedrigen Feuchtigkeit der Presskuchen $\geq 10\%$ kann die Glucosinolat-Hydrolyse stattfinden, falls vorher die Saat thermisch nicht konditioniert wurde (Schumann, 2004).

Deshalb wurde die Saat vor dem Pressvorgang wärmebehandelt, um die myrosinasekatalysierten Glucosinolat-Spaltung zu vermeiden. Es wurden Untersuchungen zur Myrosinaseinaktivierung durch eine thermische Konditionierung der Rapssamen durchgeführt. Die Versuche ergaben, dass das Enzym bei einer Behandlungstemperatur von 60-70 °C fast nicht inaktiviert wurde, da die Myrosinase ihre höchste Aktivität bei 40 bis 70 °C besitzt und deren Deaktivierung erst oberhalb von 70°C beginnt (Schumann, 2004). Erst bei höheren Temperaturen wurde eine Inaktivierung des Enzyms beobachtet. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 90 °C wurde die Myrosinase zu 35 % inaktiviert. Durch die thermische Behandlung der Rapskörner konnte eine Inaktivierung des Enzyms in unzureichendem Maße erreicht werden (Abbildung 4-1). Für eine vollständige Inaktivierung der Myrosinase in den intakten Rapskörnern sind drastischere Erhitzungsbedingungen notwendig. Aber die intensive Wärmebehandlung wird eine Proteindenaturierung bedingen,

deshalb wurde für die Wärmekonditionierung eine Behandlungstemperatur von 80 °C und eine Verweilzeit von 15 min festgelegt.

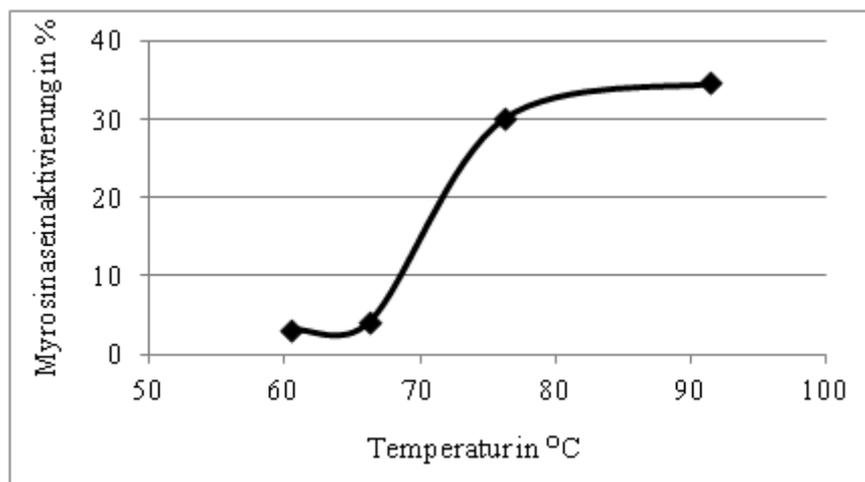


Abbildung 4-1: Myrosinaseinaktivierung als Funktion der Temperaturbelastung

Die Entölung der wärmebehandelten Rapssamen findet durch Kaltpressung und Lösungsmittlextraktion statt. Durch die Ölabbpressung wurden 71,5 % des Öles gewonnen. Der nach dem Pressen entstandene Presskuchen enthält 12,9 Mass.-% i. Tr. Öl. Um das Restöl zu entfernen, werden der in einer Riffelwalzen-Mühle zerkleinerte Presskuchen (Grobzerkleinerung auf ca. 5 mm) mit Hexan zwei Stunden bei ca. 60 °C zweistufig extrahiert. Das Rapsextraktionsschrot weist anschließend einen Restölgehalt von 2,1 Mass.-% i. Tr. auf. Die Ölausbeute aus dieser Verarbeitungsstufe beträgt 23,8 %. Der Entölungsprozess ist in der Abbildung 4-2 schematisch dargestellt. Die berechneten Daten beziehen sich auf kg Trockenmasse. Die Massenverluste während der Verarbeitung wurden nicht berücksichtigt.

Das Rapsschrot wird anschließend desolventisiert. Die Desolventisierung dient zur Hexanextraktion aus dem Rapsschrot, und es wird auf einen Hexangehalt < 300 ppm orientiert. Für eine schonende Entbenzinierung des Schrotes wurde ein neuartiges, wirbelschicht-basiertes Verfahren eingesetzt. Das Schrot wurde 15 min lang bei Fluidisationstemperaturen von ca. 90 °C in einem diskontinuierlich arbeitenden Wirbelschichtapparat desolventisiert. Dabei lag die Schrottemperatur zwischen 65 – 80 °C. Durch den Desolventisierungsprozess wurde der Hexangehalt auf 80 ppm abgesenkt, dessen Wert stets unter dem maximal zulässigen Wert der Hexanreduzierung (300 ppm) liegt.

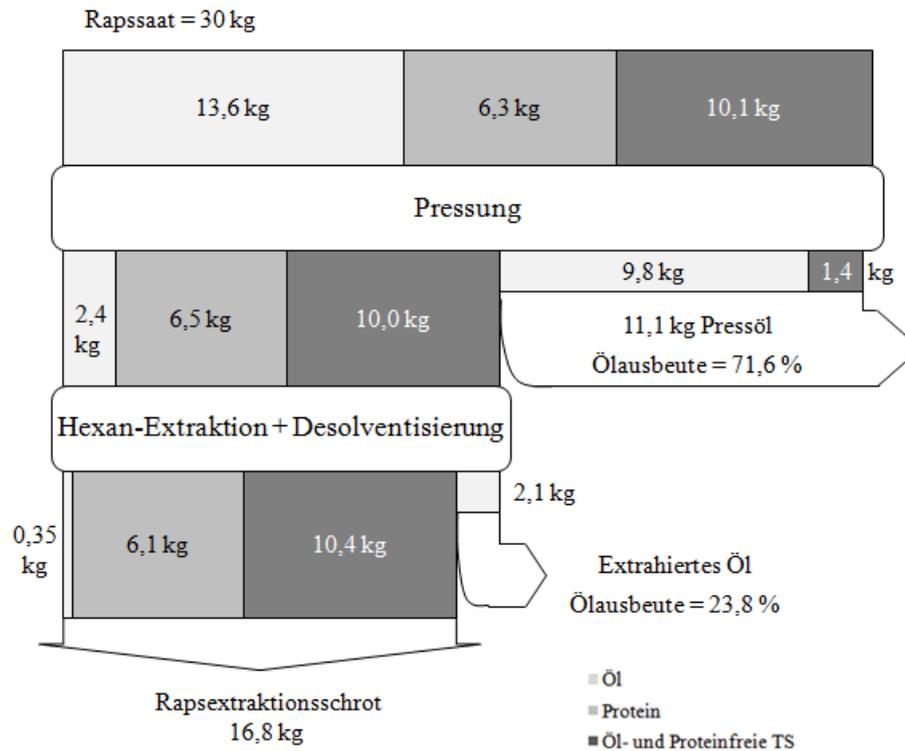


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Entölungprozesses

Unter Bezugnahme auf das spätere Einsatzziel der zu extrahierenden Proteine als Fischmehlsubstitut ist über eine Abtrennung von unerwünschten Begleitstoffen wie z.B. den Bitterstoffen zu entscheiden. Die Entbitterung von Rapsextraktionsschrot dient zur Reduzierung antinutritiver Rapsbestandteile.

Die Untersuchungen zur Entbitterung des RES mit dem ethanolisch-wässrigen Lösungsansatz verdeutlichen, dass die Glucosinolate aus dem Schrot weitgehend extrahiert werden. Die Versuchsergebnisse beweisen eine Verringerung des Glucosinolatgehaltes um ca. 85 % durch die ethanolische Behandlung, sodass der Glucosinolatgehalt von 20,67 $\mu\text{mol/g}$ i.Tr. im Schrot auf 3,03 $\mu\text{mol/g}$ absinkt. Dagegen findet eine Aufkonzentrierung der Phytinsäure statt. Der Phytinsäuregehalt steigt von 2,02 g/100g i.Tr. im Schrot auf 3,34 g/100g i.Tr.. Der Restölgehalt des entbitterten Rapsextraktionsschrotes wurde auf ca. 1,2 Mass.-% i. Tr. reduziert. Um den Einfluss der Ethanolbehandlung auf die Nährstoffgehalte im Schrot bewerten zu können, wurden ethanolisch behandelte und unbehandelte Rapsschrote auf Nährstoffzusammensetzung analysiert. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind tabellarisch im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 4-1: Nährstoffgehalte in ethanolisch behandelten und unbehandelten RES

Nährstoffe in Mass.-% i. Tr.	RES 18/2009 vor EtOH	RES 18/2009 nach EtOH	RES 2/2009 nach EtOH
Rohprotein (RP)	38,1	45,5	41,6
Rohfett	1,7	0,7	1,2
Rohfaser	7,6	8,5	11,5
Rohasche	7,5	10,1	10,5
Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)	45,1	35,2	35,2
Organische Masse	92,5	89,9	89,5

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurde die Nährstoffzusammensetzung durch die ethanolische Extraktion verändert. Neben den antinutritiven Inhaltsstoffen und dem Restöl wurden ein Fünftel der Kohlenhydrate während dieses Verarbeitungsschrittes gelöst. Das wirkt sich auf den Gehalt der stickstofffreien Extraktstoffe aus, und es kommt zu einer Erhöhung der Rohprotein-, Rohfaser- und auch der Rohaschegehalte. Das behandelte Schrot weist weniger organische Masse auf, was durch die im Ethanol gelösten Kohlenhydrate, vor allem Zuckerbestandteile, und Öle bedingt ist.

Die Unterschiede in der Nährstoffzusammensetzung der ethanolisch behandelten Schrote 18/2009 und 2/2009 lassen sich mit dem unterschiedlichen Saatarsprung erklären, da die Inhaltsstoffe natürlichen Schwankungen unterlegen sind. Allerdings wurde das RES 2/2009 als Ausgangsmaterial für die Rapsproteinherstellung verwendet. Deshalb beziehen sich die Werte der nächsten tabellarischen und grafischen Darstellungen auf RES 2/2009.

Die Herstellung von hochwertigen Rapsproteinen erfordert ein schonend behandeltes Ausgangsmaterial mit hoher Proteinlöslichkeit, um höhere Proteinausbeute zu erzielen und gleichzeitig eine hohe Proteinqualität zu gewährleisten (Pastuszewska, et al., 2003; UFOP, 2007). Eine hohe Proteinlöslichkeit ist die grundlegende Voraussetzung für hohe Proteinausbeuten des jeweiligen Proteingewinnungsprozesses aus dem Schrot. Deshalb wurden die beschriebenen technologischen Arbeitsschritte zur Rapssaatverarbeitung eingesetzt, um die Qualität und die Verfügbarkeit der Proteine zu verbessern. Durch Vermeidung der hohen thermischen Belastung während der Verarbeitungsstufen ist zu erwarten, dass die nativen funktionellen Eigenschaften der Proteine erhalten bleiben. Höhere Arbeitstemperaturen wurden hinsichtlich der Verminderung der Proteinlöslichkeit und Proteindenaturierung gezielt vermieden.

Als ein wesentliches Maß für die Proteinlöslichkeit und die damit verbundene Proteinqualität wurde der PDI-Wert der Rapsrückstände von einzelnen Verarbeitungsschritten ermittelt. Die Abbildung 4-3 stellt die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen vor. Die Daten bestätigen, dass die Proteinlöslichkeit deutlich von den technologischen Verfahren zur Rapssaatverarbeitung abhängt.

Trotz der niedrigeren Temperaturbelastungen konnte die Reduzierung der Proteinlöslichkeit nicht verhindert werden. Der stark negativ proteinlöslichkeits-beeinflussende Arbeitsschritt ist die ethanolische Extraktion zur Entbitterung des RES. Der nach der Hexanextraktion erhaltene PDI-Wert von 70,4 % verringerte sich auf 27,8 %. Die zusätzliche ethanolische Behandlung des schonend verarbeiteten Rapsschrotes zur Reduzierung der antinutritiven Substanzen führte zur Verringerung der Proteinlöslichkeit um ca. 60 %. Der PDI-Wert des entbitterten Rapsschrotes ist vergleichbar mit industriell hergestelltem Schrot. Der niedrigere PDI-Wert kann ein Zeichen dafür sein, dass Proteinschädigungen während des Entbitterungsprozesses eingetreten sind.

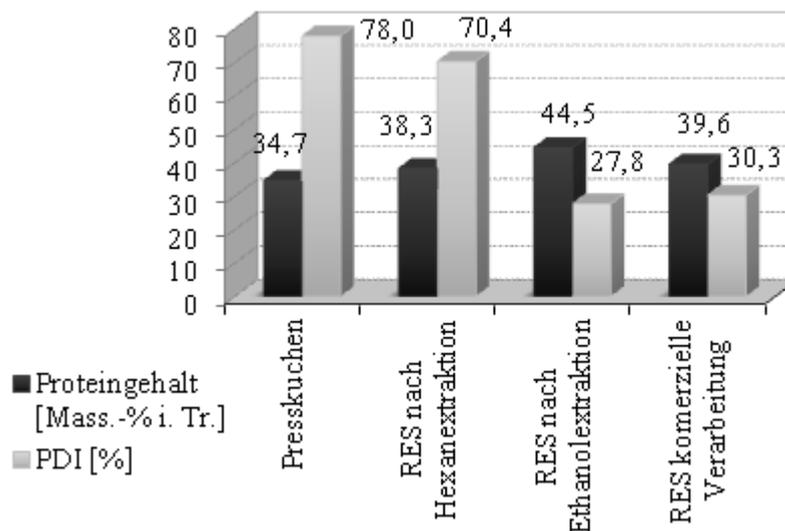


Abbildung 4-3: Proteingehalt und PDI der Rapsrückstände nach verschiedenen Verarbeitungsschritten und des industriell hergestellten Schrotes

In der Tabelle 4-2 ist die Aminosäurezusammensetzung von Schroten vor und nach der ethanolischen Behandlung zusammengefasst. Die Aminosäureanalytik weist nach, dass durch den Entbitterungsprozess leichte Änderungen des Aminosäureprofils eingetreten sind. Größere Differenzen traten lediglich beim Lysin auf, welches die erstlimitierende Aminosäure ist. Die Bioverfügbarkeit der Aminosäure Lysin nimmt um ca. 10 % ab. Das verdeutlicht, dass

Schädigungen von Aminosäuren stattgefunden haben, was sich auch in dem niedrigeren PDI-Wert äußert. Im Grunde genommen kann die ethanolische Extraktion als leicht proteinschädigender Verfahrensschritt bezeichnet werden, der im Hinblick auf höhere Proteinausbeuten vorzugsweise vermieden werden soll.

Tabelle 4-2: Aminosäuregehalte in ethanolisch behandelten und unbehandelten RES

Aminosäure in g/100g RP	RES 18/2009 vor EtOH	RES 18/2009 nach EtOH	\Delta AS	p% ¹	Richtung
MET	1,95	2,04	0,09	4,76	↑
CYS	2,34	2,26	0,08	3,35	↓
M+C	4,29	4,31	0,01	0,34	↑
LYS	7,00	6,30	0,69	9,92	↓
THR	4,54	4,72	0,18	3,90	↑
TRP					
ARG	6,19	6,30	0,11	1,85	↑
ILE	3,99	4,16	0,18	4,39	↑
LEU	7,13	7,40	0,26	3,67	↑
VAL	5,21	5,40	0,19	3,64	↑
HIS	2,70	2,75	0,05	1,70	↑
PHE	4,04	4,16	0,12	2,95	↑
TYR					
GLY	5,21	5,23	0,02	0,37	↑
SER	4,32	4,40	0,08	1,94	↑
PRO	6,13	6,37	0,24	3,97	↑
ALA	4,52	4,65	0,13	2,93	↑
ASP	7,75	7,71	0,04	0,45	↓
GLU	16,22	15,86	0,36	2,20	↓

¹ Prozentuale Veränderung, berechnet durch $p\% = \frac{AS_{\text{vorEtOH}} - AS_{\text{nachEtOH}}}{AS_{\text{vorEtOH}}} \cdot 100$

Die nächste Grafik stellt die Entwicklung der Ölgehaltsreduzierung und der entsprechenden Proteingehaltserhöhung während der Verarbeitungsschritte dar.

Während der Ölgewinnung findet eine gleichzeitige Proteinaufkonzentrierung in dem Schrot statt.

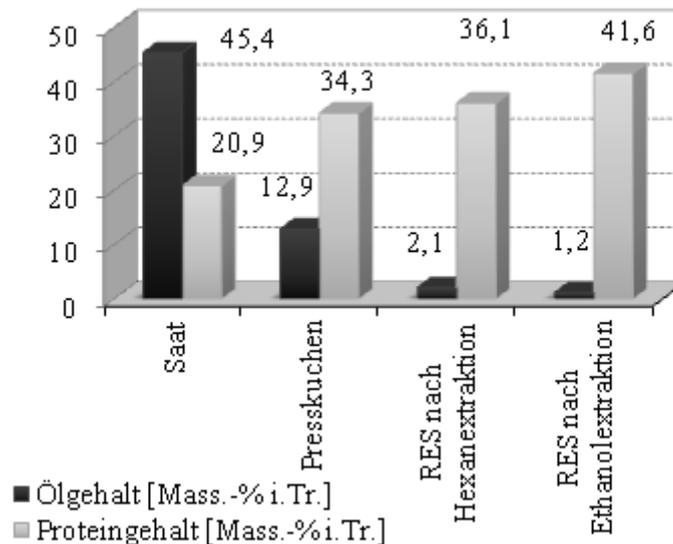


Abbildung 4-4: Öl- und Proteingehalte der Rapsrückstände nach verschiedenen Verarbeitungsschritten

Die Löslichkeit der Proteine kann wesentlich auch vom Grad des Zellaufschlusses beeinflusst werden. Da die Proteinextraktion eine Fest-Flüssig-Extraktion ist, bei der die Proteine durch das Extraktionsmittel aus dem Schrot herausgelöst werden, übt die Extraktionsoberfläche einen Einfluss auf die Extraktionsleistung aus. Die Oberfläche des Extraktionsgutes bzw. des Schrotes soll möglichst groß sein, weil sie der extrahierten Stoffmenge proportional ist (Ignatowitz, 2003).

Deshalb wurde eine zusätzliche Zerkleinerung des entölten Rapsextraktionsschrotes vorgenommen. Die Vermahlung des Schrotes erfolgt im Walzenstuhl in mehrfachen Vermahlungsschritten bei unterschiedlich eingestellten Spaltweiten, wie im Abschnitt 3.5.7 beschrieben wurde. Angestrebt wurde ein Hauptteil des Mahlgutes mit Partikelgrößen von $> 200 \mu\text{m}$ bis $< 500 \mu\text{m}$. Somit sollte die Oberfläche des Rapschrotes genug groß sein, um höhere Proteinlöslichkeit durch ausreichenden Zellaufschluss der Pflanzenmatrix zu gewährleisten. Gleichzeitig ist die angestrebte Partikelgröße ausreichend groß, um eine vollständige Abtrennung vom Extraktionsmittel zu sichern bzw. kein Zellmaterial in die Proteinlösung gelangen zu lassen.

Laut der Partikelgrößenverteilung des vermahlenden Schrotes (Abbildung 4-5 und Tabelle 4-3) wurde ein Vermahlungsgrad von 90 % der Teilchen $< \text{ca. } 540 \mu\text{m}$ erreicht.

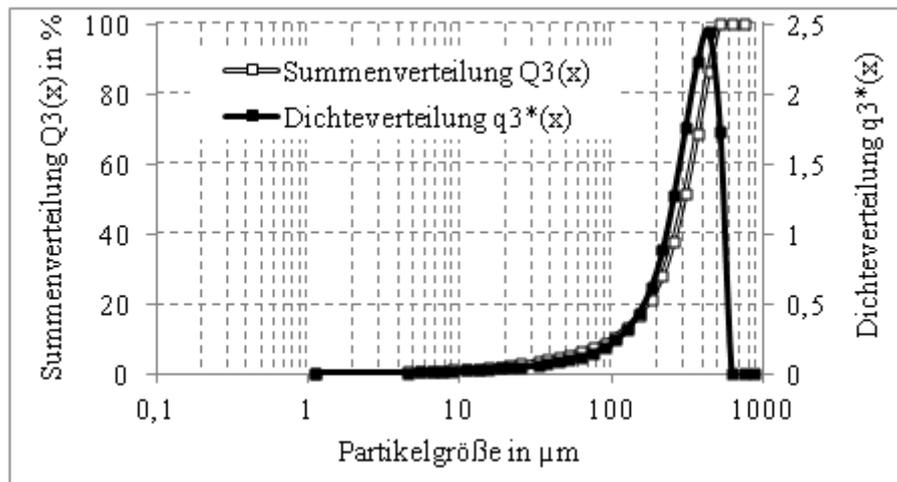


Abbildung 4-5: Partikelgrößenverteilung des vermahlenden Rapsextraktionschrotes

Tabelle 4-3: Partikelverteilungswerte des vermahlenden Rapsextraktionschrotes

	$d_{10,3}$ in μm	$d_{50,3}$ in μm	$d_{90,3}$ in μm
1. Messung	70,11	336,89	505,39
2. Messung	64,50	327,30	583,87
Mittelwert	67,31	332,1	544,63

4.1.1.2. Proteinaufbereitung

Die Kenntnis des Löslichkeitsprofils der Proteine im Schrot ist von entscheidender Bedeutung um das Proteinextraktionsverfahren mit maximaler Proteinausbeute für hohe Wirtschaftlichkeit zu gestalten. Folglich wurden Untersuchungen zur Bestimmung des Löslichkeitsverhaltens vorgenommen.

Das Löslichkeitsprofil vom Rapsprotein aus dem hergestellten Schrot wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert in einem pH-Bereich von 3 – 12 untersucht. Die Proteinlöslichkeit ist mittels Bestimmungsverfahren nach Morr et al. ermittelt (Morr, et al., 1985). Die Abbildung 4-6 zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die Proteinlöslichkeit des Rapsextraktionsschrotes.

An der Löslichkeitskurve des Rapsextraktionsschrotes fällt auf, dass zwei Peaks bei pH 5 bzw. pH 9 entstanden sind. Dabei liegt die maximale Proteinlöslichkeit bei pH 5. Deshalb wurden die pH-Werte 5 und 9 für die Proteinextraktion in Betracht gezogen.

Im Folgenden wird die wässrige Proteinextraktion aus dem Schrot und die nachfolgende Proteinaufreinigung detailliert aufgeführt.

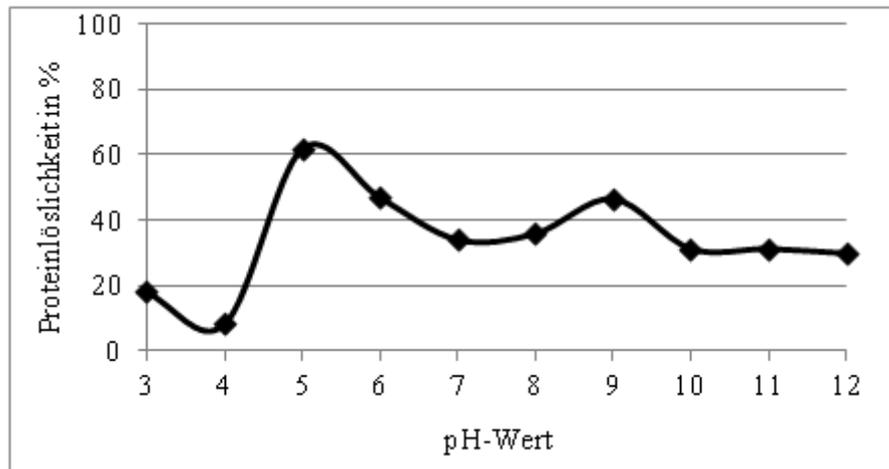


Abbildung 4-6: Proteinlöslichkeit des Rapsextraktionsschrotes in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Extraktionsbedingungen für die Proteine wurden durch Mischungsverhältnis, Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert definiert. Zu Beginn wurde eine einstufige, wässrige Extraktion durchgeführt. Dabei ist das Verhältnis RES – Wasser 1:10. Es wird eine 0,5 mol Salzlösung hergestellt. Die Temperatur beträgt 40 ÷ 45 °C. Unter diesen Bedingungen liegt der pH-Wert bei etwa 5. Die Suspension wird 1 Stunde lang gerührt. Danach werden die beiden Phasen durch einen Labordekanter getrennt. Der Rückstand wird entsorgt und die abgetrennte Lösung wird zur Erreichung eines hohen Proteingehaltes ultra- und diafiltriert, aufkonzentriert und schließlich sprühgetrocknet.

Durch die Diafiltration werden die gelösten, niedermolekularen Substanzen abgetrennt, und dadurch erfolgt eine Aufkonzentration höhermolekularer Substanzen. Die während der Extraktion eingesetzten Salze und andere niedermolekulare Stoffe werden in diesem Verfahrensschritt entfernt. Als Maß für die Menge der in der Proteinlösung gelösten Salze wurde die elektrische Leitfähigkeit während des Diafiltrationsschrittes bestimmt.

Die gemessenen Leitfähigkeitswerte des Permeats und Retentats während eines Versuches sind in der Abbildung 4-7 schematisch dargestellt. Es ist zu betrachten, dass während der ersten 4 Diafiltrationsschritte der größte Teil der Salze ausgewaschen werden. Nach weiterem Verlauf der Diafiltration verringert sich der Salzgehalt, entsprechend verändert sich die Leitfähigkeit der Lösung und erreicht Werte von durchschnittlich 4,9 mS/cm. Bei dieser Leitfähigkeit wurde die Diafiltration beendet und nachfolgend wurde die Proteinlösung aufkonzentriert. Die sprühgetrocknete Proteinfraction weist einen Proteingehalt von 81,5 Mass.-% i. Tr. auf. Der erreichte Proteingehalt überschreitet die als Ziel gesetzten Anforderungen für Proteingehalt eines Konzentrates. Für die weiteren Versuche kann die

nachgeschaltete Diafiltration während der UF ab einem niedrigeren Wert der Leitfähigkeit abgebrochen werden.

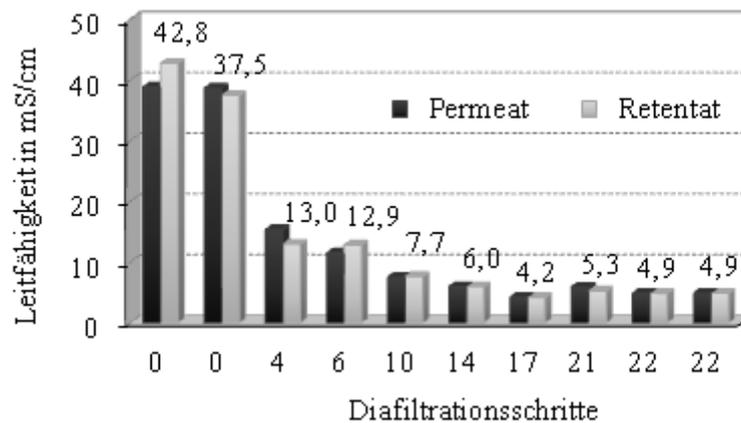


Abbildung 4-7: Verlauf der Leitfähigkeit während der Diafiltration

Mit dem auf diese Weise hergestellten Proteinprodukt wurde nur eine geringe Ausbeute erreicht. Deshalb wurde die wässrige Extraktion auf ein zweistufiges Verfahren umgestellt, um die Bedingungen für die Löslichkeit der Proteine zu garantieren. Der Rückstand von der 1. Extraktion, deren Dauer auf 2 Stunden erhöht wurde, wird mit Wasser (1:10) gemischt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von NaOH auf 9 eingestellt, und es wird eine Stunde lang bei ca. 45 °C gerührt. Die abgetrennten Lösungen von der 1. und 2. Extraktionen werden gesammelt und ultrafiltriert. Wie bei dem einstufigen Extraktionsverfahren dient die Diafiltrationsstufe sowohl zur Entfernung der während der Extraktion eingesetzten Salze als auch der Abtrennung der gelösten niedermolekularen antinutritiven Inhaltsstoffe und gleichzeitig der Proteinanreicherung.

Die Abbildung 4-8 veranschaulicht, dass durch den Leitfähigkeitswert eine Aussage über die Menge der im Retentat enthaltenen beziehungsweise der im Permeat abgeschiedenen Salze getroffen wird. Eine Leitfähigkeit der Permeatprobe in Höhe von 6,8 mS/cm entspricht dem Salzgehalt des Permeats von 3,3 g/l. Der Salzgehalt des Permeats wurde von einem Anfangswert von ca. 13,7 g/l bis auf 3,3 g/l reduziert. Mit der Reduzierung des Salzgehaltes nimmt der Anteil organischer Substanzen während der Diafiltration zu, wobei sich der Anteil an mineralischen Stoffen durch die Abscheidung der Salze verringert.

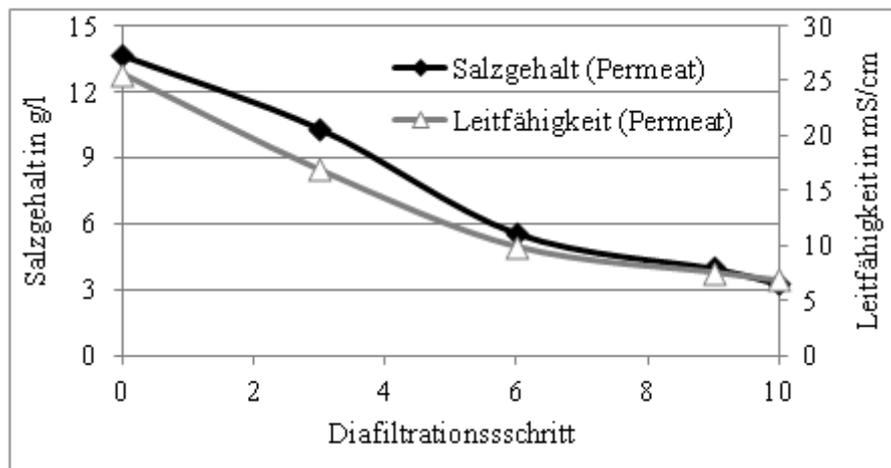


Abbildung 4-8: Verlauf des Salzgehaltes und der Leitfähigkeit während der Diafiltration

Für die weitere Bewertung der Diafiltration wurde der Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Leitfähigkeit sowohl des Retentats als auch des Permeats untersucht. Die nächste graphische Darstellung illustriert das Verhalten der Proteine während einer Diafiltration (Abbildung 4-9). Während die Salze und andere niedermolekulare Verbindungen aus der Proteinlösung als Permeat entfernt werden, reichern sich die zurückgehaltenen Proteine im Retentat an, und es können dadurch hohe Aufreinigungsgrade erzielt werden. Während der Diafiltration steigt der Proteingehalt des Permeats von 27,6 Mass.-% i. Tr. auf 64,2 Mass.-% i. Tr.. Jedoch wurde festgestellt, dass stickstoffhaltige Verbindungen, welche hier auch als Proteine bezeichnet sind, auch im Permeat vorhanden sind.

Durch den Cut-off von 20 kDa für die verwendete Membran, ist davon nicht auszugehen, dass alle Proteine < 20 kDa (Albumine) aus dem Retentat ins Permeat übergehen. Das Fouling kann z.B. eine Veränderung des Trennverhaltens der Membran auslösen und dadurch kann das Rückhaltverhalten der Proteine beeinflusst werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die die Membran durchdringenden, stickstoffhaltigen Verbindungen in Form von Peptiden, freien Aminosäuren oder Proteinsubeinheiten auftreten können, welche durch Auflösen der Proteinbindungen und damit verbundener Verringerung der Molmassen z.B. infolge der Schrottaufbereitung oder der wiederholten Überströmung des Membranmoduls mit der Proteinlösung während des Diafiltrationsprozesses zustande gekommen sind. Die durch die Membran permeierten Stickstoffverbindungen können als Proteinverluste bezeichnet werden aber bezogen auf die Trockensubstanz im Permeat können sie als vernachlässigbar klein bewertet werden.

Die Tendenz zur Erhöhung des Proteingehaltes mit dem Diafiltrationsschritt ist auch im Permeat zu beobachten. Ebenfalls lässt sich interpretieren, dass in den ersten Diafiltrationsschritten der Salzgehalt im Permeat hoch ist, welches einen geringeren Proteinanteil ergibt. Mit dem Auswaschen der Salze nimmt die Proteinkonzentration im Permeat zu. Das ergibt sich auch aus den Werten der Trockenmasse sowohl des Permeats als auch des Retentats. Die erste Erhöhung des TS-Gehaltes beim Retentat ist (Abbildung 4-10) darauf zurückzuführen, dass die Diafiltration ab einem bestimmten Konzentrierungsgrad bei der UF nachgeschaltet wurde. Und entsprechend erfolgt nach der Diafiltration eine weitere Reduzierung des Filtratwassers und, dadurch erhöht sich die Trockenmasse des Retentats und weist einen Wert von ca. 3,3 Mass.-% auf.

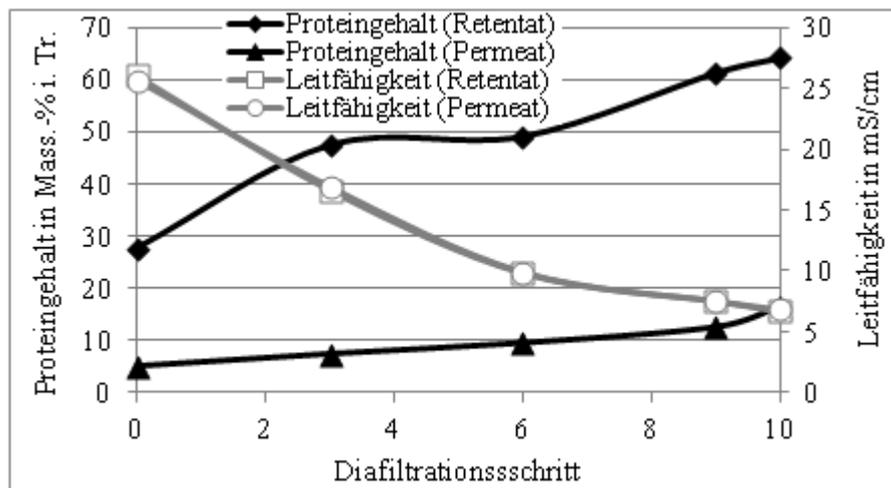


Abbildung 4-9: Verlauf des Proteingehaltes und der Leitfähigkeit während der Diafiltration

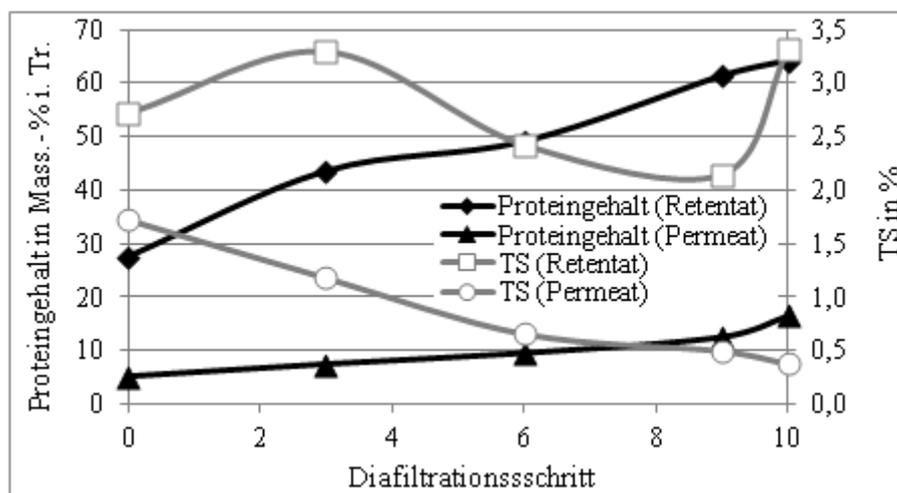


Abbildung 4-10: Verlauf des Proteingehaltes und der Trockensubstanz während der Diafiltration

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diesen Verarbeitungsschritt eine Aufreinigung der Proteine einschließlich deren Aufkonzentrierung erfolgt. Die so aufbereitete Rapsproteinlösung wurde getrocknet. Als Trocknungsverfahren wurde die Sprühtrocknung eingesetzt. Nach der Sprühtrocknung wird das Rapsproteinkonzentrat als Endprodukt gewonnen.

Die schematische Darstellung vom Rapsproteinkonzentratherstellungsverfahren ist auf der folgenden Abbildung illustriert.

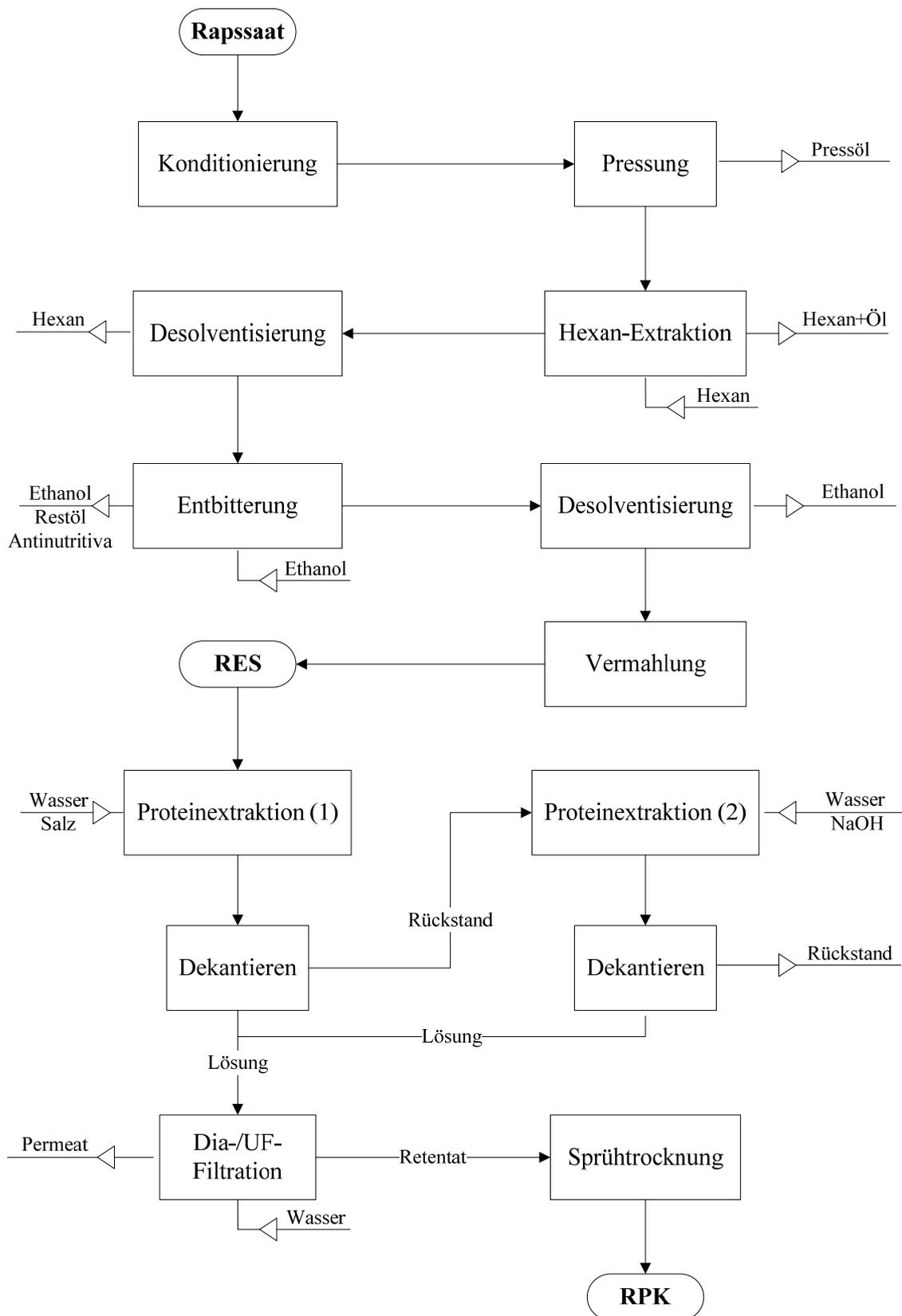


Abbildung 4-11: Verfahrensschritte zur Rapsproteinkonzentratherstellung

4.1.1.3. Ausbeutekalkulation

Für Herstellung von Rapsproteinkonzentraten wurden 300 kg Rapssaat verarbeitet. Davon wurden 174 kg Presskuchen nach dem mechanischen Entölungsverfahresschritt gewonnen. Nach der Lösungsmittlextraktion des Restöles und der anschließenden Desolventisierung wurden 136 kg Rapsextraktionsschrot hergestellt. Diese wurden einer Entbitterung zur ANF-Reduzierung unterzogen. Aus dem Entbitterungsschritt resultierten 129 kg ethanolisch extrahiertes Rapsextraktionsschrot. Davon wurden etwa 100 kg RES zur Gewinnung von Rapsproteinkonzentrate verarbeitet. Die Tabelle 4-4 stellt die berechnete Proteinausbeute aus jedem Extraktionscharge zusammen.

Das Proteinprodukt aus der 1. Charge zeichnet sich durch einen niedrigeren Proteingehalt und folglich eine niedrigere Proteinausbeute aus, obwohl diese Proteinlösung bis einen vergleichsweise höheren Aufreinigungsgrad ($\kappa_{\text{nach UF}} = 4,24 \text{ mS/cm}$) dialysiert wurde. Diese Proteinlösung beinhaltet feine Feststoffe, welche durch den Separationsprozess nicht abgetrennt wurden. Bei diesem Versuch wurde eine Kammerfilterpresse PALL mit Filtertuch CM240 zur Phasenseparation eingesetzt, deren Trennschärfe sich von der der Labordekantierzentrifuge unterscheidet. Die Abtrennung der Zellsubstanzen beeinflusst den Proteingehalt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Aufwand zur stofflichen Trennung von Feststoffen aus der Proteinlösung einen wesentlichen Einfluss auf den Proteingehalt des Endproduktes gewinnen kann. Außerdem ist die vollständige Abtrennung der Festpartikel erforderlich für die nachfolgende Ultrafiltration der Proteinlösung zur Vermeidung von Membranverstopfungen und folglich niedrigeren Flussraten.

Die berechneten Proteinausbeuten beziehen sich auf den Proteingehalt im Ausgangsmaterial. Die Ergebnisse der Ausbeutekalkulation verdeutlichen, dass geringe Proteinausbeuten erreicht wurden. Gründe dafür lagen vor allem in dem ungünstigen Einfluss der ethanolischen Behandlung auf die Proteinlöslichkeit. Allerdings konnte die Proteinausbeute durch eine nachgeschaltete zweite Proteinextraktion um 70 % erhöht werden, sodass eine Proteinausbeute von ca. 29 % erreicht wurde.

Tabelle 4-4: Ausbeuterechnungen der hergestellten Rapsproteinkonzentrat-Chargen

Charge	Extr. Stufe	Ultrafiltration						Sprühtrocknung					Proteinausbeute	
		RES [kg]	κ_{Vor} [mS/cm]	κ_{Nach}	$m_{\text{UF-Lsg}}$ [kg]	$TS_{\text{UF-Lsg}}$ [%]	$m_{\text{P-theor.}}$ [kg]	$m_{\text{P-Zyklon}}$ [kg]	$m_{\text{P-Fege}}$ [kg]	$\sum m_{\text{P}}$ [kg]	Verluste [%]	PG_{P} [%]	theoretisch [%]	getrocknet [%]
1	1	10	34,0	4,2	25	3,4	0,850	0,518	0,230	0,748	12,0	67,1	15,13	12,57
2	1	10	42,8	4,9	24,9	3,27	0,815	0,581	0,122	0,703	13,73	81,5	17,62	14,35
3	1	12	44,9	4,6	27,1	3,46	0,939	0,669	0,175	0,844	10,12	81,5	16,92	14,36
4	1	12	45,6	5,5	19,6	5,2	1,018	1,353	0,399	1,752	8,19	81,5	17,19	14,90
5	1	12	43,1	4,8	27,8	3,2	0,890							
6	2	5	21,8	5,7	34,4	2,34	0,805	1,819	0,615	2,434	2,81	71,2	27,83	25,53
7	2	5	24,4	6,4	37,7	2,18	0,822							
8	2	7	26,1	6,6	26,5	3,31	0,877							
9	2	5	28,0	6,4	24,7	3,39	0,836	1,629	0,649	2,278	9,92	71,2	31,85	27,08
10	2	5	22,5	6,1	26,6	3,38	0,898							
11	2	5	24,9	5,9	24,9	3,19	0,795							
12	2	7	29,1	6,6	30,7	3,2	0,981	0,71	0,216	0,976	0,49	71,2	26,47	24,87

$$\text{Ausbeute} = \frac{m_{\text{P}} \cdot TS_{\text{P}} \cdot PG_{\text{P}}}{m_{\text{A}} \cdot TS_{\text{A}} \cdot PG_{\text{A}}} \cdot 100$$

Gleichung 4-1

Legende:

 $TS_{\text{P}} = 96,6 \%$ $TS_{\text{A}} = 88,6 \%$ $PG_{\text{A}} = 42,54 \text{ Mass.-% i. Tr.}$ m_{P} = Masse des getrockneten Produkts in kg TS_{P} = TS des getrockneten Produkts in % PG_{P} = Proteingehalt des getrockneten Produkts in Mass.-% i. Tr. m_{A} = Masse des Ausgangsmaterials in kg TS_{A} = TS des Ausgangsmaterials in % PG_{A} = Proteingehalt des Ausgangsmaterials in Mass.-% i. Tr.

4.1.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften

4.1.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe

Die nach dem oben beschriebenen Verarbeitungsverfahren erzeugten Rapsproteinkonzentrate sollen als Futterrohstoff in der Fischfütterung verwertet werden. Deshalb wurde es für zwingend notwendig gehalten, das Rapsproteinkonzentrat einer genauen Nährstoff- und Aminosäureanalytik zu unterziehen. Die nutritiven und antinutritiven Komponenten der hergestellten Konzentrate wurden anhand folgender Tabellen mit denen des hergestellten RES verglichen. Durch den zweistufigen Proteinextraktionsprozess und die nachfolgende Proteinaufreinigungsprozedur mittels der UF/DF-Technik wurden höhere Proteinkonzentrationen erreicht. Die Rohfasern, welche für carnivore Fische unbrauchbar sind und eine schlechtere Verwertung anderer nutritiven Futterbestandteile hervorrufen können, weisen einen niedrigeren Gehalt im RPK (0,5 Mass.-% i. Tr.) auf. Diese konzentrieren sich während der Suspensiondekantation nach der Proteinextraktion in dem proteinarmen Rapsrückstand. Während der wässrigen Proteinextraktion wurden auch die wasserlöslichen Kohlenhydrate extrahiert. Das zeigt sich im NfE-Wert des Rapsproteinkonzentrates. Außerdem sind während der wässrigen Behandlung des Schrotes geringfügige Restölmengen in die Proteinlösung übergegangen. Im Gegensatz dazu wurde ein hoher Anteil an mineralischen Verbindungen im Rapsproteinkonzentrat festgestellt. Die Konzentrierung der mineralischen Stoffe lässt sich als Folge der unvollständigen Entfernung der Salze im Laufe der DF betrachten.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltsstoffe von RES und Rapsproteinkonzentrat

Nutritive Inhaltsstoffe in Mass.-% i. Tr.	RES	Rapsproteinkonzentrat
Rohprotein	41,6	71,2
Rohfett	1,2	0,6
Rohfaser	11,5	0,5
Rohasche	10,5	16,1
Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)	35,2	11,6
Organische Masse	89,5	83,9

Das hergestellte Rapsproteinkonzentrat weist niedrigere Werte einiger sekundärer Begleitstoffe auf. Insbesondere der Glucosinolatgehalt konnte wesentlich verringert werden. Der Glucosinolatgehalt in der Saat von 15,4 $\mu\text{mol/g}$ reduziert sich auf 1,32 $\mu\text{mol/g}$ im RPK.

Dagegen hatten die Verfahrensschritte keine signifikante Auswirkung auf den Phytinsäuregehalt. Dabei ist eine leichte Abreicherung im Proteinkonzentrat gegenüber des Rapschrotes zu betrachten. Der Gehalt an Tanninen wurde im hergestellten RES nicht analysiert. Nach Literaturangaben (Fenwick, et al., 1984) enthielt Rapsmehl der Sorte Tower 2,71 % (geschälte Saat) bzw. 3,91 % Tannine (Gesamtsaat). Verglichen mit diesen Werten ist der Gehalt der Tannine im RPK deutlich niedriger. Die Sinapinsäure und deren Equivalente von ethanolisch behandeltem Schrot, welches als Ausgangsmaterial für das RPK dient, wurden nicht ermittelt, sondern nur von hexan-extrahiertem Schrot. Dieses Schrot ist gekennzeichnet durch erkennbar viel höhere Werte wie z.B. 15,2 g/kg Σ SAE, 1,09 g/kg SA, 9,03 g/kg SIN und 2,21 g/kg SG im Vergleich zu dem erzeugten Rapsproteinkonzentrat. Dieser signifikante Unterschied weist darauf hin, dass eine Reduktion des Gehaltes der Sinapinsäure und deren Equivalente durch die vierstufige Extraktion des Schrotes mit 75 %-igem Ethanol erreicht wurden.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinkonzentrat

Antinutritive Inhaltstoffe	RES	Rapsproteinkonzentrat
Glucosinolate [$\mu\text{mol/g i. Tr.}$]	3,03	1,32
Phytinsäure [g/100g i. Tr.]	3,34	1,77
Tannine [g/100g i. Tr.]	n.a.	0,43
Σ SAE [g/kg i. Tr.]		0,13
Davon SA		0,04
Davon SIN	n.a.	<0,01
Davon SG		<0,01

* Σ SAE= Summe an Sinapinsäure und Sinapinsäureester
SA = Sinapinsäure; SIN= Sinapin; SG= Sinapoylglucose

4.1.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren

Um die Proteinqualität des gewonnenen RPK bewerten zu können, wurde es auf seinen Gehalt an Aminosäuren untersucht. Für RES wurden die Aminosäurenwerte, die auf Basis g/100g RP ausgewiesen sind, des ethanolisch behandelten Schrotes dargestellt. Hinsichtlich der AS-Gehalte ergaben sich für das Rapsproteinkonzentrat leicht abweichende Werte. Diese Schwankungen sind zurückzuführen auf die unterschiedlichen Prüflaboratorien und die Probenmuster bzw. die üblichen Schwankungen. Auffällig blieben die Lysin-, Histidin-, Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Werte und die schwefelhaltigen AS-Werte,

welche sich wesentlich voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse aus der Aminosäureanalytik verdeutlichen, dass das hergestellte Rapsproteinkonzentrat eine andere AS-Zusammensetzung als das RES hat. Die Veränderung des Aminosäurenprofils ist damit verbunden, dass die Albumine und Globuline wegen ihres unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens in wässrigen Medien bei den ausgewählten Extraktionsbedingungen aus dem Schrot nicht verhältnismäßig extrahiert wurden. Daher entspricht das Verhältnis Albumine zu Globuline im gewonnenen Rapsproteinkonzentrat nicht mehr dem im Schrot. In dieser Differenz kann die Ursache für die unterschiedlichen AS-Gehalte von RPK und RES liegen. Durch die Proteinextraktion wurde ein Proteinkonzentrat gewonnen, welches sich durch höhere Gehalte besonders von sowohl schwefelhaltigen AS wie Methionin und Cystein, als auch Lysin und anderen auszeichnet.

Tabelle 4-7: Aminosäurezusammensetzung des RES und Rapsproteinkonzentrates

Aminosäure in g/100g RP	RES	Rapsproteinkonzentrat				
		\overline{AS}	$ p\% ^1$	$ \Delta AS $	AS ₁	AS ₂
MET	2,04	2,16	17,59	0,42	2,37	1,95
CYS	2,26	3,78	17,72	0,74	4,15	3,42
M+C	4,31	5,94	17,68	1,15	6,52	5,37
LYS	6,30	7,28	14,94	1,18	7,87	6,70
THR	4,72	4,16	0,24	0,01	4,17	4,16
TRP						
ARG	6,30	6,68	3,11	0,21	6,79	6,57
ILE	4,16	3,82	1,17	0,04	3,79	3,84
LEU	7,40	7,45	3,22	0,24	7,57	7,33
VAL	5,40	5,11	1,36	0,07	5,15	5,08
HIS	2,75	3,57	15,62	0,60	3,87	3,26
PHE	4,16	3,68	4,51	0,16	3,60	3,76
TYR		1,93			1,93	
GLY	5,23	5,44	4,15	0,23	5,55	5,32
SER	4,40	3,99	2,34	0,09	3,94	4,04
PRO	6,37	7,61	5,20	0,41	7,81	7,41
ALA	4,65	4,76	4,33	0,21	4,87	4,66
ASP	7,71	5,62	15,79	0,82	5,21	6,03
GLU	15,86	22,77	14,90	3,66	24,60	20,93

¹ Prozentuale Abweichung, berechnet durch $p\% = \frac{AS_1 - AS_2}{AS_1} 100$

4.1.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen

Das Rapsproteinkonzentrat wurde nachfolgend auf sein Proteinmuster mittels Gelelektrophorese untersucht. Die elektrophoretische Auftrennung der Rapsproteine wurde in der Abbildung 4-12 dokumentiert. Für die Bestimmung der Proteinzusammensetzung des RPK wurden Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Banden der Elektrophorese zeigen, dass sowohl die α -Seitenketten mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa und β -Seitenketten (ca. 20 kDa) des Cruziferins als auch die schweren/großen Polypeptid-Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa und die leichten/kleinen Polypeptid-Ketten (4-6 kDa) des Napins im RPK vorhanden sind. Die Abbildung 4-13 gibt die prozentuale Zusammensetzung der Proteinfractionen an. Die Auswertung des Geles zeigt, dass das RPK aus etwa gleichen Anteilen beider Hauptproteinfractionen Napin und Cruziferin besteht.

Die Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die definierten Extraktionsbedingungen die Gewinnung eines Proteinproduktes gewährleisten, welches sich aus Globulinen und Albuminen in fast gleicher Konzentration zusammensetzt.

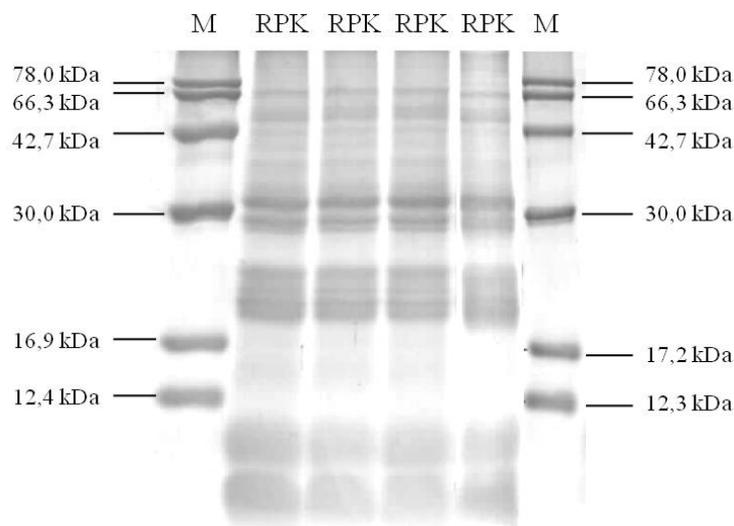


Abbildung 4-12: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Rapsproteinkonzentrates

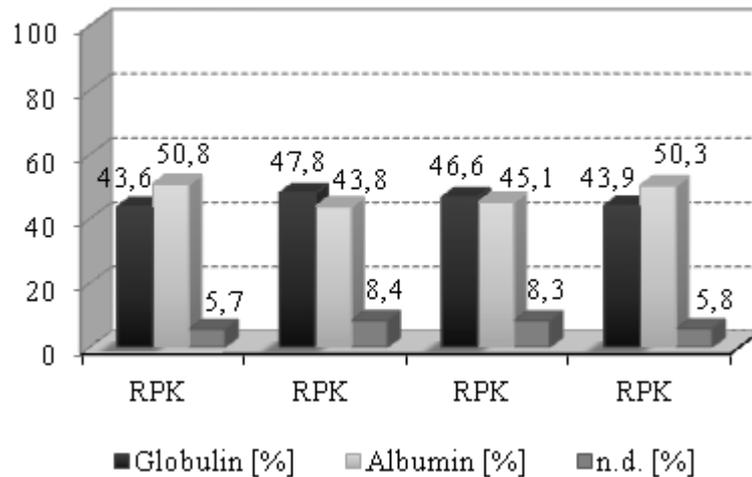


Abbildung 4-13: Proteinzusammensetzung des Rapsproteinkonzentrates

4.1.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften

4.1.3.1. Thermodynamische Eigenschaften

Die Überprüfung der nativen Struktur des hergestellten Rapsproteinproduktes erfolgt durch DSC-Messungen. Kalorimetrische Untersuchungen zur Proteindenaturierung bei Raps wurden bereits von unterschiedlichen Autoren durchgeführt. Wu et al. (Wu, et al., 2008) isolierten die Hauptproteinfraktionen, Cruziferin und Napin, aus entfettetem Canolamehl mittels der Sephacryl S-300 Gelfiltrationschromatographie und untersuchten diese einschließlich auf ihre thermodynamischen Eigenschaften. Sie stellten fest, dass das gereinigte Cruziferin einen endothermischen Peak bei 91°C ($\Delta H=12,5$ J/g) aufwies und entsprechend das Albumin bei 110°C ($\Delta H=15,9$ J/g). Diese hohe thermische Stabilität von Napin wurde ebenfalls von Krzyzaniak et al. (Krzyzaniak, et al., 1998) beobachtet. Das DSC-Thermogramm des von Wu et al. isolierten Canolaproteins vor der Fraktionierung zeigte endothermisches Verhalten mit zwei überlappenden Peaks bei Temperaturen von 84°C und 102°C, welche den Globulinen und den Albuminen zugeschrieben werden können. Die niedrigeren Denaturierungstemperaturen des Canolaproteins im Vergleich zu denen von gereinigten Globulin- und Albuminfraktionen lassen sich den Autoren nach mit dem Vorhandensein von Nichtprotein- oder Protein-Komponenten, welche sich auf die thermische Stabilität der Proteine auswirken können, erklären. Die thermische Stabilität der Proteine hängt z.B. von unterschiedlichen strukturstabilisierenden Faktoren wie Proteinstruktur, Aminosäurezusammensetzung, Protein-Protein-Kontakte, intramolekulare Wechselwirkungen u.a. ab.

Die Speicherproteindenaturierung wurde auch von Wäsche (Wäsche, 2002) untersucht. Der Autor ermittelte endotherme Wärmemengen für Rapsmehl im Bereich 66°C (Peakmaximum) 2,3 J/g und im Bereich 80 bis 100°C (Peakmaximum 84°C) 3,7 J/g. Die spezifische Enthalpie der vollfetten unbehandelten Rapssaat beträgt 4,9 J/g Protein, dagegen liegt die Denaturierungsenthalpie im isoelektrisch gefällten Isolat bei 9,66 J/g. Dieser Differenz ergibt sich infolge der vielfältigen Wechselwirkungen mit anderen Saatinhaltsstoffen. Die spezifische Denaturierungsenthalpie von 5,9 J/g Protein im entfetteten Rapsmehl steigt auf 48 J/g Protein im Proteinextrakt (Arntfield, et al., 1981).

Léger et al. (Léger, et al., 1993) betrachteten einen signifikanten Einfluss des pH-Wertes auf die Denaturierungsenthalpie und -temperatur von Canola Globulin, welcher mit Proteinkonformationen zu erklären ist. Es wurde ebenfalls bestimmt, dass auch die Zugabe von Salzen oder von Ethanol Einfluss auf die Denaturierungsenthalpie und/oder -temperatur ausüben, indem sie eine Denaturierung des Proteinproduktes hervorrufen (Harwalkar, et al., 1987; Grozav, et al., 1985). Durch die Wirkung von Alkoholen wird die Denaturierungstemperatur der Proteine herabgesetzt. In wässrig-alkoholischen Lösungen wird der Wärmekapazitätspeak der Denaturierung von Globulin 11S der Ackerbohnen verringert und verschiebt sich nach niedrigeren Temperaturen. Die Denaturierungstemperatur und -enthalpie nimmt mit der Erhöhung der Alkoholkonzentration ab (Danilenko, et al., 1986; Grinberg, et al., 2009).

Für die Bewertung des eingesetzten Verfahrens zur Proteingewinnung wurde die Nativität der Proteinstruktur, das heißt die aus der Belastung während der Verarbeitungsprozesse folgenden Proteindenaturierung untersucht. Die Thermogramme des analysierten Rapsproteinkonzentrates, welche in der Abbildung 4-14 dokumentiert sind, zeigen einen Wärmeverbrauch für die Proteindenaturierung. Obwohl durch das Elektrophorese-Bild bestätigt wurde, dass es sich um eine Proteinfraction mit nahezu gleichen Anteilen an Globulinen und Albuminen handelt, wurden zwei endotherme Peaks für den Wärmeverbrauch während der Strukturänderung der Globuline und entsprechend der Albumine nicht detektiert.

Der detektierte Peak mit einem Peakmaximum bei 99,0 °C bzw. 98,4 °C des RPK kann den Alkoholeffekt zugeschrieben werden. Der beobachtete endotherme Wärmeübergang ist eine Folge der Verschiebung, Ausdehnung und Überlagerungen der Peaks der Globuline und Albumine, was auf eine bereits abgelaufene Strukturänderung während der ethanolischen Behandlung des Schrotes zurückzuführen ist.

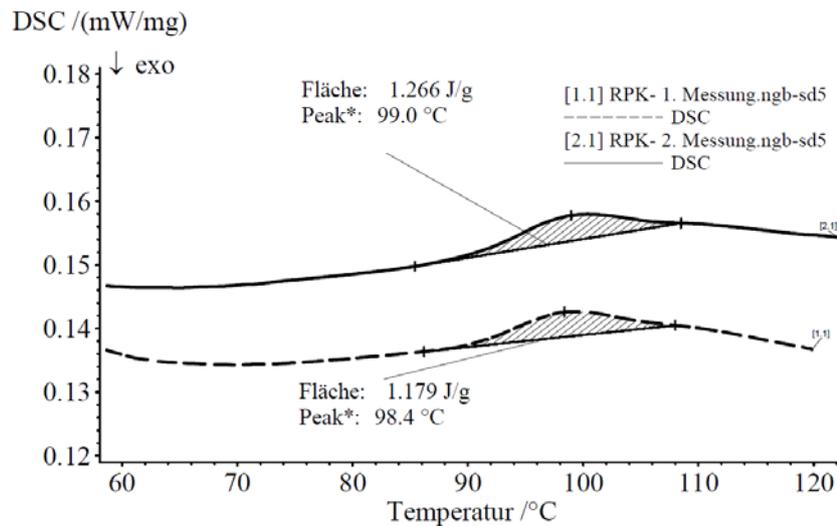


Abbildung 4-14: DSC-Thermogramme des Rapsproteinkonzentrates

Tabelle 4-8: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Rapsproteinkonzentrates

RPK	T _d in °C	ΔH _d in J/g Probe	ΔH _d in J/g Protein
1. Messung	99,0	1,266	4,743
2. Messung	98,4	1,179	4,417
Mittelwert	98,7	1,223	4,580

4.1.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften

In diesem Kapitel werden die Partikelgröße und die Oberflächenstruktur des durch die Sprühtrocknung konservierten Rapsproteinkonzentrates beschrieben. Das unter den definierten Prozessparametern sprühtrocknete Rapsproteinkonzentrat wies eine relativ enge Partikelgrößenverteilung (Abbildung 4-15) auf. Es wurden Partikeln mit Partikelgrößen im Bereich von 1-50 µm erfasst. Die erhaltenen Partikelgrößenverteilungen sind relativ eng. Ihre normierte Verteilungsbreite „span“ beträgt 1,87 und die Medianwerte (d_{50,3}) 10,04 µm.

Tabelle 4-9: Partikelverteilungswerte des Rapsproteinkonzentrates

	d _{10,3} in µm	d _{50,3} in µm	d _{90,3} in µm
1. Messung	4,04	9,97	22,74
2. Messung	4,26	10,10	23,01
Mittelwert	4,15	10,04	22,88

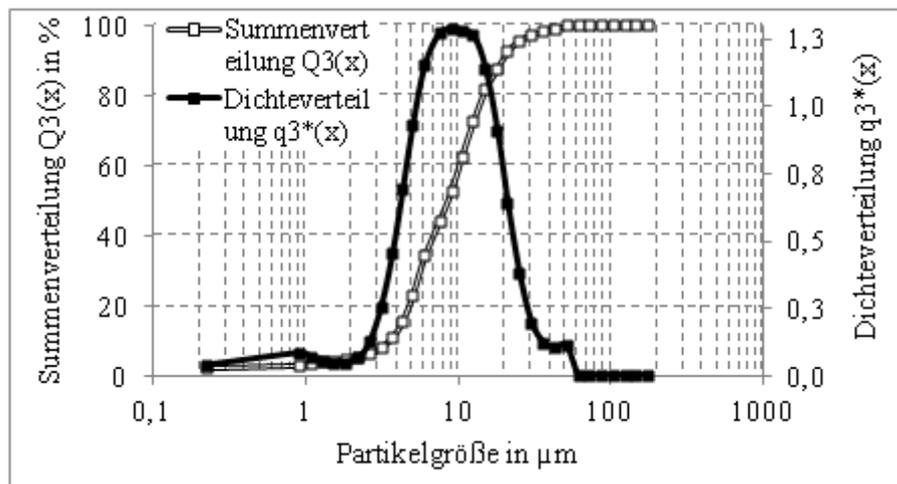


Abbildung 4-15: Partikelgrößenverteilung des Rapsproteinkonzentrates

In der Abbildung 4-16 sind die REM-Aufnahmen des Rapsproteinkonzentrates vergleichend dargestellt. Die Partikel wiesen eine kugelförmige Morphologie auf, welche aus dem Sprühtrocknungsverfahren resultiert. Mit Erhöhung des Vergrößerungsfaktors sind Unregelmäßigkeiten in der Oberflächenstruktur zu erkennen. Die unregelmäßige Struktur einiger Partikel ist stark ausgeprägt, sodass sie von der Kugelform stark abweicht und eher einer Erbsenform ähnelt. Außerdem sind unregelmäßige Partikel der unterschiedlichen Größenklassen zu beobachten. Die REM-Bilder identifizieren ebenso eine hohlräumige Struktur mit abweichender Kugelform, welche teilweise zerstört ist. Sie weisen damit eine für die Sprühtrocknung typische Form auf.

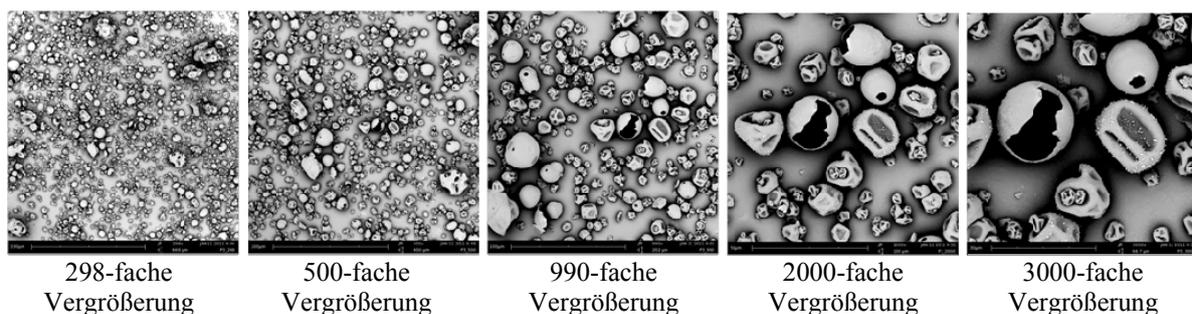


Abbildung 4-16: REM-Aufnahmen des Rapsproteinkonzentrates

Die Partikelgröße eines sprühgetrockneten Produktes, in diesem Fall des Rapsproteinpulvers hängt hauptsächlich von den Prozessparametern wie Zerstäubungsdruck, Düsendurchmesser und Temperatur während der Sprühtrocknung ab. Mit Erhöhung des Zerstäubungsdruckes oder Auswahl eines kleineren Düsendurchmessers ergeben sich kleinere Tröpfchen und als Resultat davon auch kleinere Partikel. Außerdem ist die Partikelgröße durch die Zerstäubungsrate und die Konzentration der zerstäubten Sprühlösung zu beeinflussen.

Kleinere Partikel werden bei hoher Zerstäubungsrate und geringer Konzentration erzeugt (Masters, 1985; Maa, et al., 1997). Der Einfluss dieser Parameter auf die Partikelgrößenverteilung und entsprechend auf die Oberflächenstruktur des Produktes wurde nicht als Untersuchungsziel dieser Arbeit vorgesehen, da für die nachfolgenden Fütterungsversuche die Rapsproteinkonzentrate vermischt mit anderen Futterrohstoffen zu Pellets mit einem Durchmesser von 4 mm verarbeitet werden und für den Fütterungszweck die Partikelmorphologie als Eigenschaft der hergestellten Rapsproteinkonzentrate nicht entscheidend ist. Deshalb ist die Kenntnis der Einflussgrößen auf die Partikelmorphologie für das betrachtete Anwendungsgebiet der Rapsproteinkonzentrate als alternative Proteinquelle für die Fischernährung wenig interessant.

4.2. Herstellung von Globulin- und Albuminkonzentraten

4.2.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens

In diesem Kapitel wird das technologische Verfahren zur Herstellung von Globulin- und Albuminkonzentraten beschrieben. Im Folgenden werden die Verfahrensschritte zur Fraktionierung der Rapsproteine erörtert.

4.2.1.1. Schrotaufbereitung

Die Rapssaat wurde zu Rapsextraktionsschrot nach den im Abschnitt 4.1.1.1 beschriebenen Verfahrensschritten verarbeitet. Eine Ausnahme macht der Entbenzinierungsprozess des hexanfeuchten Rapsschrotes.

Das RES hat direkt nach der Hexan-Extraktion einen Hexangehalt zwischen ca. 9 % ÷ 23 % je nachdem, aus welcher Position die Probenahme aus dem Extraktionsbehälter genommen wird. Die obere Schicht weist ca. 9 % Hexangehalt, die mittlere - ca. 14% und die untere - 23 % auf. Durch Belüftung des RES verdampft das Hexan und hat einen Restgehalt 251 ppm, dessen Wert für den nächsten Verarbeitungsschritt ohne weitere Desolventisierung annehmbar ist. Aus zeitlichen und technischen Gründen ist auf eine Desolventisierung des RES-es in der Wirbelschicht-Anlage verzichtet worden.

Um den Glucosinolatgehalt im Rapsextraktionsschrot zu verringern, soll dieses nach der Desolventisierung ethanolisch extrahiert werden. Durch ethanolische Extraktion wird einerseits der gewünschte Glucosinolatgehalt im Rapsproteinkonzentrat (unter 2 mmol/kg) erreicht, aber andererseits wird das RES chemisch noch belastet, und das führt zur Verringerung der Bioverfügbarkeit der erstlimitierenden Aminosäure Lysin und zur Abnahme der Löslichkeit der Proteine, welche sich in einer Verringerung des PDI-Wertes um 60 % ausdrückt. Die Verminderung der Proteinlöslichkeit bedeutet eine geringere Proteinausbeute. Diese repräsentiert eine geringe Wirtschaftlichkeit des jeweiligen Rapsproteinherstellungsverfahrens. Aufgrund der entstandenen Nachteile wurde auf den Entbitterungsprozess nicht zurückgegriffen.

Es wurde untersucht, inwieweit, ausgehend von hexanextrahiertem Schrot, der Glucosinolatgehalt während der Proteinaufbereitung beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsreihe im Labormaßstab zur Bestimmung der Glucosinolatlöslichkeit durchgeführt. Gleiche Extraktionsbedingungen wie bei der

Rapsproteinherstellung wurden realisiert. Nach jeder Extraktion wurde die Suspension 5 min lang, bei einer Temperatur von 20 °C und einer Geschwindigkeit 3000 rpm mit Hilfe einer Heraeus Cryofuge 5500i Centrifuge abzentrifugiert. Der Rückstand wurde für die nächste Extraktion vorbereitet und die Proteinlösungen wurden mittels Laborfilter mit einer Porengröße 10 kDa (Amicon Stirred Ultrafiltration cell) aufgereinigt und entsprechend aufkonzentriert. Der gewonnene Proteinextrakt wurde mit einem Laborsprühtrockner (Büchi 190 Mini Spray Dryer) bei einer Lufteingangstemperatur zwischen 130 und 160 °C und einer Ausgangstemperatur ca. 80 °C getrocknet. Anschließend wurde die so erhaltene Proteinprobe auf ihren Glucosinolatgehalt untersucht.

Der Glucosinolatgehalt im Ausgangsmaterial (hexanextrahierten RES) wies einen Wert von 23,2 µmol/g i. Tr. auf. Der Glucosinolatgehalt des Extraktionsrückstandes in Höhe von <0,1 µmol/g i. Tr. wies nach, dass die Glucosinolate während der Extraktionen völlig gelöst wurden. Der Glucosinolatgehalt des gewonnenen Proteinkonzentrates beträgt 1,5 µmol/g i. Tr., der den Anforderungen an die Rapsproteinprodukte für die Nutzung im Fischfutter entspricht. Die Laborversuche zeigen, dass eine Senkung der Glucosinolate durch die Proteinaufbereitungsschritte erreicht wird. Deshalb ist für die Herstellung von Globulin- und Albuminkonzentraten auf die ethanolische Extraktion zur Reduzierung von antinutritiven Inhaltsstoffen verzichtet worden.

Auf diesem Wege wurde das hexanextrahierte Schrot als Ausgangsmaterial für die Proteinfractionierung vorbereitet. Das Schrot wurde einer Vermahlung unterzogen, wie im Abschnitt 4.1.1.1 beschrieben ist.

4.2.1.2. Proteinaufbereitung

Das RES wurde einer zweistufigen wässrigen Proteinextraktion unterzogen. Die erste Extraktion wurde reinwässrig mit Verhältnis RES : Wasser von 1 : 10 durchgeführt. Es wurde bei Temperaturen in Höhe von 40 ÷ 45 °C und einer Kontaktzeit von 1 Stunde unter ständigem Rühren gearbeitet. Die Suspension wurde anschließend dekantiert. Die abgetrennte Proteinlösung wurde aufkonzentriert und der Extraktionsrückstand wurde als Einsatzmaterial für die zweite Extraktion verwendet, welche mit einer 0,5-molaren NaCl-Lösung unter den gleichen Prozessbedingungen bezogen auf das Schrot-Wasser Verhältnis, die Temperatur und die Extraktionszeit wie die erste Extraktion durchgeführt wurde. Die abdekantierte Proteinlösung aus der 2. Extraktion wurde diafiltriert, bis eine Leitfähigkeit der Lösung von ca.

6 mS/cm erreicht wurde und schließlich aufkonzentriert. Der Extraktionsrückstand aus der 2. Extraktionsstufe wurde entsorgt. Die Proteinlösungen aus der 1. und 2. Extraktion wurden separat voneinander mit der Ultrafiltration behandelt und im Anschluss daran wieder separat durch Sprühtrocknung konserviert.

Das Elektropherogramm der extrahierten Proteine gibt eine grundlegende Aussage über die Proteinfractionierung unter den gewählten Extraktionsbedingungen. Die Charakterisierung der Proteine nach der relativen Molmasse wurde mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen verwirklicht (Abbildung 4-17).

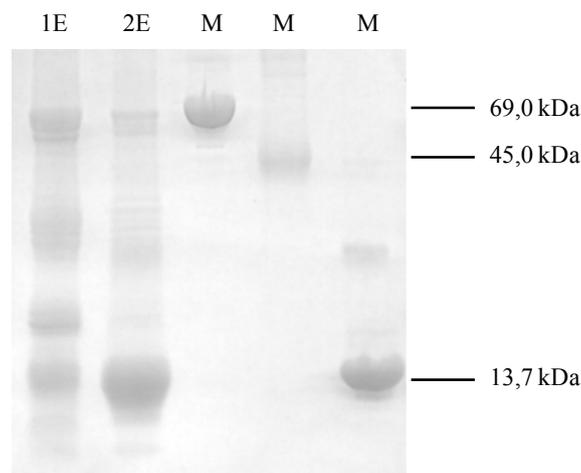


Abbildung 4-17: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Globulin- und Albuminkonzentrates unter nicht-reduzierenden Bedingungen

Wie die Abbildung 4-17 illustriert, dissoziieren die Globuline zu Subeinheiten unter nicht-reduzierenden Elektrophorese-Bedingungen und bilden Banden mit Molekülgröße von ca. 60-50 kDa, ca. 30 kDa und ca. 20 kDa, wie von Dalgarrondo et. al (Dalgarrondo, et al., 1986) beschrieben wurde. Die Bande von 14 kDa entspricht den über S-S-Brücken verbundenen größeren und kleineren Peptidketten des Napins. Das Elektropherogramm der Proteinfractionen aus 1. und 2. Extraktion gibt an, dass die Globuline im ersten Extrakt bzw. Albumine im 2. Proteinextrakt aufkonzentriert sind.

Um die Proteinfractionen des Globulin- und Albuminkonzentrates zu quantifizieren, wurden Laufstrecken des Globulin- beziehungsweise Albuminkonzentrates mittels des UV/VIS TLC Scanners Shimadzu gescannt. Der Scanner ist für Scannen von Platten von Dünnschichtchromatographie geeignet, aber mit dessen Hilfe lässt sich auch die quantitative Bestimmung der Elektrophorese-Gele prüfen. Durch Abtasten des Gels in dem Scanner entsteht aus den Unterschieden der Färbeintensität und Breite der Banden eine Kurve, die so

genannte Elektrophoresekurve. Daraus können Abläufe von Peaks abgelesen werden, welche den einzelnen Proteinbanden entsprechen. Durch Flächenberechnung unter der Kurve beziehungsweise des Peaks können die Anteile der einzelnen Proteinfractionen in der Proteinprobe bestimmt werden. Die Elektrophoresekurven des Globulin- und Albuminkonzentrates sind in der Abbildung 4-18 zu betrachten. Für das Globulinkonzentrat wurden 4 Hauptpeaks detektiert. Die ersten drei entsprechen den Globulinfractionen mit einer Molekülmasse ca. 60-50 kDa, ca. 30 kDa und ca. 20 kDa und die letzte der Albuminfraction mit einer Molekülmasse ca. 14 kDa. Nach den Flächenberechnungen der einzelnen Peaks ergibt sich ein Summenanteil an Globulinen in Höhe von 52 % und entsprechend an Albuminen von 15 %. Diese Methode beinhaltet eine gewisse Ungenauigkeit, da bei den Anteilberechnungen die Fläche von jedem einzelnen Peak berücksichtigt wird. Trotzdem kann die Aussage getroffen werden, dass die Hauptproteinfraction in dieser Probe die Globuline sind. Die Elektrophoresekurve der 2. Extraktion zeigt, dass der Hauptpeak mit der Napinfraction (14 kDa) übereinstimmt. Obwohl der errechnete Albuminanteil 45 % ist, ist diese Proteinfraction in Bezug auf die Größe des Peaks als Hauptproteinfraction zu bezeichnen.

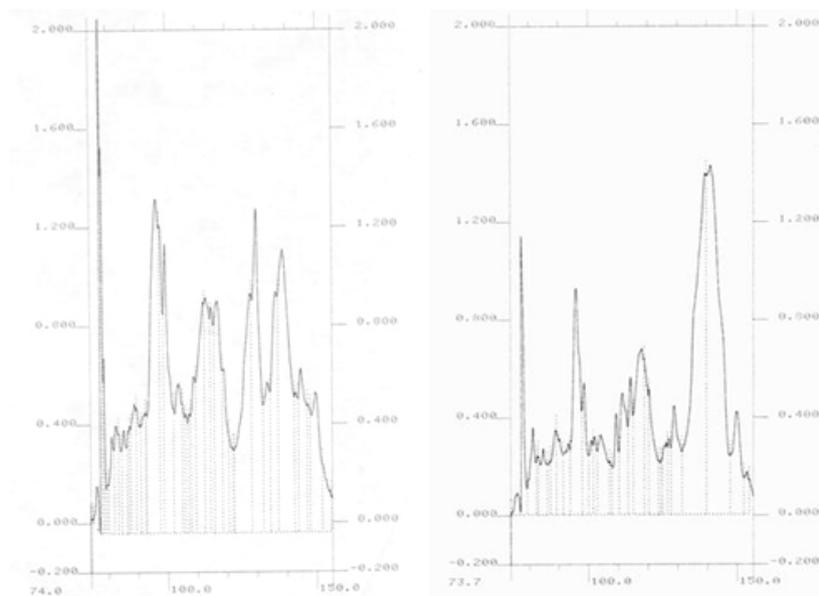


Abbildung 4-18: Elektrophoresekurve des Globulinkonzentrates (rechts) und des Albuminkonzentrates (links)

Nach der Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteinfractionen aus der 1. und der 2. Extraktionen als Globulin- und entsprechend Albuminkonzentrate eingeordnet.

Die Fraktionierung der Rapsproteine ist nachfolgend schematisch aufgeführt.

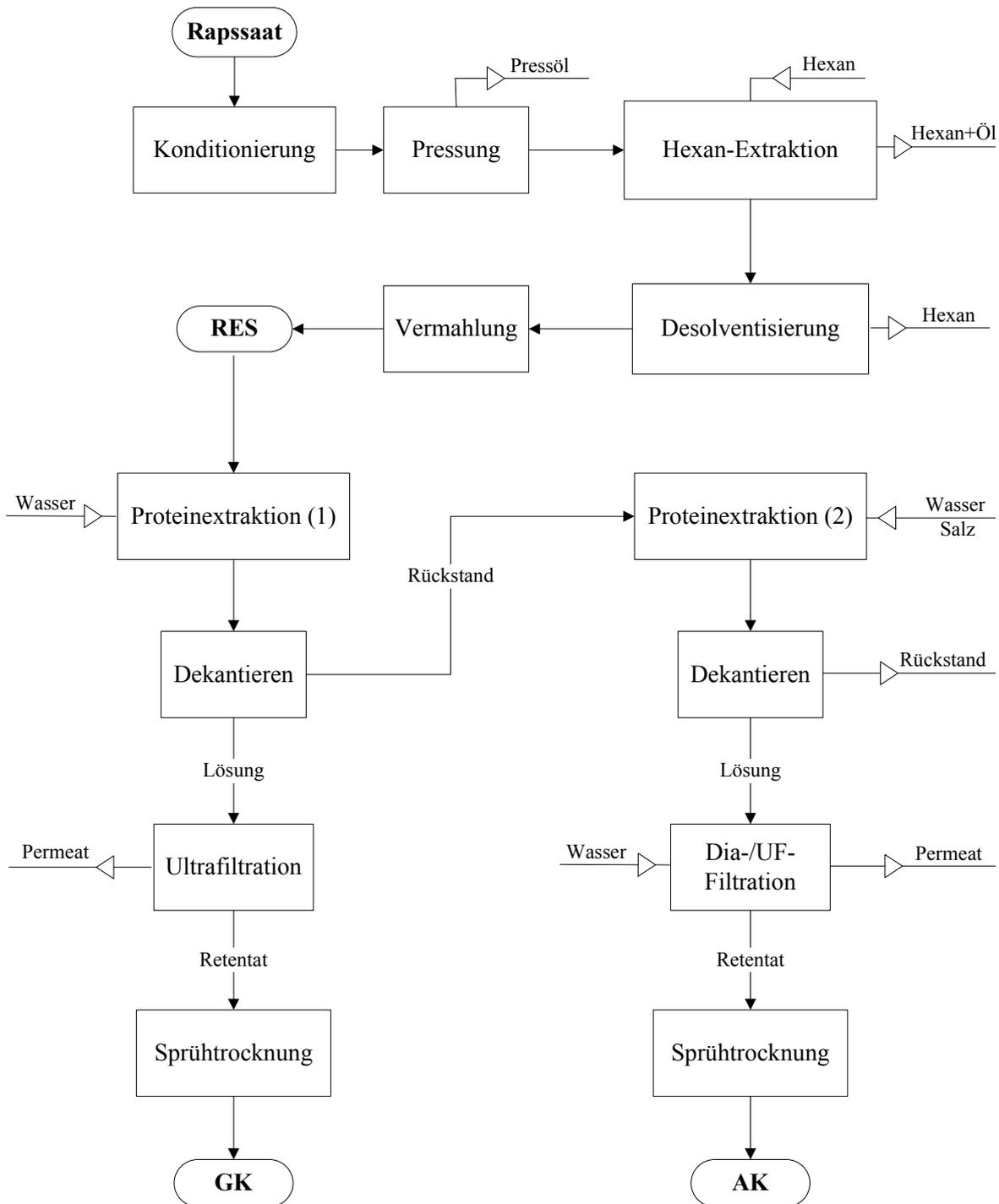


Abbildung 4-19: Verfahrensschritte zur Globulin- und Albuminkonzentratherstellung

4.2.1.3. Ausbeutekalkulation

Für die Albumin- und Globulinkonzentratherstellung wurden 300 kg Rapssaat nach den im Abschnitt 4.2.1.1 und 4.2.1.2 beschriebenen Verfahrensschritten verarbeitet. Es wurde ca. 130 kg Rapsextraktionsschrot hergestellt, welches zu Globulin- und Albuminkonzentraten weiterverarbeitet wurde.

Die Proteinausbeuten aus diesen Versuchen sind in der Tabelle 4-10 und Tabelle 4-11 dargestellt. Die Ausbeuteberechnungen wurden nach Gleichung 4-1 durchgeführt. Im Vergleich zum Herstellungsverfahren des Rapsproteinkonzentrates unterscheidet sich das Ausgangsmaterial in seiner Verarbeitungstechnologie. Es ist ethanolisch nicht behandelt worden. Daher weist das Schrot auch eine höhere Proteinlöslichkeit auf. Dies widerspiegelt sich durch die erreichten Proteinausbeuten. Durch die 1. Extraktion wurden 26,8 % (theoretische Proteinausbeute) der Proteine im Schrot gewonnen. Und entsprechend wurden 21,1 % der Restproteine durch die 2. Extraktion extrahiert. Insgesamt wurden etwa die Hälfte des Proteins im Schrot gewonnen. Allerdings wurden wesentliche Proteinverluste während der Trocknung beobachtet, welche durch den Luftstrom erst im Beutelfilter nach dem Zyklon abgetrennt wurden. Dadurch verringerte sich die Proteinausbeute bezogen auf das Endprodukt um etwa 30 %. Im Vergleich zu der Rapsproteinkonzentratherstellung verfügt der eingesetzte Sprühtrockner über keinen weiteren Abscheider für die nicht durch den Zyklon abgeschiedenen Partikel.

Es wurden nicht alle extrahierten Proteinmuster bezüglich des Proteingehaltes analysiert, sondern nur ausgewählte Proben. Die Werte der anderen Proben sind je nach Aufreinigungsgrad während der Diafiltration (κ) bei der Albuminkonzentrate anhand der Korrelation zwischen der Leitfähigkeit und dem Proteingehalt ermittelt. Daher sind geringfügige Abweichungen in den genannten Werten möglich.

Tabelle 4-10: Ausbeuterechnungen der hergestellten GK-Chargen

Charge	RES [kg]	Ultrafiltration					Sprühtrocknung				Proteinausbeute	
		$\kappa_{\text{Vor UF}}$	κ_{NachUF}	$m_{\text{UF-Lsg}}$	$TS_{\text{UF-Lsg}}$	$m_{\text{P-theoretisch}}$	$m_{\text{P-getrocknet}}$	TS_{Produkt}	Verluste	PG_{Produkt}	theoretisch	getrocknet
		[mS/cm]	[mS/cm]	[kg]	[%]	[kg]	[kg]	[%]	[%]	[Mass.-% i. Tr.]	[%]	[%]
1	5	2,30	2,39	14,02	5,52	0,7739	0,4624	92,00	40,25	64,5	27,81	15,29
2	5	2,14	2,22	15,00	4,10	0,6150	0,5300	92,00	13,82	61,8	21,17	16,79
3	5	2,29	2,35	14,96	5,19	0,7764	0,5725	92,00	26,27	63,9	27,64	18,75
4	5	2,75	2,81	11,52	5,78	0,6659	0,4279	88,62	35,74	63,9	23,70	13,50
5	5	2,46	2,72	11,86	5,64	0,6689	0,5319	90,19	20,48	63,9	23,81	17,08
6	5	2,41	2,52	13,40	5,07	0,6794	0,3956	86,62	41,77	63,9	24,19	12,20
7	5	2,43	2,43	25,00	2,92	0,7300	0,5757	92,00	21,13	63,9	25,99	18,86
8	5	3,02	3,33	9,35	6,49	0,6066	0,2971	92,95	51,02	59,4	20,07	9,14
9	5	3,02	3,18	11,20	6,75	0,7560	0,4146	94,40	45,16	59,4	25,02	12,95
10	5	2,87	3,29	15,44	4,73	0,7303	0,5528	93,74	24,31	59,4	24,17	17,15
11	5	3,07	3,14	14,94	5,75	0,8591	0,5169	92,20	39,83	59,4	28,43	15,77
12	5	3,07	2,96	22,00	3,48	0,7656	0,6619	92,00	13,54	59,4	25,34	20,15
13	5	2,99	2,99	21,50	3,50	0,7525	0,5880	92,00	21,86	59,4	24,90	17,90
14	5	3,04	3,09	16,84	5,45	0,9178	0,5777	93,55	37,05	59,4	30,37	17,88
15	5	3,06	3,39	15,68	5,97	0,9361	0,5868	93,44	37,31	59,4	30,98	18,14
16	5	2,90	3,20	18,24	4,77	0,8700	0,6254	93,59	28,12	59,4	28,79	19,37
17	5	2,77	3,16	15,74	5,25	0,8264	0,5598	93,80	32,26	59,4	27,35	17,38
18	5	2,95	3,10	19,90	4,53	0,9015	0,6546	92,22	27,39	59,4	29,83	19,97
Mittelwert	5	2,74	2,90	15,92	4,97	0,7279	0,5562	92,05	30,96	60,0	26,09	16,57

Für die Ausbeutekalkulation nach Gleichung 4-1 konstant angenommene Werte: $TS_A = 90,6 \%$; $PG_A = 39,62 \text{ Mass.-% i. Tr.}$

Tabelle 4-11: Ausbeuterechnungen der hergestellten AK-Chargen

Charge	RI ¹ [kg]	Ultrafiltration					Sprühtrocknung				Proteinausbeute	
		$\kappa_{\text{Vor UF}}$ [mS/cm]	κ_{NachUF} [mS/cm]	$m_{\text{UF-Lsg}}$ [kg]	$TS_{\text{UF-Lsg}}$ [%]	$m_{\text{P-theoretisch}}$ [kg]	$m_{\text{P-getrocknet}}$ [kg]	TS_{Produkt} [%]	Verluste [%]	PG_{Produkt} [Mass.-% i. Tr.]	theoretisch ² [%]	getrocknet ² [%]
1	3,03	33,5	4,10	8,69	5,38	0,4675	0,3530	93,13	24,51	88,71	23,11	16,22
3	2,96	40,6	4,50	18,90	2,95	0,4519	0,4864	91,60	12,76	87,34	31,58	21,68
4	2,44	45,1	4,20	10,20	4,44	0,4529	0,3509	92,97	22,52	87,34	21,60	15,87
5	2,76	40,6	6,19	17,56	3,13	0,5496	0,3942	94,22	28,28	70,10	21,46	14,50
6	2,84	33,6	7,28	29,95	1,99	0,5960	0,3593	94,58	39,72	65,00	18,02	12,31
7	3,13	41,4	10,15	32,68	1,62	0,4860	0,4433	95,19	16,27	60,00	16,25	14,11
8	3,10	45,5	7,28	15,80	3,24	0,5119	0,3848	94,02	24,83	65,00	18,54	13,10
9	3,11	46,1	7,31	24,23	2,83	0,6857	0,5239	94,45	23,60	65,00	24,83	17,92
10	3,02	42,7	7,45	19,00	3,42	0,6498	0,2625	94,24	59,61 ³	65,00	23,53	8,96 ⁴
11	3,11	42,4	6,60	20,00	2,88	0,5760	0,2521	93,00	56,23 ³	70,10	22,49	9,16 ⁴
12	3,09	48,3	7,60	20,90	2,29	0,4786	0,3159	93,00	33,99	65,00	17,33	10,64
13	3,09	38,3	6,64	17,61	3,10	0,5459	0,4310	95,49	21,05	70,10	21,32	16,07
14	3,13	40,4	6,64	17,28	2,67	0,4614	0,3610	94,61	21,76	70,10	18,02	13,34
15	3,39	35,4	4,33	16,57	2,37	0,3927	0,2823	95,02	28,11	87,30	19,10	13,05
16	3,04	41,9	5,85	18,23	3,18	0,5797	0,4520	94,94	22,03	70,10	22,64	16,76
17	3,04	41,1	5,65	20,57	2,36	0,4844	0,3645	93,09	24,75	70,10	18,92	13,25
18	2,88	37,1	5,54	18,03	2,68	0,4832	0,3159	93,28	34,62	70,10	18,87	11,51
19	2,73	38,1	4,84	14,93	3,02	0,4509	0,4115	93,97	8,73	85,00	21,35	18,31
Mittelwert	2,99	40,7	6,23	18,69	2,97	0,5219	0,3747	93,93	23,67	72,86	21,05	14,91

¹TS=100 Mass.-%; ²berechnet bezogen auf Proteingehalt im Rapsextraktionsschrot; ³Proteinlösung wurde zum Teil getrocknet; ⁴nicht berücksichtigt

Für die Ausbeutekalkulation nach Gleichung 4-1 konstant angenommene Werte: $TS_A = 90,6 \%$; $PG_A = 39,62 \text{ Mass.-% i. Tr.}$

4.2.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften

4.2.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe

Um das Ernährungspotenzial des hergestellten Globulin- und Albuminkonzentrates bewerten zu können, wurde ihre Nährstoffzusammensetzung analysiert. Wie aus der Tabelle 4-12 zu erkennen ist, liegen erhebliche Unterschiede in dem Gehalt der nutritiven Komponenten beider Proteinfractionen vor. Das Globulinkonzentrat enthielt weniger Proteine und mehr Kohlenhydrate im Vergleich zum Albuminkonzentrat. Die niedrigere Proteinkonzentration ist zurückzuführen auf das Verarbeitungsverfahren der Globulinfraktion. Die gelösten Proteine der ersten Extraktionslösung wurden während der Ultrafiltration nicht aufgereinigt, sondern die Lösung wurde nur aufkonzentriert. Dagegen wurde die Proteinlösung aus der zweiten Extraktion diafiltriert, infolge dessen stieg der Proteingehalt an. Während der reinwässrigen Extraktion wurde der größte Anteil der wasserlöslichen Kohlenhydrate extrahiert, sodass diese sich im Globulinprodukt konzentrieren. Das Albuminkonzentrat wies einen deutlich höheren Rohaschegehalt auf, welcher mit den verbleibenden Restsalzen nach der Diafiltration zu erklären ist. Gleiche Mengen an Fett und Faser kommen in den beiden Proteinfractionen vor, was darauf hinweist, dass diese Inhaltsstoffe nicht von dem Verfahrensunterschied beeinflusst wurden.

Tabelle 4-12: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltsstoffe von RES, Globulin- und Albuminkonzentrat

Nutritive Inhaltsstoffe in Mass.-% i. Tr.	RES	GK	AK
Rohprotein	38,1	56,3	70,1
Rohfett	1,7	0,37	0,38
Rohfaser	7,6	< 0,5	< 0,5
Rohasche	7,5	8,6	20,8
Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE)	45,1	34,2	8,2
Organische Masse	92,5	91,4	79,2

Die Analytik der antinutritiven Faktoren (Tabelle 4-13) veranschaulicht, dass das Globulinkonzentrat hohe Gehalte an Glucosinolaten enthält. Das Glucosinolat-Profil der Globulinfraktion zeigt, dass zu den dominierenden Glucosinolaten das Progoitrin und Gluconapin zählen. Das Herauslösen der Glucosinolate aus dem Schrot noch während der 1. Extraktion und deren Reduktion während der Diafiltration des 2. Proteinextrakts führten dazu, dass sie im Albuminkonzentrat nicht identifiziert werden konnten. Dieser Zusammenhang gilt

auch für die Sinapinsäure-Equivalente mit dem Unterschied zu erkennen, dass im Albuminkonzentrat Restmengen vorkommen. Während die Glucosinolate und Sinapinsäure-Equivalente sich im Globulinkonzentrat sammeln, konzentriert sich die Phytinsäure mit jeder nachfolgenden Extraktionsstufe und erreicht Werte von 2,04 g/100g im Albuminkonzentrat.

Tabelle 4-13: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltsstoffe von RES und Globulin- und Albuminkonzentrat

Antinutritive Inhaltsstoffe	RES	GK	AK
Σ Glucosinolate [μmol/g i. Tr.]	23,2	2,31	< 0,1
Glucobrassicinapin		0,29	
Glucobrassicin			
Gluconapin		0,86	
Gluconapoleiferin			
Progoitrin		1,16	
4-Hydroxyglucobrassicin			
Phytinsäure [g/100g i. Tr.]	2,02	1,53	2,04
Σ SAE [g/kg i. Tr.]	15,2	3,72	0,39
Davon SA	1,09	< 0,01	0,12
Davon SIN	9,03	2,46	0,02
Davon SG	2,21	0,04	< 0,01

* Σ SAE= Summe an Sinapinsäure und Sinapinsäureester
SA = Sinapinsäure; SIN= Sinapin; SG= Sinapoylglucose

4.2.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren

Es wurde untersucht, inwieweit die Fraktionierung der beiden Hauptproteine im Raps einen Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung ausübt. Die Aminosäureanalytik wurde in zwei unterschiedlichen Prüflaboratorien durchgeführt, deren Ergebnisse als AS1 und AS2 in der Tabelle 4-14 aufgetragen sind. Es ist erkennbar, dass die Albuminkonzentrate höhere Aminosäurewerte mit Ausnahme von Methionin und Phenylalanin aufwiesen. Besonders bei Cystein und Lysin ist dieser Zusammenhang äußerst ausgeprägt, da die Rapsalbumine reich an schwefelhaltigen Aminosäuren und Lysin sind.

Auffallend ist es, dass die Messwerte der Aminosäuren aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und der Probenmuster schwanken. Die Albuminkonzentrate zeichnen sich durch kleinere absolute Differenzwerte bzw. absolute prozentuale Abweichungen aus, deren Mittelwert 0,39 (Min=0,03 und Max=0,72) bzw. 9,08 % (Min=0,77 % und Max=23,66 %) beträgt. Dagegen unterscheiden sich die Messwerte der

Aminosäuren im Globulinkonzentrat mit einem Mittelwert von 0,55 (Min=0,20 und Max=1,12), was einer absoluten prozentualen Abweichung von 13,98 % (Min=5,17 % und Max=26,67 %) entspricht.

In Hinsicht auf das Aminosäureprofil können die gewonnenen Globulin- und Albuminkonzentrate ernährungsphysiologisch hoch bewertet werden. Bezugnehmend auf die höheren Gehalte an schwefelhaltigen essentiellen Aminosäuren wie Methionin und Cystein und als auch an der limitierenden Aminosäure Lysin ist das Albuminkonzentrat als hochwertiges Proteinprodukt einzustufen.

Tabelle 4-14: Aminosäurezusammensetzung des RES, des Globulin- und Albuminkonzentrates

Aminosäure g/100g RP	RES	GK					AK				
		\overline{AS}	$ p\% ^1$	$ \Delta AS $	AS ₁	AS ₂	\overline{AS}	$ p\% ^1$	$ \Delta AS $	AS ₁	AS ₂
MET	1,95	2,26	23,27	0,47	2,02	2,49	2,08	23,66	0,44	1,86	2,30
CYS	2,34	2,34	16,20	0,35	2,16	2,51	3,47	6,55	0,22	3,36	3,58
M+C	4,29	4,59	19,62	0,82	4,18	5,00	5,55	12,64	0,66	5,22	5,88
LYS	7,00	5,44	14,60	0,74	5,07	5,81	7,26	8,92	0,62	6,95	7,57
THR	4,54	4,76	26,67	1,12	4,20	5,32	4,60	16,98	0,72	4,24	4,96
TRP											
ARG	6,19	6,51	8,49	0,53	6,24	6,77	6,73	6,92	0,45	6,50	6,95
ILE	3,99	3,77	5,17	0,2	3,87	3,67	3,95	2,75	0,11	4,00	3,89
LEU	7,13	7,34	8,38	0,59	7,04	7,63	7,72	4,37	0,33	7,55	7,88
VAL	5,21	4,76	9,60	0,48	5,00	4,52	5,04	10,17	0,54	5,31	4,77
HIS	2,70	2,78	12,21	0,32	2,62	2,94	3,38	6,10	0,2	3,28	3,48
PHE	4,04	4,36	9,62	0,4	4,16	4,56	3,88	0,77	0,03	3,89	3,86
TYR		2,83				2,83	2,83				2,83
GLY	5,21	5,77				5,77	5,32				5,32
SER	4,32	4,76				4,76	4,69				4,69
PRO	6,13	5,90				5,90	6,56				6,56
ALA	4,52	4,94				4,94	4,80				4,80
ASP	7,75	9,48				9,48	6,35				6,35
GLU	16,22	20,10				20,10	20,24				20,24

¹ Prozentuale Abweichung, berechnet durch $p\% = \frac{AS_1 - AS_2}{AS_1} \cdot 100$

4.2.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen

Das Elektropherogramm der Globulin- und Albuminkonzentrate ist in der Abbildung 4-20 abgebildet. Diese Ergebnisse beruhen auf einer Untersuchung der extrahierten Proteine aus der 1. und 2. Extraktion mit SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Die ersten drei Probekolben des Elektropherogramms in der Abbildung 4-20 entsprechen dem Proteinkonzentrat aus der 1. Extraktion. Es ist zu sehen, dass diese Proteinfraction reich an Globulinen ist. Die Banden der α - (ca. 34-27 kDa) und β -Seitenketten (ca. 23-20 kDa) des Globulins zeigen wesentlich höhere Farbintensität im Gegensatz zu den Banden der größeren (ca. 13 kDa) und kleineren (ca. 11kDa) Peptidketten des Albumins. Die Farbintensität einer Bande dient zum quantitativen Abschätzen der Proteinkonzentration. Daraus folgernd ist festzuhalten, dass aus der ersten Extraktion ein Globulin-reicheres Proteinpräparat gewonnen wurde. Die zweite Extraktion (5. und 6. Balken) dagegen liefert Protein, welches reich an Albuminen ist, da die Verfärbung der Banden von 13 und 11 kDa viel intensiver ist. Hinsichtlich der Stärke der Verfärbung enthält die Proteinfraction aus der zweiten Extraktion hauptsächlich Napin.

Die nach der relativen Quantität der Proteinbanden ermittelten Prozentanteile der Proteinfractionen in den Proteinkonzentraten bestätigen die bereits abgeleitete Aussage (Abbildung 4-21).

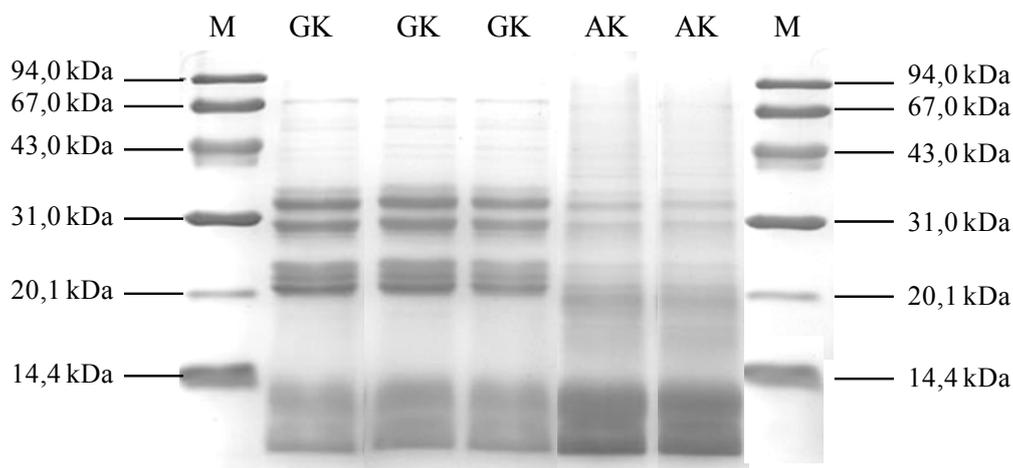


Abbildung 4-20: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Globulin- und Albuminkonzentrates

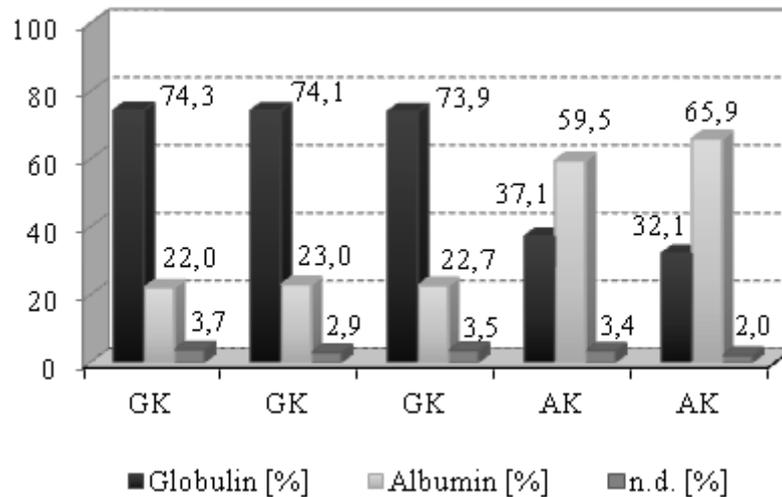


Abbildung 4-21: Proteinzusammensetzung des Globulin- und Albuminkonzentrates

4.2.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften

4.2.3.1. Thermodynamische Eigenschaften

Die Struktur der Globulin- und Albuminkonzentrate zeichnet sich durch bestimmte Nativität aus. Die folgenden grafischen und tabellarischen Darstellungen weisen nach, dass für die vollständige Denaturierung der Globulin- und Albuminkonzentrate endotherme Wärmemengen benötigt worden sind.

Während des Erwärms der Probe finden zwei endotherme Wärmeprozesse mit einem Peakmaximum bei 90,3 °C ($\Delta H_d = 8,72$ J/g Protein) und 108,6 °C ($\Delta H_d = 1,22$ J/g Protein) für die Globulinkonzentrate und entsprechend für die Albuminkonzentrate bei 95,9 °C ($\Delta H_d = 1,41$ J/g Protein) und 111,4 °C ($\Delta H_d = 2,54$ J/g Protein) statt. Der erste Peak entspricht der Denaturierung der Globuline und der zweite der Albumindenaturierung.

Die Summendenaturierungsenthalpie der Albuminkonzentrate ist kleiner als diese der Globulinkonzentrate. Dieses Charakteristikum ist auf die unterschiedliche Probenzusammensetzung aufgrund der unterschiedlichen Proteinextraktionsbedingungen bzw. die salzige Proteinextraktion durch den Restsalzgehalt der Probe und die langdauernde Diafiltration durch die dabei entstehende mechanische Belastung (Scherkräfte) als zu unterscheidenden Aufbereitungsschritte zurückzuführen. Sowohl die Globulinkonzentrate als auch die Albuminkonzentrate charakterisieren sich mit nativerer Proteinstruktur als die Rapsproteinkonzentrate.

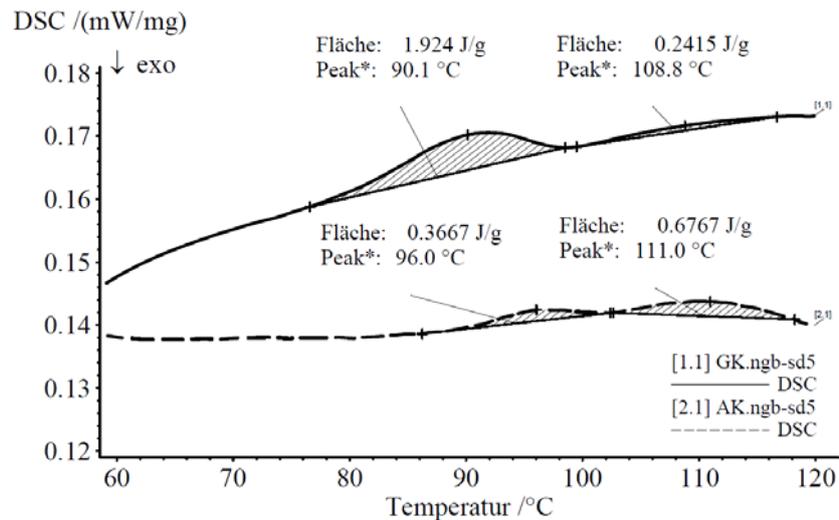


Abbildung 4-22: DSC-Thermogramm des Globulin- und Albuminkonzentrates

Tabelle 4-15: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Globulinkonzentrates

GK	Peak 1			Peak 2		
	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein
1. Messung	90,1	1,924	8,522	108,8	0,242	1,070
2. Messung	90,4	2,057	8,922	108,3	0,314	1,362
Mittelwert	90,3	1,991	8,722	108,6	0,278	1,216

Tabelle 4-16: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Albuminkonzentrates

AK	Peak 1			Peak 2		
	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein
1. Messung	96,0	0,367	1,293	111,0	0,677	2,383
2. Messung	95,7	0,442	1,520	111,8	0,784	2,697
Mittelwert	95,9	0,404	1,406	111,4	0,730	2,540

4.2.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften

Obwohl die beiden Proteinfractionen unter gleichen Prozessbedingungen getrocknet wurden, zeigen diese klare Unterschiede auch bei der Betrachtung ihrer Partikelgrößenverteilung (Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24). Bei dem Albuminkonzentrat ist eine Verschiebung der Dichteverteilungskurve in Richtung der kleinen Partikelgrößen zu beobachten. Diese Verschiebung äußert sich in den Partikelverteilungswerten (Tabelle 4-17). Da die eingestellten Betriebsparameter bei der Sprühtrocknung von beiden Proteinkonzentraten

gleich sind, ist der Grund der Verschiebung der Partikelgröße und deren Verteilung in unterschiedlichen Eigenschaften der Proteinlösungen wie z.B. Zusammensetzung, TS-Gehalt u.a. infolge der unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren zu suchen.

Tabelle 4-17: Partikelverteilungswerte des Globulin- und Albuminkonzentrates

	Globulinkonzentrat			Albuminkonzentrat		
	$d_{10,3}$ in μm	$d_{50,3}$ in μm	$d_{90,3}$ in μm	$d_{10,3}$ in μm	$d_{50,3}$ in μm	$d_{90,3}$ in μm
1. Messung	3,25	10,93	26,34	2,34	7,23	22,32
2. Messung	3,02	10,09	23,79	2,29	7,02	21,51
Mittelwert	3,14	10,51	25,07	2,32	7,13	21,92

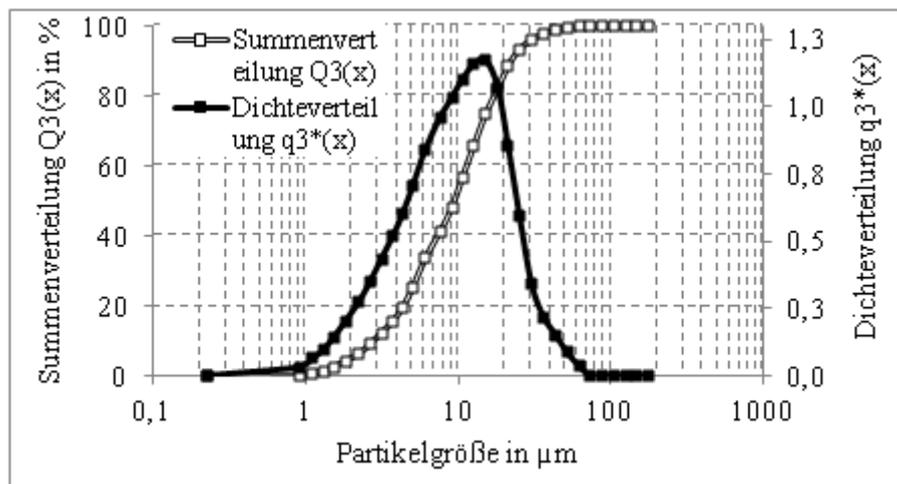


Abbildung 4-23: Partikelgrößenverteilung des Globulinkonzentrates

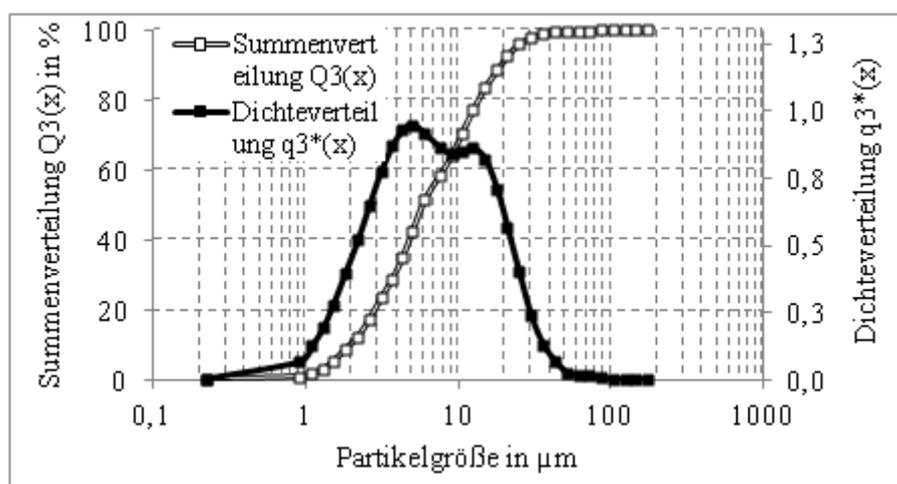


Abbildung 4-24: Partikelgrößenverteilung des Albuminkonzentrates

Die REM-Aufnahmen (Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26) der Globulin- und Albuminkonzentrate zeigen, dass Unterschiede in der räumlichen Oberflächenstruktur der Partikel vorhanden sind. Die Partikelform der Globulinkonzentrate variiert von kugelig bis erbsenförmig, und sie zeichnen sich durch eine glatte Oberfläche aus. Die Albuminkonzentrate weisen eine sehr unregelmäßige Partikelmorphologie auf. Die unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften der beiden Konzentrate können damit erklärt werden, dass die Proteinlösungen unterschiedliche Zusammensetzung und TS-Gehalte besitzen und die Proteine im Albuminkonzentrat während der Diafiltration infolge der auftretenden Scherkräfte beansprucht worden sind. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen beweisen nochmals, dass es sich bei den Albuminkonzentraten sich um kleinere Partikel handelt.

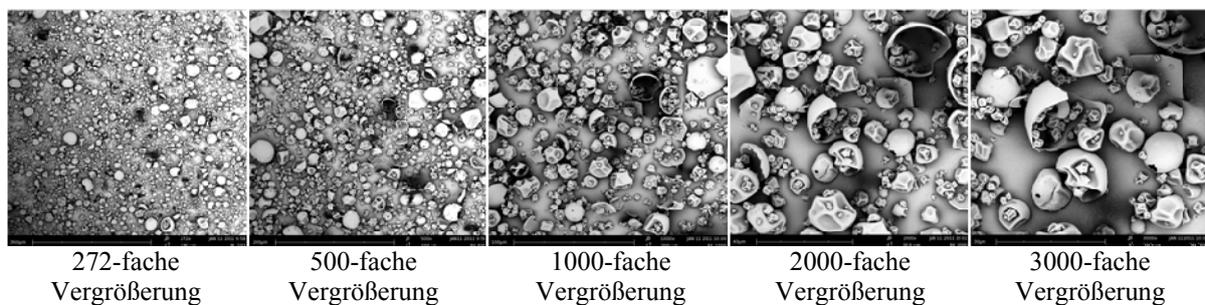


Abbildung 4-25: REM-Aufnahmen des Globulinkonzentrates

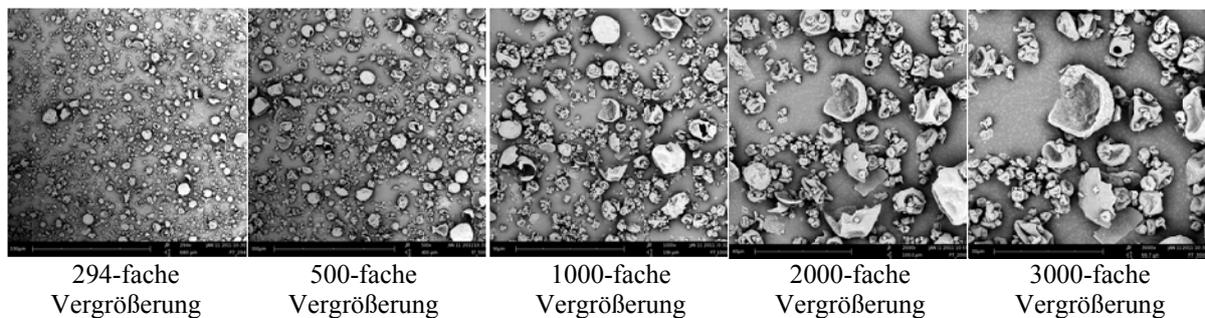


Abbildung 4-26: REM-Aufnahmen des Albuminkonzentrates

4.3. Herstellung von Rapsproteinisolat

4.3.1. Ableitung des Herstellungsverfahrens

Die Entwicklung des Herstellungsverfahrens von Rapsproteinisolat, welches sich aus beiden Proteinfractionen Globulin und Albumin zusammensetzt, wird in diesem Kapitel dargelegt. Das Verfahren beinhaltet einen technologischen Prozess zur wässrigen Proteinextraktion aus dem schonend verarbeitenden Rapsextraktionsschrot und einen Proteinaufreinigungsprozess mittels Präzipitation.

4.3.1.1. Schrotaufbereitung

Das verwendete Rapsextraktionsschrot wurde nach dem im Abschnitt 4.2.1.1 aufgeführten Verfahren hergestellt.

4.3.1.2. Proteinaufbereitung

Die Proteinextraktion aus dem Schrot erfolgte nach dem zweistufigen wässrigen Extraktionsverfahren laut des Absatzes 4.2.1.2. Um einen Proteinisolat herzustellen, ist der Proteingehalt der gewonnenen Proteinextrakte aus der 1. und 2. Proteinextraktion zu erhöhen. Dafür wurde die Methode der Präzipitation zur Proteinisolierung ausgewählt.

Um die signifikanten Einflussgrößen des Prozesses zu ermitteln, wurden Screening-Versuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben sind.

Drei Versuchsreihen mit unterschiedlicher Ausgangslösung wurden im Labormaßstab durchgeführt, um den optimalen Präzipitations-pH-Wert zu bestimmen. Die Proteinextraktionsbedingungen sind in der Tabelle 4-18 dargestellt.

Tabelle 4-18: Extraktionsbedingungen der Präzipitationsvorversuche

Versuch	1. Extraktion	2. Extraktion
1.	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1h
2.	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1h, pH=5 Zitronensäure	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1h, pH=9 NaOH
3.	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1h	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=9 NaOH

Die Proteinlösungen aus der 1. und 2. Extraktion im Verhältnis 1:1 wurden für die Präzipitationsversuche verwendet. Der pH-Wert wurde von 4 bis 10 variiert, für dessen

Einstellung Zitronensäure Monohydrat 99,5 %, 2N NaOH, 1N NaOH und 0,1N NaOH als Präzipitationsreagenzien verwendet wurden. Nach einer Präzipitationsdauer von 30 min wurde die Proteinlösung zentrifugiert, und danach wurde der Präzipitationsrückstand gefriergetrocknet.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in der Abbildung 4-27 zusammengefasst. Die Präzipitationsversuche führten zu der Hauptschlussfolgerung, dass bei einem pH-Wert von 4 ein maximaler Proteingehalt dokumentiert wurde. Einen Einfluss auf den Proteingehalt übte ebenfalls die Proteinkonzentration der Ausgangslösung aus. Die Präzipitationsrückstände der konzentriertesten Proteinlösung (Versuch 3) zeigten höhere Proteingehalte außer bei pH 4.

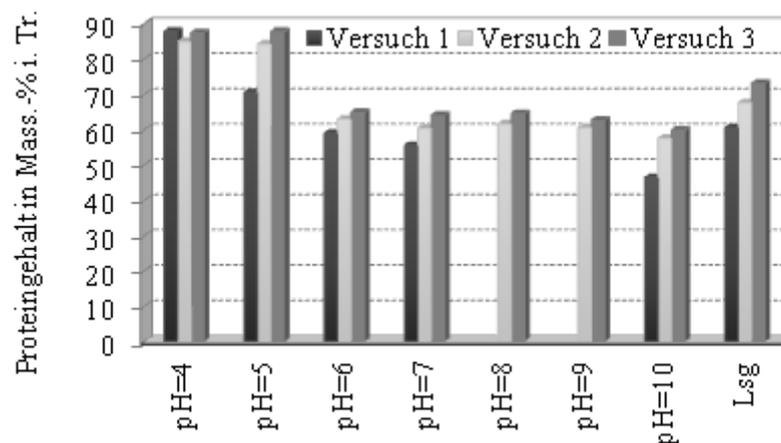


Abbildung 4-27: Einfluss des pH-Wertes (4-10) auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes

In den Abbildungen 4-28, 4-29 und 4-30 sind die Elektropherogramme der Präzipitationsrückstände aus diesen Versuchen dargestellt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass bei pH 4 und 5 hauptsächlich die Globuline aus der Lösung ausfallen. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes wird beobachtet, dass die Präzipitationsrückstände Albumine und β -Polypeptidketten der Globuline enthalten. Das spricht für eine Dissoziation des hochmolekularen Globulins in Untereinheiten infolge der höheren pH-Werte (6 – 10).

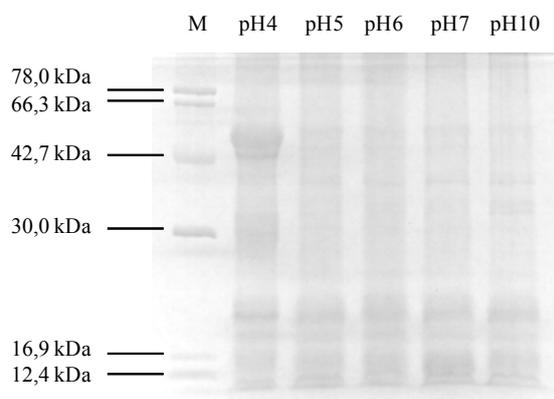


Abbildung 4-28:
Elektropherogramm (SDS-PAGE)
der Präzipitationsrückstände-
Versuch 1

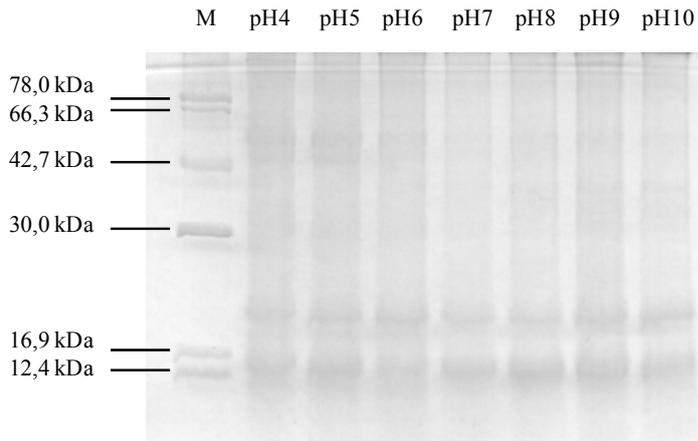


Abbildung 4-29:
Elektropherogramm (SDS-PAGE)
der Präzipitationsrückstände-
Versuch 2

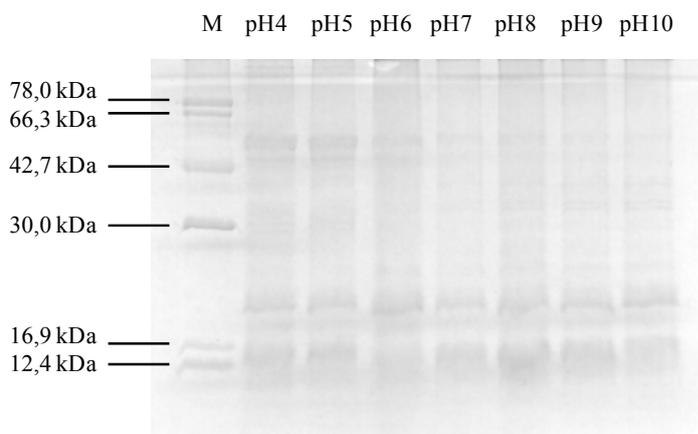


Abbildung 4-30:
Elektropherogramm (SDS-PAGE)
der Präzipitationsrückstände-
Versuch 3

Weiterhin wurden Experimente zur weiteren Optimierung des pH-Wertes durchgeführt. Für die Präzipitationsversuche wurde eine Ausgangsproteinklösung eingesetzt, welche unter gleichen Bedingungen wie bei dem Versuch 1 hergestellt wurde. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in der Tabelle 4-19 zusammengestellt. Die untersuchten pH-Werte liegen im Bereich von 3 bis 4,5 mit einem Differenzintervall von 0,5. Es ist zu betrachten, dass ein maximaler Proteingehalt bei dem pH-Wert von 4 erreicht wurde. Außerdem wurde festgestellt, dass die Präzipitationstemperatur einen erheblichen Einfluss auf den Proteingehalt und die Proteinausbeute ausübt (Tabelle 4-19).

Wie der Abbildung 4-31 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Präzipitationsrückstände in ihrem Proteinfractionsprofil fast nicht. Bei den untersuchten pH-Werten werden überwiegend die Globuline aus der Extraktionslösung gewonnen. Ein geringer Anteil an Napin ist auch zu beobachten. Da die Albumine gut wasserlöslich und nicht mit Säure fällbar sind und ihr IP oberhalb pH 10 liegt (Schwenke, et al., 1973), wurden die in der Lösung enthaltenen Albumine bei den untersuchten Präzipitationsbedingungen nicht ausgefällt, wie in dem

elektrophoretischen Bild des Überstandes (als ÜpH4,5 bezeichnet) aus der Präzipitation bei pH von 4,5 dokumentiert ist. Das erklärt auch die niedrigeren Proteinausbeuten.

Tabelle 4-19: Einfluss des pH-Wertes auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes

	Lsg	pH=3,0	pH=3,5	pH=4,0	pH=4,0 (T=40-45°C)	pH=4,5
Proteingehalt in Mass.-% i. Tr.	62,1	75,7	82,0	83,2	78,5	81,6
Proteinmenge in g	39,7	18,3	19,4	18,7	11,8	15,8
Proteinausbeute in %	100	46,1	48,9	47,2	29,9	39,8

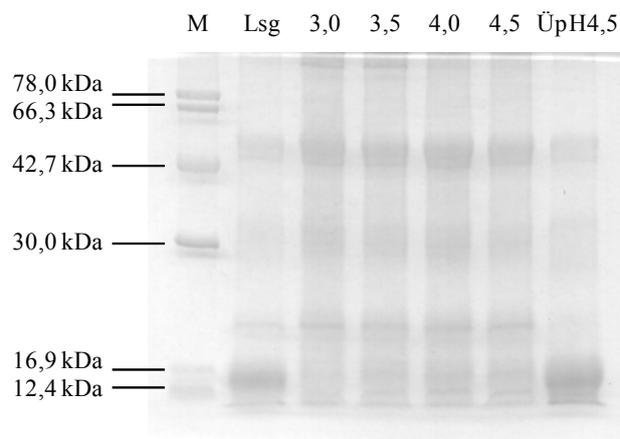


Abbildung 4-31: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Präzipitationsrückstände bei pH von 3 – 4,5

Nachfolgend wurden die Präzipitationsbedingungen untersucht (Tabelle 4-20). Die Präzipitationsdauer und -temperatur wurden variiert. Die Präzipitation wurde bei pH 4 durchgeführt. Die Ergebnisse weisen nach, dass eine längere Präzipitationszeit die Proteinausbeute nicht erhöht. Es wurde die oben abgeleitete Aussage bestätigt, dass der Präzipitationsprozess unter niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden soll, da eine höhere Präzipitationstemperatur den Proteingehalt und folglich die Proteinausbeute verringert. Außerdem erhöht eine wässrige Waschung des Präzipitationsrückstandes den Proteingehalt und die -ausbeute durch Auswaschung des Präzipitationsmittels und der Verunreinigungen. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 4-20 als 1xW bezeichnet.

Tabelle 4-20: Einfluss der Präzipitationsbedingungen auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes

	Lsg	30 min	60 min	T=40-45 °C	1xW
Proteingehalt in Mass.-% i. Tr.	53,1	86,5	84,6	77,7	88,0
Proteinmenge in g	24,2	11,7	11,2	7,7	10,8
Proteinausbeute in %	100	48,6	46,6	31,8	44,5

In einem nächsten Schritt wird die Isolatgewinnung durch die Präzipitationsmethode im Pilotmaßstab überprüft werden. Da durch die Laboruntersuchungen ein pH-Wert von 4 für das Ausfallen der Globuline ermittelt wurde, ist zu erwarten, dass bei einer separaten Präzipitation der globulinreichen Proteinlösung aus der 1. Extraktion (Extraktionsbedingungen s. Abschnitt 4.2.1.2) höhere Proteingehalte erzielt werden. Einige Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind in der Tabelle 4-21 dargestellt. Entsprechend der Erwartungen wurde ein Proteinisolat mit etwa 95 Mass.-% Proteingehalt i. Tr. durch die Präzipitation des 1. Proteinextraktes bei pH 4 gewonnen. Der Überstand aus dieser Präzipitation wies einen Proteingehalt in Höhe von 32,9 Mass.-% auf. Eine nachgeschaltete Präzipitation bei einem höheren pH-Wert konnte den Proteingehalt nicht erhöhen, deshalb ist auf die zweite Präzipitation verzichtet worden. Wie der Tabelle 4-21 zu entnehmen ist, verringert die höhere Präzipitationstemperatur sowohl den Proteingehalt als auch die Ausbeutemenge.

Tabelle 4-21: Ergebnisse aus der Präzipitation der 1. Extraktion im Pilotmaßstab

Vers. Nr.	Proteingehalt in Mass.-% i. Tr.	pH-Wert	Temperatur in °C	Masse in g	Bemerkungen
1	94,9	4	6	281,6	
2	94,2	4	12	262,7	
2	28,6	8	20	37,6	2. Präzipitation
3	95,0	4	12	272,0	
3	25,2	8	18	39,2	2. Präzipitation
4	90,1	4	35	211,6	

Um keine Geschmacksbeeinträchtigung bei den Fischen wegen des sauren Charakters des bei pH 4 gefällten Proteinisolates hervorzurufen (Schulz, 2011), soll ein Neutralisationsprozess durchgeführt werden. In der Abbildung 4-32 sind einige möglichen Prozessvariationen schematisch dargestellt. Wenn gleich nach der Präzipitation die Proteinlösung neutralisiert wird, indem der pH-Wert auf 7,0 eingestellt wird, löst sich ein Teil der bereits ausgefällten Proteine wieder. Das führt zur erheblichen Proteinverlusten (Prozessschritt 2). Deshalb wurde zunächst der abzentrifugierte Präzipitationsrückstand neutralisiert, indem er zuvor in 10l Wasser suspendiert wurde. Die Neutralisation mit anschließender Zentrifugation ergibt ein Proteinisolat mit einem geringeren Proteingehalt. Außerdem beobachtet man einen signifikanten Massenverlust bedingt durch die Wiederlöslichkeit der Proteine bei dem neutralen pH-Wert (Prozessschritt 3). Das kann durch eine direkte Trocknung des neutralisierten Rückstandes vermieden werden. Allerdings ist eine

geringfügige Reduktion des Proteingehaltes im Vergleich zu dem nicht neutralisierten Proteinisolat infolge der Zugabe des Neutralisationsmittels zu erwarten.

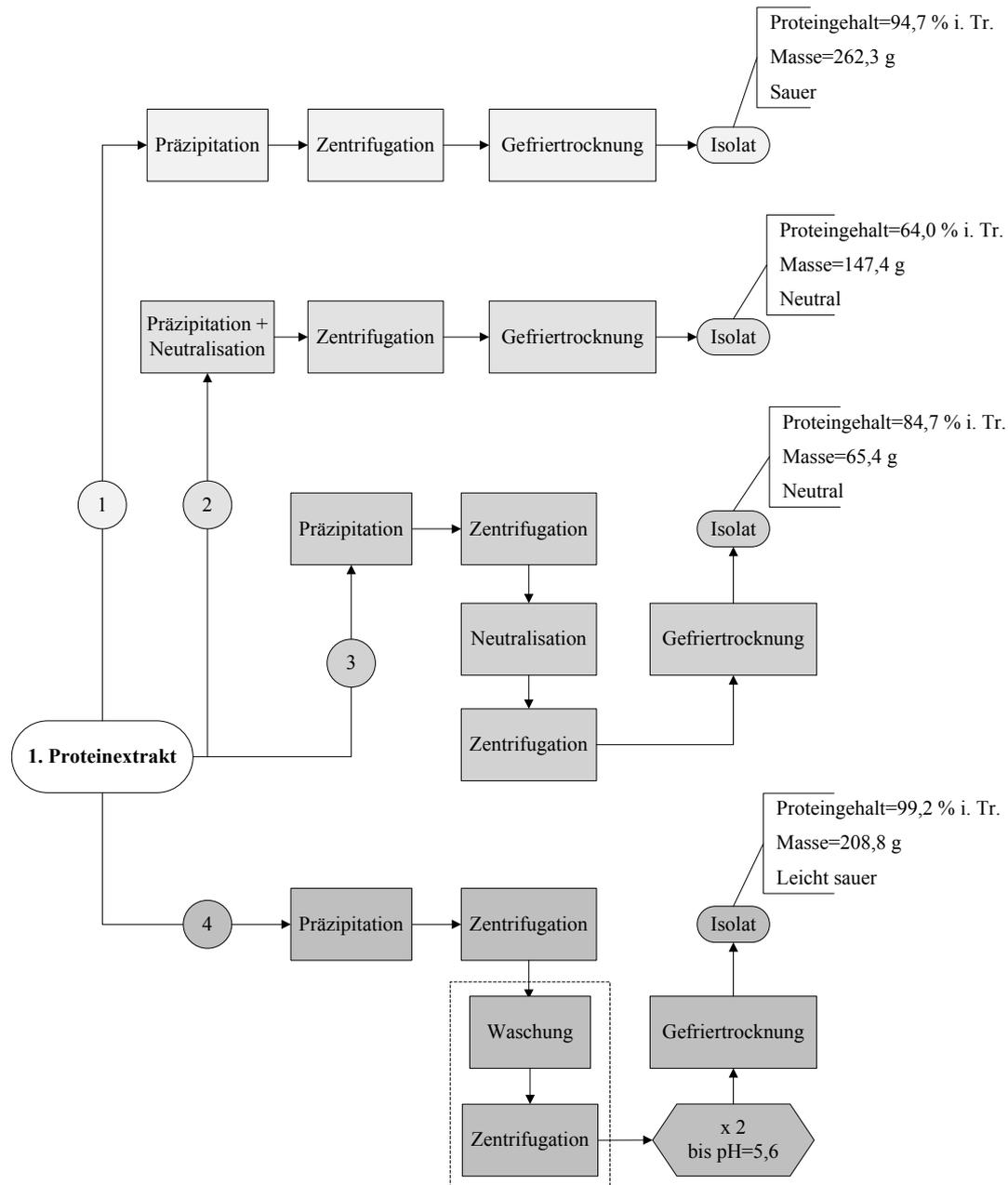


Abbildung 4-32: Variationen des Präzipitationsprozesses des 1. Proteinextraktes

Der Prozessschritt 4 beschreibt eine weitere Option zur Behandlung des Präzipitationsrückstandes. Dieser wurde im Verhältnis 1:10 mit Wasser vermisch und 10 min bei ca. 10 °C gerührt. Danach wurde die Suspension abzentrifugiert. Dieser Waschungsschritt wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Durch Auswaschung des Präzipitationsmittels wurden ein sehr hoher Proteingehalt und eine Erhöhung des pH-Wertes erreicht. Wegen des zeitlichen

Aufwands wurde dieses Isolatherstellungsverfahren für die weiteren Isolatherstellungsversuche nicht angewandt.

Parallel wurden Versuche zur Proteinpräzipitation aus der 2. Extraktion (Extraktionsbedingungen s. Abschnitt 4.2.1.2) durchgeführt (Tabelle 4-22). Zu Beginn wurde die Lösung bei pH 4 gefällt und nachfolgend der Präzipitationsüberstand bei pH 8. Es wurden bei diesen Präzipitationsbedingungen erzielte Proteingehalte über 90 Mass.-% i. Tr. nicht beobachtet. Der höchste Proteingehalt wurde bei einem pH-Wert von 11 erreicht. Eine wässrige Waschung des Rückstandes erhöht den Proteinanteil nur um 4 %. Da der Proteinanteil sich nicht bedeutend verändert, wurde auf diesen zusätzlichen Verarbeitungsschritt verzichtet. Der nach der Präzipitation bei pH 11 verbliebene Überstand enthielt einen hohen Restproteingehalt (etwa 70 Mass.-% i. Tr.), deshalb wurde dieser einer zweiten Präzipitation bei pH 4 unterzogen. Somit reduziert sich der Proteinanteil im zweiten Überstand auf ca. 50 Mass.-% i. Tr..

Tabelle 4-22: Ergebnisse aus der Präzipitation der 2. Extraktion im Pilotmaßstab

Vers. Nr.	Proteingehalt in Mass.-% i. Tr.	pH-Wert	Temperatur in °C	Masse in g	Bemerkungen
1	77,2	4	22	211,4	
1	42,7	8	18	36,6	2. Präzipitation
2	73,4	8	6	274,9	
3	71,7	8	18	197,5	
4	84,3	11	2	151,0	
5	82,4	11	15	70,9	
5	85,7	11	15	20,1	3 x Waschung bis pH=8,5
5	84,3	4	18	45,8	2. Präzipitation

Die gewonnenen Proteinpräparate wurden auf ihre Proteinzusammensetzung mittels der Gelelektrophorese unter reduzierten Bedingungen untersucht. In der Abbildung 4-33 sind die Ergebnisse aus diesen Analysen gezeigt. Der Präzipitationsrückstand der 1. Extraktion (Prozessschritt 1) besteht aus Globulinen. Hier sind die Banden im Bereich von ca. 30 kDa und 20 kDa Molekülgröße (α - und β -Globulin-Polypeptide) stark gefärbt (Balken 1, 2, 3 und 11). Die Albumine aus dem 1. Extrakt wurden durch die Präzipitation nicht gewonnen und als Überstand getrennt (Balken 4 und 5). Die Balken 6 und 10 entsprechen den Präzipitationsrückständen der 2. Extraktion (pH=11), welche Albumine und modifizierte

(infolge dem höheren pH-Wert dissoziierte) Globuline enthalten. Im Überstand aus der Präzipitation bei pH 11 sind Banden sowohl für Globuline, als auch für Albumine erkennbar (Balke 7). Während die Restglobuline bei der 2. Präzipitation bei pH 4 ausfallen (Balke 8), verbleiben die Albumine im Überstand (Balke 9).

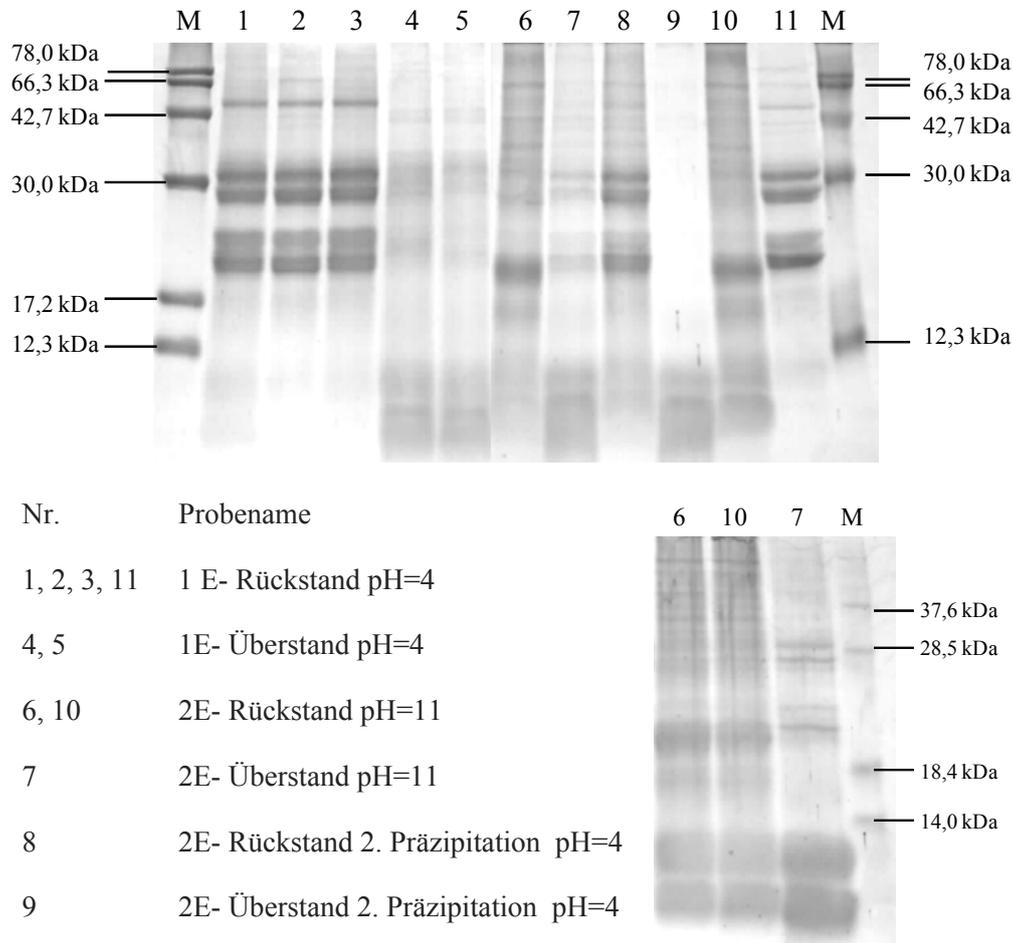


Abbildung 4-33: Elektropherogramm der Präzipitationsrückstände aus den 1. und 2. Extraktionen

Für die Herstellung des Rapsproteinisolates wurde der Prozessschritt 1 (Abbildung 4-32) aufgrund seines vergleichsmäßig einfacheren Aufbereitungsverfahrens trotz des saueren Charakters des gewonnenen Isolats ausgewählt. Auf eine Neutralisation wurde wegen der Proteinverluste verzichtet. Da dieses Isolat mit dem aus der 2. Extraktion vermischt wird, welches durch Präzipitation bei pH 11 gewonnen wird, steigt der pH-Wert des Gesamtproteinproduktes, welches aus den Proteinisolaten der 1. und der 2. Extraktion im Verhältnis 2:1 besteht, auf 5,62 (bei 30,6 °C wurde der pH-Wert vermessen). Deshalb wurde es für nicht streng notwendig gehalten, eine Neutralisation durchzuführen.

Die nach vorangehend beschriebenen Präzipitationsverfahren gewonnenen Präzipitationsprodukte der 1. und 2. Proteinextraktionen wurden miteinander im Verhältnis von 2:1 vermischt. Daraus folgend ergab sich das Rapsproteinisolat, welches in Fischfütterungsversuchen als Fischmehlsubstitut eingesetzt wurde. Die einzelnen Verfahrensschritte zur Rapsproteinisolatherstellung sind in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

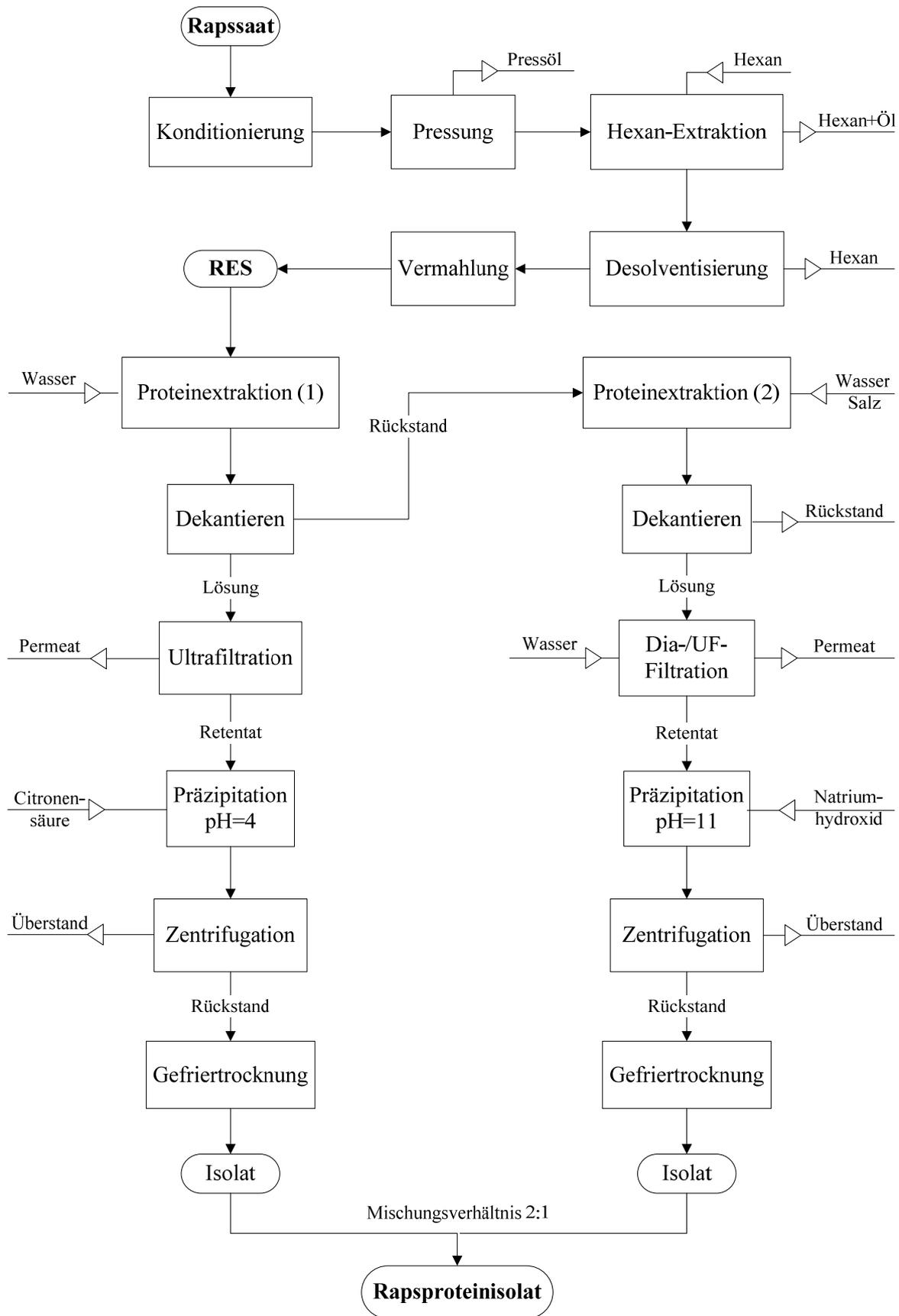


Abbildung 4-34: Verfahrensschritte zur Rapsproteinisolatherstellung

4.3.1.3. Ausbeutekalkulation

Für die Rapsproteinisolatherstellung wurden 400 kg Rapssaat zu Rapsextraktionsschrot verarbeitet. Die Ergebnisse der Proteinausbeute-Kalkulation der durchgeführten Versuche zur Rapsproteinherstellung sind in der Tabelle 4-23 und Tabelle 4-24 zusammengefasst.

Die Berechnung der Proteinausbeute erfolgte nach Gleichung 4-1. Es soll darauf hingewiesen werden, dass die Verluste- und Ausbeutekalkulationen annähernde Werte liefern, weil für die Berechnungen ein konstanter Proteingehalt angenommen wurde. Da es sich um organische Materie handelt, können Abweichungen in dem Proteingehalt bei jedem Versuchsansatz entstehen.

Hohe Proteinverluste sind während der Ultrafiltration zu beobachten. Die Trenngröße der eingesetzten Membran (5 kDa) lässt einen Proteinrückhalt von 100 % erwarten. Die Proteinverluste sind im Wesentlichen infolge der Verstopfungen der Membranporen durch die Rapsproteine und Proteinlösungsverluste in den Anlagenröhren. Es wurde beobachtet, dass nach vergleichsweise wenigen Versuchsansätzen die Membran völlig verstopft war. Die Verwendung einer 5kDa- Membrantrenngröße zur Dialyse von Rapsproteinlösungen mit dem Ziel der Verbesserung des Proteinrückhaltes ist unter dem Gesichtspunkt der schnellen Verblockung der Membran und der daraus resultierten Proteinverluste demnach streng abzulehnen. Für den Präzipitationsprozess des 1. Proteinextrakts kann der Ultrafiltrationsschritt ausgeschlossen werden. Nach dem 18. Versuchsansatz wurde die Proteinlösung durch Ultrafiltration nicht aufkonzentriert, um daraus folgende Proteinverluste zu vermeiden und den Herstellungsprozess zu vereinfachen.

Die Präzipitation bei pH 4 der Globuline aus der Proteinlösung der 1. Extraktion zeichnete sich durch eine Proteinausbeute in Höhe von ca. 15 %. Wie sich auch aus den elektrophoretischen Untersuchungen gezeigt wurde, wurden die Albumine durch den Präzipitationsprozess nicht ausreichend gewonnen, sodass sich diese im Präzipitationsüberstand anreichern. Als Folge daraus ist der hohe Anteil an nicht präzipitierten Proteinen.

Die Albumine zeichnen sich unabhängig vom pH-Wert durch gute Löslichkeit in wässrigem Medium aus und sind schwer durch die pH-Änderung zu gewinnen wie im Abschnitt 4.3.1.2 gezeigt wurde. Das bestätigt die in Literaturstellen beschriebene hohe Stabilität des Napins. Es traten keine Konformationsveränderungen bei pH-Änderung auf. Diese Eigenschaft wird

durch den hohen Anteil an helicaler Struktur (48,6 - 57,9 %) im Vergleich zu 7 - 15,3 % β -Faltblatt-Struktur erklärt (Schmidt, et al., 2004).

Darauffolgend zeichnet sich die Präzipitation der albuminreichen Proteinlösung (aus der 2. Extraktion) durch geringe Proteinausbeute aus. Nur etwa 5 % der Proteine im Schrot wurden durch die Präzipitation bei pH von 11 gewonnen. Insgesamt ergibt sich eine Proteinausbeute aus beiden Präzipitationsprozessen von ca. 20 % bezogen auf den Proteingehalt im Schrot. Folglich ist es zu einem Verlust von bis zu 30 % an aus dem Schrot extrahierten Proteinen durch eine nachgeschaltete Präzipitation der Proteinlösungen gekommen (Vergleichswert-Proteinausbeute der Globulin- und Albuminherstellung).

Aufgrund der hohen Proteinverluste kann sich diese Prozessführung großtechnisch keinesfalls umsetzen. Folglich ist eine Verbesserung der Prozessgestaltung erforderlich. Die Wirtschaftlichkeit des Präzipitationsprozesses bei der 1. Extraktion kann durch eine Nachbehandlung des Präzipitationsüberstands verbessert werden. Daher kann der Überstand per Ultrafiltration aufgereinigt werden. Der Waschungsprozess soll bei Erreichung der Wertekonstanz der Leitfähigkeit unterbrochen werden. Dadurch kann der Proteingehalt der Anfangslösung von 32,9 auf 62,2 Mass.-% i. Tr. erhöht werden. Somit können aus dem 1. Proteinextrakt zwei unterschiedliche Proteinprodukte, ein Globulinisolat mit einem Proteingehalt von 95,2 Mass.-% i. Tr. und ein Albuminkonzentrat mit einem Proteingehalt von 62,2 Mass.-% i. Tr. gewonnen werden.

Wie im Abschnitt 4.3.1.2 und in der Tabelle 4-24 gezeigt wurde, konnten die Albumine durch einen Präzipitationsschritt unzureichend gewonnen. Deshalb wird vorgeschlagen, die Präzipitation auszuschließen und die Aufreinigung der Proteinlösung per Ultrafiltration durchzuführen. Dabei sind jedenfalls höhere Membrantrenngrößen (10 kDa od. 20 kDa) vorzuziehen. Durch eine vollständige Auswaschung der Salze (bis zur Wertekonstanz der Leitfähigkeit) können hohe Proteingehalte von bis zu 90 Mass.-% i. Tr. erzielt werden.

Tabelle 4-23: Ausbeuterechnungen der hergestellten RPI-1E-Chargen

Charge	RES [kg]	Dekantieren				Ultrafiltration ²					T [°C]	Präzipitation		
		m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ¹ [kg]	m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ³ [kg]	Verluste _{Protein} [%]		m _{RPI} ⁴ [kg]	Ausbeute _{Protein} ⁵ [%]	Anteil _{n.p.Protein} ⁶ [%]
1	5	46,67	3,03	1,414	0,807	19,72	4,96	0,978	0,591	26,8	12	0,263	14,5	58,7
2	5	44,62	3,28	1,464	0,836	21,07	4,87	1,026	0,620	25,8	12	0,272	15,0	59,2
3	5	39,90	2,87	1,145	0,654	25,14	3,19	0,802	0,484	25,9	6	0,282	15,6	46,0
4	5	39,15	3,35	1,312	0,749	23,36	3,99	0,932	0,563	24,8	11	0,273	15,1	54,9
5	5	39,81	3,56	1,417	0,809	28,53	3,68	1,050	0,634	21,6	16	0,297	16,4	56,5
6	5	36,43	3,52	1,282	0,732	24,77	4,14	1,025	0,619	15,4	19	0,265	14,7	60,2
7	5	41,82	3,23	1,351	0,771	23,09	4,24	0,979	0,591	23,3	18	0,268	13,9	60,4
8	5	42,49	3,25	1,381	0,789	22,84	4,32	0,987	0,596	24,4	19	0,237	13,1	63,0
9	5	41,50	2,81	1,166	0,666	25,14	3,80	0,955	0,577	13,3	16	0,240	13,3	61,4
10	5	41,98	3,17	1,331	0,760	16,58	5,36	0,889	0,537	29,4	11	0,228	12,6	60,5
11	5	41,41	3,19	1,321	0,754	25,78	4,14	1,067	0,645	14,5	11	0,249	13,8	64,1
12	5	42,63	2,84	1,211	0,691	27,98	3,37	0,943	0,570	17,6	14	0,235	13,0	61,7
13	5	56,87	2,44	1,388	0,792	24,19	4,19	1,014	0,612	22,7	5	0,256	15,8	61,1
14	5	41,50	2,77	1,150	0,656	25,36	3,82	0,969	0,585	10,9	15	0,238	14,6	62,2
15	5	41,98	3,22	1,352	0,772	28,10	3,90	1,096	0,662	14,2	16	0,231	14,2	67,6
16	5	41,39	3,35	1,387	0,792	23,88	4,28	1,022	0,617	22,0	11	0,202	12,5	69,5
17	5	39,87	3,23	1,288	0,735	23,93	4,01	0,960	0,580	21,2	15	0,241	14,8	61,4
18	5	44,46	3,00	1,334	0,762						11	0,249	15,3	69,7
19	5	42,40	3,14	1,331	0,760						11	0,232	14,3	71,6

Fortsetzung der **Tabelle 4-23**

Charge	RES	Dekantieren				Ultrafiltration ²					Präzipitation			
		m _{Lsg}	TS _{Lsg}	m _{TS}	m _{Protein} ¹	m _{Lsg}	TS _{Lsg}	m _{TS}	m _{Protein} ³	Verluste _{Protein}	T	m _{RPI} ⁴	Ausbeute _{Protein} ⁵	Anteil _{n.p..Protein} ⁶
	[kg]	[kg]	[%]	[kg]	[kg]	[kg]	[%]	[kg]	[kg]	[%]	[°C]	[kg]	[%]	[%]
20	5	39,89	3,04	1,213	0,692						9	0,272	16,8	63,5
21	5	39,31	3,29	1,293	0,738						10	0,250	15,4	68,5
22	5	39,80	3,25	1,294	0,739						18	0,225	13,8	71,7
23	5	40,59	3,09	1,254	0,716						9	0,244	15,0	68,4
24	5	41,43	3,10	1,284	0,733						10	0,237	14,6	70,0
25	5	40,70	3,28	1,335	0,762						11	0,249	15,3	69,7
26	5	43,81	3,08	1,349	0,770						12	0,256	15,8	69,1
27	5	40,48	3,16	1,279	0,730						11	0,268	16,5	65,9
28	5	42,50	2,78	1,179	0,673						11	0,250	15,4	65,5
29	5	42,30	2,64	1,117	0,638						13	0,253	15,6	63,1
Mittelwert	5	41,99	3,10	1,297	0,741	24,09	4,13	0,982	0,593	20,8	13	0,250	14,7	63,6

¹berechnet bezogen auf den Proteingehalt von 57,1 Mass.-% i. Tr.; ²Leitfähigkeit vor und nach UF nicht dargestellt- Grund: keine Veränderung ($\bar{\chi}_{Vor}=3,1$ mS/cm und $\bar{\chi}_{Nach}=3,2$ mS/cm); ³berechnet bezogen auf den Proteingehalt von 60,4 Mass.-% i. Tr.; ⁴getrocknetes Produkt ⁵berechnet bezogen auf den Proteingehalt im Rapsextraktionsschrot; ⁶Anteil an nicht präzipitiertem Protein

Für die Ausbeutekalkulation nach Gleichung 4-1 konstant angenommene Werte: TS_p=97,6 Mass.-%; PG_p=95,2 Mass.-% i. Tr.; TS_A = 89,9 Mass.-%; PG_A = 37,4 Mass.-% i. Tr.

Tabelle 4-24: Ausbeuterechnungen der hergestellten RPI-2E-Chargen

Charge	R1 ¹ [kg]	Dekantieren				Ultrafiltration							Präzipitation			
		m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ² [kg]	κ _{Vor} [mS/cm]	κ _{Nach} [mS/cm]	m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ³ [kg]	Verluste _{Protein} [%]	T [°C]	m _{RPI} ⁴ [kg]	Ausbeute _{Protein} ^{5,6} [%]	Anteil _{n.d. Protein} ⁷ [%]
1	2,76	43,72	4,47	1,954	0,499	27,3	2,89	24,12	2,41	0,581	0,450	9,9	2	0,151	7,25	72,9
2	3,31	43,06	4,40	1,895	0,484	34,0	4,22	29,99	1,90	0,570	0,427	11,7	10	0,148	6,60	74,0
3	2,93	43,08	4,40	1,896	0,484	43,2	3,45	22,60	2,53	0,572	0,417	13,8	15	0,130	6,10	75,5
4	3,26	40,1	4,40	1,764	0,451	42,1	3,43	23,89	2,38	0,569	0,440	2,4	19	0,120	5,34	79,6
5	3,36	42,35	4,37	1,851	0,473	43,5	3,17	30,65	1,79	0,549	0,425	10,2	22	0,096	3,98	84,3
6	3,34	42,71	4,81	2,054	0,525	43,5	3,51	28,01	2,08	0,583	0,451	14,1	17	0,098	4,35	83,8
7	3,02	42,96	4,20	1,804	0,461	40,6	2,57	29,79	1,88	0,560	0,434	6,0	18	0,179	7,98	69,1
7 ⁸	3,02							28,75 ⁹	1,39 ⁹	0,400 ⁹	0,310 ⁹		19	0,092	4,41	76,1
8	2,76	45,4	3,90	1,771	0,452	42,6	2,96	23,05	2,17	0,500	0,387	14,4	12	0,117	5,21	77,4
9	3,10	41,4	4,70	1,946	0,497	44,2	3,03	24,80	2,18	0,541	0,418	15,8	23	0,116	4,62	81,5
9 ⁸	3,10							23,94 ⁹	1,90 ⁹	0,455 ⁹	0,353 ⁹		20	0,137	6,57	68,7
10	3,41	43,66	4,63	2,021	0,517	42,0	2,65	13,55	3,23	0,438	0,339	34,4 ¹⁰	11	0,138	6,11	69,7
10 ⁸	3,41							12,89 ⁹	2,31 ⁹	0,298 ⁹	0,231 ⁹		18	0,036	1,63	88,2
11	3,33	42,91	3,84	1,648	0,421	43,2	2,75	22,22	2,06	0,458	0,354	15,9	15	0,107	4,57	78,3
11 ⁸	3,33							21,80 ⁹	1,80 ⁹	0,392 ⁹	0,304 ⁹		16	0,108	5,18	71,4
12	2,76	44,68	4,24	1,894	0,484	43,1	2,88	32,58	1,33	0,433	0,335	30,7 ¹⁰	13	0,159	7,43	62,8
13	3,20	44,22	4,44	1,963	0,502	42,5	2,92	30,14	1,42	0,428	0,331	34,0 ¹⁰	11	0,133	6,05	69,3
13 ⁸	3,20							29,24 ⁹	1,07 ⁹	0,313 ⁹	0,242 ⁹		16	0,041	1,87	87,0
14	3,19	47,91	3,99	1,912	0,489	39,3	3,62	35,28	1,57	0,554	0,429	12,2	11	0,163	6,49	74,6

Fortsetzung der **Tabelle 4-24**

Charge	R1 ¹ [kg]	Dekantieren				Ultrafiltration							Präzipitation			
		m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ² [kg]	κ _{Vor} [mS/cm]	κ _{Nach}	m _{Lsg} [kg]	TS _{Lsg} [%]	m _{TS} [kg]	m _{Protein} ³ [kg]	Verluste _{Protein} [%]	T [°C]	m _{RPPI} ⁴ [kg]	Ausbeute _{Protein} ^{5,6} [%]	Anteil _{n.d. Protein} ⁷ [%]
15	3,34	42,95	4,67	2,01	0,513	40,1	3,43	37,13	1,44	0,535	0,414	19,3	18	0,075	2,99	87,9
16	3,32	44,67	4,45	1,99	0,508	36,1	3,36	28,41	1,57	0,446	0,345	32,0 ¹⁰	13	0,133	5,31	74,2
16 ⁸	3,32							27,50 ⁹	1,19 ⁹	0,327 ⁹	0,245 ⁹		9	0,027	1,09	92,5
17	3,29	40,42	4,60	1,86	0,475	43,4	3,09	22,53	2,15	0,484	0,375	21,1	10	0,146	6,64	70,3
17 ⁸	3,29							21,45 ⁹	1,41 ⁹	0,302 ⁹	0,227 ⁹		16	0,028	1,10	91,9
18	3,26	44,6	4,70	2,10	0,536	41,6	3,03	22,07	2,42	0,534	0,413	22,8	10	0,152	6,90	72,0
19	3,31	43,65	4,42	1,93	0,493	42,3	2,88	34,08	1,76	0,600	0,464	5,8	19	0,140	5,58	79,8
20	3,26	40,73	4,22	1,72	0,439	44,8	3,06	17,43	2,44	0,425	0,329	25,1 ¹⁰	13	0,080	3,62	81,5
20 ⁸	3,26							16,92 ⁹	1,89 ⁹	0,320 ⁹	0,248 ⁹		17	0,079	3,15	78,6
21	1,91	43,04	4,50	1,94	0,495	35,2	3,27	25,75	2,30	0,592	0,458	7,4	12	0,125	5,68	79,2
22	3,47	42,93	4,09	1,76	0,449	44,1	2,67	31,40	1,63	0,512	0,396	11,7	21	0,083	3,25	86,2
23	2,96	40,31	4,74	1,91	0,488	45,6	3,00	23,03	2,15	0,495	0,383	21,5	12	0,169	7,67	66,4
Mittelwert	3,15	43,11	4,40	1,90	0,484	41,1	3,12	26,63	2,03	0,520	0,402	13,2 31,2 ¹⁰	15	0,128 0,069 ⁸	5,61 3,12 ⁸	76,1 81,8 ⁸

¹TS=100 Mass.-%; ²berechnet bezogen auf den Proteingehalt von 25,6 Mass.-% i. Tr.; ³berechnet bezogen auf den Proteingehalt von 77,4 Mass.-% i. Tr.; ⁴getrocknetes Produkt; ⁵berechnet bezogen auf den Proteingehalt im Rapsextraktionsschrot; ⁶berechnet bezogen auf den Proteingehalte in Bezugnahme auf die im Abschnitt 4.3.1.2 beschriebenen Versuchsergebnisse; ⁷Anteil an nicht präzipitiertem Protein; ⁸2. Präzipitation des Präzipitationsüberstandes bei pH 4; ⁹Werte beziehen auf den Präzipitationsüberstand; ¹⁰Waschung wurde unterbrochen

Für die Ausbeutekalkulation nach Gleichung 4-1 konstant angenommene Werte: TS_P=95,6 %; TS_A = 89,9 %; PG_A = 37,4 Mass.-% i. Tr.

4.3.2. Charakterisierung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften

4.3.2.1. Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltsstoffe

Die Tabelle 4-25 stellt die Nährstoffzusammensetzung der erzeugten Rapsproteinfraktionen dar. Als RPI-1E wurde die Proteinfraktion aus der Präzipitation (pH=4) der 1. Extraktion bezeichnet und entsprechend als RPI-2E die Proteinfraktion aus der Präzipitation (pH=11) der 2. Extraktion. Aus den beiden Präzipitationsrückständen ergab sich im Mischungsverhältnis 2:1 das Rapsproteinisolat (RPI), welches als alternative Proteinquelle in den Fischfütterungsversuchen eingesetzt wurde. Die Ergebnisse aus der Nährstoffanalytik verdeutlichen, dass durch den Präzipitationsschritt der 1. Extraktion bei einem pH-Wert von 4 ein Rapsproteinprodukt mit einem Proteinanteil von über 95 Mass.-% i. Tr. erzielt wurde. Obwohl bei den Einzelversuchen der Präzipitation bei pH 11 höhere Proteingehalte beobachtet wurden, wies die Mischprobe einen niedrigeren Proteingehalt auf. Das kann infolge der abweichenden Präzipitationbedingungen wie Temperatur oder Anfangsproteingehalt der Lösung auftreten. Als Resultat der beiden erzeugten Proteinfraktionen wurde ein Rapsproteinprodukt mit relativ hohem Proteingehalt von ca. 87 Mass.-% i. Tr. für Fütterungsexperimente bereitgestellt.

Tabelle 4-25: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinisolat

Nutritive Inhaltstoffe in Mass.-% i. Tr.	RES	RPI-1E	RPI-2E	RPI
Rohprotein	38,1	95,2	69	86,6
Rohfett	1,7	1,2	7,4	3,2
Rohfaser	7,6	0,2	0,3	0,2
Rohasche	7,5	9,1	16,5	9,8
NfE	45,1	-5,6	6,8	0,2
Organische Masse	92,5	91	83,5	90,2

Die Menge der wertmindernden antinutritiven Komponenten wie Glucosinolate, Phytinsäure und Sinapinsäure in den hergestellten Rapsproteinfraktionen wurden analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4-26 dargestellt. Die Fraktionierung der Proteine durch Präzipitation insbesondere der 1. Extraktionslösung führte zu keiner Reduktion der Glucosinolate. Die Glucosinolate wurden in Folge der Wechselwirkungen mit Proteinen mitpräzipitiert. Ebenfalls erfolgte eine Konzentrierung der Phytinsäure während der

Proteinpräzipitation. Das aus den beiden Präzipitationsrückständen resultierende Rapsproteinisolat charakterisiert sich mit niedrigeren Anteilen an Glucosinolaten und Phytinsäure, welche vergleichsweise ähnliche Werte wie die Globulin- und Albuminkonzentrate besitzen. Die Analytik zur Bestimmung der Sinapinsäure und deren Equivalente wurde nur von dem Endprodukt, dem RPI, durchgeführt.

Tabelle 4-26: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinisolat

Antinutritive Inhaltstoffe	RES	RPI-1E	RPI-2E	RPI
Glucosinolate [µmol/g i. Tr.]	23,2	3,59	<0,1	2,27
Phytinsäure [g/100g i. Tr.]	2,02	1,30	4,29	2,31
Σ SAE [g/kg i. Tr.]	15,2			1,1
Davon SA	1,09			0,23
Davon SIN	9,03	n.a.	n.a.	0,17
Davon SG	2,21			<0,01

4.3.2.2. Zusammensetzung der Aminosäuren

Das Aminosäureprofil der nach dem Präzipitationsverfahren hergestellten Rapsproteinisolate ist tabellarisch wie folgt dargestellt. Aus den essentiellen Aminosäuren sind das Cystein, das Lysin und das Threonin die limitierenden Aminosäuren im Globulinisolat (RPI-1E). Dagegen ist die Proteinfraction RPI-2E anhand der Tabelle 4-27 durch hohe Mengen an den schwefelhaltigen Aminosäuren wie Methionin und Cystein und die Aminosäure Lysin gekennzeichnet. Diese Proteinfraction ist eine Napinfraktion, welche reich an Lysin und schwefelhaltigen Aminosäuren ist. Diese Eigenschaft von Napin ist auch von Wanasundara et al. (Wanasundara, 2010; Wanasundara, 2008) dokumentiert. Die limitierende essentielle Aminosäure der Proteinfraction RPI-2E ist das Phenylalanin.

Tabelle 4-27: Aminosäurezusammensetzung des RES und des Rapsproteinisolates

Aminosäure in g/100g RP	RES	RPI-1E	RPI-2E	RPI
MET	2,00	2,08	2,26	2,19
CYS	2,30	1,36	2,29	1,57
M+C	4,30	3,44	4,54	3,75
LYS	6,65	3,90	6,22	4,61
THR	4,63	4,09	4,83	4,37
TRP				
ARG	6,24	7,07	7,07	7,20
ILE	4,07	4,52	4,63	4,84
LEU	7,27	8,65	8,55	8,69
VAL	5,31	5,42	5,71	5,78
HIS	2,73	2,43	2,98	2,56
PHE	4,10	5,27	4,63	5,23
TYR				
GLY	5,22	5,59	6,49	5,89
SER	4,36	4,20	4,76	4,35
PRO	6,25	5,38	5,91	5,25
ALA	4,58	4,73	5,25	4,87
ASP	7,73	10,48	7,35	9,71
GLU	16,04	18,67	15,39	17,67

4.3.2.3. Zusammensetzung der Proteinfractionen

Die elektrophoretischen Untersuchungen der Proteinisolatfraktionen wurden unter reduzierten Bedingungen durchgeführt. Der erste Balken entspricht dem Präzipitationsrückstand aus der 1. Extraktion (Abbildung 4-35). Wie aus dem Elektropherogramm zu erkennen ist, besteht diese Proteinfraction nur aus Subeinheiten des Cruziferins. Wie im Abschnitt 4.3.1.2 aufgeführt wurde, fallen die Globuline aus der Extraktionslösung bei einem pH-Wert von 4 aus und werden als Globulinisolat mit hohem Proteingehalt gewonnen. Die zweite Laufstrecke des Gels bestätigt, dass das Albumin als Hauptproteinfraction in dieser Proteinfraction vorkommt. Außerdem ist hier eine Bande im Bereich mit Molekülmasse von ca. 20 kDa zu beobachten, welche der β -Seitenketten des Cruziferins entsprechen. Eine Erklärung dafür ist die Dissoziation der Globuline von 12 S zu 7 S und 2-3 S bei hohen (wie

pH=11) oder niedrigen pH-Werten (Schwenke, 1983). Die letzten drei Balken entsprechen dem Rapsproteinisolat als Endprodukt für die Fischfütterung. Es sind drei unterschiedliche Stichproben analysiert. Die elektrophoretischen Ergebnisse bestätigen, dass die Globulinfraktion die Hauptproteinfraktion im Rapsproteinisolat darstellt (Abbildung 4-35).

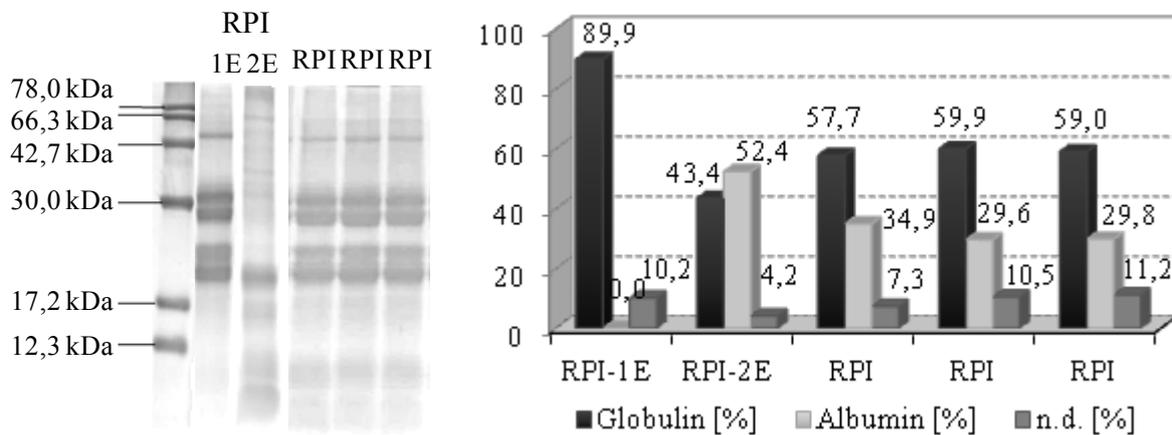


Abbildung 4-35: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Rapsproteinisolate (links) und Proteinzusammensetzung der Rapsproteinisolate (rechts)

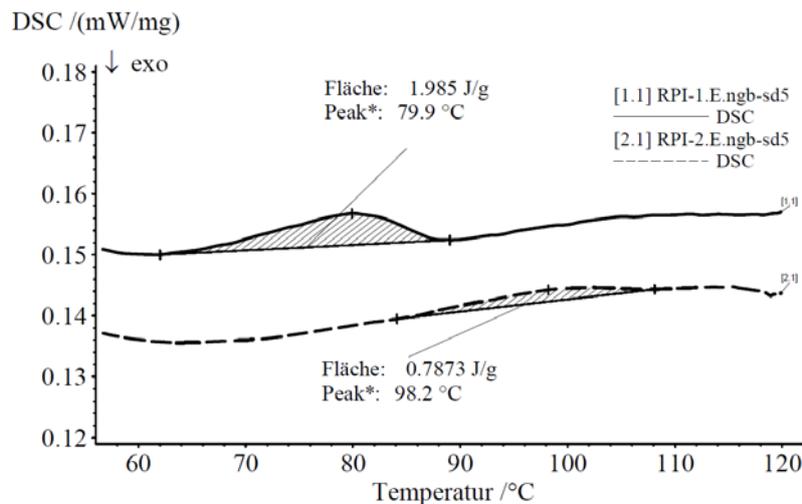
4.3.3. Charakterisierung der Produkteigenschaften

4.3.3.1. Thermodynamische Eigenschaften

Mittels DSC-Messungen konnte ein endothermer Peak der Denaturierung des Proteins (RPI-1E) beobachtet werden. Eine Denaturierungstemperatur von 80,0 °C und eine Denaturierungsenthalpie von 5,38 J/g Protein wurde ermittelt. Für das Rapsproteinisolat aus der 2. Extraktion wurde ein Wärmeübergang bei 98,2 °C ($\Delta H_d = 3,54$ J/g Protein) gemessen. Die benötigten Wärmemengen zur vollständigen Denaturierung der Globulinisolate sind niedriger im Vergleich zu den Globulinkonzentraten. Das ist eine Folge der bereits eingetretenen Proteindenaturierung durch die Veränderung der Proteinstruktur während des Präzipitationsprozesses.

Tabelle 4-28: Denaturierungsenthalpie und -temperatur der Rapsproteinisolate

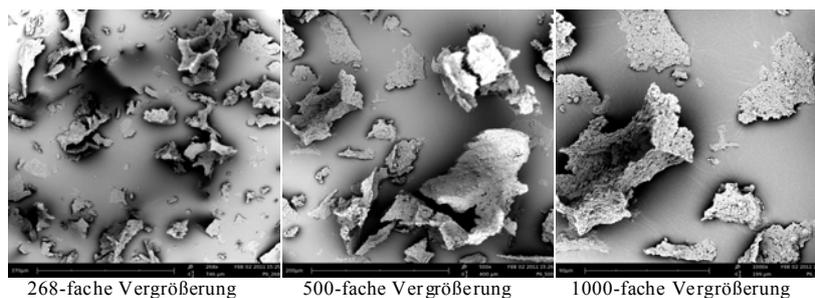
	RPI-1E			RPI-2E		
	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein	T_d in °C	ΔH_d in J/g Probe	ΔH_d in J/g Protein
1. Messung	79,9	1,985	5,451	98,2	0,787	3,528
2. Messung	80,1	1,962	5,305	98,2	0,791	3,543
Mittelwert	80,0	1,974	5,378	98,2	0,789	3,536

**Abbildung 4-36:** DSC-Thermogramm des RPI-1E und des RPI-2E

4.3.3.2. Anwendungstechnische - und Oberflächeneigenschaften

Die Partikelgrößenverteilung der Rapsproteinisolate wurde nicht analysiert, da sie durch die Gefriertrocknung konserviert wurden und dadurch ihre Partikelgröße nicht von dem Trocknungsverfahren sondern von dem nachfolgenden Mahlvorgang abhängt.

Die Oberflächenpartikelstruktur von zerkleinertem Rapsproteinisolat aus der 1. Extraktion wurde untersucht. Die Partikel wiesen eine unregelmäßige Partikelstruktur auf und besaßen eine poröse Partikeloberfläche (Abbildung 4-37).

**Abbildung 4-37:** REM-Aufnahmen des RPI-1E

5. Optimierung der Extraktionsbedingungen hinsichtlich der Proteinausbeute

Für eine industrielle Umsetzung des Verfahrens zur Rapsproteinherstellung soll das Verfahren wirtschaftlich gestaltet werden. Maximale Proteinausbeute ist Voraussetzung dafür, was durch hohe Proteinqualität bzw. hohe PDI-Werte des eingesetzten Rapsschrotes und optimale Prozessparameter während des Extraktionsprozesses gewährleistet werden kann.

Nachfolgend werden Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit während der Extraktion bzw. Proteinausbeute durch Auswahl unterschiedlicher Extraktionsbedingungen dokumentiert. Eine Erhöhung der Proteinlöslichkeit durch geeignetere Extraktionsbedingungen kann eine höhere Proteinausbeute sichern, was die Wirtschaftlichkeit des Rapsproteinherstellungsprozesses verbessert. Die Löslichkeit der Proteine kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Im Rahmen der durchgeführten Extraktionsversuche kamen die Einstellung des pH-Wertes und die Einsetzung ionenhaltiger Lösungsmittel für eine Verbesserung der Extraktionsbedingungen in Betracht. Die ausgewählten Extraktionsbedingungen bzw. -parameter der durchgeführten Extraktionsversuche sind in der Tabelle 5-1 übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 5-1: Übersicht über die Extraktionsbedingungen der Versuche zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit bzw. -ausbeute

Versuch	1. Extraktion	2. Extraktion
V-1	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1 h
V-2	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=5 Zitronensäure	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=9 NaOH
V-3	0,5M NaCl, 1:10, 45 °C, 1 h	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=9 NaOH
V-4	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=5 Zitronensäure	H ₂ O, 1:10, 45 °C, 1 h, pH=9 NaOH

Die Extraktionsversuche wurden mit einem RES-Ansatz von 3 kg durchgeführt. Das RES wurde nach dem im Abschnitt 4.2.1.1 beschriebenen Verfahren hergestellt. Für die Proteinausbeutekalkulation wurden das Ausgangsmaterial und die Extraktionsrückstände nach jeder Extraktionsstufe auf ihren Proteingehalt untersucht. Aus den gewonnenen Ergebnissen

soll die Auswirkung der untersuchten Proteinextraktionsparameter auf die Proteinlöslichkeit bzw. Proteinausbeute charakterisiert werden.

In der Abbildung 5-1 sind die errechneten Proteinausbeuten aus der 1. und 2. Extraktion und entsprechend die Gesamte Proteinausbeute grafisch dargestellt. Die Werte beziehen sich auf den extrahierten Proteinanteil im Rapsschrot.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass höhere Proteinausbeuten bei Versuch V-2 (58 %) und V-3 (52 %) erreicht wurden. Höhere Ausbeuten wurden bei Extraktionen unter Einsatz von Salzlösungen beobachtet. Durch eine zusätzliche Einstellung des pH-Wertes von 5 nimmt die Proteinausbeute geringfügig zu (V-2- 1E). Folglich wiesen die Salzextraktionen eine höchste Proteinextraktionseffizienz auf. Die Proteinausbeute aus der 1. Extraktion hängt stark von den Extraktionsbedingungen ab. Dagegen unterscheiden sich die Extraktionsversuche in ihrer Proteinausbeute aus der 2. Extraktion nicht wesentlich.

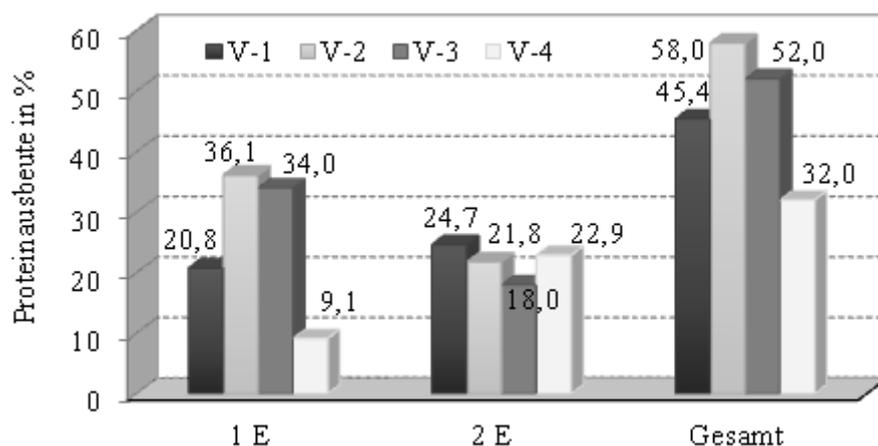


Abbildung 5-1: Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Proteinlöslichkeit bzw. -ausbeute

Es wurde untersucht, welche Einflüsse auf die Proteinausbeute die Schrotqualität hat. Drei unterschiedlich verarbeitete Schrote, ein ethanolisch behandeltes Schrot, hergestellt nach dem Verfahren laut Absatz 4.1.1.1, ein ethanolisch unbehandeltes Schrot, hergestellt nach dem Verfahren laut Absatz 4.2.1.1, und ein industrielles Schrot, hergestellt nach dem Verfahren laut Absatz 2.4.1, wurden verwendet.

Die Abbildung 5-2 dokumentiert die Ergebnisse aus den Proteinextraktionen mit dem ethanolisch behandelten und unbehandelten Schrot. Die Extraktionsbedingungen sind in der

Tabelle 5-1 (V-3) eingetragen. Die Proteinausbeute wurde bezugnehmend auf den Proteingehalt des Extraktionsrückstandes ermittelt.

Wie der Abbildung 5-2 zu entnehmen ist, ist die Proteinextraktion aus dem ethanolisch extrahierten Rapsschrot durch geringere Proteinausbeute gekennzeichnet. Infolge der während der ethanolischen Extraktion stattgefundenen Proteinschädigungen wurde die Löslichkeit der Proteine negativ beeinflusst, so dass der PDI-Wert um 60 % im Vergleich zu dem ethanolisch nicht-behandelten Schrot reduziert wurde (s. Abschnitt 4.1.1.1 Abbildung 4-3). Dementsprechend wirkt sich die Schrotqualität auf die Proteinausbeute stark aus, sodass eine Verringerung der Proteinausbeute um 40 % beim Ansatz vom ethanolisch behandelten Rapsextraktionsschrot ermittelt wurde.

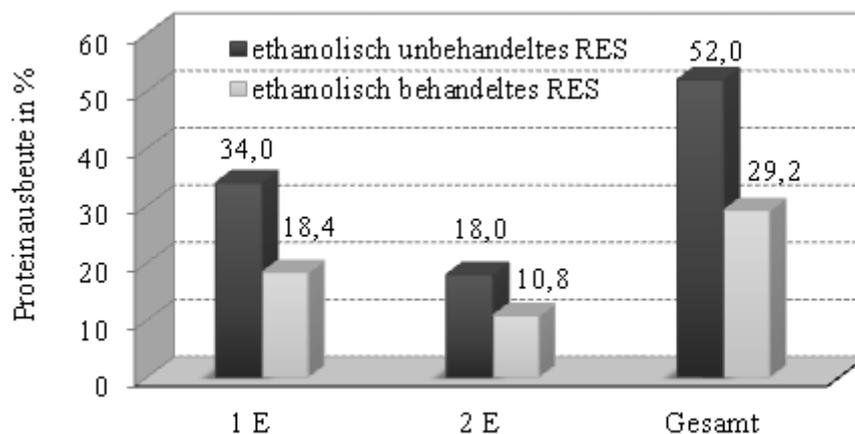


Abbildung 5-2: Einfluss der ethanolische Behandlung des Rapsschrotes auf die Proteinausbeute

Für die Proteingewinnung aus industriell erzeugten Rapsextraktionsschrot wurde das Schrot einer dreistufigen Extraktion unterzogen (Tabelle 5-2). Die Proteinausbeute wurde anhand der Proteingehalte der Extraktionsrückstände des jeweiligen Extraktionsschrittes berechnet. Außerdem wurde die Proteinausbeute in Anbetracht der gewonnenen Proteinmenge errechnet. Die Ergebnisse aus diesem Extraktionsversuch sind in der Tabelle 5-3 eingetragen.

Der Versuch wurde mit einem RES-Ansatz von 5 kg durchgeführt. Die durch den Dekanter abgetrennten Proteinlösungen wurden in dem nachfolgenden Verarbeitungsschritt zusammen behandelt. Zur vollständigen Abtrennung der während der Extraktion eingesetzten Salze wurde die Proteinlösung über eine 20 kDa Membran diafiltriert, bis die Leitfähigkeit der Proteinlösung zur Wertekonstanz reduziert wurde (ca. 2 mS/cm). Einschließend wurde das Retentat getrocknet und auf seinen Proteingehalt untersucht.

Tabelle 5-2: Übersicht über die Extraktionsbedingungen des Extraktionsversuches mit kommerziell verarbeitetem Rapsextraktionsschrot

Extraktion	Extraktionsbedingungen
1. Extraktion	H ₂ O, 1:15, 45 °C, 2 h
2. Extraktion	5 % NaCl, 1:10, 45 °C, 2 h
3. Extraktion	0,1 N NaOH (pH=11), 1:10, 45 °C, 2 h

Nach dieser Extraktionsmethode wurden etwa 28 % der im Rapsschrot erhaltenen Proteine extrahiert. Das Schrot wurde industriell hergestellt, bzw. nach herkömmlichen Rapsverarbeitungsverfahren entölt (s. Unterkapitel 2.4.1). Während der Verarbeitungsschritte wurde das Schrot thermisch sehr beansprucht, was zur Verringerung der Proteinlöslichkeit führte, sodass das Schrot einen niedrigen PDI-Wert von 30,3 % aufwies (s. Unterkapitel 4.1.1.1 Abbildung 4-3). Demzufolge wurden niedrigere Proteinausbeuten erreicht.

Tabelle 5-3: Übersicht über die Proteinausbeuten (Extraktionsversuch mit kommerziell verarbeiteten Rapsextraktionsschrot)

Probebezeichnung	Proteingehalt in % i. Tr.	Extrahierter Proteinanteil in %	Proteinausbeute in %
Industrielles RES	34,36		
Rückstand 1	31,08	3,28	9,54
Rückstand 2	26,53	4,55	13,24
Rückstand 3	24,80	1,74	5,06
			Σ27,83
Probebezeichnung	Proteingehalt in % i. Tr.	Masse in g	Proteinausbeute in %
Zyklonprodukt	60,24	390	
Fegeprodukt	61,44	113	
Gesamt	60,84	503	19,65

Die Ergebnisse aus den Extraktionsversuchen mit unterschiedlich verarbeitetem Rapsschrot zeigen, dass für eine effiziente Proteinextraktion aus dem Schrot die Schrotqualität entscheidend ist.

6. Bewertung des ernährungsphysiologischen Potenzials von hergestellten Rapsproteinprodukten für die Fischernährung

6.1. Vergleich der Nährstoffzusammensetzung von Rapsproteinprodukten und Fischmehl

Insgesamt wurden drei Versuchsserien zur Herstellung von unterschiedlichen Rapsproteinprodukten durchgeführt. Aus diesen Untersuchungen sind vier Rapsproteinprodukte zustande gekommen, welche sich in ihrer Nährstoff-, Aminosäure- und Proteinzusammensetzung infolge der verschiedenen Verarbeitungsverfahren unterscheiden. Die Nährstoffzusammensetzung und auch die Gehalte an antinutritiven Faktoren der hergestellten Proteinprodukte und des Fischmehls sind in der folgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 6-1: Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltstoffe von den hergestellten Rapsproteinprodukten und dem Fischmehl

Inhaltstoff	RPK	GK	AK	RPI	Fischmehl
Rohprotein [Mass.-% i. Tr.]	71,2	56,3	70,1	86,6	69,0
Rohfett [Mass.-% i. Tr.]	0,6	0,37	0,38	3,2	7,0
Rohfaser [Mass.-% i. Tr.]	0,5	< 0,5	< 0,5	0,2	0,5
Rohasche [Mass.-% i. Tr.]	16,1	8,6	20,8	9,8	20,7
NfE [Mass.-% i. Tr.]	11,6	34,2	8,2	0,2	2,8
Bruttoenergie¹ [MJ/kg i. Tr.]	19,4	19,6	18,4	22,0	19,9
Glucosinolate [μmol/g i. Tr.]	1,32	2,31	< 0,1	2,27	-
Phytinsäure [g/100g i. Tr.]	1,77	1,53	2,04	2,31	-
Σ SAE [g/kg i.Tr.]	0,13	3,72	0,39	1,1	
Davon SA	0,04	< 0,01	0,12	0,23	
Davon SIN	<0,01	2,46	0,02	0,17	-
Davon SG	<0,01	0,04	< 0,01	<0,01	

¹Berechnung: Rohprotein = 23,9 MJ/kg; Rohfett = 39,8 MJ/kg; Rohfaser, NfE: 17,6 MJ/kg

Die durch unterschiedliche Bearbeitungsverfahren erzeugten Rapsproteinprodukte zeichnen sich durch höhere Proteinkonzentrationen im Vergleich zu Fischmehl aus. Eine Ausnahme macht das Globulinkonzentrat durch seinen um ca. 20 % niedrigeren Proteingehalt gegenüber dem Fischmehl. Außerdem weist dieses Proteinprodukt einen ziemlich hohen Gehalt an Kohlenhydraten (NfE) auf. Ebenfalls ist der hohe Gehalt an Rohasche bei

Albuminkonzentraten auffällig, was mit dem unvollständigen Auswaschen der Salze verbunden ist. Allerdings ist der Rohaschegehalt des Albuminkonzentrates vergleichbar mit dem von Fischmehl.

6.2. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Rapsproteinprodukten und Fischmehl

In der Tabelle 6-2 sind die Gehalte an essentiellen Aminosäuren in den erzeugten Rapsproteinprodukten und dem Fischmehl zusammengefasst. Bemerkenswert ist, dass alle Rapsproteinprodukte, besonders diejenigen, die viel Napin enthalten, viel reicher an der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein im Vergleich zu Fischmehl sind. Die albuminreicheren Rapsprodukte weisen auch höhere Lysingehalte auf. Bei dem Globulinkonzentrat und dem Rapsproteinisolat ist das Lysin eine limitierende Aminosäure. Diese Produkte weisen einen niedrigeren Lysingehalt im Vergleich zu Fischmehl auf.

Abschließend lässt sich sagen, dass hochwertige Rapsproteinprodukte mit hohem Proteingehalt hergestellt wurden, deren Aminosäureprofil den Anforderungen an die Fischernährung entspricht.

Tabelle 6-2: Aminosäurezusammensetzung der hergestellten Rapsproteinprodukte und des Fischmehls

Aminosäure in g/100g RP	RPK	GK	AK	RPI	Fischmehl
MET	2,16	2,26	2,08	2,19	2,37
CYS	3,78	2,34	3,47	1,57	0,80
M+C	5,94	4,59	5,55	3,75	3,17
LYS	7,28	5,44	7,26	4,61	6,55
THR	4,16	4,76	4,60	4,37	3,90
TRP					0,84
ARG	6,68	6,51	6,73	7,20	5,84
ILE	3,82	3,77	3,95	4,84	3,63
LEU	7,45	7,34	7,72	8,69	6,46
VAL	5,11	4,76	5,04	5,78	4,45
HIS	3,57	2,78	3,38	2,56	2,00
PHE	3,68	4,36	3,88	5,23	3,52

6.3. Fischmehlaustausch durch Rapsproteinprodukte

Die hergestellten Rapsproteinprodukte wurden als Alternative zu Fischmehl in Futtermitteln für juvenile Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss* W.), juvenile Steinbutt (*Psetta maxima* L.), juvenile Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und juvenile Welse (*Silurus glanis* L.) getestet. Die Fütterungsversuche wurden am Institut für Fischereiökologie (Außenstelle Ahrensburg) des Johann Heinrich von Thünen Institutes, Bundesinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, und an der Gesellschaft für Marine Aquakultur mbH Büsum von Herrn Slawski im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt. Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse der Untersuchungen zur Fischmehlsubstitution durch die hergestellten Rapsproteinprodukte kurz dargelegt. Eine zusammenfassende Ergebnisdarstellung der Fischfütterungsversuche zeigt die Tabelle 6-3 (Slawski, 2011; Nagel, et al., 2012; Nagel, et al., 2012).

Es wurde festgestellt, dass die Wachstumsleistungen, die Futteraufnahme und die Futtermittelverwertung der Regenbogenforellen bei einem Fischmehlersatz durch das Rapsproteinkonzentrat nicht signifikant beeinflusst waren. Ebenfalls wurden keine Unterschiede in dem lichtmikroskopisch untersuchten Verdauungstrakt zwischen den Gruppen beobachtet. Die Blutparameter wie Hämatokrit und Hämoglobin sowie Glucose, Triglyceride und Gesamtprotein waren gruppenübergreifend genauso identisch. Folglich konnten bis zu 100 % des Fischmehls in Futtermitteln für juvenile Regenbogenforellen durch das Rapsproteinkonzentrat ersetzt werden (Slawski, 2011).

Desweiteren wurde das Rapsproteinkonzentrat als Fischmehlalternative in Futtermitteln für juvenilen Steinbutt eingesetzt. Bei dieser Fischart konnten 33 % des Fischmehls durch das Rapsproteinkonzentrat ohne negative Auswirkungen auf die Wachstumsleistung und den Gesundheitsstatus der Fische ausgetauscht werden. Bei einer höheren Austauschrate (66 %) wurden signifikant niedrigere Gewichtszunahmen und Futteraufnahme beobachtet. Die Unterschiede in der Futteraufnahme beruhen vermutlich auf der Sensibilität dieser Fischart für den Futtermittelgeschmack, der durch den hohen Anteil an Rapsproteinkonzentrat im Futtermittel infolge des negativen Einflusses der Glucosinolate und deren Abbauprodukte verändert ist (Slawski, 2011).

Weiterhin wurde die Eignung des Rapsproteinkonzentrates für die Ernährung von juvenilen Karpfen untersucht. Eine Fischmehlsubstitution von 33 % wurde erreicht. Bei höherem

Einsatz des Rapsproteinkonzentrates waren Futteraufnahme und Futtermittelverwertung signifikant verringert. Infolge dessen zeigten diese Versuchsgruppen geringere Gewichtszunahmen. Vermutlich ist ein Grund dafür die mögliche negative Beeinflussung des Futtermittelgeschmacks (Slawski, 2011).

Das Rapsproteinkonzentrat wurde als Fischmehlsubstitut in der Ernährung von juvenilen Welsen eingesetzt. Bei einem Fischmehlersatz von 25 % waren Wachstumsleistungen, Futteraufnahme und Futtermittelverwertung nicht signifikant verschieden zu der Kontrollgruppe. Eine Erhöhung des Anteils an Rapsproteinkonzentrat im Fischfutter führte zu geringerer Futteraufnahme, verringerter Futtermittelverwertung und abnehmenden Wachstumsleistungen aufgrund der verschlechterten Futtermittelqualität und des -geschmacks (Slawski, 2011).

Die Globulin- und Albuminkonzentrate wurden als Fischmehlersatz in Futtermitteln für juvenile Regenbogenforellen getestet. Die Nährstoffverdaulichkeit der fraktionierten Rapsproteinkonzentrate wurde untersucht. Es zeigte sich, dass die Verdaulichkeit des Proteins aus Fischmehl ($89,2 \pm 1,1$ %) und Globulinkonzentrat ($88,8 \pm 0,6$ %) signifikant höher als bei dem Albuminkonzentrat ($77,7 \pm 1,4$ %) war. Entsprechend war die Verdaulichkeit des Trockenfutters mit den Albuminkonzentraten niedrig und mit den Globulinkonzentraten gleich hoch im Vergleich zu der von Fischmehl. Trotz des höheren Proteingehaltes, des besseren Aminosäureprofils und auch der niedrigeren Gehalte an antinutritiven Inhaltsstoffen (Ausnahme macht Phytinsäure) wies das Albuminkonzentrat niedrigere Proteinverdaulichkeit auf. Dies geht vermutlich auf den höheren Gehalt an Phytinsäure, die die antinutritive Eigenschaft zur Hemmung der Protein- und Phosphorverfügbarkeit und -verdaulichkeit besitzt, dieser Proteinfraction zurück. Außerdem wurde für die Rapsalbumine in der Literatur auch eine allergene Wirkung beschrieben. Allerdings ist es nicht bekannt, ob das allergene Potenzial des Napins einen Einfluss auf die Fischgesundheit nehmen kann (Slawski, 2011; Nagel, et al., 2012).

Die Fütterungsversuche mit Globulin- und Albuminkonzentraten zeigten, dass mit 50 % Fischmehlaustausch durch Albuminkonzentrat die Wachstumsleistungen, die Futteraufnahme und die Überlebensrate mit den Ergebnissen aus der Kontrollgruppe übereinstimmen. Es wurde kein gelungener Fischmehlaustausch durch Globulinkonzentrate beobachtet. Der hohe Gehalt an Kohlenhydraten (NfE) und Geschmacksbeeinträchtigungen können als Ursachen dafür betrachtet werden (Slawski, 2011; Nagel, et al., 2012).

Nachfolgend wurde das Potenzial des hergestellten Rapsproteinisolates als Fischmehlalternative untersucht. Als Versuchsfische wurden juvenile Steinbutte ausgewählt. Die Proteinverdaulichkeit des Fischmehls ($76,2 \pm 1,5$ %) und des Rapsproteinisolates ($76,8 \pm 1,9$ %) wiesen ähnliche Werte auf. Die Wachstumsleistungen, Futterraufnahme und Futtermittelverwertung zeigten keine negative Beeinträchtigung bei 33 %-igem Fischmehlaustausch. Ein höherer Fischmehlersatz durch das Rapsproteinisolat (66 % und 100 %) verursacht eine Reduzierung der Futterraufnahme und der Futtermittelverwertung, was zu geringerer Wachstumsleistung führt. Die Blutparameter wie Hämatokrit, Glucose, Triglyceride und Cortisol unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Dagegen wurde eine signifikante Verringerung des Blutparameters Gesamtprotein bei Austauschraten von 66 % und 100 % festgestellt. Histopathologie von Lebergewebe zeigte eine leichte Hypertrophie von Hepatozyten in der Kontrollgruppe und eine schwere Hypotrophie in Fisch mit gefüttertem Fischfutter, dessen Fischmehl zu 33 % mit Rapsproteinisolat ausgetauscht wurde. Entsprechend den verringerten Konditionsfaktor und hepatosomatischen Index wurde eine leichte Hypotrophie der Hepatozyten bei der Testgruppe mit 100 % Fischmehlaustausch beobachtet. Es wurden keine Abnormitäten des Mitteldarms bei allen Behandlungsgruppen gefunden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das Rapsproteinisolat 33 % des Fischmehls in Futtermitteln von Steinbutt effektiv ersetzen kann (Nagel, et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hergestellten Rapsproteinprodukte großes Potenzial für die Fischernährung haben. Besonders für die Ernährung von Regenbogenforellen eignet sich das Rapsproteinkonzentrat am Besten und kann als hervorragende Fischmehlalternative betrachtet werden.

Tabelle 6-3: Übersicht über die Fischfütterungsergebnisse (Slawski, 2011; Nagel, et al., 2012; Nagel, et al., 2012)

Fischart		RPK				GK				AK			RPI			
		Regenbogenforelle ¹ ; Steinbutt ² ; Karpfen ³ ; Wels ⁴				Regenbogenforelle							Steinbutt			
Fischmehl- austauschrate [%]	1	0	-	66	100	0	50	75	100	50	75	100	0	33	66	100
	2	0	33	66	-											
	3	0	33	66	100											
	4	0	25	50	75											
ANF der Futtermittel⁵ Glucosinolate⁶ [µmol/g]	1	-	0,26 ⁶	0,39 ⁶	0,23 ⁶	0,47 ⁶	0,58 ⁶	<0,1	<0,1	<0,1	0,19	0,37	0,57			
			0,35 ⁷	0,52 ⁷												
Phytinsäure⁷ [g/100g]	2	0,20 ⁶	0,40 ⁶	-	0,31 ⁷	0,46 ⁷	0,61 ⁷	0,37 ⁷	0,56 ⁷	0,75 ⁷	0,18	0,48	0,78	1,08		
			0,25 ⁷	0,52 ⁷												
Aufbau der Fütterungs- versuche	1	3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 12 Fische; 84 Tage Versuchsdauer				3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 10 Fische; 70 Tage Versuchsdauer						3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 15 Fische; 56 Tage Versuchsdauer				
	2	3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 14 Fische; 84 Tage Versuchsdauer														
	3	3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 10 Fische; 56 Tage Versuchsdauer														
	4	3 Wiederholungen je Versuchsgruppe; je 16 Fische; 63 Tage Versuchsdauer														

Fortsetzung der **Tabelle 6-3**

Fischart	RPK				GK				AK			RPI					
	Regenbogenforelle ¹ ; Steinbutt ² ; Karpfen ³ ; Wels ⁴				Regenbogenforelle				Steinbutt								
Anfangsgewicht [g/Fisch]	1	37,6	-	37,4	38,5												
	2	73,1	74,1	73,3	-	31,4	31,8	31,4	31,4	31,3	31,0	31,9	32,0	32,1	31,8	32,2	
	3	26,4	26,7	26,5	27,2												
	4	87,8	85,5	86,1	86,7												
Endgewicht [g/Fisch]	1	102,8	-	94,0	97,0												
	2	147,5 ^a	145,0 ^a	122,2 ^b	-	91,3 ^a	77,7 ^b	66,3 ^c	60,8 ^c	90,6 ^a	79,7 ^b	79,9 ^b	98,4 ^a	82,4 ^a	53,1 ^b	45,8 ^b	
	3	73,5 ^a	71,2 ^a	60,6 ^b	49,7 ^c												
	4	279,8 ^a	264,0 ^a	218,4 ^b	159,4 ^c												
Gewichtszunahme ⁸ [%]	1	173,4	-	151,3	151,9												
	2	101,8 ^a	95,7 ^a	66,7 ^b	-	190,8 ^a	144,3 ^b	111,1 ^c	93,6 ^c	188,5 ^a	157,1 ^b	150,5 ^b	207,5 ^a	156,7 ^a	67,0 ^b	42,2 ^c	
	3	178,4 ^a	167,0 ^a	128,7 ^b	83,3 ^c												
	4	218,7 ^a	208,8 ^a	153,6 ^b	83,9 ^c												
SWR ⁹ [%/Tag]	1	1,19	-	1,10	1,10												
	2	0,83 ^a	0,80 ^a	0,61 ^b	-	1,57 ^a	1,31 ^b	1,09 ^c	0,97 ^c	1,57 ^a	1,39 ^b	1,35 ^b	2,00 ^a	1,68 ^a	0,91 ^b	0,63 ^b	
	3	1,83 ^a	1,75 ^a	1,47 ^b	1,08 ^c												
	4	1,84 ^a	1,79 ^a	1,48 ^b	0,97 ^c												
Futteraufnahme [g/Fisch]	1	78,5	-	75,8	74,7												
	2	73,9 ^a	82,6 ^a	58,2 ^b	-	67,6 ^a	57,1 ^{bc}	49,5 ^c	44,0 ^c	60,3 ^{ab}	52,7 ^{bc}	54,3 ^{bc}	1,48 ^{a,15}	1,32 ^{a,15}	1,0 ^{b,15}	0,73 ^{c,15}	
	3	51,5 ^a	49,4 ^a	42,2 ^b	34,8 ^c												
	4	102,9 ^a	97,1 ^a	85,7 ^b	60,9 ^c												

Fortsetzung der **Tabelle 6-3**

Fischart	RPK					GK				AK			RPI			
	Regenbogenforelle ¹ ; Steinbutt ² ; Karpfen ³ ; Wels ⁴					Regenbogenforelle				Steinbutt						
FQ ¹⁰ [g/g]	1	1,09 ^a	-	1,22 ^b	1,18 ^{ab}	1,14 ^{ab}	1,26 ^b	1,41 ^c	1,39 ^c	1,02 ^a	1,09 ^a	1,04 ^a	0,74 ^a	0,78 ^a	1,10 ^b	1,18 ^b
	2	1,00 ^a	1,16 ^b	1,20 ^b	-											
	3	1,09 ^a	1,11 ^a	1,24 ^b	1,56 ^c											
	4	0,53 ^a	0,56 ^a	0,68 ^b	0,86 ^c											
PER ¹¹	1	1,90 ^a	-	1,70 ^b	1,80 ^{ab}	1,80 ^{ab}	1,61 ^b	1,38 ^c	1,44 ^c	1,92 ^a	1,72 ^b	1,65 ^b	2,31 ^a	2,17 ^a	1,55 ^b	1,45 ^b
	2	1,75 ^a	1,49 ^b	1,42 ^b	-											
	3	36,96 ^a	36,09 ^a	32,72 ^b	26,18 ^c											
	4	1,13 ^a	1,11 ^a	0,92 ^b	0,72 ^c											
K ¹²	1	k.A.	-	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1,87 ^{ab}	1,94 ^a	1,84 ^{ab}	1,72 ^b
	2	1,80 ^a	1,76 ^a	1,56 ^b	-											
	3	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.											
	4	0,57	0,62	0,61	0,61											
Bruttoenergie- aufnahme ¹³ [MJ]	1	1,74	-	1,71	1,67	1,54 ^a	1,32 ^b	1,16 ^c	1,04 ^c	1,39 ^a	1,22 ^b	1,28 ^b	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
	2	1,57 ^a	1,78 ^a	1,27 ^b	-											
	3	1,09 ^a	1,06 ^{ab}	0,91 ^b	0,75 ^{bc}											
	4	2,33 ^a	2,24 ^a	1,98 ^b	1,41 ^c											

Fortsetzung der **Tabelle 6-3**

Fischart	RPK				GK				AK			RPI					
	Regenbogenforelle ¹ ; Steinbutt ² ; Karpfen ³ ; Wels ⁴				Regenbogenforelle							Steinbutt					
Überlebensrate¹⁴ [%]	1	100	-	97,2	91,7												
	2	94,4	100	100	-	96,6 ^a	46,6 ^b	50,0 ^b	46,6 ^b	96,6 ^a	76,7 ^b	50,0 ^b	100	100	100	100	
	3	96,7	96,7	93,3	96,7												
	4	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.												
Erreichter Fischmehl- austausch	1	100 %															
	2	33 %															
	3	33 %				0 %				50 %				33 %			
	4	25 %															

⁵kalkuliert anhand der Konzentrationen in den Rohstoffen⁸Gewichtszunahme (%) = (Endgewicht - Anfangsgewicht) x 100/Anfangsgewicht⁹Spezifische Wachstumsrate (SWR, %/Tag) = (ln Endgewicht - ln Anfangsgewicht) x 100/Fütterungstage¹⁰Futterquotient (FQ, g/g) = g Trockenfutteraufnahme/g Gewichtszunahme¹¹Proteinwirkungsverhältnis (PER) = g Gewichtszunahme/g Proteinaufnahme¹²Fulton'scher Konditionsfaktor (K) = g Körpergewicht/cm Gesamtlänge³ x 100¹³Bruttoenergieaufnahme (MJ) = Bruttoenergiegehalt im Versuchsfutter x g Futteraufnahme¹⁴Überlebensrate (%) = (Anzahl Fische Versuchsbeginn - Anzahl Totfische)/Anzahl Fische Versuchsbeginn x 100¹⁵tägliche Futteraufnahme (% Körpergewicht/Tag)^{a,b,c}Werte in denselben Zeilen mit unterschiedlichen Indices sind signifikant verschieden (Tukey Test; P < 0,05)

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Rapsverarbeitung nimmt heutzutage aufgrund der global steigenden Nachfrage nach Ölsaaten für die menschliche Ernährung und die industrielle Verwertung weltweit zu. Bei der Ölgewinnung aus Rapssamen fallen enorme Mengen an proteinreichen Beiprodukten an. Die hohe biologische Wertigkeit aufgrund der ausgewogenen und hochwertigen Aminosäurezusammensetzung, der hohe Proteingehalt, die Verfügbarkeit und die hohe Preiswürdigkeit der Rapsschrote machen die Rapsproteine als Fischmehlalternativa für die nachdrücklich proteinbedürftige Aquakulturindustrie sehr attraktiv. Durch Ersatz des Fischmehls im Fischfutter durch Rapsproteine kann das Futterproblem des Aquakultursektors gelöst werden und dazu beitragen, die weitere Überfischung der Fischbestände zu vermeiden.

Neben Protein enthält das Rapsextraktionsschrot hohe Mengen an Kohlenhydraten, Faserstoffen und antinutritiven Komponenten, welche die nutritive Qualität des Rapsproteins senken können und somit seinen Einsatz als Rohstoff für Fischfutterproduktion einschränken. Deshalb zielte die vorliegende Arbeit auf die Gewinnung von für die Fischernährung geeigneten Rapsproteinprodukten, welche nachfolgend als Fischmehlalternative evaluiert wurden.

Eine Grundvoraussetzung für die Proteingewinnung aus Raps ist ein schonend behandeltes Ausgangsmaterial, welches sich durch hohe Proteinlöslichkeit auszeichnet. Da die industrielle Rapsverarbeitung auf die Ölgewinnung orientiert ist, sind Verarbeitungstechnologien zum Erreichen von maximaler Ölausbeute in den Ölmühlen etabliert worden, welche aber die Schrotqualität vermindern. Besonders während des Desolventisierungsprozesses wird das Schrot thermisch stark beansprucht, was zur Denaturierung der Proteine und daher zur deutlichen Verringerung der Proteinlöslichkeit führt und die Proteinextraktion aus dem Schrot erschwert. Ebenfalls tritt eine Reduktion der Aminosäurenverfügbarkeit und der Proteinverdaulichkeit auf (Schöne, et al., 2007). Eine Extraktion der Proteine aus dem in den Ölmühlen erzeugten Rapsextraktionsschrot ist zwar möglich, aber nur mit geringer Ausbeute bei reduzierten ernährungsphysiologischen Eigenschaften. Um hochwertige Rapsproteine für den Einsatz in der Fischzucht zu erzeugen, sollten daher Verfahren zur Ölgewinnung eingesetzt werden, welche die Schrotqualität und die nutritiven Eigenschaften der Rapsproteine nicht negativ beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden geeignete Verfahren für die Proteingewinnung aus Raps unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung von qualitäts- und ausbeuteorientierten Proteinextraktionsverfahren und neuen proteinschonenden Saatverarbeitungstechnologien untersucht, welche die Besonderheiten der Rapsproteine berücksichtigen. Im kleintechnischen Maßstab wurden Verfahrensentwicklungen für die Herstellung von Rapsproteinkonzentrat, Globulin- und Albuminkonzentrat und Rapsproteinisolat erarbeitet.

Das erste Untersuchungsziel der Arbeit war die Herstellung von Rapsproteinkonzentrat, welches sich aus den beiden Rapssamen-Speicherproteinen, 2-S-Albumine (Napin) und 12-S-Globuline (Cruziferin) zusammensetzen. Das Verfahren zur Rapsproteinkonzentratherstellung beinhaltete einen technologischen Prozess zur wässrigen Proteinextraktion aus dem schonend verarbeiteten Rapsextraktionsschrot. Zur Absicherung der Produktqualität durch Vermeidung der Glucosinolathydrolyse während der Proteinextraktion wurde die Rapssaat zur Myrosinaseinaktivierung wärmeconditioniert. Folglich wurde die Rapssaat zu Rapsextraktionsschrot durch Kaltpressverfahren und Lösungsmittlextraktion verarbeitet. Zur Hexanentfernung wurde ein proteinschonendes Desolventisierungsverfahren eingesetzt, mit dem ein Rapsextraktionsschrot erzeugbar ist, das thermisch nicht geschädigt ist und über eine hohe Proteinlöslichkeit (gemessen als PDI) verfügt. Da die nutritive Qualität der Rapsproteine für die Fischernährung von den antinutritiven Inhaltsstoffen wie den Glucosinolaten stark abhängt, wurde das schonend hergestellte Rapsextraktionsschrot einer ethanolischen Behandlung unterzogen. Allerdings wurde ermittelt, dass die Proteinlöslichkeit durch die ethanolische Extraktion wesentlich verringert wird. Die Proteinextraktion aus dem Schrot erfolgte durch wässrige Extraktionsverfahren. Durch eine zweistufige wässrige Extraktion und nachfolgende Proteinaufreinigung durch Membranfiltrationstechnik konnten hochwertige Rapsproteinkonzentrate mit einem Proteingehalt von über 70 Mass.-% i. Tr., einer ausgewogenen Aminosäurezusammensetzung und reduzierten antinutritiven Substanzen erzeugt werden. Allerdings wurden niedrige Proteinausbeuten (ca. 29 % bezogen auf den Proteingehalt des Schrotes) erreicht.

Als nächstes wurde die Fraktionierung der beiden Speicherproteine im Raps untersucht. Um höhere Ausbeuten zu erreichen, wurde die ethanolische Extraktion des Schrotes ausgeschlossen. Die Globulin- und Albumingewinnung erfolgte durch Auswahl unterschiedlicher Extraktionsbedingungen und anschließender separativer Behandlung von wässrigen Proteinextrakten. Auf diesem Wege wurden zwei Proteinkonzentrate hergestellt, welche reich an Globulinen (nachfolgend als Globulinkonzentrat bezeichnet) und

entsprechend an Albuminen (bezeichnet als Albuminkonzentrat) sind. Die Albuminkonzentrate zeichneten sich durch einen höheren Proteingehalt gegenüber den Globulinkonzentraten aus. Außer der Phytinsäure sind die Gehalte an antinutritiven Faktoren in Albuminkonzentrat niedriger im Vergleich zu Globulinkonzentrat. Bei dem Gewinnungsprozess von Globulin- und Albuminkonzentraten konnten deutlich höhere Proteinausbeuten (ca. 47 % bezogen auf den Proteingehalt des Schrotes) erreicht werden.

Als dritter Ansatz wurden Rapsproteinisolate hergestellt. Zur Isolatgewinnung wurden die Proteinextrakte einem nachfolgenden Präzipitationsschritt unterzogen. Daraus wurden zwei Proteinpräparate, ein Globulinisolat mit von über 95 % Proteinkonzentration und ein albuminreiches Proteinprodukt, dessen Proteingehalt einem Isolat nicht entspricht, gewonnen. Das Rapsproteinisolat wurde aus den beiden Fraktionen hergestellt. Allerdings soll bemerkt werden, dass die Albumine durch den Präzipitationsprozess nicht ausreichend gewonnen wurden. Demzufolge ist das Verfahren durch niedrige Proteinausbeuten charakterisiert (20 % bezogen auf den Proteingehalt des Schrotes).

Alle hergestellten Rapsproteinprodukte wiesen eine hervorragende Aminosäurezusammensetzung auf und verfügen über ein für die Fische sehr günstiges Aminosäurenmuster.

Die erzeugten Rapsproteinprodukte wurden als Fischmehlalternative in Futtermitteln für juvenile Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss* W.), juvenilen Steinbutt (*Psetta maxima* L.), juvenile Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und juvenile Welse (*Silurus glanis* L.) evaluiert. Die höchste Austauschrate wurde bei dem Rapsproteinkonzentrat erreicht. In dem Futtermittel für die Regenbogenforellen konnte das Rapsproteinkonzentrat bis zu 100 % des Fischmehls ersetzen. Die fraktionierten Proteinkonzentrate zeigten niedrigere Fischmehlaustauschraten bei juvenilen Regenbogenforellen. Keine Fischmehlsubstitution mit den Globulinkonzentraten war möglich bei den untersuchten Fischmehlaustauschraten (0 %, 50 %, 75 % und 100 %). Angeblich liegt die erreichbare Austauschrate zwischen 0 % und 50 %. Durch das Albuminkonzentrat konnten 50 % des Fischmehls in den Futtermitteln für die Regenbogenforellen substituiert werden. Ein Fischmehlaustausch durch Rapsproteinkonzentrat von 25 % wurde bei juvenilen Welsen erreicht. Steinbutt und Karpfen konnten eine Futtermittelformulierung mit 33 % Rapsproteinkonzentrat ertragen. Das Rapsproteinisolat konnte 33 % des Fischmehls in den Futtermitteln für Steinbutt austauschen. Die niedrigeren Austauschraten sind mit der Sensitivität dieser Fischarten auf den

Futtergeschmack zu erklären, welcher vermutlich durch Sinapine und/oder die Glucosinolate und deren Spaltprodukte beeinflusst wurde. Es ist nicht ausgeschlossen, dass während der Proteinverarbeitungstechnologie Abbauprodukte der Glucosinolathydrolyse infolge der nicht ausreichenden Myrosinaseinaktivierung entstanden sind. Es ist darauf hinzuweisen, dass eine Verbesserung des Myrosinaseinaktivierungsverfahrens unbedingt erforderlich ist. Zum Ziel kann eine hydrothermische Behandlung in Betracht gezogen werden.

Aus den Ergebnissen der Fütterungsversuche lässt sich schließen, dass die hergestellten Rapsproteinprodukte als Eiweißträger im Fischfutter erfolgreich eingesetzt werden können. Dabei ist das Rapsproteinkonzentrat in der Lage das Fischmehlprotein in der Ernährung von Regenbogenforellen ohne weiteres vollständig zu ersetzen. Um die Effizienz des Rapsproteinkonzentrates für die anderen untersuchten Fischarten bzw. des Globulin- und Albuminkonzentrates und des Rapsproteinisolates als Fischmehlalternative zu steigern, können Geschmacksverbesserer, Verdauungsförderer, eine Vorbehandlung mit Phytase zum Einsatz kommen.

Angesichts der guten Aussichten auf den Einsatz der hergestellten Rapsproteinprodukte, besonders des Rapsproteinkonzentrates, im Aquafeed erhebt sich die Frage der industriellen Umsetzbarkeit bzw. Wirtschaftlichkeit des Rapsproteinherstellungsverfahrens. Folglich soll künftig eine eingehende ökonomische Betrachtung des Prozesses vorgenommen werden. Um den Herstellungsverfahren wirtschaftlich zu gestalten, soll an erster Stelle die Qualität des Ausgangsmaterials, d.h. des Rapsextraktionsschrotes verbessert werden, da von der Schrotqualität sowohl die extrahierte Proteinmenge als auch die Proteinqualität abhängen. Es zeigte sich, dass das Proteinextraktionsverfahren auf der Basis von kommerziell verfügbarem Rapsextraktionsschrot wirtschaftlich nicht umgesetzt werden kann. Die Erhöhung der Qualität bzw. der Proteinlöslichkeit des Rapsextraktionsschrotes ist ein wesentlicher Beitrag zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit der Rapsproteinherstellung.

Im Aspekt zur wirtschaftlichen Gestaltung des Herstellungsverfahrens im industriellen Maßstab und der Verbesserung des nutritiven Wertes der Rapsproteinprodukte leiten sich aus den Untersuchungsergebnissen folgende Schwerpunkte für weiterführende Arbeiten ab:

- Industrielle Umsetzung von bereits entwickelten Verfahren zur schonenden Desolventisierung bzw. Entwicklung von neuen Desolventisierungsverfahren, die für eine nachfolgende Proteingewinnung geeignetes Schrot erzeugen, aber bei denen

herkömmliche DDTK ohne konstruktive Änderungen eingesetzt werden können

- Optimierung der Proteinextraktion für die Gewinnung des vollständigen Anteils an extrahierbarem Protein
- Optimierung der Cross-Flow-Ultrafiltration von Rapsproteinlösungen und Entwicklung eines effizienten Membranreinigungsverfahrens
- Weitere Reduzierung der antinutritiven Inhaltsstoffe bzw. Optimierung des Verfahrens der Myrosinaseinaktivierung

Als Resume kann man festhalten, dass die hergestellten Rapsproteinprodukte großes Potenzial für die Fischernährung haben. Ein Fischmehlaustausch durch Rapsproteine bedeutet ein Entgegenwirken der weiteren Überfischung der Weltmeere und eine Verbesserung des marinen Ökosystems. Gleichzeitig eröffnet diese Anwendungsapplikation die Option auf neue Möglichkeiten der Wertschöpfung aus der Rapsverarbeitung.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Entwicklung der Verteilung des Fischmehlverbrauches (Jackson, 2011; Shepherd, 2007).....	2
Abbildung 1-2: Entwicklung der Aquakultur- und Fischmehlproduktion (IFFO, 2009).....	3
Abbildung 1-3: Preisentwicklung des Fischmehls und des Rapsextraktionsschrotes (Indexmundi, 2011; Canolacouncil, 2011)	4
Abbildung 2-1: Oil-bodies (Ölkörper) in Saatkern. Links: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer Brassica-Samenzelle, welche große und auffällige Speicherprotein-bodies und kleine und zahlreiche Oil-bodies zeigt. Rechts: Modell eines Ölkörpers, welches eine Matrix von Triacylglycerols (blau) enthält, welche von einer Schicht von Phospholipiden (rot) und Strukturproteine (Oleosine) (gelb) umschlossen sind (Huang, 2011).	11
Abbildung 2-2: Milieuabhängige Dissoziation und entsprechend Assoziation von 12 S Rapsproteinen (Schwenke, et al., 1983)	13
Abbildung 2-3: Struktur der Glucosinolate (Kroll, et al., 2007)	14
Abbildung 2-4: Weltweite Produktion der Rapssaat, des Rapsextraktionsschrotes und des Rapsöles (USDA, 2011)	22
Abbildung 2-5: Rapsverarbeitung in Deutschland (Weiß, 2008; UFOP, 2011)	22
Abbildung 2-6: Schema der konventionellen Rapssaatverarbeitung (Verband Deutscher Ölmühlen) (Jeroch, 2008).....	23
Abbildung 3-1: Schema der Festbettextraktion (Leidt, 2010).....	40
Abbildung 3-2: Schema der Versuchsanlage zur WS-Desolventisierung (rechts) und Schema der Desolventisierung mit Teilstromkondensation an der Versuchsanlage (links) (Leidt, 2008)	41
Abbildung 3-3: Versuchsverlauf der WS-Desolventisierung.....	42
Abbildung 4-1: Myrosinaseinaktivierung als Funktion der Temperaturbelastung	47
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Entölungsprozesses.....	48
Abbildung 4-3: Proteingehalt und PDI der Rapsrückstände nach verschiedenen Verarbeitungsschritten und des industriell hergestellten Schrotes	50
Abbildung 4-4: Öl- und Proteingehalte der Rapsrückstände nach verschiedenen Verarbeitungsschritten.....	52
Abbildung 4-5: Partikelgrößenverteilung des vermahlenden Rapsextraktionsschrotes	53

Abbildung 4-6: Proteinlöslichkeit des Rapsextraktionsschrotes in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	54
Abbildung 4-7: Verlauf der Leitfähigkeit während der Diafiltration.....	55
Abbildung 4-8: Verlauf des Salzgehaltes und der Leitfähigkeit während der Diafiltration.....	56
Abbildung 4-9: Verlauf des Proteingehaltes und der Leitfähigkeit während der Diafiltration.....	57
Abbildung 4-10: Verlauf des Proteingehaltes und der Trockensubstanz während der Diafiltration ...	57
Abbildung 4-11: Verfahrensschritte zur Rapsproteinkonzentratherstellung.....	59
Abbildung 4-12: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Rapsproteinkonzentrates.....	65
Abbildung 4-13: Proteinzusammensetzung des Rapsproteinkonzentrates.....	66
Abbildung 4-14: DSC-Thermogramme des Rapsproteinkonzentrates.....	68
Abbildung 4-15: Partikelgrößenverteilung des Rapsproteinkonzentrates.....	69
Abbildung 4-16: REM-Aufnahmen des Rapsproteinkonzentrates.....	69
Abbildung 4-17: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Globulin- und Albuminkonzentrates unter nicht-reduzierenden Bedingungen.....	73
Abbildung 4-18: Elektrophoresekurve des Globulinkonzentrates (rechts) und des Albuminkonzentrates (links)	74
Abbildung 4-19: Verfahrensschritte zur Globulin- und Albuminkonzentratherstellung	75
Abbildung 4-20: Elektropherogramm (SDS-PAGE) des Globulin- und Albuminkonzentrates	82
Abbildung 4-21: Proteinzusammensetzung des Globulin- und Albuminkonzentrates	83
Abbildung 4-22: DSC-Thermogramm des Globulin- und Albuminkonzentrates	84
Abbildung 4-23: Partikelgrößenverteilung des Globulinkonzentrates.....	85
Abbildung 4-24: Partikelgrößenverteilung des Albuminkonzentrates.....	85
Abbildung 4-25: REM-Aufnahmen des Globulinkonzentrates.....	86
Abbildung 4-26: REM-Aufnahmen des Albuminkonzentrates.....	86
Abbildung 4-27: Einfluss des pH-Wertes (4-10) auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes	88
Abbildung 4-28: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Präzipitationsrückstände-Versuch 1	88
Abbildung 4-29: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Präzipitationsrückstände-Versuch 2	89
Abbildung 4-30: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Präzipitationsrückstände-Versuch 3	89
Abbildung 4-31: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Präzipitationsrückstände bei pH von 3 – 4,5	90

Abbildung 4-32: Variationen des Präzipitationsprozesses des 1. Proteinextraktes.....	92
Abbildung 4-33: Elektropherogramm der Präzipitationsrückstände aus den 1. und 2. Extraktionen ..	94
Abbildung 4-34: Verfahrensschritte zur Rapsproteinisolatherstellung.....	96
Abbildung 4-35: Elektropherogramm (SDS-PAGE) der Rapsproteinisolate (links) und Proteinzusammensetzung der Rapsproteinisolate (rechts)	106
Abbildung 4-36: DSC-Thermogramm des RPI-1E und des RPI-2E.....	107
Abbildung 4-37: REM-Aufnahmen des RPI-1E.....	107
Abbildung 5-1: Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Proteinlöslichkeit bzw. -ausbeute	109
Abbildung 5-2: Einfluss der ethanolische Behandlung des Rapsschrotes auf die Proteinausbeute ...	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Überblick über die durchgeführten Fischfütterungsversuche unter Einsatz von Rapsschrot/Canolaschrot (Enami, 2011).....	6
Tabelle 2-1: Aufbau und Chemische Zusammensetzung der Rapssaat der 00-Sorte (Bertram, 1986)	10
Tabelle 3-1: Zusammensetzung der Gele	34
Tabelle 3-2: Inhaltsstoffzusammensetzung der Rapssorte Lorenz	36
Tabelle 3-3: Versuchsparameter der Gefriertrocknung	45
Tabelle 4-1: Nährstoffgehalte in ethanolisch behandelten und unbehandelten RES.....	49
Tabelle 4-2: Aminosäuregehalte in ethanolisch behandelten und unbehandelten RES.....	51
Tabelle 4-3: Partikelverteilungswerte des vermahlenden Rapsextraktionschrotes.....	53
Tabelle 4-4: Ausbeuterechnungen der hergestellten Rapsproteinkonzentrat-Chargen.....	61
Tabelle 4-5: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltsstoffe von RES und Rapsproteinkonzentrat	62
Tabelle 4-6: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinkonzentrat	63
Tabelle 4-7: Aminosäurezusammensetzung des RES und Rapsproteinkonzentrates	64
Tabelle 4-8: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Rapsproteinkonzentrates	68
Tabelle 4-9: Partikelverteilungswerte des Rapsproteinkonzentrates	68
Tabelle 4-10: Ausbeuterechnungen der hergestellten GK-Chargen	77
Tabelle 4-11: Ausbeuterechnungen der hergestellten AK-Chargen	78
Tabelle 4-12: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltstoffe von RES, Globulin- und Albuminkonzentrat.....	79
Tabelle 4-13: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltsstoffe von RES und Globulin- und Albuminkonzentrat.....	80
Tabelle 4-14: Aminosäurezusammensetzung des RES, des Globulin- und Albuminkonzentrates	81
Tabelle 4-15: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Globulinkonzentrates	84
Tabelle 4-16: Denaturierungsenthalpie und -temperatur des Albuminkonzentrates	84
Tabelle 4-17: Partikelverteilungswerte des Globulin- und Albuminkonzentrates.....	85
Tabelle 4-18: Extraktionsbedingungen der Präzipitationsvorversuche	87
Tabelle 4-19: Einfluss des pH-Wertes auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes.....	90

Tabelle 4-20: Einfluss der Präzipitationsbedingungen auf den Proteingehalt des Präzipitationsrückstandes	90
Tabelle 4-21: Ergebnisse aus der Präzipitation der 1. Extraktion im Pilotmaßstab	91
Tabelle 4-22: Ergebnisse aus der Präzipitation der 2. Extraktion im Pilotmaßstab	93
Tabelle 4-23: Ausbeuterechnungen der hergestellten RPI-1E-Chargen.....	99
Tabelle 4-24: Ausbeuterechnungen der hergestellten RPI-2E-Chargen.....	101
Tabelle 4-25: Zusammensetzung der nutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinisolat.....	103
Tabelle 4-26: Zusammensetzung der antinutritiven Inhaltstoffe von RES und Rapsproteinisolat.....	104
Tabelle 4-27: Aminosäurezusammensetzung des RES und des Rapsproteinisolates.....	105
Tabelle 4-28: Denaturierungsenthalpie und -temperatur der Rapsproteinisolate	107
Tabelle 5-1: Übersicht über die Extraktionsbedingungen der Versuche zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit bzw. -ausbeute.....	108
Tabelle 5-2: Übersicht über die Extraktionsbedingungen des Extraktionsversuches mit kommerziell verarbeitetem Rapsextraktionsschrot.....	111
Tabelle 5-3: Übersicht über die Proteinausbeuten (Extraktionsversuch mit kommerziell verarbeiteten Rapsextraktionsschrot)	111
Tabelle 6-1: Zusammensetzung der nutritiven und antinutritiven Inhaltstoffe von den hergestellten Rapsproteinprodukten und dem Fischmehl	112
Tabelle 6-2: Aminosäurezusammensetzung der hergestellten Rapsproteinprodukte und des Fischmehls	113
Tabelle 6-3: Übersicht über die Fischfütterungsergebnisse (Slawski, 2011; Nagel, et al., 2012; Nagel, et al., 2012).....	117

Literaturverzeichnis

- A.C.T.FOODS** Bestimmung von Sinapinsäure in Rapsproteinproben [Bericht] : Prüfbericht. - Kiel : [s.n.], 2011.
- Abdul-Aziz G. M., El-Nady, M. A., Shalaby, A. S., Mahmoud, S. H.** Partial Substitution of Soybean Meal Protein by Different Plant Protein Sources in Diets for Nile tilapia Fingerlings [Journal] // Bulletin of Faculty of Agriculture. - 1999. - Bd. 50. - S. 189-202.
- ADM** GRAS Notification for the ADM/Burcon NutraScience Canola Protein Isolates Puratein and Supertein [Bericht] : GRAS Notification. - [s.l.] : Archer Daniels Midland Company ADM, 2010.
- Aerts R J, Barry T N und McNabb W C** Polyphenols and Agriculture: Beneficial Effects of Proanthocyanidins in Forages [Journal] // Agriculture, Ecosystems and Environment. - 1999. - Bd. 75. - S. 1-12.
- Agbo N W** Oilseed Meals as Dietary Protein Sources for Juvenile [Bericht] : PhD Thesis / Institute of Aquaculture, University of Stirling. - Scotland : [s.n.], 2008.
- Aider M und Barbana C** Canola proteins: Composition, Extraction, Functional Properties, Bioactivity, Applications as a Food Ingredient and Allergenicity- A Practical and Critical Review [Artikel] // Trends in Food Science & Technology. - 2011. - Bd. 22. - S. 21-39.
- Aluko R E und McIntosh T** Polypeptide Profile and Functional Properties of Defatted Meals and Protein Isolates of Canola Seeds [Journal] // J. Sci. Food Agric.. - 2001. - 4 : Bd. 81. - S. 391-396.
- Aluko R E, McIntosh T und Katepa-Mupondwa F** Comparative Study of the Polypeptide Profiles and Functional Properties of Sinapis aba and Brassica juncea Seed M meals and Protein Concentrates [Journal] // J. Sci. Food Agric.. - 2005. - 11 : Bd. 85. - S. 1931-1937.
- Anderson J. L.** Some Key Fishmeal And Fish Oil Issues: An Economic Perspective [Konferenz] // IFFO Annual Conference. - Lima : [s.n.], 2011.
- Anjou K., Lönnerdal, B., Uppstöm, B., Aman, P** Composition of Seeds from Some Brassica Cultivars [Journal] // Swedish Journal of Agricultural Research. - 1977. - Bd. 7. - S. 169-178.
- Arntfield S. D. und Murray E. D.** The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation [Journal]. - [s.l.] : Food Science Technology Journal, 1981. - 4 : Bd. 14. - S. 289-294.
- Becker K und Makkar H P S** Effects of Dietary Tannic Acid and Quebracho Tannin on Growth Performance and Metabolic Rates of Common Carp ž Cyprinus Carpio L. [Journal] // Aquaculture. - 1999. - 3-4 : Bd. 175. - S. 327-335.
- Bell J M** Nutrients and Toxicants in Rapeseed Meal: A Review [Journal] // Journal of Animal Science. - 1984. - 4 : Bd. 58. - S. 996-1010.
- Bell M** Factors Affecting the Nutritional Value of Canola Meal: A Review [Journal] // Can. J. Anim. Sci.. - 1993. - Bd. 73. - S. 679-697.
- Bertram H. J., Brauer, D., Hatje, G., Henkel, H., Kley, G., Lange, D., Lennerts, L., Röbbelen, G.** RAPS auf neuen Wegen: 00-Sorten in Zuechtung, Anbau und Vermehrung [Buch]. - Gelsenkirchen : Th. Mann, Raps-Förderungs-Fond (RFF), 1986. - S. 98.
- Bockisch M** Nahrungsfette und -öle [Buch]. - [s.l.] : Eugen Ulmer, 1993.

- Böhringer** Bestimmung der Glucosinolate in Rapssaamen (Glucose-Methode) Boehringer Mannheim GmbH [Buchabschnitt] // Kontroll-Labor Biochemie. - Mannheim : Boehringer Mannheim GmbH, 1989. - Bd. 1.
- Bouchereau A [et al.]** Distribution of Sinapine and Related Compounds in Seeds of Brassica and Allied Genera [Journal] // Phytochemistry. - 1991. - Bd. 30. - S. 1873-1881.
- Buchner R und Thies W** HPLC Analysis of Glucosinolates in 00-Rapeseed [Konferenz] // 7th International Rapeseed Congress. - 1987. - S. 1322-1329.
- Burel C [et al.]** Digestibility of Extruded Peas, Extruded Lupin, and Rapeseed Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Turbot (*Psetta maxima*) [Journal] // Aquaculture. - 2000a. - Bd. 188. - S. 285-298.
- Burel C [et al.]** Effects of Rapeseed Meal-Glucosinolates on Thyroid Metabolism and Feed Utilization in Rainbow Trout [Journal] // General and Comparative Endocrinology. - 2001. - 3 : Bd. 124. - S. 343-358.
- Burel C [et al.]** Potential of Plant-Protein Sources as Fish Meal Substitutes in Diets for Turbot (*Psetta maxima*): Growth, Nutrient Utilisation and Thyroid Status [Journal] // Aquaculture. - 2000b. - Bd. 188. - S. 363-382.
- Burgess D A und Winnipeg Manitoba** Purification, Characterization and the Micelle Response of the 12S Canola Globulin [Bericht] : MSc Thesis / University of Manitoba. - Manitoba : [s.n.], 1991.
- Canolacouncil** Canolacouncil of Canada [Online]. - 2011. - 23. Dezember 2011. - <http://www.canolacouncil.org/canolaprices.aspx>.
- Cao L [et al.]** Effects of Pretreatment with Microbial Phytase on Phosphorous Utilization and Growth Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [Journal] // Aquaculture Nutrition. - 2008. - 2 : Bd. 14. - S. 99-109.
- Carter C G und Hauler R C** Evaluation of Phytase in Atlantic Salmon, *Salmo Salar* L., Feeds Containing Fishmeal and Different Plant Meals. In: Fishmeal Replacement in Aquaculture Feeds for Atlantic Salmon [Bericht] : Project 93/120 / Fisheries Research and Development Corporation. - Canberra, Australia : [s.n.], 1999.
- Cramer N.** Raps - Züchtung, Anbau und Vermarktung [Journal]. - [s.l.] : Ulmer, 1989.
- Dabrowski K J und Sosulski F W** Composition of Free and Hydrolyzable Phenolic Acids in Defatted Flours of Ten Oilseeds [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 1984. - 1 : Bd. 32. - S. 128-130.
- Dabrowski K J und Sosulski F W** Composition of Free and Hydrolyzable Phenolic Acids in the Flours and Hulls of ten Legume Species [Journal] // J. Agric. Food Chem.. - 1984. - 1 : Bd. 32. - S. 131-133.
- Dalgalarondo M, Robin J-M und Azanza J-L** Subunit Composition of the Globulin Fraction of Rapeseed (*Brassica napus* L.) [Journal] // Plant Science. - 1986. - 2 : Bd. 43. - S. 115-124.
- Danilenko A N [et al.]** Influence of Ethanol on Conformational Stability of Broad Bean 11S Globulin According to Data of Differential Scanning Microcalorimetry [Artikel] // Mol. Biol. (Moscow). - 1986. - 20. - Bd. 6. - S. 1315-1324.
- Delseny M und Raynal M.** Globulin Storage Proteins in Crucifers and Non-legume Dicotyledonous Families. [Buchabschnitt] // In Seed Proteins / Buchverf. Shewry P und Casey R.. - [s.l.] : Springer Netherlands, 1999.

- Drew M D** Canola Protein Concentrate as a Feed Ingredient for Salmonid Fish [Bericht] / Department of Animal and Poultry Science ; University of Saskatchewan. - 2004.
- Eapen K. E., Tape, N W., Sims, R. P. A.** New Process for the Production of Better-Quality Rapeseed Oil and Meal. I. Effect of Heat Treatments on Enzyme Destruction and Color of Rapeseed Oil [Journal] // Journal of the American Oil Chemist' Society. - 1968. - 3 : Bd. 45. - S. 194-197.
- Eklund A. und Agreen G. and Langler, T.** Rapeseed Protein Fractions I. Preparation of a Detoxified Lipid-Protein Concentrate from Rapeseed Sy a Water-Ethanol Extraction Methode [Journal] // Sci. Food Agric.. - 1971. - 12 : Bd. 22. - S. 650-652.
- El-Beltagi H E-D S und Mohamed A A** Variations in Fatty Acid Composition, Glucosinolate Profile and Some Phytochemical Contents in Selected Oil Seed Rape (*Brassica napus* L.) Cultivars [Journal] // Grasas Y Aceites . - 2010. - 2 : Bd. 61. - S. 143-150.
- El-Sayed A.-F.M.** Protein Nutrition of Farmed Tilapia: Searching for Unconventional Sources. In: Bolivar, R.B., Mair, G.C. and Fitzsimmons, K., (Eds.) [Konferenz] // Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. - Manila, Philippines : ISTA Publications, 2004. - S. 364-378.
- Enami H. R.** A Review of Using Canola/Rapeseed Meal in Aquaculture Feeding [Journal]. - [s.l.] : Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2011. - 1 : Bd. 6. - S. 22-36.
- Erdmann J W** Oilseed Phytates: Nutritional Implications [Journal] // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 1979. - 8 : Bd. 56. - S. 736-741.
- Ericson M L [et al.]** Structure of the Rapeseed 1.7 S Storage Protein, Napin, and its Precursor [Journal] // J. Biol. Chem.. - 1986. - 31 : Bd. 261. - S. 14576-14581.
- Euronatur** Aquakultur Zahlen, Hintergründe, Ausblicke [Bericht]. - [s.l.] : Stiftung Europäisches Naturerbe (Euronatur), 2005.
- FAO** Review of the State of World Marine Fishery Resources [Bericht] : FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 569 / FAO Fisheries and Aquaculture Department. - Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.
- FAO** The State of World Fisheries and Aquaculture [Bericht]. - Rome : FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010.
- FAOSTAT** Food and Agriculture Organization of the United Nations [Online]. - 17. May 2011. - 26. Dezember 2011. - <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- FAOSTAT** Food and Agriculture Organization of the United Nations [Online]. - 2010. - <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Fenton T W, Leung J und Claudinin D R** Phenolic Components of Rapeseed Meal [Journal] // Journal of Food Science. - 1980. - 6 : Bd. 45. - S. 1702-1705.
- Fenwick G. R. [et al.]** The Treatment of Rapeseed Meal and its Effect on Chemical Composition and Egg Tainting Potential [Journal]. - [s.l.] : Journal of the Science of Food and Agriculture, July 1984. - 7 : Vol. 35. - pp. 757-761.
- Forster I [et al.]** Potential for Dietary Phytase to Improve the Nutritive Value of Canola Protein Concentrate and Decrease Phosphorus Output in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Held in 11°C Fresh Water [Journal] // Aquaculture. - 1999. - 1-4 : Bd. 179. - S. 109-125.
- Francis G., Makkar, H.P.S., Becker, K.** Antinutritional Factors Present in Plant-Derived Alternate Fish Feed Ingredients and their Effects in Fish [Journal]. - [s.l.] : Aquaculture, August 2001. - 3-4 : Bd. 199. - S. 197-227.

- Ghodsvali A [et al.]** Preparation of Canola Protein Materials Using Membrane Technology and Evaluation of Meals Functional Properties [Journal] // Food Res Int.. - 2005. - 2 : Bd. 38. - S. 223-231.
- Glencross B.** Pilot Assessment of the Potential for Canola Meal and Oil Use in Aquaculture Feeds [Bericht] : Final report for the Grains Research and Development Corporation; Fisheries Research Contract Report / Department of Fisheries Western Australia. - 2003. - 5.
- Griffiths D W** Condensed Tannins [Buchabschnitt] // Condensed tannins. In: Toxic Substances in Crop Plants / Buchverf. D'Mello J P F, Duffus C M und Duffus J H. - 1991.
- Grinberg V Y, Burova T V und Tolstoguzov V B** Thermal Analysis of Denaturation and Aggregation of Proteins and Protein Interactions in a Real Food System [Buchabschnitt] // Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems / Buchverf. Kaletunc G. - [s.l.] : Wiley-Blackwell, 2009.
- Grozav E. K. [et al.]** Studies on the Effect of Ethanol on Thermal Denaturation of Soybean Globulins by Differential Scanning Microcalorimetry [Journal]. - [s.l.] : Journal of Food Science, September 1985. - 5 : Bd. 50. - S. 1266-1270.
- Guderjan M** Untersuchungen zum Einfluss elektrischer Hochspannungsimpulse bei der Gewinnung pflanzlicher Öle [Bericht] : Dissertation / Technische Universität Berlin. - Berlin : [s.n.], 2006.
- Gueguen J [et al.]** Interfacial Behaviours and Emulsifying Properties of Native Rapeseed Proteins. Influence of the Cruciferin/Napin Ratio. In: Proteins go ahead! [Konferenz] // Innovative Produkte aus pflanzlichen Proteinen. - [s.l.] : Fraunhofer IVV, 2002.
- Hardy R. W., Sullivan, C. V.** Canola Meal in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Production Diets [Journal] // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. - 1983. - 3 : Bd. 40. - S. 281-286.
- Harland B F und Morris E R** Phytate: a Good or a Bad Food Component? [Journal] // Nutrition Research. - 1995. - 5 : Bd. 15. - S. 733-754.
- Härtel F. V., Brandt, A.** Characterization of a Brassica napus Myrosinase Expressed and Secreted by *Pichia pastoris* [Journal] // Protein Expression and Purification. - [s.l.] : Elsevier, March 2002. - 2 : Bd. 24. - S. 221-226.
- Harwalkar V.R. und Ma C.-Y.** Study of Thermal Properties of Oat Globulin by Differential Scanning Calorimetry [Journal]. - [s.l.] : Journal of Food Science, March 1987. - 2 : Bd. 52. - S. 394-398.
- Higgs D A [et al.]** Protein Quality of Altex Canola Meal for Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Considering Dietary Protein and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine Content [Journal] // Aquaculture. - 1983. - 213-238 : Bd. 34.
- Higgs D.A., Dosanjh, B.S., Prendergast, A. F., Beames, R. M., Mwachireya, S. A., Deacon, G** Nutritive Value of Rapeseed/Canola Protein Products for Salmonids [Konferenz] // Eastern Nutrition Conference. - New York, USA : [s.n.], 1996. - S. 187-196.
- Hilton J. W., Slinger, S. J.** Digestibility and Utilization of Canola Meal in Practical-Type Diets for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) [Journal] // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. - 1986. - 6 : Bd. 43. - S. 1149-1155.
- Hofsten A.** The Ultrastructure of Seeds of some Brassica Species-New Sources of Seed Protein [Journal] // Svensk Botanisk Tidskrift. - 1974. - Bd. 68. - S. 153-163.
- Huang A H C [et al.]** Lipids, Proteins and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species [Journal] // Planta Physiol.. - 1993. - Bd. 101. - S. 267-276.

Huang A H C Subcellular Oil Droplets and Oleosins in Plants [Online] // American Oil Chemists' Society AOCs. - 23. 02 2011. - 12. 02 2012. - <http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/oilbodies/index.htm>.

Huber K und Kühne P Frühstückscerealien neue und bekannte Getreideprodukte Herstellung Qualitätsveränderungen Bio-Angebot [Bericht]: Bericht des Forschungsprojekts zum Thema „Qualitätsveränderungen durch Verarbeitung“ / Arbeitskreis für Ernährungsforschung. - 2004.

Hughes K P und Soares J Efficacy of Phytase on Phosphorus Utilization in Practical Diets Fed to Striped Bass *Morone saxatilis* [Journal] // Aquaculture Nutrition. - 1998. - 2 : Bd. 4. - S. 133-140.

IFFO IFFO Fishmeal and Fish Oil Statistical Yearbook 2009. - 2009.

Ignatowitz E Chemietechnik [Buch]. - [s.l.] : Verlag Europa-Lehrmittel, 2003. - 7.

Indexmundi [Online] // Indexmundi. - 2011. - 23. Dezember 2011. - <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=240¤cy=eur>.

Indexmundi [Online]. - 2011. - 26. Dezember 2011. - <http://www.indexmundi.com/energy.aspx?product=biodiesel&graph=production>.

Ismond M A H und Welsh W D Application of New Methodology to Canola Protein Isolation [Journal] // Food Chem.. - 1992. - 2 : Bd. 45. - S. 125-127.

Jackson A. The Future of Fishmeal and Fish Oil in Aquaculture Diets [Bericht]. - [s.l.] : International Fishmeal & Fish Oil Organisation (IFFO), 2011.

Jackson L S, Li M H und Robinson E H Use of Microbial Phytase in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Diets to Improve Utilization of Phytate Phosphorus [Journal] // Journal of World Aquaculture Society. - 1996. - Bd. 27. - S. 309-313.

Jeroch H., Schöne, F., Jankowski, J. Inhaltsstoffe von Rapsfuttermitteln und Futterwert für das Geflügel [Journal] // Arch.Geflügelk.. - Stuttgart : © Verlag Eugen Ulmer, 2008. - 1 : Bd. 72. - S. 8-18.

Keller and Heckman LLP GRAS Notification for BioExx Canola Proteins: Canola Protein Isolate (Isolexx™) and Hydrolyzed Canola Protein Isolate (Vitallexx™) [Bericht] : GRAS Notification. - [s.l.] : U.S. Food and Drug Administration, 2011.

Klockeman D M und Toledo R, Sims, K A Isolation and Characterization of Defatted Canola Meal Protein [Journal] // J Agric Food Chem.. - 1997. - 10 : Bd. 45. - S. 3867-3870.

Kolodziejczyk P [et al.] Phenolics In Rapeseed: Capillary Electrophoresis as a Novel Analytical Method for Detection of Sinapine, Sinapic Acid Esters and Ferulates [Konferenz] // 10th International Rapeseed Congress. - Canberra : [s.n.], 1999.

Kozłowska H., Nowak, H., Zadernowski, R. Rapeseed Hulls Fat Characteristics [Journal] // Fat Science Technology. - 1988. - Bd. 90. - S. 216-219.

Kracht W [et al.] Effect of Dehulling of Rapeseed on Feed Value and Nutrient Digestibility of Rape Products in Pigs [Journal] // Archives of Animal Nutrition. - 2004. - 5 : Bd. 58. - S. 389-404.

Kroll J Selected Functional Properties of Detoxified Rapeseed Protein Preparations Effected by Phytic Acid [Journal] // Food/Nahrung. - 1991. - 6 : Bd. 35. - S. 619-624.

Kroll J, Krause J-P und Rawel H M Native sekundäre Inhaltsstoffe in Rapssaamen-Eigenschaften und Wechselwirkungen mit Proteinen [Buchabschnitt] // Deutsche Lebensmittel-Rundschau I. - 2007. - Bde. 103. Jahrgang, Heft 4.

Krzyzaniak A. [et al.] The Structure and Properties of Napin-Seed Storage Protein from Rape (*Brassica napus* L.) [Journal]. - [s.l.] : Food / Nahrung, August 1998. - 03-04 : Bd. 42. - S. 201-204.

Laemmler U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [Journal] // Nature. - 1970. - Bd. 227. - S. 680-685.

Lange R und Linow F Zur Kenntnis der Schwefelverbindungen in Raps- (*Brassica napus*) Varietäten und Verarbeitungsprodukten 4. Mitt. Präparative Isolation von Glucosinolaten und Glucosinolatgemischen [Journal]. - 1987. - 8 : Bd. 31. - S. 837-841.

Leatherland J F, Hilton J W und Slinger S J Effects of Thyroid Hormone Supplementation of Canola Meal-based Diets on Growth, and Interrenal and Thyroid Gland Physiology of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) [Journal] // Fish Physiol. Biochem.. - 1987. - Bd. 3. - S. 73-82.

Léger L. W. und Arntfield S. D. Thermal Gelation of the 12S Canola Globulin [Journal]. - [s.l.] : Journal of the American Oil Chemists' Society, September 1993. - 9 : Bd. 70. - S. 853-861.

Leidt K-H Entwicklung eines kontinuierlichen mehrstufigen wirbelschichtbasierten Verfahrens der schonenden Desolventisierung von Rapsextraktionsschrot [Bericht] : Zwischenbericht zum ZIM-Kooperationsprojekt KF2023902 / Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e.V.. - 2010.

Leidt K-H Entwicklung eines wirbelschichtbasierten Verfahrens zur schonenden Desolventisierung und Detoxifizierung von Rapsextraktionsschrot für die Proteingewinnung [Bericht] : Zwischenbericht zum ProInno Kooperationsprojekt KF033001JA6 / Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e.V.. - 2008.

Lickfett T [et al.] Seed Yield, Oil and Phytate Concentration in the Seeds of Two Oilseed Rape Cultivars as Affected by Different Phosphorus Supply [Journal] // European Journal of Agronomy. - 1999. - Bd. 11. - S. 293-299.

Lim C., Klesius, P. H., Higgs, D. A. Substitution of Canola Meal for Soybean Meal in Diets for Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* [Journal] // Journal World Aquaculture Soc.. - 1998. - Bd. 29. - S. 161-168.

Lipša F D Genetische und molekulare Untersuchungen antinutritiver phenolischer Inhaltsstoffe (Tannine) der Rapssaat (*Brassica napus* L.) [Bericht] : Dissertation / Justus-Liebig-Universität Giessen. - Giessen : [s.n.], 2010. - S. 134.

Liu B L [et al.] The Induction and Characterization of Phytase and Beyond [Journal] // Enzyme Microbial Technology. - 1998. - Bd. 22. - S. 415-424.

Lönnerdal B und Janson J-C Studies on Brassica Seed Proteins: I. The low Molecular Weight Proteins in Rapeseed. Isolation and Characterization [Journal] // Biochim Biophys Acta. - August 1972. - 1 : Bd. 278. - S. 175-183.

Lühs W, Baetzel R und Friedt W Zur Kombinierbarkeit von hoher Saatgutqualität und wertvollen Korninhaltsstoffen bei Raps (*Brassica napus*): Möglichkeiten und Grenzen [Bericht] : Bericht über die 51. Arbeitstagung 2000 der Vereinigung österreichischer Pflanzzüchter / Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Giessen. - Gumpenstein, Österreich : [s.n.], 2000.

Lulu G [et al.] Study on the Preparation and Functional Properties of Rapeseed Protein [Konferenz] // International Conference on Sustainable Agriculture ICESA. - 2008.

Maa Y. F. [et al.] The Effect of Operating and Formulation Variables on the Morphology of Spray-Dried Protein Particles [Journal]. - [s.l.] : Pharm Dev Technol., 1997. - 3 : Bd. 2. - S. 213-223.

- Maenz D D [et al.]** Fractionation and Processing of Oilseed Meal [Patent] : 6,800,308 B2. - United States of America, 5. October 2004.
- Maenz D D** Fractionation of De-Oiled Canola and Production of High Valued Protein Concentrates [Bericht]. - [s.l.] : MCN BioProducts Inc., 2007.
- Mainz D D, Classen H L und Newkirk R W** Isolation of Inositol from Plant Materials [Patent] : WO/2004/050887 . - World, 17. Juny 2004.
- Malabat C [et al.]** Genetic Variability of Rapeseed Protein Composition [Konferenz] // 11th International Rapeseed Congress. - [s.l.] : Royal Veterinary and Agricultural University, 2003. - Bd. 1.
- Masters K.** Spray Drying Handbook [Buch]. - New York : Longman Scientific & Technical, 1985. - Bd. 4.
- Matthäus B** Effect of Dehulling on the Composition of Antinutritive Compounds in Various Cultivars of Rapeseed [Journal] // Fett/Lipid. - 1998. - Bd. 100. - S. 295-301.
- Mawson R [et al.]** Rapeseed Meal- Glucosinolates and their Antinutritional Effects. Part 3. Animal Growth and Performance. [Journal] // Nahrung. - 1994a. - Bd. 38. - S. 167-177.
- Mawson R [et al.]** Rapeseed Meal-Glucosinolates and their Antinutritional Effects. Part 1. Rapeseed Production and Chemistry of Glucosinolates [Journal] // Nahrung. - 1993. - Bd. 37. - S. 131-140.
- Mawson R [et al.]** Rapeseed Meal-Glucosinolates and their Antinutritional Effects. Part 4. Goitrogenicity and Internal Organs Abnormalities in Animals [Journal] // Nahrung. - 1994b. - Bd. 38. - S. 178-191.
- Mawson R [et al.]** Rapeseed Meal-Glucosinolates and their Antinutritional Effects. Part 7. Processing [Journal] // Nahrung. - 1995. - 1 : Bd. 39. - S. 32-41.
- Michov B** Elektrophorese Theorie und Praxis [Buch]. - Berlin : de Gruyter, 1995.
- Mieth G [et al.]** Review Article: Rapeseed: Constituents and Protein Products Part I [Journal] // Die Nahrung. - 1983. - Bd. 27. - S. 675-697.
- Minkowski K** Influence of Dehulling of Rape Seeds on Chemical Composition of Meal [Journal] // Animal Feed Science and Technology. - 2002. - 3 : Bd. 96. - S. 237-244.
- Monsalve R I [et al.]** Detection, Isolation and Complete Amino Acid Sequence of an Aeroallergenic Protein from Rapeseed Flour [Journal] // Clinical Experiments Allergy. - 1997. - 7 : Bd. 27. - S. 833-841.
- Morr C V [et al.]** A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure [Journal] // Journal of Food Science. - 1985. - Bd. 50. - S. 1715-1718.
- Murphy D J, Cummins I und Kang A S** Synthesis of the Major Oil-body Membrane Protein in Developing Rapeseed (*Brassica napus*) Embryos [Journal] // Biochemical Journal. - 1989. - Bd. 258. - S. 285-293.
- Murphy D. J.** Structure and Functions of Oleosins in Oil Plants [Journal] // INFORM. - 1993a. - Bd. 4. - S. 922-932.
- Murphy D. J.** Structure, Function and Biogenesis of Storage Lipid Bodies and Oleosins in Plants [Journal] // Prog. Lipid Res.. - 1993b. - Bd. 32. - S. 247-280.
- Naczki M [et al.]** Current Research Developments on Polyphenolics of Rapeseed/Canola: a Review [Journal] // Food Chemistry. - 1998. - Bd. 62. - S. 489-502.

- Naczk M, Diosady L und Rubin L J** Functional Properties of Canola Meals Produced by a Two-phase Solvent Extraction System [Journal] // Journal of Food Science. - 1985. - 6 : Bd. 50. - S. 1685-1688.
- Nagel F [et al.]** Albumin and Globulin Rapeseed Protein Fractions as Fish Meal Alternative in Diets fed to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) [Artikel] // Aquaculture. - 2012. - Bde. 354-355. - S. 121-127.
- Nagel F [et al.]** Evaluation of a Rapeseed Protein Isolate as Fish Meal Substitute in Nutrition of Turbot Juveniles (*Psetta maxima* L.): Impact on, Growth Performance, Body Composition, Nutrient Digestibility and Health Status [Artikel] // Aquaculture . - 2012. - Bde. 356-357. - S. 357-364.
- Natsch A.** Untersuchung der Herstellbarkeit von Rapsproteinprodukten auf der Grundlage verschiedener Entölungungsverfahren [Bericht] : Dissertation / Technische Universität Berlin. - Berlin : [s.n.], 2006.
- Naylor R L [et al.]** Effects of Aquaculture on World Fish Supplies [Artikel] // Issues in Ecology. - 2001. - Bd. 8.
- Newkirk R W [et al.]** The digestibility and content of amino acids in toasted and non-toasted canola meals [Journal] // Canadian Journal of Animal Science. - 2003. - 1 : Bd. 83. - S. 131-139.
- Newkirk R W, Maenz D D und Classen H L** Oilseed Processing [Patent] : 7,090,887 B2. - United States of America, 15. August 2006.
- Newkirk R W, Maenz D D und Classen** Oilseed Processing [Patent] : 7,629,014 B2. - United States of America, 8. December 2009.
- Newkirk R.** Canola Meal: Feed Industry Guide [Bericht] / Canadian International Grains Institute, Canada. - [s.l.] : www.canolacouncil.org, 2009. - 4.
- Oliva-Teles A [et al.]** Utilisation of Diets Supplemented with Microbial Phytase by Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles [Journal] // Aquatic Living Resources. - 1998. - 4 : Bd. 11. - S. 255-259.
- Osborne T B** The Vegetable Proteins. Monographs in Biochemistry [Buch]. - [s.l.] : Longmans, Green & Co, 1924. - 2nd Edition.
- Pastuszewska B [et al.]** The Protein Value of Differently Processed Rapeseed Solvent Meal and Cake Assessed by in Vitro Methods and in Tests with Rats [Journal] // Animal Feed Science Technology. - 2003. - 1 : Bd. 106. - S. 175-188.
- Pei-wu L I [et al.]** Analysis of Glucosinolate Components and Profiles in *Brassica napus* [Journal] // Scientia Agricultura Sinica. - 2005. - 7 : Bd. 38. - S. 1346-1352.
- Petterson D S** The use of Lupins in Feeding Systems- Review [Journal] // Asian Australian Journal of Animal Science. - 2000. - 6 : Bd. 13. - S. 861-882.
- Pickardt C [et al.]** Protein Preparation Produced from Rape Seed / Aus Rapssaamen hergestelltes Proteinpräparat [Patent] : WO 2010/096943 A2. - World, 2. September 2010.
- Pietsch M, Rimbach G und Pallauf J** Zur Auswirkung einer abgestuften Phytinsäurezufuhr auf den Magnesiumstatus wachsender Ratten [Journal] // Proc. Soc. Nutr. Physiol. . - 1995. - Bd. 4. - S. 93-96.
- Pippig S [et al.]** Einfluß von Phytinsäure und Phytase auf die Bioverfügbarkeit von Eisen bei der wachsenden Ratte [Journal] // Proc.Soc. Nutr. Physiol.. - 1995. - Bd. 4. - S. 89-92.

- Pokorny J und Reblova Z** Sinapines and other phenolics of Brassicaceae seeds [Journal] // Potravinarske Vedy - UZPI. - 1994. - 2 : Bd. 13. - S. 155-168.
- Portz L und Liebert F** Growth, Nutrient Utilization and Parameters of Mineral Metabolism in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Fed Plant-based Diets with Graded Levels of Microbial Phytase [Journal] // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. - 2004. - 9-10 : Bd. 88. - S. 311-320.
- Pudel F.** Gewinnung und Nutzung von Rapssamenspeicherproteinen [Konferenz] // BIO-raffiniert VI Nachwachsende Rohstoffe nachhaltig nutzen. - Oberhausen : [s.n.], 2011.
- Puumalainen T J [et al.]** Napins, 2SAalbumins, are Major Allergens in Oilseed Rape and Turnip Rape [Journal] // The Journal of Allergy Clinical Immunology. - 2006. - 2 : Bd. 117. - S. 426-432.
- Raab B und Schwenke K D** Contribution to the Subunit Composition of the 11S Globulin from Rapeseed (*Brassica napus* L.) [Journal] // Die Nahrung. - 1986. - 3-4 : Bd. 30. - S. 395-396.
- Reddy N R, Sathe S K und Salunkhe D K** Phytates in Legumes and Cereals [Journal] // Adv. Food Res.. - 1982. - Bd. 28. - S. 1-92.
- Remmele E** Handbuch Herstellung von Rapsölkraftstoff in dezentralen Ölgewinnungsanlagen [Buch]. - Gülzow : Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V., 2007.
- Rickard S E und Thompson L U** Interactions and Biological Effects of Phytic Acid. In: Antinutrients and Phytochemicals in Food [Buchabschnitt] = Chemical Society Symposium series // Antinutrients and Phytochemicals in Food / Hrsg. Shahidi F. - [s.l.] : American Chemical Society, 1997. - Bd. 662.
- Rudolph B** Simultaneously Determination of Glucosinolates and their Breakdown Products by Means of HPLC [Konferenz] // 9th International Rapeseed Congress. - 1995. - S. 925-927.
- Rumsey G. L.** Fishmeal and alternate sources of protein in fish feeds [Journal] // Aquaculture. - 1993. - S. 14-19.
- Sajjadi M und Carter C** Dietary Phytase Supplementation and the Utilisation of Phosphorus by Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Fed a Canola Meal-based Diet [Journal] // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. - 2003. - 1-4 : Bd. 12.
- Salunkhe D K [et al.]** World Oilseeds Chemistry, Technology and Utilization [Buch]. - New York : Van Nostrand Reinhold, 1992.
- Sang J P [et al.]** Glucosinolate Profiles in the Seed, Root and Leaf Tissue of Cabbage, Mustard, Rapeseed, Radish and Swede [Journal] // Can. J. plant Sci.. - 1984. - Bd. 64. - S. 77-93.
- Schmidt I [et al.]** Detailed Physicochemical Characterization of the 2S Storage Protein from Rape (*Brassica napus* L.) [Journal] // Journal Agricultural Food Chemistry. - 2004. - 19 : Bd. 52. - S. 5995-6001.
- Schöne F [et al.]** Stärkeres Toasten bei der Rapsextraktionsschrottherstellung inaktiviert Glucosinolate und verändert die Proteinqualität [Konferenz] // Landnutzungskonzepte heute und morgen - dargestellt am Beispiel der Region südlicher Oberrhein. - Darmstadt : VDLUFA, 2007. - Bd. 62. - S. 297-300.
- Schulz C** Persönliche Mitteilung. - 2011.
- Schumann W und Schöne F** Qualität von Rapsextraktionsschroten nach unterschiedlich starkem Toasten [Konferenz] // Rapskolloquium Schleswig-Holstein/Mecklenburg-Vorpommern. - 2007. - Bd. Tagungsband IX. - S. 15-16.

- Schumann W** Untersuchungen zum Glucosinolatgehalt von in Deutschland erzeugten und verarbeiteten Rapssaaten und Rapsfuttermitteln [Bericht] : UFOP-Schriften Heft 27. - [s.l.] : UFOP, 2004. - S. 1-69.
- Schweizer M, Willardsen R und Green B E** Preparation of Canola Protein Isolate and Use in Aquaculture [Patent] : CA 2556711 A1. - Canada, 25. August 2005.
- Schwenke K D [et al.]** The Structure of the 12 S Globulin from Rapeseed [Journal] // Die Nahrung. - 1983. - 2 : Bd. 27. - S. 165-175.
- Schwenke K D [et al.]** Über Samenproteine III. Isolierung und Charakterisierung der Albumine aus Sonnenblumen und Rapssaaten [Journal] // Die Nahrung. - 1973. - 8 : Bd. 17. - S. 791-809.
- Schwenke K D** Structural Studies on Native and Chemically Modified Storage Proteins from Rapeseed (*Brassica napus* L.) and Related Plant Proteins [Journal] // Nahrung. - 1990. - 3 : Bd. 34. - S. 225-240.
- Ser W Y [et al.]** Use of Diabetic test Kits to Assess the Recovery of Glucosinolates During Isolation of Canola Protein [Journal] // LWT - Food Sci Technol.. - 2008. - 5 : Bd. 41. - S. 934-941.
- Shahidi F und Naczk M** An Overview of the Phenolics of Canola and Rapeseed: Chemical, Sensory and Nutritional Significance [Journal] // Journal of the American Oil Chemists' Society. - 1992. - 9 : Bd. 69. - S. 917-924.
- Shahidi F und Naczk M** Effect of Processing on the Content of Condensed Tannins in Rapeseed Meal [Journal] // J. Food Sci.. - 1989. - Bd. 54. - S. 1082-1083.
- Shahidi F.** Rapeseed and Canola: Global Production and Distribution. In: Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology [Buch]. - New York : Van Nostrand Reinhold, 1990.
- Shepherd J., Jackson, A., Mittaine, J.-F.** Fishmeal Industry Overview [Bericht]. - [s.l.] : International Fishmeal & Fish Oil Organisation (IFFO), 2007.
- Slawski H** Rapeseed Protein Products as Fish Meal Replacement in Fish Nutrition [Bericht] : PhD Thesis / Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. - Kiel : [s.n.], 2011.
- Sørensen H [et al.]** High Quality Oils, Proteins and Bioactive Products for Food and Non-Food Purpose Based on Biorefining of Cruciferous Oilseed Crops [Bericht] : Final Report FAIR CT95-0260 / Fraunhofer Institute ; Fraunhofer IVV. - 2000.
- Sørensen Jensen, S., Olsen, H. S., Sørensen, H.** Aqueous Enzymatic Processing of Rapeseed for Production of High Quality Products. In: Canola and Rapeseed [Buch]. - New York : Shahidi, F.(Edts), 1990.
- Spinelli J, Houle C R und Wekell J C** The Effect of Phytates on the Growth of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Purified Diets Vontaining Varying Quantities of Calcium and Magnesium [Journal] // Aquaculture. - 1983. - 1-4 : Bd. 30. - S. 71-83.
- Spragg J und Mailer R** Canola Meal Value Chain Quality Improvement [Bericht] : Final Report Project Code: 1B-103-0506. - 2007. - A final report prepared for AOF and Pork CRC.
- Stotz K und Remmele E** Daten und Fakten zur dezentralen Ölgewinnung in Deutschland [Bericht] : Berichte aus dem TFZ 3. - Straubing : Technologie- und Förderzentrum (TFZ) im Kompetenzzentrum für Nachwachsende Rohstoffe, 2005.

Sugiura S H [et al.] Dietary Microbial Phytase Supplementation and the Utilization of Phosphorus, Trace Minerals and Protein by Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Fed Soybean Meal-based Diets [Journal] // *Aquaculture Research*. - 2001. - 7 : Bd. 32. - S. 583-592.

Tan S H [et al.] Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties [Journal] // *J Food Sci.* - 2011. - 1 : Bd. 76. - S. R16-R28.

Tayaranian H R Entwicklung eines technischen Verfahrens zur Reduktion von unerwünschten Stoffen (Sinapin und Glucosinolate) in Rapssaat und Rapssaatprodukten der 00-Qualität [Bericht] : Dissertation / Christian-Albrechts-Universität. - Kiel : [s.n.], 1991.

TFZ Pflanzenöl als Speiseöl, Treib-, Schmier- und Verfahrensstoff [Bericht]. - [s.l.] : Technologie- und Förderzentrum im Kompetenzzentrum für Nachwachsende Rohstoffe, 2011.

Thies W Die wertbestimmenden Komponenten des Rapsschrotes [Journal] // *Vortr. Pflanzenzüchtg.* - 1994. - Bd. 30. - S. 89-97.

Tzen J T C [et al.] Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from diverse species [Journal] // *Plant Physiology*. - 1993. - Bd. 101. - S. 267-276.

Tzen J T C [et al.] Oleosin Isoforms of High and Low Molecular Weights are Present in the Oil Bodies of Diverse Seed Species [Journal] // *Plant Physiology*. - 1990. - Bd. 94. - S. 1282-1289.

Tzen J T C, Lie G C und Huang A H C Characterization of the Charged Components and Their Topology on the Surface of Plant Seed Oil Bodies [Journal] // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1992. - Bd. 22. - S. 15626-15634.

Tzeng Y M [et al.] Ultrafiltration Rejection Coefficient of Canola Meal Components [Journal] // *Can. Inst. Food Sci. Technol J.* - 1990. - 2-3 : Bd. 23. - S. 131-136.

UFOP Background Paper on Quality Improvement of Rapeseed Meal Concerning the Glucosinolate Content [Bericht] / UFOP, OVID. - [s.l.] : UFOP, 2008.

UFOP Bericht 2010/2011 [Bericht]. - 2011.

UFOP Rapsprotein in der Humanernährung [Buch]. - Berlin : Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e. V., 2007. - Bd. 32.

Unger E H Commercial Processing of Canola and Rapeseed: Crushing and Oil Extraction. In: *Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology* [Buch] / Hrsg. Shahidi F. - New York : Van Nostrand Reinhold, 1990.

USDA USDA [Online]. - United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, 12. September 2011. - 23. Dezember 2011. - <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=716&hidReportRetrievalTemplateID=13>.

VKM Opinion of the Panel on Animal Feed of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety [Bericht] = Criteria for safe use of plant ingredients in diets for aquacultured fish. - [s.l.] : Norwegian Scientific Committee for Food Safety Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM), 2009. - S. 173. - ISBN 978-82-8082-299-4.

Wanasundara J und McIntosh T Fractionation of Storage Proteins of Brassicaceae Oilseeds [Konferenz] // 101st AOCS Annual Meeting & Expo. - Phoenix, AZ, USA : [s.n.], 2010.

Wäsche A. Simultane Öl- und Proteingewinnung bei Raps [Bericht] : Dissertation / Technische Universität Berlin. - Berlin : [s.n.], 2002.

- Weier D** Die Sinapoylglucose: Cholin-Sinapoyltransferase aus *Brassica napus* [Bericht] : Dissertation / Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. - Halle (Saale) : [s.n.], 2006.
- Weiß J und Schöne F** Rapskuchen in der Schweinefütterung [Bericht] : UFOP-Praxisinformation. - [s.l.] : UFOP, 2004.
- Weiß J.** Entwicklung des Rapsschrot-/Rapskuchen- Absatzes [Konferenz] // Oelsaatenhandelstag. - Burg Warber : [s.n.], 2008.
- Widmann B A** Gewinnung und Reinigung von Pflanzenölen in dezentralen Anlagen - Einflussfaktoren auf die Produktqualität und den Produktionsprozess [Bericht] : „Gelbes Heft 51“ / Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. - München : Eigenverlag, 1994b. - S. 310.
- Widmann B A** Verfahrenstechnische Maßnahmen zur Minderung des Phosphorgehalts von Rapsöl bei der Gewinnung in dezentralen Anlagen [Bericht] : Dissertation / Technische Universität München. - München : [s.n.], 1994a.
- Wu J. und Muir A.D.** Comparative Structural, Emulsifying, and Biological Properties of 2 Major Canola Proteins, Cruciferin and Napin [Journal]. - [s.l.] : Journal of Food Science, April 2008. - 3 : Bd. 73. - S. C210-C216.
- Yiu S H [et al.]** The Microscopic Structure and Chemistry of Rapeseed and its Products [Journal] // Food Microstructure. - 1982. - Bd. 1. - S. 135-142.
- Yurkowski M [et al.]** Acceptability of Rapeseed Proteins in Diets of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) [Journal] // J. Fish. Res. Board Can.. - Bd. 35. - S. 951-962.
- Zirwer D [et al.]** Secondary Structure of Globulins from Plant Seeds: a Re-evaluation from Circular Dichroism Measurements [Journal] // International Journal of Biological Macromolecules. - 1985. - 2 : Bd. 7. - S. 105-108.
- Zum Felde T** Genetische Variation und Vererbung von Sinapinsäure-Verbindungen im Raps (*Brassica napus* L.) [Bericht] : Dissertation / Georg-August-Universität Göttingen. - Göttingen : [s.n.], 2005.

Publikationsliste

Poster

Adem, H., Pudel, F., Tressel, R.-P., Slawski, H., Schulz, C., 2010. Rapeseed Protein Applications: Aqua Feeds. NAROSSA®- 16th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology, June 07 – 08, 2010, Magdeburg, Germany

Adem, H., Tressel, R.-P., Pudel, F., Mörl, L., 2011. Rapeseed Protein Extraction Process for Aquafeed Use. 13th International Rapeseed Congress, June 05 – 09, 2011, Prague, Czech Republic

Adem, H., Slawski, H., Schulz, C., Tressel, R.-P., Pudel, F., 2011. Isolation and Characterisation of Rapeseed Protein for Use in Aquaculture Feeds. 9th Euro Fed Lipid Congress, September 18 – 21, 2011, Rotterdam, The Netherlands

Vorträge

Adem, H., Slawski, H., Schulz, C., Tressel, R.-P., Pudel, F., 2010. Rapsproteine in Aquakultur. Mitgliederversammlung des PPM e.V., November 12, 2010, Magdeburg, Germany

Adem, H., Slawski, H., Schulz, C., Tressel, R.-P., Pudel, F., 2010. Rapsproteinherstellung für Fischernährung. Symposium „Rapsproteine in der Fischernährung“, December 8, 2010, Magdeburg, Germany

Adem, H., Slawski, H., Schulz, C., Tressel, R.-P., Pudel, F., 2011. Preparation of Rapeseed Protein Products for Aquaculture Feeding. NAROSSA®- 17th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology, May 30 – 31, 2011, Poznan, Poland

Adem, H., Tressel, R.-P., Pudel, F., Slawski, H., Schulz, C., 2012. Methods for Producing a Protein Concentrate from Rapeseed as Alternative Fish Feeds for Aquaculture. NAROSSA®- 18th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology, June 04 – 05, 2012, Magdeburg, Germany

Adem, H., Tressel, R.-P., Pudel, F., Slawski, H., Schulz, C., 2012. Processing of Rapeseed into Protein Concentrates and their Usage in Aquaculture Nutrition. 10th Euro Fed Lipid Congress, September 23 – 26, 2012, Cracow, Poland

Proceedings

Adem, H., Tressel, R.-P., Pudel, F., Mörl, L., 2011. Rapeseed Protein Extraction Process for Aquafeed Use. 13th International Rapeseed Congress, June 05 – 09, 2011, Prague, Czech Republic

Adem, H., Slawski, H., Schulz, C., Tressel, R.-P., Pudel, F., 2011. Preparation of Rapeseed Protein Products for Aquaculture Feeding. NAROSSA®- 17th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology, May 30 – 31, 2011, Poznan, Poland

Forschungsberichte

Adem, H., 2011. Rapsproteinherstellung für die Fischernährung. Abschlussbericht zum Forschungsprojekt Nr. 41-7175.22-9-SH, Europäischer Fischereifonds (EFF), Zukunftsprogramm Fischerei in Schleswig-Holstein

Lebenslauf

Name	Halime Nihat Adem
Geburtsdatum	17.10.1984
Geburtsort	Razgrad, Bulgarien
Schulbildung	
1991 – 1998	Grundschule „Ivan Sergeevich Turgenew“, Razgrad, Bulgarien
1998 – 2003	Fremdsprachengymnasium „Exarch Jossif“, Razgrad, Bulgarien
Studium	
2003 – 2007	Universität für Chemische Technologie und Metallurgie (UCTM), Sofia, Bulgarien (Deutschsprachiger Studiengang, Verfahrenstechnik, Qualifikationsstufe “Bachelor of Science“, Berufliche Qualifikation Ing.) (Doppeldiplom UCTM, Sofia, BG – TUHH, Hamburg, DE)
	15.06.2007 – 15.09.2007, Bachelorarbeit Thema: „Untersuchungen zur eutektischen Zusammensetzung chiraler Systeme in Lösungsmitteln“, Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Andreas Seidel-Morgenstern, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg, Deutschland
2007 – 2008	Universität für Chemische Technologie und Metallurgie (UCTM), Sofia, Bulgarien (Deutschsprachiger Studiengang, Verfahrenstechnik, Qualifikationsstufe “Master of Science“, Berufliche Qualifikation Dipl.-Ing.) (Doppeldiplom UCTM, Sofia, BG – TUHH, Hamburg, DE)
	01.04.2008 – 30.09.2008, Masterarbeit Thema: „Partikelbewegung in Strahlschichten“ Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Lothar Mörl, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg, Deutschland
Berufslaufbahn	
2008 – 2011	Gesellschaft für Marine Aquakultur (GMA) mbH, Büsum, Deutschland Doktorandin Thema: „Herstellung von Rapsproteinprodukten für die Fischernährung“
seit 2012	Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg (PPM) e.V., Magdeburg, Deutschland Wissenschaftliche Mitarbeiterin