

MTÜ Taimsete Valkude Innovatsiooniklastri infopäev
Toimumiskoht: 27.aprill 2021. a. kell 10.00-14.00
veebikeskkonnas

Taimsete valkude eraldamine, kontsentreerimine ja omaduste iseloomustamine

Peeter Laurson
Peaspetsalist
Polli Aiandusuuringute keskus, Eesti Maaülikool



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa investeeringud
maapiirkondadesse



Eesti Maaülikool
Polli aiandusuuringute keskus

www.emu.ee

Taustast

Aastatel 2016–2017 moodustas EUROOPA LIIDU taimsete valkude nõudlus ligikaudu 27 miljonit tonni toorvalku.

Igal aastal impordib EUROOPA LIIT ligikaudu 17 miljonit tonni valku.

Veerandi taimse toorvalgu kogupakkumisest moodustavad Euroopa Liidus valgurikkad taimed mille toorvalgu sisaldus on üle 15% -di

- **õliseemned** (rapsiseeme, päevalilleseemned ja sojaoad)
- **kaunviljad** (oad, herned, läätsed, lupiin jne.)
- **söödakultuurid** (lutsern ja ristik)

Teraviljad ja rohumaa annavad küll koguseliselt suurema osa taimsete valkude kogupakkumisse, kuid nende valgu sisaldus on madal

[1]

2018. aasta aprillis võttis Euroopa Parlament vastu raporti, milles nõutakse strateegiat valgurikaste kultuuride edendamiseks.

Euroopa Liidus on kiirelt kasvamas (10-15% aastas) piima- ja liha asendajate turg, mis on loonud soodsa olukorra taimsete valkude keskkonnasäästlike eraldamistehnoloogiate arendamisele



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa Investeeringud
maapiirkondadesse



Eesti Maaülikool
Polli aiandusuuringute keskus

www.emu.ee

Olulisemad punktid taimsete valkude eraldamise tehnoloogiate arendamisel

1. Valgu eraldamise meetodi valik
2. Valgulise biomassi allika valik
3. Eraldatud valgu saagis ja puhtusaste fraktsiooniti.
4. Valgurikaste fraktsioonide, madala puhtusastmega fraktsioonide funktsionaalsed omadused.
5. Tööstuslikud rakendatavused- tootmise keskkonnamõju tootmishind ja jätkusuutlikkus.



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa Investeeringud
maapiirkondadesse

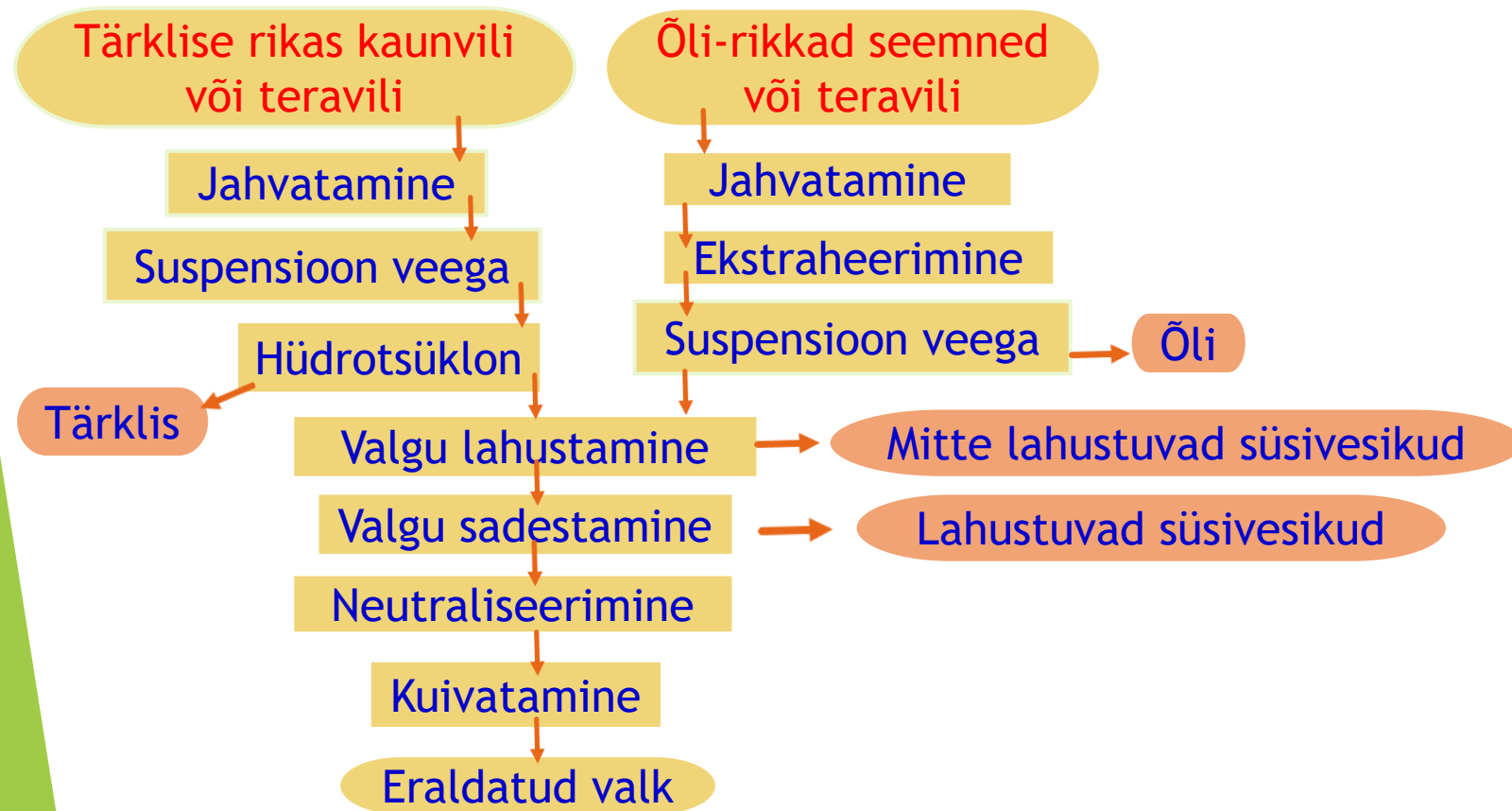


Eesti Maaülikool
Polli aiandusuuringute keskus

www.emu.ee

Valgu eraldamise meetod

1. määrg- eraldamine kemikaalidega



2. kuiv- fraktsioneerimine, veski ja õhk- separaatoriga



[2]

Märg-ja kuiv-eraldamise eelised

Märg-ekstraktsioon

1. Valgu sisaldus isolaadis on 90-95%, saagikusega 60-65%
 2. Isolaatidel on paremad funktsionaalsed omadused, kui kuiv-fraktsioonidel
 3. Enamik mitte-toidulisi komponente osaliselt desaktiveeritakse
- [5]

Kuiv-fraktsioneerimine

1. protseduurides ei vajata ei vett ega ka kemikaale
2. Säilib valkude loomulik funktsionaalsus
3. Säilivad lahustumatud valgud
4. Saab kasutada orgaaniliste toitade tootmiseks
5. Puudub vajadus kulutada energiat 1.jahu ja vee segamiseks; 2.valkude dehüdreerimiseks

[6]

Valgu tootmise efektiivsus=valgu koguse suhe tootmisesse investeeritud energiasse

Märg-ekstraktsioon

1. Vee kulu 50kg/kg või 90kg/kg õlirikkast kaunviljast toodetud valgu kohta :
(1. jahu lahustamine; 2. pihustuskuivatamine)
2. Pihustuskuivatus-energia kulu 54 MJ/kg toodetud valgu kohta
3. Tootmise efektiivsus: 14,6 g herne valku MJ kohta (vrdl. loomsed tooted annavad 4-11g valku MJ kohta)

Kuiv-fraktsioneerimine

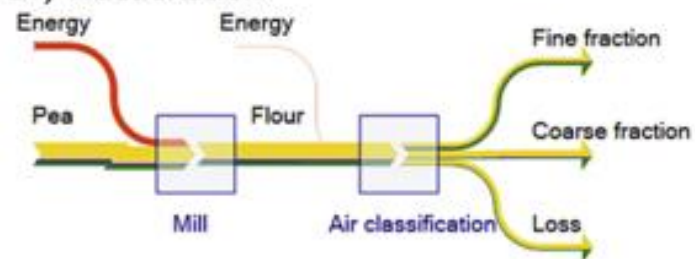
1. Puudub vee kulu
2. Energia kulu: 3.6 MJ/kg toodetud valgu kohta
3. Tootmise efektiivsus: 55,8 g herne valku MJ kohta (kaunviljadel 41-77g valku MJ kohta)

[7]

Keskkonnasäästlik valgu eraldamine toidu tootmiseks peaks põhinema efektiivsel kuiv-fraktsioneerimisel

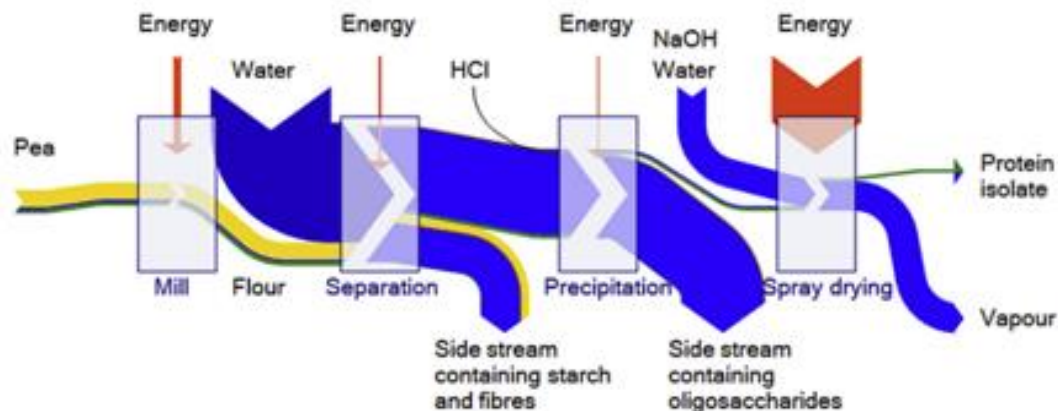
Sankey diagrammid kuiv-fraktsioneerimise ja määrg-eraldamise kohta

Dry fractionation



Scale			
Mass			
	2000 kg	300 kg	70 kg
Energy			
	2000 MJ	300 MJ	80 MJ

Wet fractionation



[8]

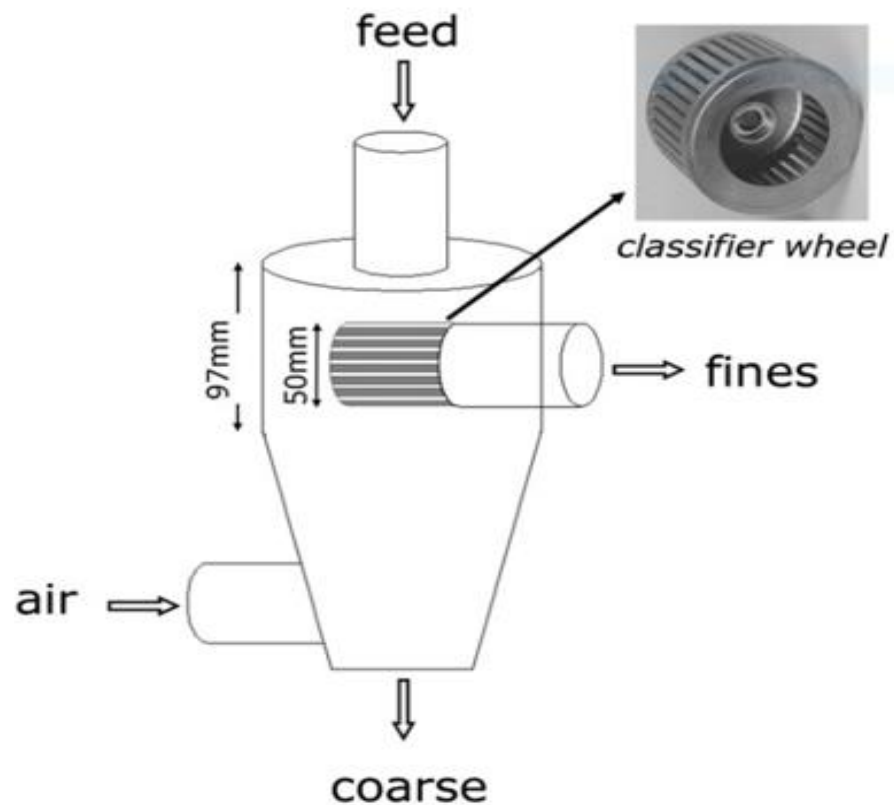
Valgu eraldamine kuiv-fraktsioneerimise teel

- ▶ Protseduurid: jahvatus fraktsioonideks ja valgu õhuga eraldamine osakeste suuruse järgi.
- ▶ Eeltöötlus: kuivatamine ($>60\text{ }^{\circ}\text{C}$); krüogeenne jahutamine, UV-töötlus ja osoneerimine; ka töötlemine kemikaalidega nagu CaCl_2 või ensüümidega [10]
- ▶ Toodet, mis saadakse kuiv-fraktsioneerimisel, iseloomustavad: **valgu kontsentratsioon, saagis, valgu eraldamise efektiivsus ja jahu muudetavus valgu fraktsiooniks** [9]
- ▶ Protsessi saagis suureneb, siis valgu fraktsiooni puhtus sageli vastavalt väheneb [11]

Jahvatus

- ▶ Valgu kontsentraatide tootmiseks kuiv-separatsiooniga on vaja valmistada väga peeneks jahvatatud jahu, osakeste suurus $<40\text{ }\mu\text{m}$. Kasutatakse nõel-, löök- või jugaveskit.
- ▶ Jugajahvatusel kiirendatakse osakesi suure kiiruselise õhujoaga ja suuruse vähenemine toimub osakeste-vaheliste kokkupõrgete käigus. Jugajahvatuse eelisteks on jahvatuse suur efektiivsus ning efektiivne lagunemine tärkliseks ja valguks.
- ▶ Sageli korraldatakse kaunviljade jahvatust ja kuiv-fraktsioneerimist tsükliliselt, et suurendada saagist ja individuaalsete fraktsioonide puhtust. Sellisel juhul saadakse esimesest tsüklist valgurikas ja tärkliserikas fraktsioon. Tärkliserikas fraktsioon jahvatatakse ja uuesti eraldatakse õhuga 2 fraktsiooni [11]
- ▶ Jahvatamise metoodikat, on võimalik paremaks muuta, 1.mõistes seemne morfoloogiat ja käitumist tema purunemisel kokkupõrke või deformatsiooni korral, 2. jahvatades, ilma tärklis vigastamata 3. eeltötlustega või 4.kasutades kaunviljade sorte, mis paremini sobituvad kuiv- fraktsioneerimisega [12]

Õhk-separaator



Eraldab materjale lähtudes nende erinevast **suurusest, kujust ja tihedusest**.

See masin töötab paisates materjali kambrisse, mis sisaldab kerkivat õhku.

Erineva suuruse ja kuju tõttu liiguvad osakesed erinevalt õhusambas, mõjutatuna gravitatsioonist ja õhu üleslükkejõust, jaotu-des vertikaalselt [5]

Klassifikaatori ratta optimaalset kiirust valgu eraldamiseks erinevast materjalist tuleb 4000 rpm

Veskid



Nõelveskis toimub osakeste peenestamine suurel kiirusel pöörlevate nõelketaste vahel



Löökveski või õhk-eraldamise veskis toimub osakeste suuruse vähenemine lüües vastu pöörlevaid jahvatuselemente ja seisvat vooderdist.

Pöörlemiskiirus 140 m/s, peenestusaste kuni $d = 10 \mu\text{m}$.
Osakesed läbivad klassifikaatoriratta ja väljuvad veskist.

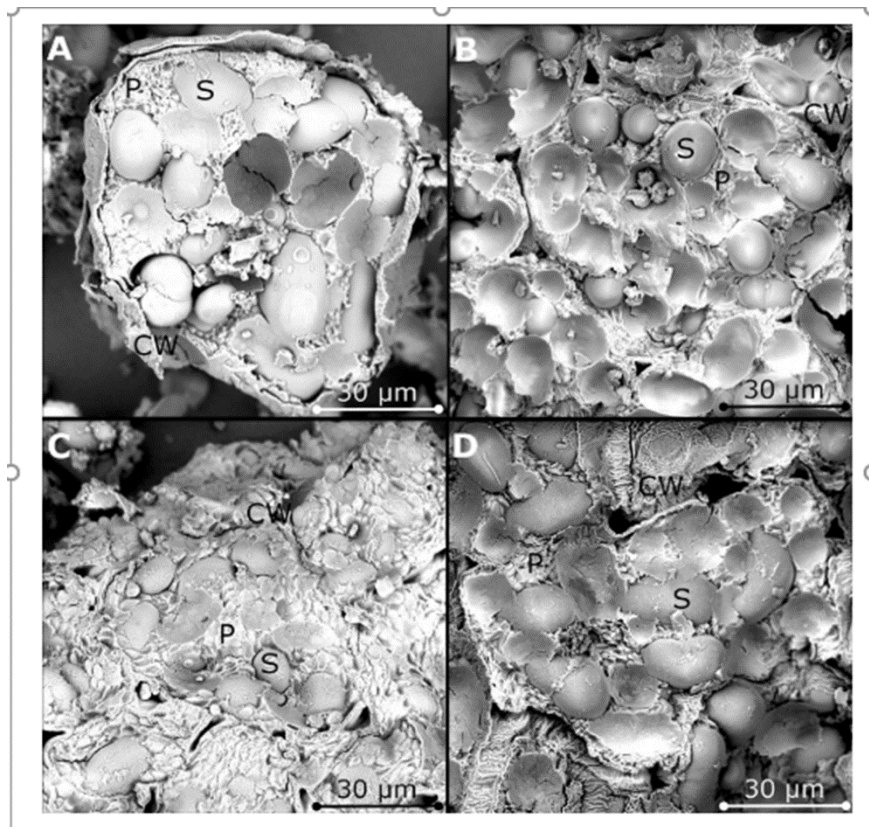
Õhuga klassifitseerimise alternatiivid

- ▶ **Sõelumine**- see põhineb osakeste suuruse erinevusel. Tavaliselt kasutatakse väheneva suurusega sõelaavadega sõelte pakki. Selle tehnika puuduseks on sõela ummistumine, mida nimetatakse ka sõela pimestamiseks [14]
- ▶ **Elektrostaatiline eraldamine**- viiakse läbi kahes etapis: esmalt osakesed laetakse ning seejärel eraldatakse laetud osakesed elektrivälja abil [15]
- ▶ **Hõõrde-ehk tribo-elektrostaatiline eraldamine**, kehad omandavad hõõrdumisel hõõrdeelektrilaengu. Nii fraktsioneeritakse kaunvilja jahu valgurikkaks ja süsivesikute rikkaks fraktsiooniks. Sellist meetodit rakendades on saadud 15% kõrgema valgusisaldusega fraktsioon, kui tavalise õhk- separatsiooniga [16]

Valgulise biomassi allika valik

1. Tera- ja kaunviljade, valgud asetsevad valgu kehakestes - lihtne eraldada ning saavutada suurt tootlust ja puhtusastet. Õlirikastel kultuuridel on enne kuiv-fraktsioneerimist vajalik eelnevalt vabaneda õlist.
2. Teraviljad sisaldavad vaid 10-12% valku. Teravilja valgud on rikkad väävlit sisaldavatest aminohapetest, põhjustades disulfiidsete sidemete tekkimise- väheneb valgu lahustuvus [3]. Prolamiinid peamised säilitusvalgud enamikes teravilja seemnetes võivad olla tugevad allergeenid [4].
3. Kaunviljad sisaldavad 20-25% valku (globuliinid, albumiinid) Fraktsioneerimisel kõrgem saagis, võrreldes teraviljadega.
4. Kaunviljadest saadud kõrge valgusisaldusega fraktsioonid on küllaltki funktsionaalsed võrreldes teiste valguallikatega ja nende töötlemist peetakse ökonoomiliselt jätkusuutlikuks [3].
5. Valgu kvaliteeti hinnatakse aminohapete seeduvuse hindega (PDCAAS) [4].

Herne (A), oa (B), kikerherne (C) ja lääts (D) morfoloogia.



Valgukehad (P) ja tärgklise graanulid S on eristatavad
Kikerherne puhul on õli kuiv-eraldamist takistavaks
faktoriks

Proteaasi inhibiitorid

- ▶ Kaunviljade mittetoidulised faktorid on jaotatud mitmesse gruppi vastavalt nende keemilistele ja füüsikalistele omadustele, nagu näiteks mitte valgulised aminohapped, teatud alkaloidid, tsüanogeensed glükosiidid, isoflavoonid, tanniinid, oligosahhariidid, saponiinid, fütiinid, lektiinid või **proteaasi inhibiitorid** [16]
- ▶ Traditsiooniliselt kuuluvad **proteaasi inhibiitorid** kahte põhilisse klassi: Kunitzi trüpsiini inhibiitor (sojas) ja Bowman-Birk'i trüpsiini/ kumotrüpsiini inhibiitorid (teistes kaunviljades).

Viimased mõjutavad valgu seeduvust. Põlduba sisaldab vitsiini ja konvitsiini, mis võivad põhjustada vererakkude biokeemiliste kõrvalekallete tõttu hemolüütilist aneemiat. [2]

- ▶ Paljud mittetoidulised faktorid on **mürgised, vastumeelsed** või **mittesöödavad**, seega püütakse neist vabaneda valides vastavaid taime genotüüpe või töödeldes taimi pärast koristust (idandades, keetes, leotades, fermenteerides, ekstraheerides)

Funktsionaalsed omadused

- ▶ Valgutoote **hind** sõltub tema funktsionaalsetest omadustest ja traditsioonilisest kasutusest toidutoodetes, aga ka valgusisaldusest.
- ▶ Üldine trend on, et **isolaatidel ja kõrgema puhtusega fraktsioonidel on paremad funktsionaalsed omadused ja maitse** kui vähem puhastatud fraktsioonidel. Seega, maitsete ja aroomide lisamine, aroomainete ja valkude vaheliste ühendite tekkimise arvestamine ja maitsete peitmine pakuvad toidutootjatele uusi väljakutseid [19]
- ▶ Samas on valkude ja ülejäänud komponentide vahel **sünergilisi mõjusid**, mis võimaldavad uudseid tehno-funktsionaalseid omadusi.
- ▶ Tehno- funktsionaalsetest omadustest on kõige olulisemal kohal **valgu lahustuvus**, millele järgneb **vahustatavus, emulgeeruvus**, ja lõpuks **geelistumine**. Suuremad õli kogused halvendavad vahustamisomadusi, samas, suurem kogus vett siduvaid kiudaineid parandab valgufraktsioonide geelistumist [18]

Taimekasvatus

- ▶ Siiani on aretatud kaunvilja sorte, millel on **suurem valgu sisaldus**.
- ▶ **Suuremate tärklise graanulitega, või pehmemate seemetega sordid** vähendavad jahvatuse vajadust. Need soodustavad tärklisegraanulite ja valkkehakeste kergemat eraldamist, mis suurendavad jahuosakeste suurust, ühtlasi suurendades hajutatavust ja suurendades valgu rikastamist.
- ▶ **Väiksem kiudaine hulk ja sitkem kiudaine** on jahvatuseks sobilikum. Suur kiudainehulk suurendab rakuliste komponentide kleepuvust, nõudes jahvatuse käigus väiksemaid valgu osakesi tärklise graanulitest eraldumiseks. Tekib vajadus jahvatada kiudained liiga peenikeseks ja need sisenevad peenesse- valgufraktsiooni [19]

Kaunviljade võrdlus

Kultuur	Valgu-sisaldus %	Õli	Kuiv-fraaktsio- neerimise saagis / Valgu-sisaldus	Valk- keha läbi- mõõt (µm)	Tärklise- graanuli suurus (µm)	Seemne tugevus (N)	Osakese tihedus (kg/m ³)	Mitte- toidulised ained	Märkused rakendused
Hernes: aed- ja põld- hernes	Globuliin (55-65%), Albumiin (18-22%)	2%	22–35/ 50-63%	17	26	210	1441	Fütiinid- vähendavad Zn, Fe ja Ca absorptiooni	liha- ja muna-valgu asendajaks, makaroni- toodetesse; hea lahustuvusega
Uba: aed- ja põlduba	Globuliin 45-70%, Albumiin 10-30%	1-4%	21–33/ 55-75%	15	25	126	1427	Fütiinhape ja letsitiin, mis vähendavad valgu seeduvust	jahu kasutatakse nisujahu asendajana pastad, pagari- tooted, antibakteriaalne
Lääts	26	2%	22–26/ 57-65%	12	25	31	1437	Trüpsiini inhibiitorid, tanniinid, fütiinid	õlivabana paremad emulgeerivad, vahustumis- omadused, kui soja valgu kontsentraadil

Teraviljade võrdlus

Kultuur	Valgu-sisaldus %	Kuiv-fraktsioneerimisel saadud valgusisaldus	Märg ekstraktsioonil saadud valgu-sisaldus	Õli	Mitte- toidulised ained	Märkused rakendused
Hirss Valge/kollane	Globuliin, gluteliin, prolamiin	46-63%	80	2-5%	Fütiinhape 1,31	parem emulgeeruvus , vahustuvus ja vahu stabiilsus, kui soja valgu kontsentraadil
Kaer	albumiinid, globuliinid 80%, Prolamiinid=aveniinid	Jäme fraktsioon sisaldab 15% valku, 48% tärklis ja 5% β -glükaani, peenike-9% valku, 60% tärklis and 1% β -glükaani, 2-5% väga peenikest fraktsiooni, 83-88%-valku	59- 75 trüptofaan laguneb hüdrolyüsi käigus	7%	fosfolipiididest lipaasiga tekkinud küllastumata rasvhapped- seebi maitse, reaktsioonil lipoksügenaasiga rasvhappe hüdroperoksiidid, millest edasi tekivad lenduvad rasvhappe laguproduktid nagu heksanaal, tekitavad haisu	Kuumutamine vähendab prolamiinide ja albumiinide omastatavust 50%, funktsionaalsust, , õrn maitse

[20]

Valgu eraldamise katse läbi viimine



NEUMAN & ESSER Process Technology GmbH

Werkstraße o. Nr.

52531Übach-Palenberg, Germany

Firma üheks tegevusalaks on peenestusseadmete ja kuivfraksioneerimisseadmete tootmine.

Kaerast ja hernest valgu eraldamise katse viidi läbi ettevõtte katsekojas



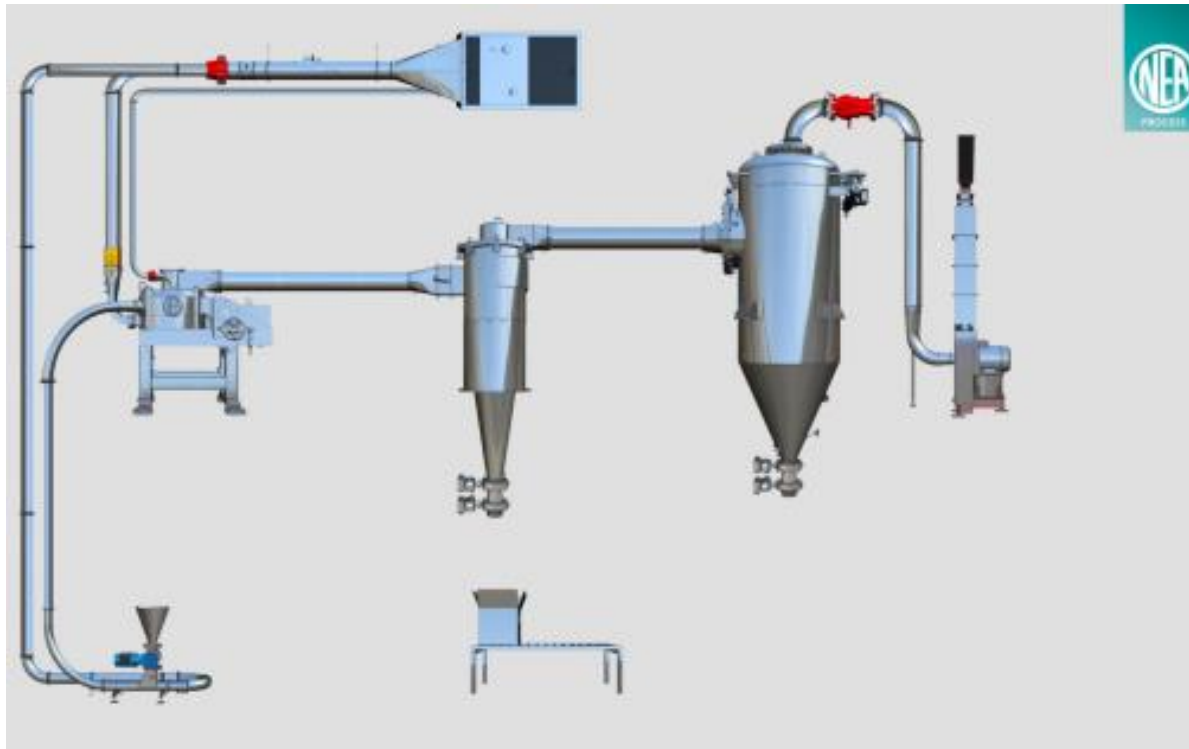
Katse läbi viimiseks kasutati
15 kg kooritud kaera „Kusta“ ja 15 kg koorimata põldhernest „Kirke“

Katse plaan:

1. Kaer ja põldhernes peenestatakse ja jahvatatakse valguosakesi eraldada võimaldava peensuseni (millise peensuseni on vajalik jõuda selgub katse käigus)
2. Kuiv fraktsioneerimine (eesmärk on saavutada 1. kõrge valgusisaldusega fraktsioon ja 2. valgusisaldusega fraktsioon)

NEUMAN & ESSER Process Technology GmbH-s läbi viidud valgu kuivfraktsioneerimise katsete tulemused

Jahvatamine viidi läbi seadmega ICM328 (1919) eesmärk oli saavutada peensus 45 μm



NEUMAN & ESSER
Process Technology GmbH

Overview of mill chamber:

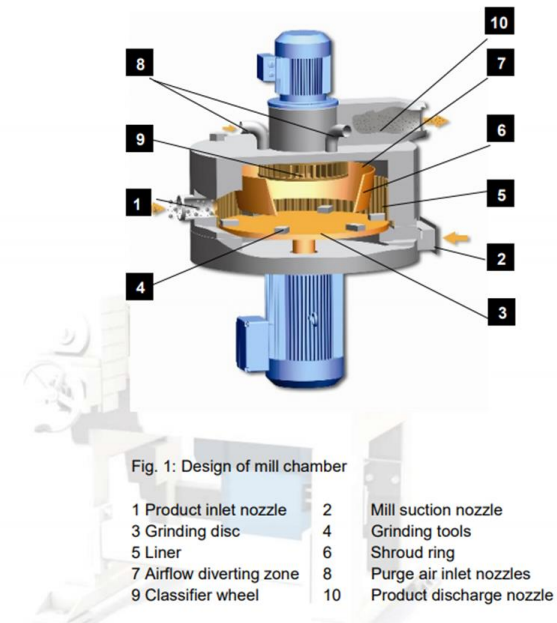
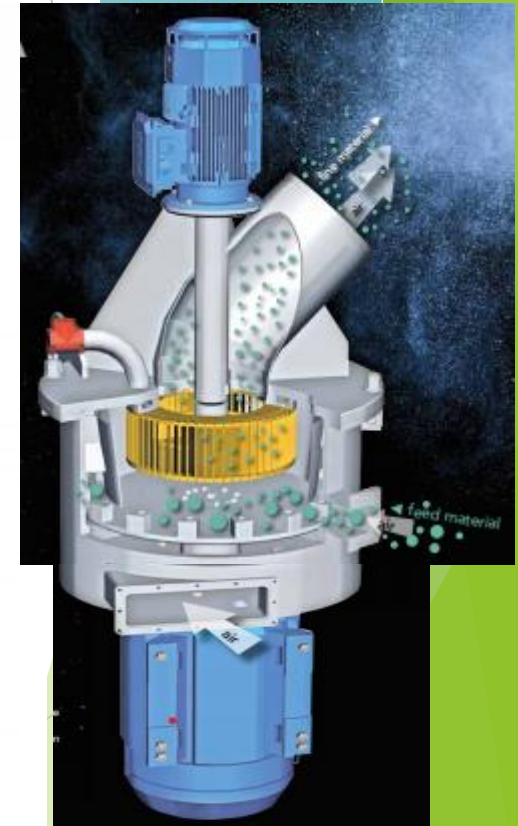


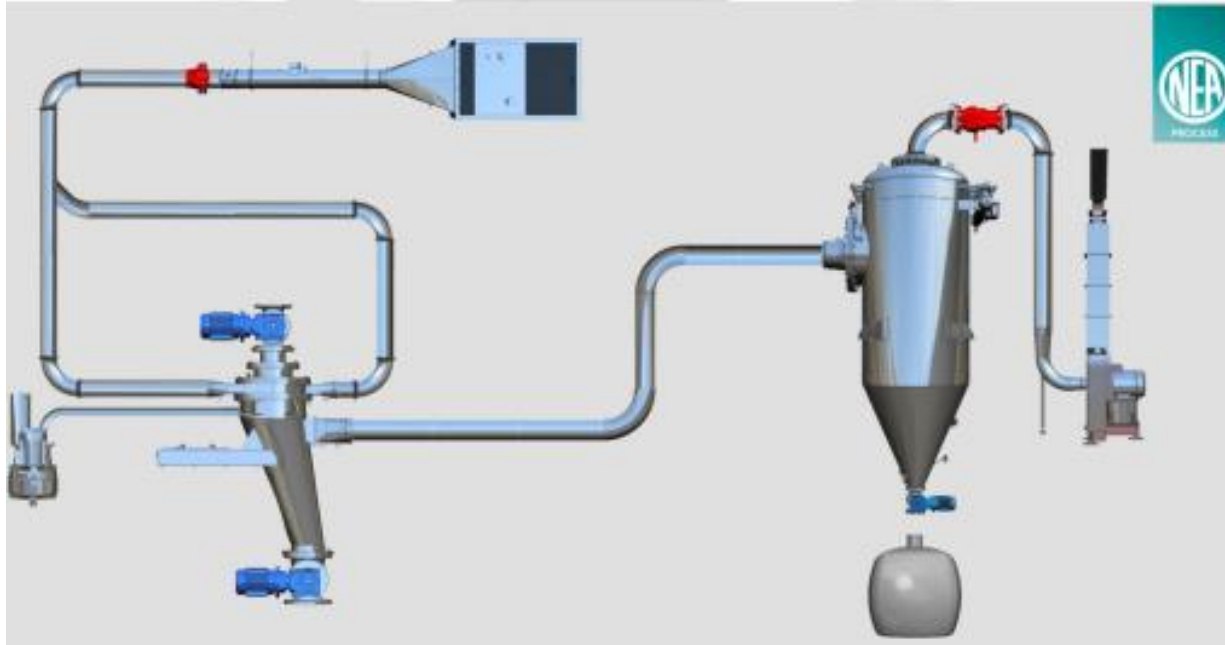
Fig. 1: Design of mill chamber

- | | |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1 Product inlet nozzle | 2 Mill suction nozzle |
| 3 Grinding disc | 4 Grinding tools |
| 5 Liner | 6 Shroud ring |
| 7 Airflow diverting zone | 8 Purge air inlet nozzles |
| 9 Classifier wheel | 10 Product discharge nozzle |



ICX seeria seade ICM (impact classifier mill) kujutab endast jahvatusseadet kus toimub ka jahvatatud osakeste klassifitseerimine. Osakeste jaotamine toimub kambris tekitatud negatiivse rõhu tingimustes.

Seadmega GRC430 (1920) viidi läbi valgu eraldamine



Valgu osakeste eraldamine toimub osakeste suurusjaotuse põhimõttel.



<https://youtu.be/bpLuOms8rwk?t=23>

Osakeste suuruse jaotumist /toote peensust mõõdeti laserdiffraktsiooniga
(NEA-Malvern Mastersizer 2000, kuival meetodil)



Test overview:

1919 ICM

no.	product	time (min)	through put (kg/h)	grinding disk [m/s]	grinding disk (kW)	classifier wheel [m/s]	d50 [µm]	d90 [µm]	d97 [µm]
1	peas	62	14,4	130	6,4	15	18,40	36,10	45,20
2	oats	85	8,9	130	4,6	15	39,50	187,20	273,50

1920 GRC

no.	product	time [sec]	throughput [kg/h]	classifier wheel [m/s]	classifier wheel [kW]	discharge GRC [%]	discharge filter [%]	material	d50 [µm]	d97 [µm]	d99 [µm]
1	oats	330	124	60	1,8	78,95	21,05	fine	8,50	71,30	98,70
								coarse	33,10	240,00	280,80
2	oats	270	115	40	1,1	82,08	17,92	fine	14,00	120,10	155,50
								coarse	41,60	257,60	301,60
3	peas	212	237	60	1,8	74,29	25,71	fine	9,00	48,20	76,90
								coarse	23,00	52,30	61,20

Kuivalt valgu eraldamine toimus kahes etapis

- 1) Jahvatamine valgu ja tärglise osakesteks suuruseni
- 2) Eraldamine osakeste suuruse järgi

Valguosakesed jahvatuvad väiksemateks osakesteks kui tärgliseosakesed ja seetõttu on neid võimalik eraldada peenfraktsioonina.

Kuid see nõuab jahvatamise põhjalikku optimeerimist. Selliselt, et valk jahvatatakse peeneks, kuid tärglise graanulid pole kahjustatud.

Lisaks tulebki kindlaks teha on täpne nn. lõikepunkt mis annab parima saagise / valgusisalduse suhe.

Selles konkreetses testis oli piiratud koguses materjali (15 kg kaera ja herneid). Seetõttu ülalkirjeldatud protsess viidi läbi tuginedes varasematele kogemustele sarnastega toodetega.

Materjalist saadi järgmised fraktsioonid ja vastavate valgu ja tärklise sisaldusega

herne jämefraktsioon kambrist (1920 TEST 3 GRC) ~ 10,4 kg
valk $6,91 \pm 0,21$; tärklis 36,6 (g/100g)

herne peenfraktsioon kambrist (1920 TEST 3 PF)~ 1,7 kg
valk **$33,08 \pm 0,99$** (g/100g) ehk 0,562 kg ; tärklis 19,5 (g/100g)
valk filtrist 2,17 kg

Fraktsioon kokku $1,7 + 2,9 = 4,6$ kg

Valk kokku $0,562 + 2,17 = 2,73$ kg

Kokku peenfraktsioonis valku **59,34%**

kaera jämefraktsioon kambrist (1920 TEST 2 GRC) ~7,1kg
valk $9,97 \pm 0,30$; tärklis 61,3 (g/100g)

kaera peenfraktsioon kambrist (1920 TEST 2 PF)~0,65 kg
valk $12,42 \pm 0,37$; starch 64,0 (g/100g)



Täna !



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa Investeeringud
maapiirkondadesse



www.emu.ee
Eesti Maaülikool
Polli aiandusuuringute keskus

Kirjanduse loetelu

1. EUROOPA KOMISJONI ARUANNE NÕUKOGULE JA EUROOPA PARLAMENDILE taimsete valkude kasutuse arendamise kohta Euroopa Liidus COM(2018) 757 final. Brüssel, 2018.
2. Boye, J., Zare, F. & Pletch, A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431 (2010).
3. Hagberg, K. L., Yurgel, S. N., Mulder, M. & Kahn, M. L. Interaction between nitrogen and phosphate stress responses in *Sinorhizobium meliloti*. *Front. Microbiol.* 7, (2016).
4. Hughes, G. J., Ryan, D. J., Mukherjea, R. & Schasteen, C. S. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12707–12712 (2011).
5. Klupšaitė & Juodeikienė, G. Legume: composition, protein extraction and functional properties. A review. (2015). doi:10.5755/j01.ct.66.1.12355
6. Berghout, J. A. M., Pelgrom, P. J. M., Schutyser, M. A. I., Boom, R. M. & Van Der Goot, A. J. Sustainability assessment of oilseed fractionation processes: A case study on lupin seeds. *J. Food Eng.* 150, 117–124 (2015).
7. Schutyser, M. A. I. & van der Goot, A. J. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science and Technology* (2011). doi:10.1016/j.tifs.2010.11.006
8. Schutyser, M. A. I., Pelgrom, P. J. M., van der Goot, A. J. & Boom, R. M. Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. *Trends Food Sci. Technol.* (2015). doi:10.1016/j.tifs.2015.04.013
9. Tyler, Youngs, S. air classification of legumes. (1981).
10. Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C. & Abecassis, J. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *J. Cereal Sci.* 46, 327–347 (2007).
11. Létang, C., Samson, M. F., Lasserre, T. M., Chaurand, M. & Abécassis, J. Production of starch with very low protein content from soft and hard wheat flours by jet milling and air classification. *Cereal Chem.* 79, 535–543 (2002)
12. Topin, V., Radjaï, F., Delenne, J. Y., Sadoudi, A. & Mabilie, F. Wheat endosperm as a cohesive granular material. *J. Cereal Sci.* 47, 347–356 (2008).

Kirjanduse loetelu

13. Maaroufi, C. *et al.* Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. I. Physical and chemical characteristics of pea seed fractions. *Anim. Feed Sci. Technol.* **85**, 61–78 (2000).
14. Hemery, Y. *et al.* Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part II: Electrostatic separation of particles. *J. Cereal Sci.* **53**, 9–18 (2011).
15. Wang, J., Zhao, J., De Wit, M., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. I. Lupine protein enrichment by milling and electrostatic separation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **33**, 596–602 (2016).
16. Enneking. towards the elimination of antinutritional factors. (2000).
17. Geerts, M., van Veghel, A., Zisopoulos, F. K., van der Padt, A. & Jan van der Goot, A. Exergetic comparison of three different processing routes for yellow pea (*Pisum sativum*): Functionality as a driver in sustainable process design. *J. Clean. Prod.* **183**, 979–987 (2018).
18. Egbert and Borders. Achieving success with meat analogs. (2006).
19. Pelgrom, P. J. M., Wang, J., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. I. Pre- and post-treatment enhance the protein enrichment from milling and air classification of legumes. *J. Food Eng.* (2015). doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.01.005
20. Pelgrom, P. J. M., Boom, R. M. & Schutyser, M. A. I. Method Development to Increase Protein Enrichment During Dry Fractionation of Starch-Rich Legumes. *Food Bioprocess Technol.* (2015). doi:10.1007/s11947-015-1513-0