

Datum: 28-3-2018

Projectgegevens	
Projecttitel	Circulair ontwerp voor lupeol extractie uit reststromen van industriële lupine verwerking vergeleken met concurrerende processen.
Projectnummer	CE.01.082
Penvoerende hogeschool	Hanzehogeschool Groningen

Contactgegevens projectleider	
Naam	Dr.ir. Rob van Haren
E-mail	r.j.f.van.haren@pl.hanze.nl
Telefoonnummer	+31621082110

Algemeen	
<p>Publieksvriendelijke samenvatting over resultaten project. (wordt gepubliceerd op POdium)</p>	<p>Lupineschillen (lupine zaadhuid) zijn een reststroom van lupineverwerking. Lupineschillen vormen 25% van de totale biomassa van de lupineboon, terwijl sojaschillen slechts 5% van de totale biomassa van de sojaboon zijn. Er zijn onvoldoende rendabele toepassingen voor lupineschillen waardoor de rentabiliteit van de lupine supply chain achter blijft bij de veel competitievere soja supply chain.</p> <p>Lupineschillen zijn rijk aan de actieve stof lupeol waarvan recent farmaceutische en cosmetische anti-aging werkingen zijn vastgesteld, waaronder anti-tumor werking. Lupeol komt naast lupine ook in hoge concentraties voor in berkenbast. Berkenbast bevat bovendien een chemische voorloper van lupeol namelijk betuline. Recentelijk is er een chemische syntheseroute ontwikkeld voor lupeol op basis van betuline. Als deze syntheseroute kosteneffectief is, dan kan deze route de ontwikkeling van nieuwe toepassingen van lupineschillen blokkeren.</p> <p>Het doel van deze studie is het opstellen van een circulair ontwerp voor lupeol extractie uit twee reststromen met behulp van superkritische CO<sub>2</sub> extractie en de kosteneffectiviteit van deze circulaire ontwerpen met elkaar vergelijken voor het selecteren van het meest optimale proces voor lupeol extractie en/of synthese. Bovendien worden mogelijke cosmetische anti-aging effecten van lupeol getest.</p> <p>Met behulp van superkritische CO<sub>2</sub> extractie is het mogelijk om lupeol kosteneffectief uit lupineschillen te extraheren. De alternatieve syntheseroute van lupeol uit betuline zoals deze in de wetenschappelijke literatuur was gepubliceerd bleek niet reproduceerbaar te zijn. Patentliteratuur leverde een reproduceerbare syntheseroute. Vergelijking van de twee routes was nog niet mogelijk vanwege de lage omzetting efficiënties van de syntheseroute. Daarnaast zijn er mogelijke intellectuele eigendom issues. De effectiviteit van lupeol is in vitro en in vivo getest. Hieruit bleek dat lupeol in tegenstelling tot de literatuur minimale effecten had op huidcellen. De huidelasticiteit bij proefpersonen nam enigszins toe na gebruik van een cosmetische formulering met lupeol. Uit onze studie is gebleken dat we kosteneffectief lupeol kunnen extraheren met behulp van superkritische CO<sub>2</sub>, dat de alternatieve routes voor lupeol synthese nog niet mogelijk zijn en dat we enige anti-aging effecten van lupeol hebben kunnen vinden bij toepassing in cosmetische producten.</p>

Algemeen	
<p>Kort verslag van het verloop van het project sinds de voortgangsrapportage. (max. 300 woorden)</p>	<p>Het project bestond uit 4 onderdelen, hier worden de voornaamste bevindingen gerapporteerd:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Superkritisch CO2 extractieproces (SFE) voor lupeol uit lupineschillen Er is een SFE-proces voor extractie van lupeol uit lupineschillen ontwikkeld. Met behulp van een experimenteel design zijn de optimale SFE-condities vastgesteld (400 bar, 40 gCO<sub>2</sub>/min en 3uur extractie). De SFE-extractie is vergeleken met conventionele hexaan extracties waarbij vergelijkbare opbrengsten werden verkregen.</li> <li>2) Chemische syntheseroute van lupeol uit betuline Bij aanvang van het project as er een artikel in de wetenschappelijke literatuur verschenen over synthese van lupeol uit betuline. Het reproduceren van deze gepubliceerde methode bleek niet mogelijk. Op basis van twee verschillende patenten is op papier een nieuwe synthese route ontwikkeld en in het lab getest. Het bleek mogelijk om in twee reactie stappen lupeol te synthetiseren uit betuline, echter de omzetting efficiënties zijn nog niet hoog genoeg voor een economisch verantwoord proces.</li> <li>3) Gevalideerde anti-aging in-vitro test met fibroblasten Er zijn met huid fibroblasten testen uitgevoerd met lupeol. De huidcellen bleken niet goed op lupeol te reageren, terwijl de controle met genisteine wel goed verliep. Cosmetische formuleringen met lupeol zijn ontwikkeld en getest bij een beperkt aantal vrijwilligers. Cosmetisch gebruik van lupeol in huid crèmes liet hier een lichte verhoging in huidelasticiteit zien na gebruik van 4 weken op de binnen onderarm.</li> <li>4) Technisch-economische evaluatie van twee concurrerende processen en circulair ontwerp business case Met behulp van proces technische software is de kostprijs van lupeol SFE-extractie berekend. Vergelijken met de betuline route was niet mogelijk (zie boven). Lupeol is kosteneffectief te extraheren uit lupineschillen bij een kostprijs van maximaal 7€/kg lupineschillen en een lupeol extractie efficiëntie van minimaal 0,27%. De wereldmarktprijs van lupeol is ca 5000€/kg. De lupineschillen zijn na de SFE extractie geschikt als “ontvet waterbindende voedingsvezel” en kunnen zonder verdere bewerking voor de voedingsmarkt verkocht worden.</li> </ol>

Vraagsturing
Hoe heeft het onderzoek bijgedragen aan het oplossen van de vragen uit het veld? (max. 100 woorden)
<p>De onderzoeksvraag uit het werkveld was: “Kunnen we een kosten concurrerend circulair ontwerp ontwikkelen voor “groene” en farma-grade lupeol extractie uit lupineschillen in vergelijking met alternatieve processen en grondstoffen en de effectiviteit van deze lupeol extracten testen met in-vitro-bio-assays.” Met het onderzoek hebben we de volgende vragen van het werkveld beantwoord:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Het is mogelijk om kosteneffectief lupeol uit lupineschillen te extraheren en een circulair ontwerp te maken, verder onderzoek moet een mogelijke investering gaan onderbouwen</li> <li>2) Het is mogelijk om lupeol uit betuline te maken, echter dit proces is nog niet volmaakt. Verder onderzoek moet de efficiënties hiervan verhogen</li> <li>3) Lupeol is effectief als anti-aging cosmetische inhoudstof en het is mogelijk hier producten mee te formuleren</li> </ol>

**Netwerkvorming**

Op welke manier hebben de netwerkpartners bijgedragen in de projectresultaten? (max. 100 woorden)

De netwerkpartners hebben het lupeol SFE proces begeleid (FrankFood), de grondstoffen hiervoor geleverd en de ontvette lupineschillen als nieuw voedingsproduct getest. De netwerkpartners Syncom en Offichem hebben actief patentonderzoek uitgevoerd voor het vinden van alternatieve hypothesen voor lupeol synthese uit betuline. Het resultaat was twee patenten die te combineren zijn tot een nieuw lupeol synthese proces. Daarnaast zijn de netwerkpartners betrokken geweest bij de technisch economische analyse door onder andere wereldmarktprijzen voor lupeol en betuline te onderzoeken.

**Innovatie**

Welke concrete resultaten en inzichten zijn tot stand gekomen? (max. 300 woorden)

De volgende concrete resultaten en inzichten zijn tot stand gekomen:

- 1) SFE-extractie van lupeol  
 er zijn met behulp van een box-behken design of experiments en response surface modelling benadering optimale procescondities gevonden voor lupeol extractie uit lupineschillen en deze zijn vergeleken met conventionele extractie met behulp van hexaan. De optimale extractie condities zijn 400 bar, 40 gCO2/min en 3uur extractie waarbij ca 100-120% van de conventioneel beschikbare lupeol werd geëxtraheerd (vergeleken met de soxhlet hexaan methode). Het gebruik van co-solvents (bio-ethanol) verhoogde de extractie efficiëntie niet. Het lupeol was eenvoudig met één reactiestap uit het extract te isoleren in de vorm van witte kristallen met hoge zuiverheid (>95%)
- 2) Lupeol synthese uit betuline  
 In de wetenschappelijke literatuur was een route voor lupeol synthese gepubliceerd. Deze route is nagewerkt maar de resultaten waren niet reproduceerbaar.

S. Liu et al. / Industrial Crops and Products 74 (2015) 494–496

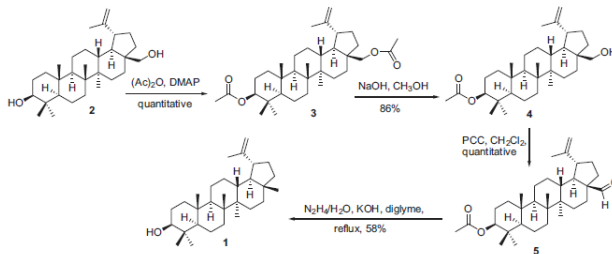


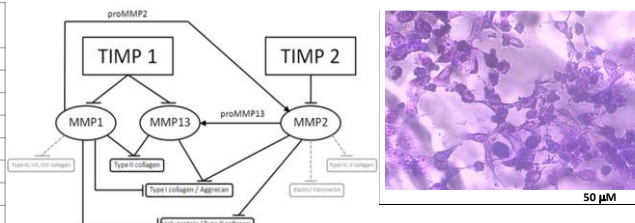
Fig. 1. Semi-synthetic route of lupeol (1) from betuline (2).

Patent onderzoek leverde door

combinatie van meerdere papenten een mogelijke alternatieve route op die is nagewerkt. Echter de efficiënties zijn nog niet hoog, verder onderzoek moet uitwijzen of dit een haalbare route is. Deze route wordt vooralsnog nog niet gerapporteerd vanwege vertrouwelijkheid.

- 3) Lupeol effectiviteit assays.  
 Er zijn twee bioassays in vitro ontwikkeld en uitgevoerd. Dit zijn een fibroblasten huidtest en testen voor genexpressie voor remming van vorming van collageen in de extracellulaire matrix.

Expressie van:	Na stimulatie van lupeol (0-100 µM)	Na stimulatie van genisteïne (0-100 µM)
Coll 1a1	Afname	Toename (25-50 µM)
Coll 3a1	Afname	Toename (25-50 µM)
FN	Afname	Afname
MMP-1	Afname	Toename (25-50 µM)
MMP-3	Onduidelijk	Geen resultaat
TIMP-1	Toename	Geen resultaat
Casp 1	Onduidelijk	Onduidelijk
Casp 4	Onduidelijk	Onduidelijk



Lupeol bleek negatief, geen of nauwelijks effect te hebben op de genexpressie tov controle genestein en de huidcellen reageerden niet normaal bij 50 uM blootstelling. In-vivo huidelasticiteit en huid hydratatie zijn bij een kleine groep vrijwilligers bepaald met behulp van niet-invasieve huidanalyses.

- 4) De business case voor lupeol SFE extractie is positief bij een maximale kostprijs van 7€/kg en een extractie efficiency van minimaal 0,027%. Hiertoe is een kostmodel in DesignerPro ontwikkeld en zijn er simulaties met verschillende procesconfiguraties en schaal groottes uitgevoerd.

### Doorwerking

Op welke manier worden de resultaten benut voor de doorwerking naar de beroepspraktijk, het onderwijs of vervolg aanpak? (max. 100 woorden)

De doorwerking van dit project is via

- 1) De ontwikkelde protocollen en softwareprogramma's zijn beschikbaar voor verder onderzoek door de partners en komen beschikbaar in het onderwijs van de school "Life Sciences&Technology" van de Hanzehogeschool
- 2) De lupeol syntheseroute op basis van het patentonderzoek wordt nog in samenwerking met Syncom en Offichem verder doorontwikkeld.
- 3) De business case voor lupeol SFE-extractie uit lupineschillen lijkt positief, verder overleg met Frank Foods wordt gevoerd voor verder onderzoek in deze richting.