

Backmittel mit fermentativ angereicherten Hydrokolloiden

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Lebensmittelmikrobiologie Prof. Dr . H. Schmidt/Dr. C. Hertel
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Prof. Dr. R. F. Vogel
Industriegruppe:	Verband der Backmittel- und Backgrundstoffhersteller e.V., Bonn
	Projektkoordinator: Dr. G. Böcker, Ernst Böcker GmbH & Co. KG, Minden
Laufzeit:	2004 – 2006
Zuwendungssumme:	€ 297.200,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die Herstellung von Brot und Backwaren war in den vergangenen Jahrzehnten einem grundlegenden Wandel hin zur industriellen Produktion, größerem Produktionsmaßstab und längeren Vertriebswegen unterworfen. Damit verbunden sind erhöhte Anforderungen an die Haltbarkeit der Produkte. Hydrokolloide werden als Zusatzstoffe zur Verbesserung der Maschinengängigkeit der Teige, zur Verbesserung der Brotqualität sowie zur verlängerten Haltbarkeit von Brot und Backwaren verwendet. Diese positive Wirkung von Hydrokolloiden kann ebenfalls durch Bildung von Exopolysacchariden (EPS) durch Milchsäurebakterien (MSB) erzielt werden. In den vergangenen Jahren wurde durch Charakterisierung der EPS-Bildung durch getreideassoziierte Milchsäurebakterien, den Nachweis der technologischen Wirksamkeit dieser Polysaccharide und durch Nachweis ihrer Bildung im Teig die Grundlagen für den Einsatz von EPS-bildenden Milchsäurebakterien bei der biotechnologischen Herstellung von Backmitteln geschaffen. Vorarbeiten haben gezeigt, dass Sauerteig-Laktobazillen ein großes Potential zur EPS-Bildung haben. In einem ersten Screening waren mehr als 20 % der Isolate EPS-positiv. *L. sanfranciscensis* bildet während der Sauerteigfermentation mit Weizen- oder Roggenmehlen EPS in technologisch relevanten Men-

gen. Bei direkt geführten Broten konnte durch Zusatz von 0,1 % EPS von *L. sanfranciscensis* das Altbackenwerden deutlich verzögert werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, das Potential von Milchsäurebakterien zur EPS-Bildung für die Herstellung von Backmitteln mit fermentativ angereichertem Exopolysacchariden zu nutzen. Dabei sollte die technologische Wirkung des EPS auf verlängerte Haltbarkeit von Backwaren und verbesserte Verarbeitungseigenschaften von Teigen zum Tragen kommen.

Forschungsergebnis:

Screening von Milchsäurebakterien auf Exopolysaccharidbildung

In einem physiologischen und PCR-gestützten Screening von Milchsäurebakterien auf EPS-Bildung konnte ein hoher Anteil an EPS bildenden Milchsäurebakterien gefunden werden, die im Sauerteig Anwendung finden können. Vor allem Stämme von *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. fermentum*, *L. mucosae* und *L. animalis* erwiesen sich als gute EPS-Produzenten. Das Molekulargewicht des EPS betrug mindestens $5 \cdot 10^6$. Glucan wurde fast ausschließlich von *L. reuteri*-Stämmen und

L. animalis TMW 1.971 gebildet. Es konnte ein Set an Oligonucleotid-Primern entwickelt werden, das ein einfaches und schnelles Screening auf das Vorhandensein von Glycosyltransferasegenen mittels PCR zulässt. Hiermit wurden vier verschiedene Glycosyltransferasen identifiziert. Glycosyltransferasen bilden alternativ auch Oligosaccharide aus Saccharose. Bei allen Fructanbildnern wurde die Bildung von 1-Kestose detektiert, welche bei 120 g/l Saccharose die Fructanbildung überwog. *L. reuteri* TMW 1.106 produzierte in Weizenteig Maltodextrine, welche bei der Verzögerung von Staling interessant sein könnten. Eine Untersuchung des weiteren Produktspektrums aus Saccharose verdeutlichte die Unterschiede der je nach eingesetztem Stamm gebildeten Mengen an Laktat und Acetat und wies auf eine geringere Laktatbildung und einen niedrigeren Gärungsquotienten durch Glucanbildner hin. Mit Projektfortschritt wurde erkennbar, dass mehr potente EPS-Bildner identifiziert wurden, als im Projektzeitraum in Backmitteln erprobt werden konnten. Eine iterative Verbesserung erscheint vielversprechend, war jedoch im Projektzeitraum weder vorgesehen oder realisierbar.

Einfluss von Exopolysacchariden auf das Altbackenwerden von Backwaren

Um den Einfluss von fermentativ gebildetem EPS im Vergleich zu kommerziellen Hydrokolloiden auf das Altbackenwerden von Backwaren zu untersuchen, wurden Weizenbrote gebacken und die Parameter Krumenfestigkeit (Textur-Profil-Analyse) und Retrogradation der Stärke („Differential Scanning Calorimetry“) zur Erfassung des Altbackenwerdens ausgewählt. Das Altbackenwerden war grundsätzlich von der Mehlqualität abhängig. Bei schwachen Mehlen findet im Gegensatz zu starken Mehlen bei direkter Teigführung ein schnelleres Altbackenwerden statt. Mit steigender Konzentration von Guarkernmehl konnte eine zunehmende Verringerung des Altbackenwerdens bewirkt werden. Der Zusatz von isoliertem EPS aus *L. sanfranciscensis* LTH 1729 und LTH 2590 war wirkungsvoller hinsichtlich der Verzögerung des Altbackenwerdens als Guarkernmehl und Xanthan. Backversuche mit chemisch gesäuerten Vorteigen zeigten, dass Quellvorgänge und endogene Enzymaktivitäten einen negativen Einfluss auf das Altbackenwerden von Weizenbroten haben, während Brote mit fermentativ angereichertem EPS im Vorteig eine etwas langsamere Brotalterung zeigten. Die Levansucrase-Knock-out-Mutante von *L. sanfranciscensis* LTH 2590 verlor die Fähigkeit, Saccharose zu spalten oder Levan- und 1-Kestose zu bilden. Bei der Brotalterung konnte

jedoch bei Zugabe von Vorteigen mit Wildtyp bzw. Mutante kein Unterschied festgestellt werden. Es wurden auch beispielhaft Untersuchungen zum Einfluss von EPS auf das Altbackenwerden von Mischbroten (Roggen:Weizen, 50:50) unter Einsatz der *L. sanfranciscensis*-Stämme in Vorteigen durchgeführt. Auch hier verlangsamte der Zusatz von EPS-angereicherten Vorteigen das Altbackenwerden. Die Tiefkühlagerung der Teige hatte keinen Einfluss auf das Altbackenwerden der Brote. Die Volumina der Kontrollbrote waren jedoch mit und ohne Tiefkühlagerung die geringsten, wohingegen der Zusatz von Guarkernmehl, EPS und EPS-angereicherten Vorteigen selbst nach der Tiefkühlung höhere Brotvolumina erzielte als die frisch verbackenen Kontrollbrote. Letztlich wurde mit dem Stamm LTH 1729 unter optimierten Fermentationsbedingungen ein getrocknetes Sauerteigpräparat (Backmittel) mit EPS hergestellt. Die Zugabe von 3 % dieses Backmittels bewirkte ein ebenso schnelles Altbackenwerden wie die Kontrolle, jedoch bei einer um 2 % erhöhten Wasserabsorption. Bei Verkostung von 24 h gelagerten Broten wurden jene mit EPS-angereichertem Vorteig eindeutig frischer empfunden als die direkt geführten Kontrollbrote mit Guarkernmehl bzw. ohne Zusatz. Ebenso wurden 1 Tag alte Brote mit 3 % Backmittel vom Prüferpanel als frischer und beliebter eingestuft als die Kontrollbrote ohne Zusatz.

Einfluss von Exopolysacchariden auf die Teig-rheologie

Zur Untersuchung der Einflüsse von EPS und Hydrokolloiden auf die Teig-rheologie wurden folgende Geräte bzw. Methoden ausgewählt: Rheofermentometer, Farinograph, Texture-Analyzer (Stickiness; Kiefferzelle), Rapid-Visco-Analyzer (RVA), Bohlin-Rheometer und das Breite/Höhe-Verhältnis. Zunächst wurden Guarkernmehl, Xanthan, isoliertem EPS und in Vorteigen gebildetes EPS eingesetzt. Der Zusatz von Hydrokolloiden bzw. EPS bewirkte zwar eine Erhöhung der Wasseraufnahme (Farinograph) um 1-1,5 %, jedoch wurde hinsichtlich Teigstabilität und Gashaltung (Rheofermentometer) keine klare Tendenz beobachtet. Das Breite-Höhe-Verhältnis war bei allen Teigen gleich außer bei Einsatz von Xanthan; dieser Teig lief nicht so stark breit wie die anderen. Bei den Messungen mit dem Bohlin-Rheometer verhielten sich die Teige sehr ähnlich, da alle Teige auf 500 FE eingestellt wurden. Teige mit Zusatz von Guarkernmehl und Xanthan waren im Vergleich zur Kontrolle fester und weniger elastisch; Teige mit EPS-Zusatz weicher und elastischer.

Die Klebrigkeit der Teige wurde mit dem Texture Analyzer ("Stickiness") gemessen. Teige mit Hydrokolloiden und EPS waren weniger klebrig. Der Zusatz von chemisch gesäuertem Vorteig erhöhte die Klebrigkeit mit sinkendem pH. Vorteige mit angereichertem EPS waren klebriger als ohne EPS, was auf Restgehalte an Sucrose, welche für die EPS-Bildung zugesetzt wurde, zurückgeführt wurde. Im Extensogramm beeinflusste zugesetztes EPS das Dehnverhalten der Teige weit weniger als Guarkernmehl und Xanthan. Die Verwendung von Vorteigen mit angereichertem EPS bewirkte einen höheren Dehnwiderstand und geringere Dehnbarkeit als von Vorteigen ohne EPS-Bildung. Damit wird durch das gebildete EPS der negative Einfluss der Vorteigführung auf die Teigstruktur kompensiert. Im Rapid-Visco-Analyzer bewirkten Guarkernmehl und Xanthan eine Viskositätserhöhung. EPS und EPS-haltige Vorteige hatten hingegen keinen Effekt auf die Stärkeverkleisterung bzw. die Viskosität der Gele. Die teigrheologischen Versuche mit der Mutante ließen vermuten, dass die Unterschiede in der Säureproduktion großen Einfluss auf die Teigrheologie und Brotqualität haben und sich mit dem Effekt des EPS überlagern. Bei Zusatz von Vorteigen mit Wildtyp und Mutante konnten keine Unterschiede in der Teigrheologie festgestellt werden.

Teige nach 10-tägiger Tiefkühlung hatten generell eine schlechtere Teigstabilität und Gashaltung, mit EPS war jedoch das Gesamtgasvolumen (Rheofermentometer) nicht wesentlich geringer als bei nicht gefrorenen Teigen. Auch die negativen Auswirkungen von Vorteigen wurden durch EPS verringert. Die Klebrigkeit nahm generell zu, der Dehnwiderstand ab und die Dehnbarkeit zu, was aber wiederum durch Zusatz von Hydrokolloiden und EPS verringert werden konnte. Im Bohlinrheometer waren TK-gelagerte Teige weicher und weniger elastisch. Auch hier kompensierte der Zusatz von EPS diese Entwicklung. Bei Zugabe von 3 % Backmittel mit EPS stieg die Wasseraufnahme bei mittlerer Mehlqualität um 2 %, im Bohlinrheometer ergaben sich jedoch kaum Änderungen der Teigrheologie. Die Teigstabilität und das Gashaltvermögen wurden deutlich verbessert. Die Teigklebrigkeit wurde verringert, der Dehnwiderstand war etwas geringer als beim Kontrollteig. Im RVA verursachte das Backmittel keine Viskositätsunterschiede.

Optimierung der EPS-Bildung

Die Optimierung der EPS-Bildung bei gleichzeitiger Minimierung von Nebenprodukten erforderte die biochemische Charakterisierung der Glycosyltransferasen. Hierzu wurden deren Gene se-

quenziert, kloniert und zur Gewinnung der Enzyme heterolog exprimiert. Durch Enzymtests mit den gereinigten Glycosyltransferasen konnten die Bedingungen gefunden werden, bei denen das jeweilige Enzym die Bildung von EPS gegenüber seinen anderen Aktivitäten wie der Bildung von Oligosacchariden und der Saccharosehydrolyse favorisierte. Für die Glucosyltransferase Δ N-GTFA von *L. reuteri* TMW 1.106 wurde ein pH-Optimum für die Transferaseaktivität von 3,5 - 4,0 ermittelt. Das Temperatur optimum lag bei 45°C. Mit dem reinen Enzym konnten bei pH 4,3 und 300 mM (ca. 100g/l) Saccharose über 25g/l reines Glucan mit einem relativen Molekulargewicht von ca. $3 \cdot 10^7$ erhalten werden. Die gereinigte Levansucrase von *L. sanfranciscensis* TMW 1.392 (LTH 2590) zeigte ihr pH-Optimum bei 5,4 und arbeitete optimal zwischen 35 und 45°C. Am meisten Levan wurde bei 50 mM (ca. 20g/l) Saccharose gebildet. Die Levanbildung war gegenüber der Kestoseproduktion und der Fructosefreisetzung durch Hydrolyse bei niedrigen Saccharosekonzentrationen, hohem pH (5,5) und niedriger Temperatur bevorzugt.

Bei der Optimierung der EPS-Bildung durch *L. reuteri* in Saccharosemedium konnten als optimale Werte ein pH von 4,7, eine Saccharosekonzentration von 100 g/l und 42°C ermittelt werden. Bei diesen Bedingungen konnten bis zu 22 g/l eines verzweigten Dextrans mit einem relativen Molekulargewicht von $3,8 \cdot 10^7$ erhalten werden. Eine Verlängerung der Fermentation von 24 auf 48 Stunden führte zu mehr zusätzlicher Säure- als EPS-Bildung. Bei Saccharosekonzentrationen über 100 g/l sank die EPS-Ausbeute, die Produktion von Laktat und Acetat stieg weiter an. Fermentationen in Weizenteigen deuteten darauf hin, dass niedrige Teigausbeuten die EPS-Bildung stark behinderten. Die Hydrolyse der Saccharose mit darauf folgender Säurebildung und die Synthese von Maltooligosacchariden durch *L. reuteri* TMW 1.106 dagegen wurden kaum beeinflusst. Für *L. reuteri* TMW 1.106 erwies sich Roggenkleie (mit 10 % Saccharose) für kurze Fermentationszeiten als optimales Substrat, ferner führten eine pH-Regulation im Teig auf pH 4,7 und ein Saccharose-Fed-Batch zur Steigerung der EPS-Synthese. Die aus Teig isolierbare EPS-Menge lag jedoch unter den im Medium erreichten Werten (ca. 10 g/kg Mehl nach 48 h). Das Dextran von *L. reuteri* TMW 1.106 erschien während dreimonatiger Lagerung der Sauerteige bei 4°C (anaerob) stabil. *L. sanfranciscensis* bildete in Weizenteigen mit 20 % Saccharose durch Levansucraseaktivität etwa 4 g Levan und 20 mmol 1-

Kestose, entsprechend einer Verwendung von 24 und 39 % der eingesetzten Saccharose. Eine maximale Levanproduktion wurde bei pH 4,7 und Saccharose-Fed-Batch erreicht (7 g Levan/kg Weizenmehl mit 10 % Saccharose), jedoch stiegen dadurch Kestose- und Säureproduktion überproportional an, so dass es sich empfiehlt, weniger als 10 % Saccharose einzusetzen. Die Stabilität des Levans von *L. sanfranciscensis* TMW 1.392 bei Lagerung der Sauerteige war mindestens bis zu 1,5 Monaten gegeben. Deutliche Auswirkung von Fermentationsbedingungen auf die Zusammensetzung und die Struktur des EPS konnten nicht festgestellt werden.

Die Struktur des EPS von *L. sanfranciscensis* TMW 1.392 (LTH 2590) und 1.54 (LTH 1729), *L. reuteri* TMW 1.106 und *L. curvatus* TMW 1.642 wurde aufgeklärt. Bei dem Glucan von TMW 1.642 handelte es sich um ein unverzweigtes Dextran, das als einziges strukturviskoses Verhalten aufwies und die größten Auswirkungen auf die Teig rheologie zeigte.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der Pro-Kopf-Verbrauch an Brot und Kleingebäck beläuft sich in Deutschland auf ca. 80 kg, bei einem Umsatzvolumen von 13 Mrd. €. Substantielle Mengen der Brotproduktion müssen entsorgt werden, da sie innerhalb der Akzeptanzfrist nicht verkauft wurden. Das Potential von deklarationsfreundlichen, mittels Sauerteig erzeugten Backmitteln zur Verbesserung der Haltbarkeit von Backwaren ist bisher weitgehend ungenutzt. Mit verbesserten Teigverarbeitungseigenschaften sowie einer besseren Haltbarkeit von Backwaren bei höherer Verbraucherakzeptanz erhöht sich die Wettbewerbsfähigkeit der Backbetriebe und damit die der Backmittel- und Backgroundstoffhersteller. Dies gilt auch für den wachsenden Markt für gefrorene Teige.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2006.
2. Thomann, S., Schenkel, P. und Hinrichs, J.: The impact of homogenization and microfiltration on rennet-induced gel formation. *J. Text. Stud.* 39, 326-344 (2008).
3. Thomann, S., Schenkel, P. und Hinrichs, J.: Effect of homogenization, microfiltration and pH on curd firmness and syneresis of curd grains. *LWT Food Sci. Technol.* 41 (5), 826-835 (2008).

4. Thomann, S.: The Impact of Milk Properties and Process Conditions on Consistency of Rennet-coagulated Curd and Syneresis of Rennet Curd Grains. Dissertation, Verlag Dr. Hut, ISBN 978-3-89963-688-8 (2008).
5. Maißner, D. und Vogel, R. F.: Einsatz von bakteriellen Exopolysacchariden im Backprozess von Weizenbrot – Untersuchung des Effekts auf die Broteigenschaften. (Posterabstract) Tagungsband 65. FEI-Jahrestagung 2007, 101-102 (2008).
6. Kaditzky, S. und Vogel, R.F.: Optimization of exopoly saccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 291-299 (2008).
7. Kaditzky, S., Seitter M., Hertel, C. und Vogel, R. F.: Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2), 433-442 (2007). DOI 10.1007/s00217-007-0738-1.
8. Korakli, M. und Vogel, R.F.: Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2006. DOI 10.1007/s00253-006-0469-4 (2006).
9. Tiekling, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R.F. und Gänzle, M.G.: Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* 99 (3), 692-702 (2005).
10. Tiekling, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. und Gänzle, M.G.: Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 655-663 (2005).
11. Tiekling, M., Kühnl, W. und Gänzle, M.G.: Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2456-2462 (2005).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft
und Biotechnologie,
FG Lebensmittelmikrobiologie
Garbenstr. 28, 70593 Stuttgart
Tel.: 0711/459-22305, Fax: 0711/459-24199
E-Mail: hschmidt@uni-hohenheim.de

Technische Universität München
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising-
Weihenstephan
Tel.: 08161/71-36 63, Fax: 08161/71-33 27
E-Mail: rudi.vogel@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

