

## Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Dr. R. G. Berger/Dr. U. Krings
<b>Forschungsstelle II:</b>	Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi), Garching Prof. Dr. Dr. P. Schieberle/Prof. Dr. P. Köhler
<b>Industriegruppen:</b>	Der Backzutatenverband e.V. (BZV), Bonn Verein der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Institutes für Mehl- und Eiweißforschung e.V., Garching
	Projektkoordinator: Dr. S. Marx, N-Zyme BioTec GmbH, Darmstadt
<b>Laufzeit:</b>	2007 – 2010
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 313.150,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Die im Mehl vorkommenden (endogenen) Enzyme sind, zusammen mit den Enzymen der Hefe, bei der Herstellung von Backwaren wichtig, indem sie die Teigeigenschaften, die Verarbeitungsqualität und die Eigenschaften des Endproduktes beeinflussen. Abhängig von verschiedenen Bedingungen sind die endogenen Enzymaktivitäten in Getreidemehlen sehr unterschiedlich. Zum Ausgleich, aber auch zur Verbesserung der backtechnischen Eigenschaften, werden bei der Herstellung von Backwaren Enzyme zugesetzt. Diese Präparate ermöglichen eine reproduzierbare Herstellung und gleichbleibende Qualität der Backwaren. Redoxenzyme aus Speisepilzen (Basidiomyceten) bieten einen neuen Ansatz, um die rheologischen und backtechnischen Eigenschaften von Weizenteigen zu verbessern. Da das kommerzielle Angebot an Enzymen aus diesen Organismen gering ist, liegen bislang weder Untersuchungen noch einschlägige Patente zum Einsatz solcher Enzyme bei der Herstellung von Backwaren vor.

Ziel des Vorhabens war es daher, technische Oxidoreduktasen aus gut voruntersuchten Kulturen der Speisepilze und Laccasebildner, wie z.B.

*Grifola frondosa* (Klapperschwamm, Polyporales), zu isolieren. Solche Enzyme sind im Gegensatz zu den bisher benutzten Redoxenzymen keine Oxidationsmittel und katalysieren direkt die Umsetzung von phenolischen Teiginhaltsstoffen zu vernetzten heteromolekularen Produkten. Nach Zusatz zu Weizenmehl sollten die technofunktionellen Eigenschaften der Teige und Gebäcke bestimmt und so das Potenzial der neuen Enzympräparate zur Verbesserung der Teigeigenschaften und zur Schaffung neuer Qualitäten und Backwaren ermittelt werden, um letztlich Alternativen zu bisherigen Backmitteln zu entwickeln.

### Forschungsergebnis:

In umfassenden Screenings wurden zahlreiche neue Peroxidasen, Laccasen und Tyrosinasen identifiziert. Durch Variation der Kultivierungsbedingungen konnten vorhandene Oxidoreduktaseaktivitäten drastisch erhöht oder gänzlich neue Aktivitäten induziert werden. Als potenteste Induktoren stellten sich dabei Xylidin, Ferulasäure und EtOH heraus. Die vielversprechendsten Kandidaten dieses Screening wurden anschließend für eine genauere Untersuchung aus-

gewählt. Es wurde eine Laccase aus *Meripilus giganteus* (Lac1) und eine dye decolorizing Peroxidase aus *Hirneola auricula-judae* (DyP) mittels chromatographischer Methoden (IEX, SEC) elektrophoretisch rein isoliert. Die aufgereinigten Enzyme wurden hinsichtlich Größe, pI, pH- und Temperaturoptimum charakterisiert. Für die Lac1 wurden darüber hinaus noch die Michaelis-Menten-Parameter gegenüber DMOP und ABTS bestimmt, welche als sehr hoch einzustufen sind. Die Laccase aus *Meripilus giganteus* wurde durch einen Zweistufenprozess (Schäumung und IEX) im Kilounit-Maßstab (ABTS) elektrophoretisch rein dargestellt und der Forschungsstelle 2 für Backversuche zur Verfügung gestellt. Mit den aufgereinigten Oxidoreduktasen wurde das Modellsubstrat Ferulasäure erfolgreich quervernetzt und die entstandenen Dehydrodi-, -tri und -tetramere über LC-MS/MS identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Ferulasäure durch geringe Aktivitäten von Lac1 mit hoher Umsatzrate oxidiert und quervernetzt wird. Da für die künftige Anwendung von Laccasen in der Backwarenindustrie geeignete Mengen kostengünstig bereitgestellt werden müssen, wurde für eine spätere homologe oder heterologe Expression sowohl die prozessierte Laccasesequenz (mRNA) als auch die genomische DNA-Sequenz kloniert. Aus den Sequenzen wurde die isolierte Lac1 als „high potential“ Laccase, zu welcher ebenfalls die Laccase aus *Trametes* zählt, mit einem Redoxpotential von 790 mV klassifiziert. Die kommende Positivliste der EU für Enzyme in Lebensmittelanwendungen wird bereits zahlreiche rekombinant gewonnene Präparate enthalten, ein Indiz für die zu erwartende Bevorzugung hochreiner Enzyme durch die Industrie.

Die von der Forschungsstelle 1 bereitgestellten Enzyme wurden zur oxidativen Quervernetzung der wasserlöslichen Arabinoxylane eingesetzt. Durch Größenausschlusschromatographie wurde die Veränderung der Molekularmassenverteilung sowie die Abnahme der monomeren Ferulasäure nachgewiesen. Messungen an einem Stressrheometer zeigten, dass die untersuchten Laccasen eine Quervernetzung und Gelbildung der wasserlöslichen Arabinoxylane induzierten. Die Wirkungen der Enzyme auf die Kleberproteine wurden durch RP-HPLC untersucht. Während die von der Forschungsstelle 2 bereitgestellte Laccase in der eingesetzten Aktivität von 25 nkat/100 mg Mehl keine Wirkung auf die Kleberproteine zeigte, führte eine Laccase aus *Trametes versicolor* mit einer Aktivität von 530 nkat/100 mg Mehl zu einer Proteinquervernetzung. Durch Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass die Laccase

aus *Trametes versicolor* in der Lage ist, Protein-Protein-Cross-Links über Dityrosin-Brücken auszubilden. Die rheologischen und backtechnischen Eigenschaften von Teigen aus einem sortenreinen Mehl nach Zusatz verschiedener Konzentrationen der im Kulturüberstand des Speisepilzes *Grifola frondosa* enthaltenen Laccase sowie der von der LUH aufgereinigten Laccase aus dem Speisepilz *Meripilus giganteus* wurden untersucht. Der Kulturüberstand von *Grifola frondosa* führte bei Zugversuchen zu einer drastischen Verschlechterung von Dehnbarkeit und Dehnwiderstand, was auf eine Peptidase-Nebenaktivität des Kulturüberstandes zurückzuführen war. Die aufgereinigte Laccase aus *Meripilus giganteus* führte dagegen zu einer Verbesserung der Teigeigenschaften, d.h. der Dehnwiderstand und die Festigkeit des Teiges nahmen zu. Im Mikrobackversuch führte dieses Enzym durch Verringerung der Klebrigkeit zu einer verbesserten Teigbereitung und Verarbeitbarkeit. Dadurch war eine geringere Gärzeit bis zum Erreichen des Backoptimums erforderlich als ohne Zusatz.

Die in dem Forschungsvorhaben gesetzten Ziele wurden damit erreicht. Laccasepräparate aus Speisepilzen können eingesetzt werden, um die Teigeigenschaften zu verbessern und die Produktion von Weizenbrot zu erleichtern.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Backwarenbranche in Deutschland wird von kleinen und mittleren Betrieben dominiert. Den mehr als 16.000 handwerklichen Bäckereien stehen etwa 50 mittelständische und 4 große Betriebe gegenüber. Mit ihren mehr als 130.000 Beschäftigten setzt allein die Backwarenindustrie jährlich etwa 15 Mrd. Euro um. Im traditionell arbeitenden Backbetrieb können die schwankenden Backeigenschaften der Rohstoffe durch Anpassung von Rezeptur, Teigführung und Backprozess teilweise ausgeglichen werden. Bereits kleinere Bäckereiketten nutzen heute jedoch modifizierte Zusätze.

Größere Backbetriebe sind auf Backhilfsmittel angewiesen, um die schwankenden Eigenschaften der Rohstoffe auszugleichen und ihre Produkte zu standardisieren. Daher wären Enzyme aus Speisepilzen zur Optimierung der Teig- und Backeigenschaften ein guter Ersatz der bisher gebräuchlichen Enzympräparate und Zusatzstoffe, da durch verkürzte Knet- und Bearbeitungszeiten der Teige die Produktivität verbessert werden könnte. Da übliche Zusätze, wie Soja-

mehl oder viele in der Zusatzstoffzulassungsverordnung beschriebene Substanzen, vom Verbraucher meist nicht akzeptiert werden, ist es der mittelständischen Industrie ein besonderes Anliegen, ihre Produktionsverfahren auf deklarationsfreundliche Zutaten umzustellen. Im Laufe dieses Forschungsprojektes wurde gezeigt, dass ein Laccase-Zusatz zu einer Verfestigung des Teiges und aufgrund dessen zu einer besseren Bearbeitbarkeit der Teige während des Herstellungsprozesses von Backwaren führt. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass die behandelten Teige eine deutlich verbesserte Gärstabilität als diejenigen ohne Zusatz aufwiesen und dass sich ein optimales Backergebnis bereits nach einer um 10 Minuten verkürzten Gare einstellte. Die in dem Projekt verwendeten Laccasepräparate lassen sich einfach in den Herstellungsprozess von Brot integrieren, da sie einfach im Anteilwasser gelöst dem Mehl zugegeben werden können.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.
2. Berger, G.: Basidiomyceten – Biokatalysatoren für eine nachhaltigere Lebensmittelproduktion. Tagungsband 67. FEI-Jahrestagung 2009, 15-30 (2009).
3. Meyer, C., Schmidt, G., Lunkenbein, S., Krings, U., Berger, R.G. und Köhler, P.: Enzymatische Oxidation von Pentosanen mit Laccasen aus Speisepilzen. Lebensmittelchem. 63, 142 (2009).
4. Schmidt, G., Meyer, C., Lunkenbein, S., Krings, U., Köhler, P. und Berger R.G.: Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung. Lebensmittelchem. 63, 156 (2009).
5. Meyer, S. und Köhler P.: Enzymatische Oxidation von Arabinoxylanen aus Weizen mit Laccase aus Speisepilzen. Jahresbericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Garching, 92-95 (2009).
6. Meyer, C., Schmidt, G., Berger, R.G. und Köhler, P.: Enzymatic oxidation of arabinoxylans with laccases from edible mushrooms. Gluten Proteins 2009. Proc. 10<sup>th</sup> Intern. Gluten Workshop (im Druck) (2010).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

#### Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hannover  
Institut für Lebensmittelchemie  
Callinstr. 3-9, 30167 Hannover  
Tel.: 0511/762-4582, Fax: 0511/762-4547  
E-Mail: rg.berger@lci.uni-hannover.de

Hans-Dieter-Belitz-Institut  
für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi)  
Lichtenbergstr. 4, 85748 Garching  
Tel.: 089/289-13265, Fax: 089/289-14183  
E-Mail: peter.schieberle@lrz.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:

