

Strukturverbesserung glutenfreier Backwaren durch Fermentationen mit Essigsäurebakterien

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Prof. Dr. Rudi F. Vogel/Dr. Frank Jacob
Industriegruppen:	Der Backzutatenverband e.V., Bonn Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung e.V. (AGF), Detmold Weihenstephaner Institut für Getreideforschung e.V. (WIG), Freising
	Projektkoordinator: Dr. Markus Brandt Ernst Böcker GmbH & Co. KG, Minden
Laufzeit:	2014 – 2017
Zuwendungssumme:	€ 249.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die Zöliakie gehört zu den bedeutendsten und am weitesten verbreiteten Lebensmittelunverträglichkeiten. Zöliakie-Patienten (je nach Europäischer Region sind dies eine(r) aus 20 bis 500 Personen) müssen lebenslang auf den Verzehr von Lebensmitteln mit glutenhaltigen Cerealien (z.B. Weizen, Roggen, Gerste) verzichten. Dadurch wird die Ernährungs- und Lebensqualität des betroffenen Personenkreises stark eingeschränkt, da Getreideprodukte, insbesondere Brot, zu den Grundnahrungsmitteln zählen. Die eingeschränkte Auswahl an solchen natürlichen Zutaten steht dem allgemeinen Trend zur Entwicklung natürlicher Produkte mit hoher sensorischer Qualität und langer Haltbarkeit entgegen. Trotz der konstant zunehmenden Nachfrage nach weizen- und glutenfreien Backwaren ist die Produktpalette glutenfreier Backwaren am Markt derzeit mengenmäßig und qualitativ sehr begrenzt. Sie basiert hauptsächlich auf einer Reis-, Mais- oder Stärkematrix und besitzt neben erheblichen sensorischen Defiziten eine sehr kompakte elastische Krumenstruktur, kleine Volumina und teilweise abgebackene Krusten. Die Qualität ist daher nicht mit der von konventionellen Backwaren zu vergleichen. Darüber hinaus verfügen diese glutenfreien Backwaren über eine geringere ernährungsphysiologische Wertigkeit. Entsprechende Prozessdesigns

oder der Zusatz von Backzutaten, die diesen Nachteilen entgegenwirken, sind daher von außerordentlichem Interesse. Die voranschreitende Entwicklung von Backzutaten, die vergleichsweise einfache Anwendungsmuster haben, ist für Zöliakiekranken und das Bäckereigewerbe gleichermaßen attraktiv und kann so eine Win/ Win-Situation erzeugen.

Gegenwärtig kann die Backfähigkeit glutenfreier Backwaren aufgrund des fehlenden Klebereiweißes nur durch den Zusatz von strukturgebenden Hydrokolloiden oder durch das proteinquervernetzende Enzym Transglutaminase erreicht werden. Einen Ausweg zur Verwendung deklarationspflichtiger Zusatzstoffe stellen Fermentationen mit lebensmittelassoziierten Mikroorganismen (Starterkulturen) dar, deren metabolisches Potenzial dazu genutzt werden kann, die sensorischen und technologischen Eigenschaften des Endproduktes natürlicherweise zu verbessern.

Hydrokolloide und Exopolysaccharide (EPS) aus Milchsäurebakterien bringen vielfältige Vorteile und Verbesserungen für (glutenfreie) Backwaren. Für Weizengebäcke konnte gezeigt werden, dass sich Essigsäurebakterien in optimierten Getreidefermentationen durchsetzen können, und EPS aus Essigsäurebakterien ein struktur-

verbesserndes Potenzial haben, das weit über das der Milchsäurebakterien-EPS hinausgeht.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, das bisher in der Backmittelindustrie ungenutzte metabolische Potenzial von Essigsäurebakterien zur Erweiterung der Produktpalette glutenfreier Backwaren zu erschließen. Der Einsatz von Vorteigen aus Fermentationen mit Essigsäurebakterien sollte den Einsatz von Zusatzstoffen ersetzen und die Herstellung von Clean-Label-Produkten ermöglichen. Dabei sollten die molekularen Hintergründe einer damit erzielten Strukturverbesserung glutenfreier Brote aufgeklärt werden.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurden unterschiedliche Essigsäurebakterien-Stämme in Bezug auf ihr EPS-bildendes Potential in flüssigem Melassemedium untersucht, wobei insbesondere vier Stämme eine starke Homopolysaccharid (HoPS)-Produktion aufwiesen: *Gluconobacter albidus* (TMW 2.1191), *Neoasaia chiangmaiensis* (TMW 2.1086), *Kozakia baliensis* (TMW 2.1340) und *Gluconacetobacter azotocaptans* (DSM 13594). Durch die Analyse der im Medium gebildeten EPS konnte gezeigt werden, dass es sich um ein aus Fruktose bestehendes HoPS, genannt Levan, handelt. Des Weiteren konnten ebenfalls vier Heteropolysaccharide (HePS)-bildende Stämme auf Saccharosefreiem modifizierten Gluconatmedium identifiziert werden. Zu diesen gehören zwei *Kozakia*-Stämme (TMW 2.1087, TMW 2.1340) sowie *Neoasaia chiangmaiensis* (TMW 2.1086) und des Weiteren *Acetobacter cerevisiae* (TMW 2.1084). Eine Analyse der HePS mittels HPLC zeigte eine identische Monomierzusammensetzung für beide *Kozakia*-Stämme, welches aus Glucose, Galactose und Mannose bestand, wohingegen sich das HePS von *N.chiangmaiensis* (TMW 2.1086) aus Glucose, Rhamnose und Mannose zusammensetzte. Für *A. cerevisiae* (TMW 2.1084) konnte kein HePS isoliert werden. Wachstumsversuche der EPS-bildenden Essigsäurebakterien in Buchweizen-Melasse-Teig mit einer initialen Zellzahl von 5×10^7 KbE/mL zeigten, dass ein konstantes Wachstum der Bakterien innerhalb 48 Stunden bis zu einer maximalen Zellzahl von 10^9 KbE/mL stattfindet. Zudem konnte während der Fermentation ein zusätzliches Wachstum von natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien beobachtet werden, die

ebenfalls eine maximale Zellzahl von 10^9 KbE/mL nach 48 Stunden erreichten. In diesem Zusammenhang zeigte sich einzig *G. albidus* (TMW 2.1191) als durchsetzungsfähiger Stamm, während die anderen drei Stämme nur innerhalb der ersten 24 Stunden dominant waren (*Neoasaia chiangmaiensis* (TMW 2.1086), *K. baliensis* (TMW 2.1340) und *Gluconacetobacter azotocaptans* (DSM 13594)).

Folglich wurden *G. albidus* TMW 2.1191 (aufgrund seiner konstanten Durchsetzungsfähigkeit) und *K. baliensis* TMW 2.1340 (aufgrund hoher gebildeter Levanmengen) für weitere Backexperimente ausgewählt. Es konnte gezeigt werden, dass Buchweizensauerteigbrote mit für 24 h fermentierten Sauerteigen eine akzeptable Sensorik und Textur (Volumen, Krumenhärte) aufweisen. Zudem konnte demonstriert werden, dass insbesondere die gebildeten Säuren (vor allem Acetat) die Backergebnisse maßgeblich beeinflussen können (nach 48 h Sauerteigführung hohe Acetatmengen und damit zu niedrige Brotvolumina, zu saure Brote und mögliche Inhibierung der Hefegärleistung). Der positive Effekt der *in situ* gebildeten EPS kann somit von den zu hohen Säuregraden in negativer Weise übertroffen/maskiert werden. Für diese beiden Stämme wurden zudem entscheidende Parameter zur EPS-Bildung (initiale Melassekonzentration, Teigausbeute, Animpfmenge) weiter optimiert und die in Buchweizensauerteigen gebildeten Metabolite (Levan, verbrauchte Zucker, gebildete Säuren) bestimmt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit Essigsäurebakterien hergestellte Sauerteige die sensorischen und physikalischen Eigenschaften von glutenfreien Broten verbessern können. Während *in situ* produzierte Levane das Altbackenwerden verzögerten, wurden generelle Brotcharakteristika, wie Volumen und Sensorik, hauptsächlich durch die gebildeten Säuren beeinflusst. Zudem konnte demonstriert werden, dass über die Regulierung des pH-Wertes spezifische Fruktane mit unterschiedlich guten Eigenschaften zur Strukturverbesserung glutenfreier Backwaren maßgeschneidert hergestellt werden können. Die kontinuierlich zunehmende Säuerung während der Sauerteigfermentation verhindert jedoch das Maßschneidern ohne Zusatz von Säureregulatoren, so dass derzeit lediglich die Fermentationszeit als Kontrollparameter zur gezielten Einbringung spezifischer

EPS genutzt werden kann.

Darüber hinaus wurden zur Aufklärung von EPS-Clustern Genomsequenzierungen für sechs Stämme (*A. cerevisiae* (TMW 2.1084), *N. chinganmaiensis* (TMW 2.1086), *K. baliensis* (TMW 2.1087), *K. baliensis* (TMW 2.1340), *A. acetii* (TMW 2.1153) und *G. albidus* (TMW 2.1191)) durchgeführt. Es konnten mittels der erhaltenen Rohdaten EPS-Cluster innerhalb von fünf Stämmen identifiziert und nach vergleichenden Analysen zwei spezifischen HePS-Clustern zugeordnet werden: Zum einen ein „*Kps*-Cluster“, zum Export von EPS und zum anderen ein „*gum*-like-Cluster“, welches den *gum*-Genen von *X. campestris* ähnelt, welche für die Synthese von Xanthan verantwortlich sind.

Des Weiteren wurde zur Identifizierung der Funktion der einzelnen Gene damit begonnen, *Knock-down*-Versuche durchzuführen. Im Verlauf dieser Versuche entstand eine spontane Mutation im Genom von *K. baliensis* TMW 2.1340, die zu einer Veränderung des Phänotyps führte, wodurch der ehemals HePS-bildende Stamm zu einem Nicht-HePS-Bildner wurde. Die spontane Mutation wurde als Transposoninsertion innerhalb des *gumD*-Gens im *gum*-Cluster identifiziert und liefert somit den Beweis für die Funktionalität des Clusters.

Die von beiden *K. baliensis* Stämmen (TMW 2.1087, TMW 2.1340) gebildeten HePS wurden mittels Methylierungsanalysen und NMR-Spektroskopie auf ihre Struktur hin untersucht. Die identifizierten Verknüpfungstypen der durch *K. baliensis* TMW 2.1340 und TMW 2.1087 gebildeten HePS deuten auf eine Xanthan-ähnliche Struktur hin. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Monomierzusammensetzung beider HePS nicht durch die zur Verfügung gestellte Kohlenstoffquelle beeinflusst wird, diese jedoch einen Effekt auf das rheologische Verhalten der HePS hat, bedingt durch makromolekulare Veränderungen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die in diesem Projekt ermittelten Daten liefern wissenschaftlich fundierte Informationen, die belegen, dass EPS-bildende Essigsäurebakterien zur Herstellung glutenfreier Sauerteige mit strukturverbessernden Eigenschaften genutzt werden können. Es konnte erstmalig eine Korrelation zwischen Säure- und EPS-Bildung (Menge, Struktur) hergestellt werden, die in

vielfältiger Weise auf Anwendungen im Backgewerbe, u. a. zur gezielten und verbesserten Einbringung von EPS durch Milchsäurebakterien in Sauerteigen

transferiert werden kann. Limitierungen liegen derzeit im aeroben Metabolismus der Essigsäurebakterien, der eine konstante Durchsetzungsfähigkeit im industriellen Sauerteigmaßstab bei derzeit bestehenden Prozesslinien verhindern kann. Durch die Identifizierung Xanthan-ähnlicher Heteropolysaccharide können zukünftig erstmalig Lebensmittelentwicklungen erfolgen, über die aus sicheren, lebensmittelassoziierten Mikroorganismen effiziente Verdickungsmittel ohne Einsatz von deklarationspflichtigen Zusatzstoffen eingebracht werden können. Insgesamt eröffnen sich hiermit vielfältige Möglichkeiten zur Herstellung alternativer Clean-Label-Produkte.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2017.
2. Brandt, J.U., Born, F.-L., Jakob, F. & Vogel, R. F.: Environmentally triggered genomic plasticity and capsular polysaccharide formation are involved in increased ethanol and acetic acid tolerance in *Kozakia baliensis* NBRC 16680. Intern. J. Biol. Macromol. 17 (1), 172 (2017).
3. Brandt, J. U., Jakob, F., Geissler, A. J., Behr, J. & Vogel, R. F.: Multiple Genome Sequences of Heteropolysaccharide-Forming Acetic Acid Bacteria. Genome Ann. 5 (16), e00185-17 (2017).
4. Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F.: Fermentation pH modulates the size distributions and functional properties of *Gluconobacter albidus* TMW 2.1191 levan. Front. Microbiol. 8, 807 (2017).
5. Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F.: Influence of levan-producing acetic acid bacteria on buckwheat sourdough breads. Food Microbiol. 65, 95-104 (2017).
6. Brandt, J. U., Jakob, F., Behr, J., Geissler, A.J. & Vogel, R.F. Dissection of exopolysaccharide biosynthesis in *Kozakia baliensis*. Micr. Cell Fact. 15 (1), 170. (2016).
7. Ua-Arak, T., Jakob, F. & Vogel, R. F.: Characterization of growth and exopolysaccharide production of selected acetic acid bacteria in buckwheat sourdoughs. Intern. J. Food Microbiol. 239, 103-112. (2015).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3663
Fax: +49 8161 71-3327
E-Mail: Rudi.Vogel@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.