Charakterisierung der Substrat-spezifitäten von Backlipasen für den Einsatz in Feinen Backwaren



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Institut für Angewandte Biowissenschaften Abteilung für Bioaktive und funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe Prof. Dr. Katharina Scherf
Industriegruppe(n):	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn Der Backzutatenverband e.V. (BZV), Berlin Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V. (DLG), Fachzentrum Lebensmittel, Frankfurt a.M. Verband Deutscher Großbäckereien e.V., Düsseldorf
Projektkoordinator:	Dr. Alexander Henrich AB Enzymes GmbH, Darmstadt
Laufzeit:	2019 – 2022
Zuwendungssumme:	€ 263.680,--

Ausgangssituation

Die Leitsätze für Feine Backwaren definieren diese als Backwaren, die bezogen auf 90 Teile Getreidemahlerzeugnisse mindestens 10 Teile Fett und/oder Zucker enthalten. Bei Backwaren ist die Verwendung von Mehlbehandlungsmitteln gängig, um anbaujahrbedingte Schwankungen der Mehleigenschaften auszugleichen, die Maschinengängigkeit der Teige zu verbessern, Ruhezeiten zu verringern, gute Volumen-, Textur- und Aromaeigenschaften zu erzielen und die Haltbarkeit der Backwaren zu verlängern. Als Mehlbehandlungsmittel dienen häufig Emulgatoren, wie Mono- und Diacetylweinsäureester von Mono- und Diacylglyceriden von Speisefettsäuren (DAWE), Natriumstearoyl-2-lactylat oder Lecithine, die jedoch mit den entsprechenden E-Nummern (E 322, E 472e, E 481) zu deklarieren sind. Dagegen ermöglicht der Einsatz von Enzymen die Herstellung von Clean-Label-Produkten, da Backwaren am Ende des Herstellungsprozesses stark erhitzt und die darin enthaltenen Enzyme inaktiviert werden, so dass von ihnen keine technologische Wirkung mehr ausgeht. Somit gelten Enzyme als Verarbeitungshilfsstoffe und müssen nicht deklariert werden.

Lipasen gehören zu den Carboxylesterhydrolasen und lassen sich in Triacylglycerid (TAG)-Lipasen, Phospholipasen und Galactolipasen einteilen. Die Verwendung von exogenen Lipasen in Backwaren bewirkt bei Teigen eine Verringerung der Klebrigkeit und eine Verbesserung der Stabilität und Elastizität, beim Backen eine Erhöhung des Brotvolumens und bei Broten eine Verzögerung des Altbackenwerdens durch Erzielung einer weicheren und gleichmäßigeren Krumentextur. Die beschriebenen funktionellen Wirkungen beruhen hauptsächlich auf der partiellen Hydrolyse mehleigener, unpolarer und polarer Lipide zu oberflächenaktiven Fettsäuren (FS), Di- (DAG) und Monoacylglyceriden (MAG) sowie modifizierten Phospho- und Galactolipiden.

Bei Vorhandensein von Butter in der Rezeptur, können bei der Hydrolyse der TAG allerdings kurzkettige Fettsäuren, wie Buttersäure und Hexansäure, freigesetzt werden, die ein ranziges Fehlaroma hervorrufen.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Charakterisierung der Substratspezifitäten von Backlipasen für den Einsatz in Feinen Backwaren. Es sollten Lipasen identifiziert werden, die aufgrund ihrer Substratspezifität keine für das Fehlaroma verantwortlichen kurzkettigen Fettsäuren freisetzen, aber positive Eigenschaften in Bezug auf Teigstabilität, Produktvolumen, -textur und -frischhaltung aufweisen.

Forschungsergebnisse

Siebzehn Backlipasen, die für ihre positive Wirkung auf die Teig- und Produktqualität von Brot bekannt waren, wurden zunächst mithilfe des *p*-Nitrophenyl-Assays hinsichtlich ihrer Substratspezifität für FS unterschiedlicher Kettenlängen charakterisiert. Durch Unterschiede bei der Reaktivität gegenüber kurzkettigen FS wurden sieben Lipasen für Backversuche ausgewählt.

Für die Analytik der Substratspezifität der Backlipasen gegenüber natürlichen Substraten wurden vier stabile Modellemulsionen (Substrate: Butter, Margarine, Raps- und Weizenkeimöl) sowie eine gaschromatographische Methode für freie FS etabliert. Durch Quantifizierung der freien FS in den Emulsionen nach Inkubation mit Lipasen konnten Rückschlüsse auf die bevorzugten Substrate der Lipasen gezogen werden. Die Substratspezifität der Lipasen war jedoch für alle siebzehn Backlipasen innerhalb einer Emulsion ähnlich. Sie war daher abhängig von der Zugänglichkeit der FS innerhalb der Emulsion und zeigte keine Übereinstimmung mit den vorher bestimmten Spezifitäten im *p*-Nitrophenyl-Assay.

Die entwickelten Modellemulsionen wurden ebenfalls zur sensorischen Beurteilung der Reaktionen aller Backlipasen eingesetzt. In pflanzlichen Fetten führten Lipasen mit hohen Aktivitäten vermutlich durch Lipidoxidationsprozesse zu Fehlaromen. Eine Vorhersage der Reaktion aufgrund von Substratspezifitäts- oder Aktivitätsdaten war jedoch nicht möglich.

Für Backversuche wurden drei Rezepturen für fettreiche Feine Backwaren im 50 g Maßstab etabliert. Neben einem einfachen Rührkuchen ohne Ei zählten dazu eine klassische Sandkuchen-Rezeptur sowie hefehaltige Brioche. Die sieben ausgewählten Lipasen führten statistisch signifikant nach dem Thurstone-Modell zu keinen Fehlaromen in den Produkten. Die Lipasen beeinflussten die Teig- und Produkteigenschaften von Rührkuchen stärker als die von Sandkuchen und Brioche. Die Stabilisierung von Gasblasen im Teig ist abhängig von den verwendeten Zutaten. Vermutlich sind in Sandkuchen und Brioche andere Mechanismen von Bedeutung als in Rührkuchen. In Rührkuchen verringerten drei der sieben Lipasen die Teigdichte und -klebrigkeit und verflüssigten den Teig. Im Produkt führten sie zu einer weicheren Krumenstruktur, verminderter Resilienz und Kohäsion der Produkte und verhinderten zudem das Altbackenwerden. Sie waren zudem dazu geeignet, die ursprünglichen Produkteigenschaften zu erhalten, wenn der Anteil an Wasser oder Butter in der Rezeptur verringert wird. Die Lipasen unterschieden sich dabei stark in ihrer Effektivität, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten.

Eine bestehende massenspektrometrische Methode zur Analytik von Lipiden wurde für die Anwendung auf Feine Backwaren optimiert. Das Lipidom der mit den sieben Lipasen behandelten Teig- und Kuchenproben wurde jeweils im Vergleich zur Kontrolle ohne Lipase untersucht und über eine Hauptkomponentenanalyse statistisch ausgewertet. In Verbindung mit den Daten aus den Backversuchen wurden für Rührkuchen Di-Glycosylmonoglyceride und für Sandkuchen Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylethanolamin als Marker für positive Effekte auf die Textur identifiziert.

Die Lipaseaktivitäten der für die Backversuche ausgewählten sieben Lipasen wurden mithilfe von drei kommerziell erhältlichen Kits bestimmt. Der Vergleich der Ergebnisse aus den drei Kits zeigte, dass trotz ähnlicher Trends die Aktivität der Lipase in Abhängigkeit vom Messsystem zu betrachten war. Deswegen wurde ein neuer Assay zur Bestimmung der Lipaseaktivität gegenüber natürlichen Substraten etabliert. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B kann die Freisetzung von FS verfolgt werden. Auch in diesem System zeigten sich Abhängigkeiten der Lipaseaktivitäten vom untersuchten Substrat, z.B. beim Einsatz verschiedener Pflanzenöle.

Insgesamt zeigte sich, dass die Substratspezifität der Lipasen im Teig entscheidend für ihre Effektivität ist. Diese lässt sich allerdings zurzeit noch nicht verlässlich vorhersagen, weil die Zugänglichkeit der Substrate im Modellsystem nur unzureichend nachgebildet werden kann. Die Projektergebnisse zeigen, dass Lipasen dazu geeignet sind, traditionelle Emulgatoren in Feinen Backwaren zu ersetzen.

Wirtschaftliche Bedeutung

Feine Backwaren stellen in Deutschland mit einer Produktionsmenge von 765.000 t und einem Wert von 2,4 Mrd. € im Jahr 2022 einen wesentlichen Anteil der handwerklich und industriell gefertigten Lebensmittel dar. Trotz fortschreitender Konsolidierung ist die Branche nach wie vor von kleinen und mittelständischen sowie handwerklichen Unternehmen geprägt. Aufgrund der Entstehung des ranzigen Fehlaromas in Feinen Backwaren mit mehr als 10 % Butter ist der Einsatz von Lipasen derzeit nicht möglich, obwohl dies wünschenswert wäre, um gleichbleibende Produktqualitäten sicherzustellen und Kosten einzusparen. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Einsatz von Lipasen anstelle von Emulgatoren die Herstellung von Clean-Label-Produkten ermöglicht.

Das Vorhaben lieferte erstmals Basiswissen zum vertieften Verständnis der Substratspezifitäten von Backlipasen für den Einsatz in Feinen Backwaren. Die Ergebnisse erlauben die gezielte Auswahl von Lipasen mit optimaler Substratspezifität. Somit können die Textureigenschaften von Feinen Backwaren optimiert werden, ohne dass Fehlaromen auftreten. Zur Verbesserung der Bestimmung der Lipaseaktivität wurde ein praxisnaher Fluoreszenz-Assay entwickelt, der die Freisetzung von Fettsäuren aus natürlichen Substraten abbildet. Zudem ermöglicht das Projekt über das erarbeitete vertiefte Verständnis der funktionellen Wirkungen der durch Lipasen entstehenden oberflächenaktiven Lipide eine Weiterentwicklung von Produkten, die beispielsweise eine Reduktion von Fett in der Rezeptur ermöglichen.

Die Ergebnisse konnten zwischenzeitlich erfolgreich in die Industrie transferiert werden und Lipasen, die positive Wirkungen auf die Teig- und Produkteigenschaften zeigen, werden bereits in industrieüblichen Rezepturen und Herstellungsprozessen eingesetzt.

Publikationen (Auswahl)

1. FEI-Schlussbericht 2022.
2. Stemler, C. D., Hoefflin, K. L. & Scherf, K. A.: Effect of seven baking lipases on the lipid class composition of three different cakes. European Food Research and Technology, 1-13, doi: 10.1007/s00217-024-04608-7 (2024).
3. Stemler, C.D., Wießler, J.M. & Scherf, K.A.: Das Potenzial von Backlipasen. brot+backwaren, 04: 45–51, (2024).
4. Stemler, C.D., Wießler, J.M. & Scherf, K.A.: Baking lipases in cakes: potential in recipe changes. baking+biscuit International, 04: 40–46 (2024).
5. Stemler, C. D., Lorenz, K. K., & Scherf, K. A.: Rhodamine B-based lipase activity assay with natural substrates—development and application. International Journal of Food Science & Technology, 59(2), 1063-1070, doi: 10.1111/ijfs.16875 (2024).
6. Stemler, C. D., Geisslitz, S., Cutignano, A., & Scherf, K. A.: Lipidomic insights into the reaction of baking lipases in cakes. Frontiers in Nutrition, 10, 1290502, doi: 10.3389/fnut.2023.1290502 (2023).
7. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Lipases as cake batter improvers compared to a traditional emulsifier. LWT 174, 114464. doi: 10.1016/j.lwt.2023.114464 (2023).
8. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Comparative characterization of baking lipase substrate specificities using emulsions and the *p*-nitrophenyl assay. LWT 168, 113914. doi: 10.1016/j.lwt.2022.113914 (2022).
9. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Improvement of cake baking properties by lipases compared to a traditional emulsifier. Food Chem 15, 100442. doi: 10.1016/j.fochx.2022.100442 (2022).
10. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Sensorische Überprüfung der Eignung von Backlipasen zur Nutzung in Feinen Backwaren. Getreide, Mehl, Brot 3, 18-21 (2022).

11. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Einfluss von Backlipasen auf die Produkteigenschaften Feiner Backwaren. Lebensmittelchem 76 (S2), S2-094-S2-094, doi: 10.1002/lemi.202259052 (2022).
12. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Fehlaromenbildung in Feinen Backwaren durch Backlipasen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Lebensmittelchem 75 (S1), S1-089-S1-089, doi: 10.1002/lemi.202155011 (2021).
13. Stemler, C.D. & Scherf, K.A.: Freie Fettsäuren als Auslöser für Backlipase-induzierte Fehlaromen in Feinen Backwaren. Lebensmittelchem 75 (S2), doi: 10.1002/lemi.20215807 (2021).

Weiteres Informationsmaterial

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institut für Angewandte Biowissenschaften
Abt. für Bioaktive und funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe
Adenauerring 20a, 76131 Karlsruhe
Tel.: +49 721 608-42929
Fax: +49 721 608-47255
E-Mail: katharina.scherf@kit.edu

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

Förderhinweis

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

Gefördert durch:
Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

AiF Forschungsnetzwerk Mittelstand
FEI FORSCHUNGSKREIS DER ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.
IGF Industrielle Gemeinschaftsforschung

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 Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Bildnachweis - Seite 1: © https://foto.wuestenigel.com/dough-eggs-butter-wheat-spikelets-and-flour/ by Marco Verch under Creative Commons 2.0

Stand: 20. Februar 2025