

Enzymatische Modifikation der Arabinoxylan- und Proteinfraction zur Aufklärung und Optimierung der Strukturbildungseigenschaften von Roggenteigen

- Anschluss zu AiF 15457 N -

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Mario Jekle
Forschungsstelle II:	Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi), Freising Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle/Prof. Dr. Peter Köhler
Industriegruppe(n):	Verband Deutscher Mühlen e.V. (VDM), Berlin Verein der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Instituts für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi), Freising
	Projektkoordinator: Carolin Keßler Carl Künkele zur SchapfenMühle GmbH & Co. KG, Ulm-Jungingen
Laufzeit:	2011 – 2014
Zuwendungssumme:	€ 456.300 (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Roggenbrote genießen beim Konsumenten aufgrund des im Vergleich zum Weizen höheren Gehaltes an Ballaststoffen und des ernährungsphysiologisch höherwertigen Proteins (höhere Gehalte an Lysin und Arginin) einen hohen Stellenwert. Jedoch weist die Herstellung von Roggenbrot im Vergleich zu Weizenbrot Besonderheiten auf, da Roggenteige im Gegensatz zu Weizenteigen keinen zusammenhängenden Kleber ausbilden und daher eine im Gegensatz zu Weizen verminderte Viskoelastizität aufweisen. Technologisch betrachtet, beruht die Backfähigkeit von Roggen unter anderem auf der Quellfähigkeit der Pentosane, die insbesondere bei sauren pH-Werten das 5 bis 20-fache ihres Eigengewichtes an Wasser binden können, wodurch sie die Teigviskosität erhöhen und damit zum Backverhalten von Roggengebäcken beitragen. Pentosane gehören zu den Hemicellulose-

sen und bestehen aus den beiden Hauptfraktionen Arabinoxylan (AX) und Arabinoxylolactan. AX machen mit etwa 70 % den Großteil der Pentosane aus (30 % Arabinoxylolactan). Der Arabinoxylangehalt von Roggen beträgt ca. 8 – 12 %, wobei sie im Weizen nur etwa 5 – 6 % ausmachen. Neben den geschilderten Wirkungen der AX auf das Backverhalten von Roggenmehl führen diese durch ihre starke Wasserbindung zu überwiegend plastischen, schwierig zu verarbeitenden Teigen. Dem könnte die Ausbildung einer kontinuierlichen, kleberähnlichen Proteinphase entgegenwirken, die bei nativen Roggenmehlen jedoch nicht beobachtet wird.

Zwei Gründe sind für die nicht ausreichende Ausbildung eines kleberartigen Proteinnetzwerkes bei Roggen verantwortlich: (1) Die im Vergleich zu Weizen unterschiedliche Protein- bzw. Disulfidstruktur und (2) der im Vergleich zu Weizen deutlich höhere Gehalt an AX

(siehe oben). Erstere führt zu einer schlechten Vernetzung der Roggenproteine und letzterer stört deren Aggregation durch die Ausbildung schleimartiger Schichten um die Mehlpartikeln beim Anteigen. Damit wird die Ausbildung einer stabilen und dennoch gut gelockerten Krume bei Roggenbrot verhindert.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, die Schleimschichten um die Roggenmehlpartikeln durch eine gezielte partielle Hydrolyse der Roggen-Arabinoxylane mit geeigneten Enzymen zu beseitigen und damit die Aggregation der Roggenproteine zu ermöglichen. Damit sollte eine Protein-, Teig- und Brotstruktur, ähnlich wie bei der Verarbeitung von Weizen erreicht werden. Die Proteinaggregation sollte dann durch zusätzliche Vernetzung mit dem Enzym Transglutaminase (TG) noch verbessert werden, um dem Weizenkleber ähnliche Eigenschaften zu erzielen.

Forschungsergebnis:

Kommerziell erhältliche Xylanasepräparate wurden auf Endo-Xylanase-, Xylosidase-, Arabinofuranosidase- und Ferulasäureesterase-Aktivität hin getestet. Alle untersuchten Präparate wiesen Endo-Xylanase-Aktivität auf, die anderen Enzymaktivitäten konnten nur in manchen Präparaten nachgewiesen werden. Der Abbau von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Arabinoxylanen wurde durch Inkubation von aus dem Mehl isolierten Arabinoxylanen untersucht. Die Analyse der Abbauprodukte mittels SE-HPLC-RI zeigt, dass alle untersuchten Xylanasepräparate sowohl wasserlösliche als auch wasserunlösliche Arabinoxylane abbauen. Ein bevorzugter Abbau von wasserunlöslichen Arabinoxylanen konnte für kein Xylanasepräparat nachgewiesen werden. Ein Xylanasepräparat mit Endo-Aktivität wurde in transglutaminasebehandelten Teigen eingesetzt. Die Transglutaminase- und Xylanase-behandelten, gefriergetrockneten Teige wurden chemisch-analytisch charakterisiert. Die Proteine wurden mittels einer modifizierten OSBORNE-Fraktionierung extrahiert und mittels RP-HPLC quantifiziert. Mit Hilfe einer reduzierenden SDS-PAGE wurde die Vernetzung der Proteine untersucht. Über eine Extraktion der wasserlöslichen Arabinoxylane und Analyse mittels SE-HPLC und RI-Detektion wurde der

Einfluss der Xylanase untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass die Proteine durch Zugabe von Transglutaminase verändert wurden. Während eine steigende Transglutaminasedosierung keinen Einfluss auf den Gehalt an Albuminen und Globulinen hatte, sank der Prolaminanteil. Durch die verknüpfende Wirkung der Transglutaminase stieg deren Molekulargewicht derart an, dass diese sich erst mit der Glutelinfraktion extrahieren ließen. Dadurch stieg der Gehalt an Glutelin an. Durch die Abnahme an Prolamin und die Zunahme an Glutelin sank das Prolamin-zu-Glutelin-Verhältnis von 3,2 ohne TG-Zugaben auf 1,2 bei 1.000 mg/kg TG. Ein geringes Verhältnis von Prolamin zu Glutelin ist mit guten Backeigenschaften korreliert. Diese Veränderungen in den Proteinen ließen sich jedoch nicht in der SDS-PAGE zeigen, hier erschienen alle Proteinbandenmuster unabhängig von der Transglutaminasedosierung gleich. Die Untersuchung der wasserlöslichen Arabinoxylane mittels SE-HPLC-RI zeigte, dass wasserlösliche Arabinoxylane unabhängig von einer steigenden Transglutaminasedosierung durch die Xylanase abgebaut wurden.

Hinsichtlich der visuellen Darstellung der AX-Fraktion im Teig wurden mit Hilfe des Farbstoffes Calcofluor White Stain keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt. Möglicherweise wurde der Farbstoff aufgrund der nicht optimal komplementären Anregungswellenlänge des Lasers unzureichend angeregt, wodurch eine klare Darstellung der Strukturen nicht möglich war. Eine weitere Möglichkeit könnte eine verminderte Affinität des Farbstoffs zu den AX sein. Um dennoch die wichtigen Fragestellung der Verteilung der AX im Korn/Teig zu beantworten, wurden Antikörper, die mit dem Farbstoff (FITC) gelabelt wurden, hergestellt. Durch diese Technik und die Spezifität der Antikörper gegenüber AX konnten erste Nachweise über die AX-Verteilungen am Getreidekorn dargestellt werden. Zum Nachweis des Einflusses der AX auf die Ausbildung eines Proteinnetzwerks wurden Roggen- (und Weizen-)modellteige mit unterschiedlichen AX-Konzentrationen (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 und 10,0 % AX) hergestellt und die Proteinstruktur mittels Confocaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM; Farbstoff: Rhodamin B) angefärbt. Anhand dieser Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die AX-Konzentration (bei gleichbleibender Teig-

festigkeit) einen entscheidenden und signifikanten ($p < 0,05$) Einfluss auf die Proteinstruktur der Roggen- (und Weizen-) teige hat. So nahm mit steigendem AX-Gehalt der Durchmesser ($r = -0,904$) und der Umfang ($r = -0,923$) der Proteinpartikel signifikant ab. Teig rheologische Untersuchungen nach enzymatischer Behandlung der Teige mittels Xylanase zeigten eine deutliche Erweichung der Teige durch Freisetzung des durch die AX gebundenen Wassers. Hierdurch kam es je nach Enzymkonzentration, Einwirkzeit und pH-Wert zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg des viskosen Anteils der Roggenteige. Durch die Wasserfreisetzung nahm auch die Teigklebrigkeit signifikant ($p < 0,05$) zu. Durch die Zugabe von TG konnte je nach Enzymkonzentration, Einwirkzeit und pH-Wert im Vergleich zum Kontrollteig eine Teigverfestigung und ein Anstieg des elastischen Anteils ermittelt werden. Auch wurde bei den Teigen mit kombiniertem Einsatz von TG und Xylanase im Vergleich zu nur mit TG behandelten Teigen eine Erhöhung des elastischen Anteils erreicht. Der Einsatz von TG führte auch im Vergleich zum Roggen-Standardteig zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$) der Klebrigkeit. Durch weitere rheologische Untersuchungen der enzymbehandelten Teige (Xylanase und TG), bei denen die Teigfestigkeit an die des Standard-Roggenteiges angepasst wurde, wurde im Gegensatz zum Standard-Roggenteig eine weitere Erhöhung des elastischen Anteils (in Abhängigkeit von den Enzymkonzentrationen bis zu 20 %) erzielt. Es zeigte sich, dass die Freisetzung/Bindung des Wassers einen erheblichen, nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die rheologischen Untersuchungen hatte. Die Backversuche zur Beurteilung des Einflusses der Enzymbehandlung der Roggenbrote hinsichtlich spezifischem Volumen und Krumbeschaffenheit (Textur-Profil-Analyse) zeigten, dass es durch den Einsatz von TG im angewandten Konzentrationsbereich nur teilweise zu signifikanten Unterschieden kam, wodurch nur von einer Tendenz bezüglich der Erhöhung des spezifischen Gebäckvolumens gesprochen werden kann. Beim Einsatz einzelner Enzyme (Xylanase oder TG) ergab sich allerdings bei bestimmten Umgebungsbedingungen (pH-Wert) eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des spezifischen Volumens. Eine Verringerung der Krumbenheit (auch über die Lagerzeit) wurde ebenfalls erzielt. Insgesamt zeigte sich, dass

durch die Modifikation der Arabinoxylan- und Proteinfractionen mittels Enzymen eine Verbesserung der Struktureigenschaften und somit der backtechnologischen Eigenschaften (spezifisches Volumen, Krumentextur) erzielt werden konnte. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden zusätzliche Versuche (erneutes Kneten, verlängertes Kneten, zeitlich versetzte Enzymzugabe) durchgeführt, welche eine weitere Verbesserung der teigrheologischen Eigenschaften zur Folge hatte. Der Einsatz von Enzymen in Kombination mit einer angepassten Teigherstellung scheint daher vielversprechend für eine weitere Optimierung der Roggenteig- und Brotstruktur zu sein.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Durch die Aufklärung der analytischen und der technologischen Funktionalität der Arabinoxylane hinsichtlich der Teig- und Gebäckeseigenschaften wird den Herstellern roggenhaltiger Backwaren, aber auch weiterer Backwaren aus arabinoxylanreichen Mehlsorten, und den Müllern selbst, insbesondere kleinen und mittelständischen Unternehmen, eine neue Basis für die Herstellung von Backwaren aus arabinoxylanreichen Mehlen gegeben. Darüber hinaus wird ihnen durch die Modifizierung der Arabinoxylane und Proteine durch entsprechende Enzyme eine Möglichkeit zur gezielten Beeinflussung der Qualitätsmerkmale dieser Backwaren an die Hand gegeben. Hierzu zählen eine bessere Maschinengängigkeit aufgrund reduzierter Teigklebrigkeit, ein besseres Gashaltevermögen aufgrund elastischerer Teige sowie eine verbesserte Krumbenstruktur und Gebäckfrischhaltung. Die technologische Aufwertung der Backwaren hergestellt aus arabinoxylanreichen Mehlen (z.B. Roggen) kann das Absatzvolumen steigern und diesen Bereich gerade für mittelständische Unternehmen wirtschaftlich interessanter gestalten. Kleinen und mittelständischen Betrieben ergibt sich so die Möglichkeit, mit geringem technologischen Aufwand leicht auftretende Produktionsfehler, die bei der Herstellung und der Aufarbeitung von Roggenteigen nicht unüblich sind, zu minimieren und somit ihren Position am Markt zu festigen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Großmann, I. und Köhler, P.: Fractionation-reconstitution studies to determine the functional properties of rye flour constituents. *J. Cer. Sci.* 70 1-8 (2016).
3. Grossmann, I., Doering, C., Jekle, M., Becker, T. und Koehler, P.: Compositional Changes and Baking Performance of Rye Dough as Affected by Microbial Transglutaminase and Xylanase. *J. Agric. Food Chem.* DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01545 (2016).
4. Döring, C., Grossmann, I., Roth, M., Jekle, M., Koehler, P. und Becker, T.: Effect of rye bran particles on structure formation properties of rye dough and bread. *J. Food Proc. Pres.* DOI: 10.1111/jfpp.12998 (2016).
5. Döring, C., Nuber, C., Stukenborg, F., Jekle, M. und Becker, T.: Impact of arabinoxylan addition on protein microstructure formation in wheat and rye dough. *J. Food Eng.* 154, 10-16 (2015).
6. Großmann, I. und Köhler, P.: Bestimmung der funktionellen Eigenschaften von Roggeninhaltsstoffen durch Rekonstitutionsversuche. *Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem.* ISBN 978-3-946117-01-8, 100-103 (2015).
7. Großmann, I. und Köhler, P.: Studien zur Wirkung von Xylanase und Transglutaminase in Roggenteigen. *Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem.*, ISBN 978-3-938896-85-3, 84-87 (2014).
8. Döring, C., Jekle, M. und Becker, T.: Technological and Analytical Methods for Arabinoxylan Quantification from Cereals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, DOI:10.1080/10408398.2012.749207 (2014).
9. Großmann, I. und Köhler, P.: Vergleichende Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von Arabinoxylanen aus Roggen. *Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem.*, ISBN 978-3-938896-74-7, 120-123 (2013).

tischen Abbau von Arabinoxylanen aus Roggen. *Jahresbericht Dt. Forschungsanst. Lebensmittelchem.*, ISBN 978-3-938896-74-7, 120-123 (2013).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3262
Fax: +49 8161 71-3883
E-Mail: tbecker@wzw.tum.de

Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi)
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-2928
Fax: +49 8161 71-2970
E-Mail: peter.koehler@tum.de

Forschungskreis der
Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 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 142-148, 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.