

## Restaktivität und Funktionalität exogener Enzyme in Backwaren

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle(n):</b>	Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München, Freising Prof. Dr. Veronika Somoza/Prof. Dr. Katharina Scherf  Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft Prof. Dr. Lutz Fischer/Dr. Sabine Lutz-Wahl  Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Freising Prof. Thomas Becker/PD Dr. Mario Jekle
<b>Industriegruppen:</b>	Der Backzutatenverband e. V. (BZV), Berlin Verband der Getreide-, Mühlen- und Stärkewirtschaft e. V. (VGMS), Berlin Verband Deutscher Großbäckereien e. V., Düsseldorf Weihenstephaner Institut für Getreideforschung e. V. (WIG), Freising Verein der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Institutes für Mehl- und Eiweißforschung e. V. (hdbi), Freising
<b>Projektkoordinatorin:</b>	Dr. Fiona Becker Novozymes A/S
<b>Laufzeit:</b>	2017 - 2020
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 748.950,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Die Enzymaktivität ist ein wichtiger prozess-technischer Faktor bei der Herstellung von Backwaren. Die endogene Enzymaktivität schwankt dabei in Abhängigkeit von Getreideart, Umweltbedingungen und Reifegrad bei der Ernte. Zum Ausgleich sowie zur Verbesserung der Maschinengängigkeit und Produktcharakteristika werden oftmals exogene Enzyme bei der Backwarenherstellung verwendet, um die Teig- und Gebäckeeigenschaften gezielt zu verbessern. Hierbei kommen hauptsächlich Hydrolasen (Amylasen, Lipasen und Xylanasen) sowie Oxidoreduktasen (Glucose- und Hexoseoxidasen) zum Einsatz. Die Effekte exogener Enzymaktivitäten werden bei der Backwarenherstellung weitverbreitet genutzt. Die wissenschaftlichen Zusammenhänge zu den genauen Wirkmechanismen und Wirkzeitpunkten exogener Enzyme während der

Backwarenproduktion waren jedoch noch nicht bekannt. Allgemein wurde davon ausgegangen, dass sowohl endo- als auch exogene Enzyme aufgrund der thermischen Belastung während des Backvorganges inaktiviert werden würden und somit im Endprodukt keine technologische Wirkung mehr auftreten könnte. Aufgrund dieser Annahme werden Lebensmittelenzyme als Zusatzstoffe oder Verarbeitungshilfsstoffe betrachtet und unterliegen keiner Deklarationspflicht. Es gab jedoch aus der wissenschaftlichen Literatur erste Hinweise, dass dies keine allgemein gültige Aussage ist.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, die Aktivitäten verschiedener bei der Herstellung von Backwaren relevanter endogener und exogener Enzyme von der Teigbereitung über die Verarbeitung bis zum Endprodukt und über den Zeitraum der Lagerung

systematisch zu analysieren. Die hierzu benötigten Extraktionsverfahren und Aktivitätsassays für Enzyme sollten im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelt und optimiert werden, um die Aktivität von Enzymen über den gesamten Herstellungsprozess verfolgen zu können. Zudem sollten Methoden zum Nachweis einer technologischen Wirkung der Enzyme im Endprodukt erarbeitet werden, die dabei helfen sollten, die funktionelle Wirkung möglicher Restaktivitäten auf die Textur der Krume während der Lagerung zu analysieren und dadurch den gesamten Zeitraum (insbesondere von Amylasen) entlang des Herstellungs- und Lagerprozesses beurteilen zu können. Als Hypothese wurde angenommen, dass bestimmte exogene Enzyme sowohl während der Teigbereitung als auch noch nach dem Backprozess eine technologische Wirkung aufweisen und somit deklarationspflichtig wären. Exogene Enzyme wirken sich zum einen während der Herstellung auf die finale Brottextur aus, zum anderen führen die postulierten Restaktivitäten während der Lagerung zu einem verlangsamten Altbackenwerden. Eine ausführliche Charakterisierung kommerziell erhältlicher Enzympräparate hinsichtlich ihrer Haupt- und Nebenaktivitäten in Backwaren sollte ferner zur Aufklärung enzyminduzierter inhaltsstofflicher Veränderungen und Struktur/Funktionsbeziehungen während der Teig- und Lagerungsphase beitragen.

#### Forschungsergebnis:

Um die Prozessstabilität verschiedener Amylasen, Xylanasen, Lipasen und Glucoseoxidasen in Teig untersuchen zu können, wurden zunächst an das Teigsystem angepasste, sensitive Aktivitätsassays entwickelt. Dabei konnte beispielsweise für den Betamyl3-Assay zur Bestimmung von Exo-Amylaseaktivitäten eine Bestimmungsgrenze von 1 pkat mL<sup>-1</sup> erreicht werden. Um für das Projekt die relevanten, thermostabilen Enzyme auswählen zu können, wurden verschiedene Amylasen, Glucoseoxidasen und Lipasen auf ihre funktionelle Stabilität in Teig hin untersucht. Dazu wurde zunächst die Rückgewinnung (Extraktion) der verschiedenen Enzyme aus der Teigmatrix optimiert. Um die Temperaturstabilität der Enzyme in Hinblick auf eine mögliche Restaktivität in Weißbrot nach dem Backen abschätzen zu können, wurde der Temperaturverlauf, der im Backofen in einem

hefegelockerten Standardweißbrot aufgenommen wurde, im Labormaßstab nachgefahren. Auf diese Weise wurden die höchsten Restaktivitäten mit zwei Amylase-Präparaten, einer maltogenen Amylase aus *G. stearothermophilus* und einer maltotetragenen Amylase aus *P. saccharophila*, ermittelt. Bei den untersuchten Lipase-Präparaten wurde im Teigsystem lediglich für ein Präparat aus *Thermomyces lanuginosus* eine geringe Restaktivität ermittelt. Diese war aber in späteren Backversuchen mit hefegelockertem Standardweißbrot nicht mehr nachweisbar. Bei den untersuchten Glucose- und Hexoseoxidasen wurden sehr geringe Restaktivitäten von unter einem Prozent nachgewiesen, die als „nicht signifikant“ eingestuft wurden.

Die Restaktivität der thermostabilsten Amylase, der maltogenen Amylase aus *G. stearothermophilus*, wurde ebenfalls in gebackenem Standardweißbrot untersucht und betrug 17,8 %. Für die  $\alpha$ -Amylase aus *B. subtilis* wurde in hefegelockertem Standardweißbrot eine Restaktivität von 2,3 % ermittelt. Die Amylase-, Lipase-, Xylanase und Glucoseoxidasepräparate wurden jeweils auf ihre Nebenaktivitäten zueinander untersucht. Das heißt beispielsweise, dass das  $\alpha$ -Amylasepräparat auf Lipase-, Xylanase- und Glucoseoxidase hin untersucht wurde. Dabei wurden in den Amylase-, Lipase- und Xylanasepräparaten sehr geringe Glucoseoxidase-Nebenaktivitäten nachgewiesen. Diese lagen, im Vergleich zu einem Original-Glucoseoxidase-Präparat, bei unter einem Prozent. Auf diese Weise wurden ebenfalls geringe Lipase-Nebenaktivitäten von unter 5 % und Amylase-Nebenaktivitäten von unter 10 %, jeweils im Vergleich zu den originalen Lipase- bzw. Amylasepräparaten, nachgewiesen. Die höchste ermittelte Nebenaktivität mit 34 % waren die Xylanase-Nebenaktivitäten in einem Glucoseoxidase-Präparat aus *Aspergillus niger*. Es wurde die Festlegung getroffen, dass Nebenaktivitäten von unter 10 %, im Vergleich zu den Hauptaktivitäten keinen bedeuteten Einfluss auf die Herstellung von Backwaren haben sollten.

Zur Charakterisierung von Weizenmehl sowie der Amylasepräparate wurde eine Identifizierung der enthaltenen Amylasen über massenspektrometrische Techniken etabliert und durchgeführt. Dabei wurde  $\beta$ -Amylase als dominierende endogene Amylase in den Weizenmehlen identifiziert. Die Analyse zeigte, dass in den Präparaten jeweils eine sehr

begrenze Anzahl an Amylasen vorhanden ist und die Aktivität resultierend aus den Präparaten daher eindeutig zugeordnet werden konnte. Mittels einer an die Matrix Brot adaptierten und vereinheitlichten Extraktionsmethode wurden Amylasen aus der Brotkrume extrahiert und ihre Aktivität mittels kommerziell erhältlicher Assays quantifiziert. Dabei wurde für die Gruppe der  $\alpha$ -Amylase Präparate lediglich für eine *Bacillus-amyloliquefaciens*- $\alpha$ -Amylase eine sehr geringe Aktivität, verglichen mit der zudosierten Aktivität, gemessen. Alle übrigen bakteriellen und fungalen  $\alpha$ -Amylasen zeigten keine messbare Restaktivität in den Modellbroten. Für die Gruppe der maltotetragenen Amylasepräparate wurde ebenfalls eine sehr niedrige Restaktivität in der Brotkrume gemessen. Die Gruppe der maltogenen  $\alpha$ -Amylasepräparate wies eine geringe bis mittlere Restaktivität auf. Diese Restaktivität ergibt sich durch die hohe Temperaturstabilität der eingesetzten Amylase aus *Geobacillus stearothermophilus*. Alle untersuchten Präparate mit detektierter Restaktivität zeigten Veränderungen des Spektrums der in der Brotkrume enthaltenen Gehalte an Mono-, Di-, und Oligosacchariden während der Lagerung der Brote.

Nach erfolgter Grundcharakterisierung der Enzympräparate wurde die funktionelle Wirkung der Enzyme in der Teig- und Krumenmatrix untersucht. Hierzu wurde eine Methodik entwickelt (nachfolgend Pelletmethode genannt), mit Hilfe der erstmals eine Differenzierung der Funktionalität von Enzymen in „vor“ und „nach“ dem Backprozess möglich ist. Hinsichtlich der einzelnen Enzymklassen wurde für Lipasen oder Xylanasen zwar ein Einfluss auf die Krumenausbildung gezeigt, allerdings konnte für diese Präparate keine technologische Wirkung im Falle einer potenziellen Restaktivität im Endprodukt gezeigt werden. Folglich lag für die untersuchten Präparate lediglich eine Funktionalität vor und während des Backprozesses vor. Im Gegensatz dazu führte die potenzielle Anwesenheit von Glucoseoxidase-Aktivität während der Lagerung zu einem Effekt in der bereits ausgebildeten Krumenmatrix, da das Krumenfirming beschleunigt ablief. Die quantifizierte Restaktivität verschiedener Glucoseoxidase-Präparate im Endprodukt war allerdings gering, wodurch ein funktioneller Einfluss auf das Endprodukt unwahrscheinlich ist.

Durch die finale Kombination der entwickelten Methoden konnte für zwei exemplarisch ausgewählte Amylasepräparate mittels eines standardisierten Laborbackversuchs der Effekt verschiedener Prozess- und Produktparameter auf die Inaktivierungskinetik untersucht werden. In Kombination mit der entwickelten Pelletmethode wurde die zugehörige Restfunktionalität der verbleibenden Enzymaktivität nach dem Backprozess im finalen Produkt quantifiziert. Im Fall der verwendeten thermosensitiven bakteriellen  $\alpha$ -Amylase wurde eine vollständige Inaktivierung während des Backprozesses ermittelt, welche sich als unabhängig von verschiedensten Prozess- und Produktparametern erwies. Ebenfalls wurde ein thermostabiles maltogenes Amylasepräparat untersucht, welches zwar eine deutliche Restaktivität aufwies, allerdings aufgrund des nicht im Endprodukt funktionellen Wirkmechanismus keinen Einfluss auf die Textur des Endproduktes während der Lagerung zeigte.

Durch die Kombination der Aktivitäts- und Funktionalitätsbestimmung exogener Enzymaktivität konnte somit im Rahmen des Forschungsprojektes grundlegendes Wissen über die Wirkmechanismen und -zeitpunkte verschiedenster Enzymklassen während der Backwarenherstellung und -lagerung erarbeitet werden.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnten Basiswissen erarbeitet und Methoden entwickelt werden, um die Erfüllung von Standards und gesetzlichen Auflagen in der Deklaration des Enzymeinsatzes in Backwaren sicherzustellen.

Bis dato bestand in der gesamten Branche ein Mangel an Grundlagenwissen für die korrekte Deklaration von exogenen Enzymen in weizenbasierten Backwaren. Das Forschungsprojekt lieferte Erkenntnisse darüber, welche Enzymgruppen eine Restaktivität im Brot haben können und wie hoch die Aktivität der Enzyme während und nach dem Backprozess ist. Dazu wurden Standardnachweisassays an die Brotmatrix adaptiert und weiterentwickelt. Durch die Erkenntnisse des Forschungsprojektes können nun wissenschaftlich basierte Empfehlungen ausgesprochen werden, welche Extraktions- und Assaymethoden verwendet werden sollten, um die Restaktivität von Enzympräparaten in Backwaren bestimmen zu

können. Zudem wurden verschiedene handelsübliche Enzymassays miteinander verglichen und ermittelt, welche Assays für die Aktivitätsbestimmung verschiedenster Enzymklassen am besten geeignet sind. Es konnten somit Empfehlungen hinsichtlich einer Standardmethodik zur Bestimmung der Restaktivität ausgesprochen werden.

Weiterhin wurde erstmalig eine Methode zum Nachweis einer technologischen Wirkung exogener Enzyme im Endprodukt entwickelt, welche von kleinen und mittelständischen Unternehmen (KMU) dazu genutzt werden kann, Klarheit hinsichtlich der Deklaration bestimmter in Backwaren eingesetzter Enzympräparate zu erlangen und das Risiko einer nicht erfolgten Kennzeichnung von zugesetzten, im Endprodukt noch technologisch wirksamen Enzymen zu vermeiden. Ob Enzymaktivitäten bei der Lagerung vorhanden sind, bei welchen Enzympräparaten dies zu erwarten ist und inwieweit sich die Matrixzusammensetzung des Teiges (Rezeptur) auf das Inaktivierungsausmaß auswirkt, wurde exemplarisch für verschiedene exogene Enzympräparate untersucht. Somit wurden die wissenschaftlichen Grundlagen und ihre Anwendung anhand der Charakterisierung typischer Präparate, welche in der Weizenbrotherstellung Verwendung finden, geschaffen und aufgezeigt.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Reichenberger, K., Luz, A., Seidl, I. & Fischer, L.: Determination of the direct activity of the maltogenic amylase from *Geobacillus stearothermophilus* in white bread. *Food Anal. Met.* 13, 496-502 (2020).
3. Rebholz, G. F., Sebald, K., Dirndorfer, S., Dawid, C., Hofmann, T. & Scherf, K. A.: Impact of exogenous  $\alpha$ -amylases on sugar formation in straight dough wheat bread.

*Eur. Food Res. Technol.* doi: 10.1007/s00217-020-03657-y (2020).

4. Paulik, S. & Jekle, M.: Novel approach to investigate the mechanical properties of crumb matrix during storage – Re-engineering of gas-free crumb pellets. *Food Chem.* 288, 333-340 (2019).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei der Forschungsstelle abzurufen.

#### Weiteres Informationsmaterial:

Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie an der Technischen Universität München  
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-2927  
Fax: +49 8161 71-2970  
E-Mail: [katharina.scherf@lrz.tum.de](mailto:katharina.scherf@lrz.tum.de)

Universität Hohenheim  
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft  
Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart  
Tel.: +49 711 459-22311  
Fax: +49 711 459-24267  
E-Mail: [lfischer@uni-hohenheim.de](mailto:lfischer@uni-hohenheim.de)

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie  
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3261  
Fax: +49 8161 71-3883  
E-Mail: [mjekle@tum.de](mailto:mjekle@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](mailto:fei@fei-bonn.de)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben **AiF 19543 N** der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, 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.