

Bijlage 1: artikel glutenvrij brood

Verkennde studie: polymeerchemie als schakel tussen gluten en broodverbetersaars.

M.R. Meijer

Samenvatting

Eigenschappen van gluten en het effect van kneden op de uiteindelijke eigenschappen van brooddeeg worden steeds meer op een fundamentele manier verklaard met behulp van polymeerchemie. De elasticiteit van deeg wordt voornamelijk toegeschreven aan de gluteninen en belangrijk deel van gluten. Een theoretische beschouwing wordt hier gepresenteerd die onderbouwd wordt met experimenteel verkregen data. Zetmeelgranules en gliadines blijken echter een niet te verwaarlozen rol te spelen. Op basis van de gepresenteerde theoretische onderbouwing blijkt het mogelijk te zijn om het effect van broodverbetersaars te verklaren.

© 2007; Ten behoeve van de onderwijsmodule is deze tekst is geschreven op basis van de originele artikelen: zie literatuurlijst.

Inleiding.

Bij de eerste productiestap van het brood bakken ontstaat een elastisch deeg. Uit recent onderzoek (Don et al, 2003) blijkt dat gehydrateerde gluten voornamelijk verantwoordelijk zijn voor deze eigenschap (Singh, 2001). Op dit moment wordt in de literatuur aangenomen dat gluten een netwerk vormen waarin de zetmeelgranules ingebed liggen. Ook blijkt echter dat een beschrijving voor de bouw het netwerk en de daaraan gerelateerde verklaring voor het elastische gedrag niet eenduidig is.

Er zijn twee mogelijke beschrijvingen: ten eerste is het glutennetwerk op te vatten als ketens die sterk met elkaar zijn verbonden (Singh et al, 2001). Ten tweede, het netwerk bestaat uit aaneengesloten eiwit aggregaten (bundels van glutenketens) die nauwelijks met elkaar mengen (Don et al., 2003).

De focus van dit artikel is om een experimenteel ondersteunde beschrijving te geven op basis van de eerste aanname: het netwerk is opgebouwd uit onderling sterk verbonden glutenketens (Singh et al, 2001). Op basis van deze veronderstelling, die eerst geverifieerd wordt, worden voorspellingen gedaan over de selectie van broodverbetersaars die zorgen voor de verbetering van de kwaliteit van het brood.

Gluten zijn onder te verdelen in twee groepen van eiwitten: gluteninen en gliadinen. Van beide groepen zijn kenmerken opgenomen in tabel 1 (Sherwy et al.; 2002; Wieser, 2007).

Gliadines bestaan uit enkele polypeptide ketens met een ongeveer gelijk molecuulgewicht. Gluteninen zijn gevormd uit kleinere eenheden die onderling verbonden zijn met zwavelbruggen. Doordat lengte en dus het molecuulgewicht van deze kleinere eenheden kan variëren, ligt het molecuulgewicht van glutenine tussen 500.000 en meer dan 10 miljoen. Hierdoor behoort de glutenine fractie met het grootste molecuulgewicht tot de langste natuurlijke polymeren.

Tabel 1. Belangrijke kenmerken van glutenine en gliadine

Glutenine	gliadine
Variabel en hoger molgewicht: Bestaat uit een fractie met een hoog molecuulgewicht M_w : 67000-88000 g/mol en een fractie met een laag M_w : 32000-35000 g/mol	Molgewicht: 28000-55000 g/mol Afmeting bij benadering: 50 nm
Lange vertakte ketens bestaat uit een 'backbone' van een keten met hoog M_w waaraan d.m.v. S-bruggen glutenine ketens met laag M_w vastzitten	Lange onvertakte ketens
Bevat t.o.v. andere natuurlijke polymeren een normale fractie aan hydrofobe delen, maar heeft een veel lagere frequentie aan geladen zijgroepen.	Bevat t.o.v. andere natuurlijke polymeren een normale fractie aan hydrofobe delen, maar heeft een veel lagere frequentie aan geladen zijgroepen (nog lager dan glutenine).
Bevat cysteïne Bindingen tussen ketens: - S- en H-bruggen - ion bindingen - vanderWaals bindingen Men vermoedt dat S-bindingen sneller gevormd worden tussen ketens en binnen ketens.	Bevat geen cysteïne. Bindingen tussen ketens: - H-bruggen - ion bindingen - vanderWaals bindingen
Vormen aggregaten van glutenine ketens van 6 typen HMW waarmee 30 LMW stukken verbonden zijn d.m.v. S-bruggen. Daarbij eiwitten ontstaan met M_w van 500000 tot $> 10 \cdot 10^6$. Deze glutenine macropolymeer (GMP) levert een belangrijke bijdrage aan de eigenschappen van het deeg. Het gehalte GMP is in tarwe deeg: 20-40 mg /g. (2-4%)	Blijven lange ketens die voornamelijk d.m.v. H-bruggen interactie hebben met omliggende ketens of water.
Verantwoordelijk voor de elasticiteit en kent veel cohesie, is dus feitelijk de 'alles-binder'. De mate van de elasticiteit wordt bepaald door het aantal bindingen, verstrengelingen (dus M_w) en verbindingen met de granules.	Gehydrateerde gliadine hebben weinig elasticiteit, weinig cohesie. Dient meer als een plasticizer, zorgt voor de rangschikking binnen het netwerk. Heeft een grote invloed op het stromingsgedrag van gluten. Houdt het water vast.

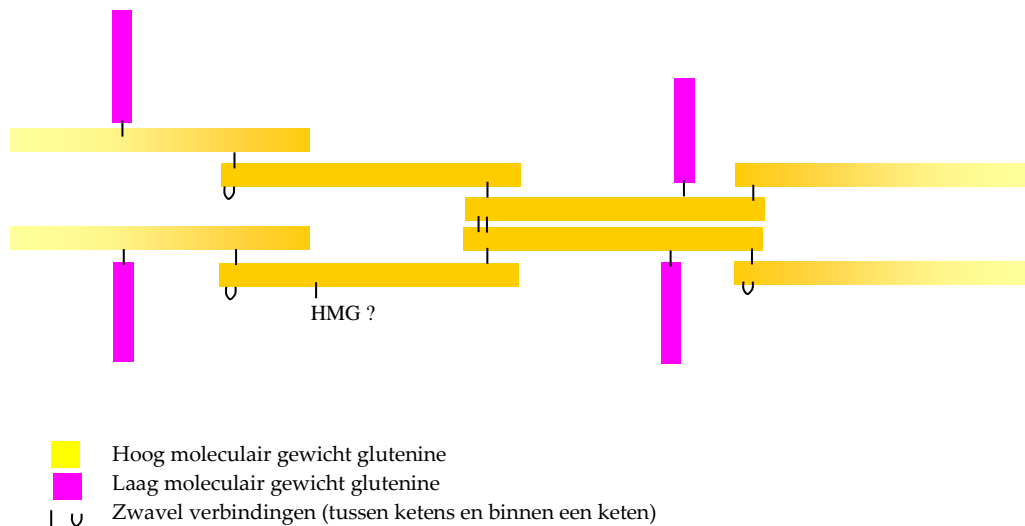
Zowel glutenine als gliadine hebben in vergelijking met de andere natuurlijke eiwitketens een gelijke fractie met hydrofobe delen, maar een veel lagere frequentie van de geladen zijgroepen (zie tabel 2). De relatief lage frequentie van de geladen groepen zorgt voor de geringe oplosbaarheid van gluten in water. Deze oplosbaarheid van gluten heeft te maken met het hoge molecuulgewicht en met de geringere interactie tussen de geladen zijgroepen en de watermoleculen, waarbij waterstofbruggen gevormd kunnen worden.

Tabel 2. Enkele karakteristieke kenmerken vergeleken met andere natuurlijke polymeren (Singh, 2001).

eiwit	Aantal hydrofobe delen	Frequentie van geladen groepen
Glutenine	0,34	0,13
Gliadine	0,39	0,08
Myoglobine	0,32	0,34
Hemoglobine	0,35	0,27
ovalbumine	0,34	0,24

De gluteninen zijn voornamelijk verantwoordelijk voor het elastische gedrag van het deeg. Het deeg krijgt rubberachtige eigenschappen. Als alleen gliadine gemengd wordt met een zetmeel-suspensie, ontstaat er namelijk een vloeibaar mengsel.

Gluteninen zijn natuurlijke polymeren die opgebouwd blijken te zijn uit tenminste 8 delen met een hoog molecuulgewicht (HMG) en 4 delen met een lager molecuulgewicht (LMG) (Sherwy et al., 2002; Wieser, 2007). Waarschijnlijk zit er een lange HMG-zijketen vast aan de 'ruggengraat' van 8 eenheden. Deze delen zijn met elkaar verbonden door 2 zwavelbruggen (Figuur 1). De zwavelbruggen kunnen gevormd worden door de aanwezigheid van het aminozuur cysteine. Aangenomen wordt dat deze zwavelbruggen direct na de productie van de ketens gevormd worden, voordat de ketens de kans krijgen om interne zwavelbruggen te vormen. Het is mogelijk dat steeds nieuwe eenheden aan elkaar gekoppeld worden. Het weergegeven deel van een glutenine molecuul in figuur 1 wordt beschouwd als de ruggengraat van het glutenine:

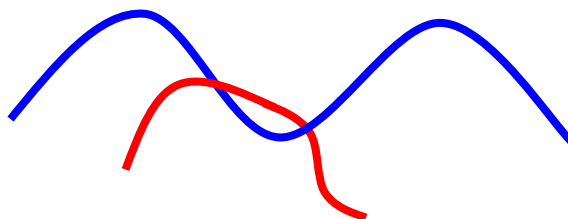


Figuur 1. Bouw van een deel van de 'backbone' bestaande uit tenminste 8 HMG en 4 LMG (Sherwy et al., 2002; Wieser, 2007).

Interacties tussen glutenketens

Bij het vormen van een glutennetwerk vinden er allerlei interacties plaats tussen gliadine, glutenine en water. Deze interacties bestaan voornamelijk uit waterstofbruggen (water en gluten) en zwavelbruggen en verstrengelingen (in gluten). Deze laatste twee types interactie ontstaan doordat de lange moleculen om elkaar heen gedraaid zitten (figuur 2). Het aantal interacties tussen de moleculen onderling en met water wordt bepaald door het molecuulgewicht, het percentage hydrofiele en hydrofobe delen en het aantal geladen zijgroepen. Daarnaast spelen de vanderWaals binding en interacties tussen geladen zijgroepen een rol bij de interactie tussen gluten onderling.

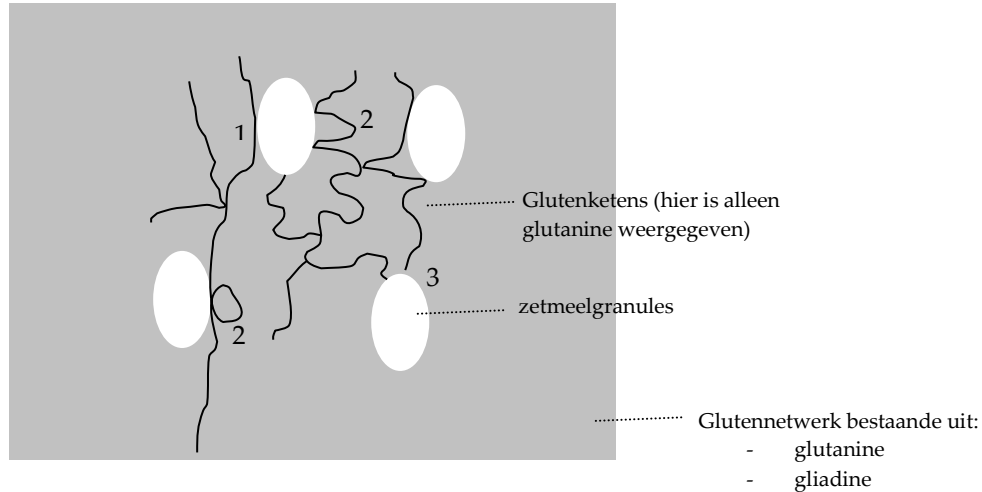
Tijdens het kneden, wanneer er water is toegevoegd om deeg te bereiden, wordt er water gebonden aan de vrije OH-groepen van de glutenketens, buigen de hydrofobe delen van het water af en de hydrofiele delen juist er naar toe. Tijdens het kneden ontstaan er dus allerlei nieuwe interacties en zijn de ketens voortdurend in beweging. Hierdoor raken de ketens meer met elkaar verstrengeld. De verstrengeling wordt ook bepaald door de lengte van de moleculen.



Figuur 2. Een schematische weergave van een verstrengeling.

Interactie tussen gluten en zetmeel granules

Het netwerk van gluten en zetmeelgranules is te beschouwen als een glutennetwerk waar de zetmeelgranules als verbindende elementen zijn ingebed. Het glutennetwerk heeft als ruggengraat de lange glutenine ketens die op verschillende manieren aan de zetmeelgranules vast zitten of met elkaar verstrengeld zijn (zie figuur 3). In dit figuur zijn er maar enkele verbindingen tussen glutenine ketens en de zetmeelgranules weergegeven. Het vermoeden bestaat dat er echter vele duizenden verbindingen zijn tussen gluten en granules. Polymeren kunnen op verschillende manieren binden met de zetmeelgranules (zie figuur 3) door middel van aanleggen (1), met lussen (2) en als eindstuk (3).



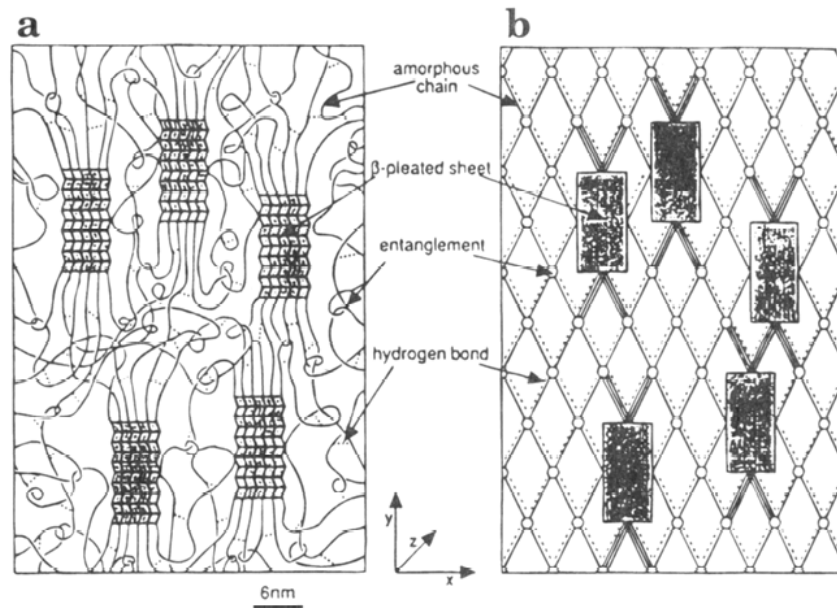
Figuur 3. Een schematische voorstelling van de glutenmatrix bestaande uit een polymeerfase (gluten) en granules (zetmeel)

Eigenschappen van glutennetwerken

Het glutennetwerk is elastisch, dus uit te rekken als er een kracht of spanning (kracht per oppervlakte) op uitgeoefend wordt. De vraag is nu hoe de voorgaande theoretische beschouwing kan bij dragen tot het opstellen van een verklaring voor de elastische eigenschap van het glutennetwerk.

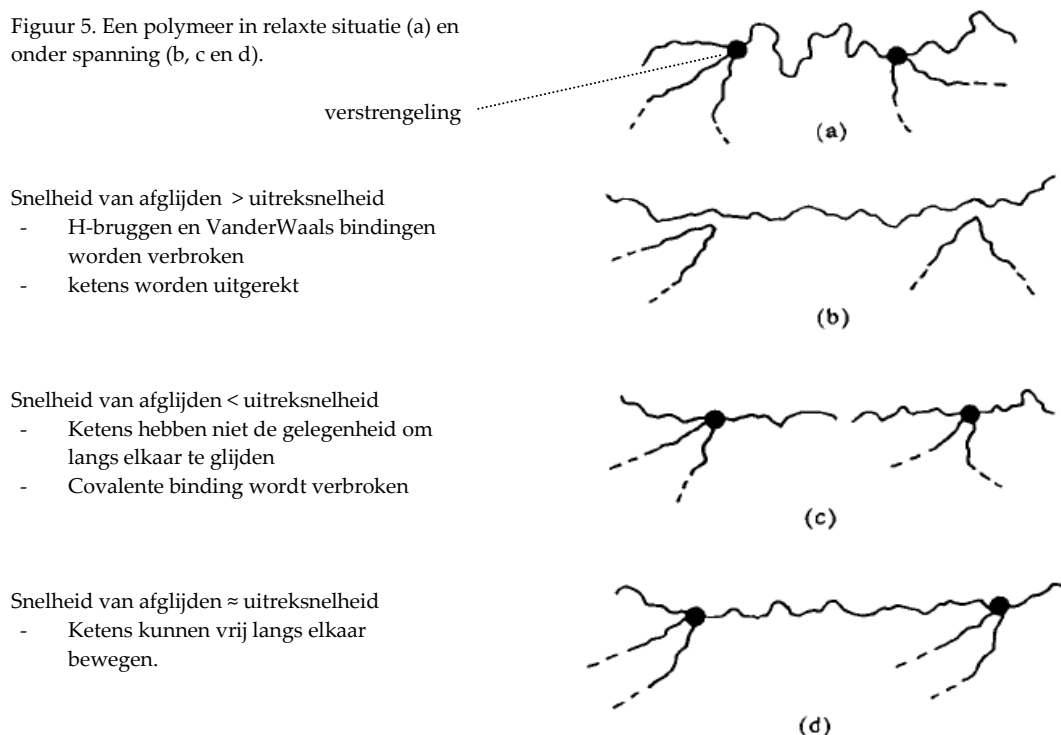
Als er een spanning wordt uitgeoefend op het glutennetwerk kan het volgende gebeuren:

- afglijden van segmenten. Grote delen van gluten kunnen ten opzichte van elkaar verschuiven. Deze afschuiving is in de orde grootte van 5 aminozuren.
- oriëntatie van ketens. Ten gevolge van de opgelegde spanning wordt het glutennetwerk uitgerekt tot het moment dat de onderlinge interacties (S-bruggen, verstrengelingen of zetmeelgranules) dit niet meer toelaten. Het gehele netwerk wordt gestrekt. Dit is analoog aan de het strekken van een zijde draad van een spinnenweb (zie figuur 4). Dit wordt verder onderbouwd, omdat uit experimenten blijkt dat het glutennetwerk een eenmalige opgelegde oriëntatie vasthoudt. Dit kan verklaard worden door aan te nemen dat er nieuwe bindingen of verstrengelingen gevormd worden tijdens de oriëntatie.
- verbreken van verbindingen. Het is mogelijk dat de opgelegde spanning een grotere verschuiving veroorzaakt dan mogelijk is door het strekken van de ketens. Er worden dan bindingen verbroken. Dat zijn eerst H-bruggen en vervolgens S-bruggen, intra moleculaire bindingen en eventueel covalente bindingen in de ketens. In het laatste geval breekt de ketens en daarmee het glutennetwerk (zie figuur 5).



Figuur 4. Het glutennetwerk kan worden vergeleken met de opbouw van spinnenzijde waarmee het web wordt gebouwd. In dit geval zijn de bèta- sheet (β -pleated sheet) te vergelijken met de zetmeelgranules. De glutenine ketens zijn niet geordend (amorpheus chain), maar zijn wel verstrengeld (entanglement) en o.a. verbonden door H-bruggen (hydrogen bond). Links (a) een voorstelling van de bouw en rechts (b) een schematische weergave van spinnenzijde (Termonia, 1994).

Figuur 5. Een polymeer in relaxte situatie (a) en onder spanning (b, c en d).



De hierboven gepresenteerde theorie is goed bruikbaar om de eigenschappen van polymeren zoals zijde en polyetheen te beschrijven. Polyetheen bestaat uit lange ketens $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$ waarbij n de waarde 10.000 kan hebben. De polyetheen moleculen zijn dus onvertakte ketens die dus heel regelmatig zijn, waardoor ze heel goed naast elkaar kunnen liggen (vgl. met de bèta sheet in figuur 4). Het is echter ook

wel logisch dat die ketens niet over de gehele molecuullengte precies naast elkaar kunnen liggen. Er zijn dus gebieden waarin die ketens ongeordend door elkaar liggen (vgl. amorpheus chain in fig. 4).

Gebleken is dat de opgestelde theorie, die hierboven gepresenteerd is, heel goed het gedrag van polyetheen kan beschrijven en voorspellen. Er zijn veel overeenkomsten tussen het gedrag van dergelijke grote polymeren en gluten (zie o.a. fig. 4). Daarom lijkt dat de polymeerchemie te gebruiken is om de bouw van het glutennetwerk te beschrijven. De onderzoeksvraag, die wordt beantwoord in dit artikel, is daarom de volgende: Kan het gedrag van glutennetwerk worden beschreven met behulp van polymeerchemie? En zo ja, kan dan worden begrepen wat de broodverbeteraars doen in het deeg?

Methode.

De experimenten aan het deeg zijn uitgevoerd met een extensiograaf, een opstelling die ook eenvoudig na te bootsen is met het door Bax et al (2003) gebruikte trek-rek toestel. Vanwege de eenvoud en het niet-kwantitatieve karakter van dit artikel is de methode van Bax voldoende. Voor details wordt verwezen naar het desbetreffende artikel.

Het deegmonster wordt daarbij uitgerekt tot het moment dat het breekt. De, op het deeg, uitgeoefende spanning wordt daarbij uitgezet tegen de uitrekking in een zogenaamd extensioqram. De uitrekking is een maat voor de insnoering van het deeg als er aan dit deeg wordt getrokken.

Resultaten.

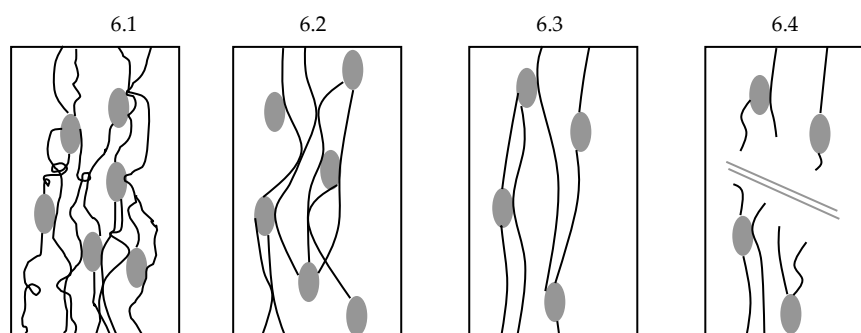
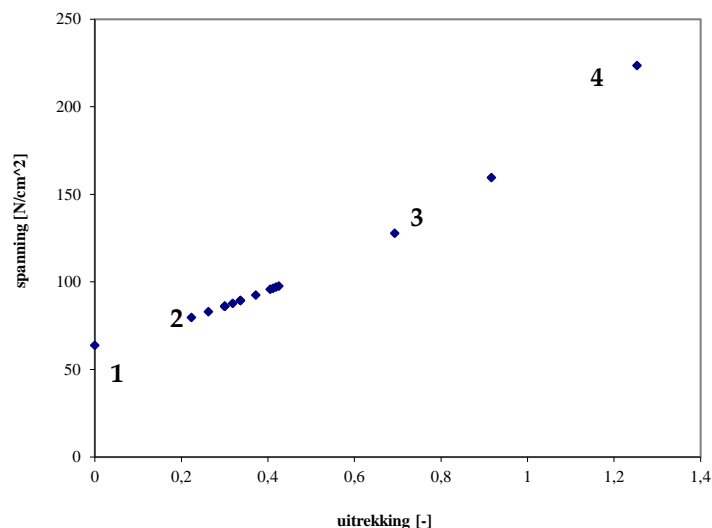
Bij een extensiograaf wordt een monster van het deeg, in de vorm van een staaf uitgerekt. De uitrekking is gedefinieerd volgens $\Delta L/L_0$, waarbij L_0 de oorspronkelijke lengte is en ΔL het verschil tussen de nieuwe lengte van de deegstaaf en de oorspronkelijke lengte. De spanning is het gewicht in Newton waarmee wordt getrokken gedeeld door het oppervlak van de doorsnede van de deegstaaf.

Uit triplo metingen blijkt dat het moment van breken ongeveer bij dezelfde uitrekking plaatsvindt. Daarbij wordt aangenomen dat er insnoeringen ontstaan (diameter van de staaf wordt kleiner). Er ontstaan nieuwe structuren als het deeg onder spanning omhoog wordt getrokken.

In figuur 6 is een typisch extensioqram van tarweddeeg weergegeven. In het extensioqram corresponderen de nummers met de voorstellingen van de polymeer netwerken (gluten) zoals wordt verwacht volgens theoretische beschouwing die hierboven is gegeven. In figuur 6.1 is het glutennetwerk in rust. Er wordt geen spanning op uitgeoefend. De ketens zijn verbonden met S- en H-bruggen en zijn verstrengeld. In figuur 6.2 worden de H-bruggen verbroken en schuiven de ketens langs elkaar tot het moment dat niet meer kan. De ketens zijn tot hun uiterste vorm uitgerekt. De verstrengelingen, S-bruggen en de sterke covalente bindingen maken verdere verschuiving onmogelijk. Bij een hogere spanning worden de S-bruggen verbroken (figuur 6.3). De, op deze manier ontstane, fragmenten worden verder uitgerekt tot het moment dat de covalente atoombindingen worden verbroken. De glutenketens breken en de deegstaaf breekt tengevolge van een verdere afschuiving die niet meer tot staan gebracht kan worden.

Uit het experiment en de theoretische beschouwing is nu goed te begrijpen dat er een grote kracht nodig is om het deeg te breken als de fractie HMG hoog is. Er is een grote mate verstrengeling mogelijk. Daarnaast kunnen veel meer onderlinge dwarsverbindingen zorgen voor een stevig netwerk. Het netwerk zou veel zwakker zijn als het volledig uit gliadine en/of LMG was opgebouwd.

Het probleem van overknedden, waarbij het kneden te lang duurt of te krachtig plaatsvindt, kan nu ook beter begrepen worden. Bij het overknedden ontstaat er een zwak deeg, dat weinig samenhang vertoont. Dat leidt tot een brood van mindere kwaliteit. In beide gevallen wordt er steeds een constante spanning op het deeg uitgeoefend waardoor bindingen eerder breken. Er ontstaat een glutennetwerk dat bestaat uit kleinere netwerken die onderling niet met elkaar verbonden zijn.



Figuur 6. Een extensigram van tarwedeeg is weergegeven. In het extensigram wordt met nummers verwezen naar de voorstellingen 6.1 t/m 6.4. In de figuren 6.1 t/m 6.4 is een voorstelling gemaakt van datgene dat plaatsvindt met de glutenketens tijdens het uitrekken van de deegstaaf. In Figuur 6.1 is het netwerk in rust. In figuur 6.2 is er sprake van een geringe uitrekking. In figuur 6.3 is de spanning verder opgevoerd waardoor er een duidelijke ordening ontstaat. In figuur 6.4 is er sprake van breuk.

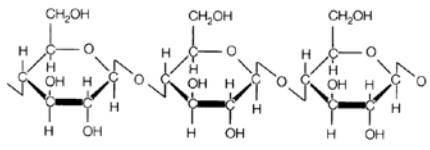
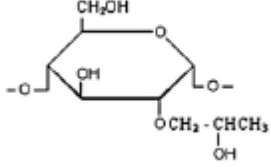
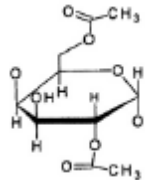
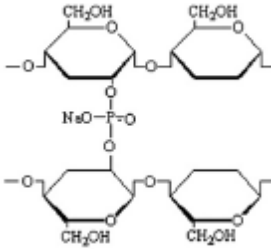
Discussie.

Een eerste indruk is dat de experimentele resultaten adequaat beschreven kunnen worden m.b.v. de gepresenteerde theoretische beschouwing. Het betreft voornamelijk een kwalitatieve beschrijving van de elastische eigenschappen van gluten.

De limitering van deze beschouwing is de geringe experimentele ondersteuning. Singh et al (2001) geeft daarbij ook aan dat de theoretische beschouwing heel goed opgaat voor polyetheen, maar dat verdere experimentele verificatie nodig is om toepasbaar te zijn op gluten. Daarbij moet worden opgemerkt dat een gluten polymeer een veel complexere structuur heeft dan polyetheen.

Is het nu mogelijk om op basis van bovenstaande theoretische beschouwing additieven te vinden die geschikt zijn om de glutenmatrix te verbeteren? Volgens Miyazaki et al. (2006) blijkt dat hydrocolloïden veelvuldig gebruikt worden als broodverbeteraar. Miyazaki et al. onderscheidt grofweg drie soorten hydrocolloïden op basis van cellulose: hydroxyalkyl, ge-acetyleerde en cross-linked. In het eerste geval zijn de OH-groepen van cellulose vervangen door $-(CH_2)_n-OH$ groepen ($n=1, 2, 3$). In het tweede geval zit er een $-OCOCH_3$ groep op de plek van een OH-groep. In het derde geval hebben OH-groepen van twee verschillende ketens gereageerd met een fosfaat groep waarbij een O-P-O brug is ontstaan tussen twee ketens (zie tabel 3).

Tabel 3. Chemische structuur van verschillende typen broodverbeteraars

verbinding	OH vervangen door	voorbeelden
Cellulose 	n.v.t.	n.v.t.
Hydroxyalkyl-verbinding 	-O-CH ₂ -CHOH-CH ₃	2-hydroxypropylcellulose Hydroxymethylcellulose (HPMC) Carboxymethylcellulose (CMC)
Geacetyeerde verbinding 	-O-CO-CH ₃	Acetylcellulose Pectine (natuurlijke oorsprong)
Cross-linked verbinding 	NaO-OPO=O	Cross-linked waxy maïszetmeel (CNCS)

Hydrocolloïden zijn dus in staat om interactie aan te gaan met water (hydroxyalkylcellulose, geacetyeerde cellulose). Daarnaast kan een hydrocolloïd een crosslink aangaan door middel van fosforbruggen. Tenslotte lijkt een hydrocolloïd wel in staat om verstrengeld te raken vanwege het hoge molecuulgewicht.

Een broodverbeteraar zou een bijdrage moeten leveren aan het versterken van het glutennetwerk, maar ook de waterregulatie mag niet te veel veranderd worden. Daarom is het verstandig om een hydrocolloïd te kiezen dat in staat is om water te binden. Tevens moet een broodverbeteraar een bijdrage kunnen leveren aan het glutennetwerk, zodat er een duidelijke verbetering optreedt op het gebied van elasticiteit, gasdichtheid en interne bouw door het aangaan van voldoende interacties met zetmeel en gluten.

Er zijn geen hydrocolloïden die al deze eigenschappen bezitten. Daarom wordt er veel gebruik gemaakt van een mengsel van hydrocolloïden zodat alle eigenschappen die gewenst zijn ook daadwerkelijk een kans hebben om gerealiseerd te worden.

Hydrocolloïden bevatten verschillende zijketens (geladen, ongeladen, polair, apolair). Hoewel de ruggengraat van de hydrocolloïden duidelijk anders is dan die van gluten lijkt het er op dat hydrocolloïden bepaalde eigenschappen gemeen hebben met gluten. Dit in combinatie met een hoog molecuulgewicht lijkt het erop dat hydrocolloïden een bijdrage kunnen leveren aan het netwerk en dus aan de uiteindelijke structuur van het brood.

We denken door het toepassen van de theoretische beschrijving dat er een combinatie nodig is van hydrocolloïden om zowel de verstrengeling te bevorderen als mede het aantal crosslinks (elasticiteit) en waterregulatie. Deze laatste is belangrijk i.v.m. het gashoudend vermogen en de kwaliteit tijdens het bewaren van het brood.

Literatuur

Don, C., W. J. Lichtendonk, J.J. Plijter, T. van Vliet & R.J. Hamer (2005). The effect of mixing on glutenin particle properties: aggregation factors that affect gluten function in dough, *Journal of Cereal Science*, 41, 69–83.

Miyazaki, M., P. Van Hung, T. Maed & N. Morita (2006). Recent advances in application of modified starches for breadmaking, *Trends in Food Science & Technology*, 17, 591-599

Singh, H. & F. MacRitchie (2001). Application of polymer science to properties of gluten, *Journal of Cereal Science*, 33, 231–243

Shewry, P.R., N.G. Halford, P.S. Belton and A.S. Tatham. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain, *the royal society*, Published online 25 February 2002

Termonia, Y. (1994). Molecular modelling of spider silk elasticity, *macromolecules*, 27, 7378-7381.

Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins, *Food Microbiology* 24, 115–119