



# PATENTSCHRIFT 147 499

**Wirtschaftspatent**

Ertelt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11) 147 499 (44) 08.04.81 Int. Cl.<sup>3</sup> 3(51) A 23 C 19/00  
A 23 L 1/226  
(21) WP A 23 C / 217 276 (22) 30.11.79

- 
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD  
(72) Quehl, Adelheid, Dipl.-Biol.; Rothe, Manfred, Dr. Dipl.-Chem.;  
Leuchtenberger, Andreas, Dr. Dipl.-Biol.; Ruttloff, Heinz,  
Prof. Dr. Dipl.-Lbm.-Chem.; Engst, Wolfram, DD  
(73) siehe (72)  
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, FZ für Molekularbiologie  
und Medizin, Zentralinstitut für Ernährung, Büro für  
Schutzrechte und Neuererwesen, 1505 Bergholz-Rehbrücke,  
Arthur-Scheunert-Allee 114-116
- 

(54) Verfahren zur Herstellung von Edelpilz-Käsearoma

---

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Edelpilz-Käsearoma unter Verwendung eines Lipasepräparates bzw. eines Lipasebildners in Verbindung mit *Penicillium roqueforti*. Die aromahaltige Phase kann zur Aromatisierung bzw. Aromaverstärkung von verschiedenen Lebensmitteln, z.B. Milch- und Molkereiprodukten, dienen. Ziel ist die Gewinnung des Edelpilz-Käsearomas in hoher Konzentration und mit nur geringen Verlusten. Die Aufgabe besteht darin, Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die zu diesem Ziel führen. Das Wesen der Erfindung ist darin zu sehen, daß der in der Kulturlösung vorhandene und für die mikrobielle Aromabildung erforderliche Fettanteil in einer solchen Menge eingesetzt wird, daß er als Extraktionsmittel bzw. Anreicherungsphase für die Aromastoffe genutzt wird. Erfindungsgemäß werden 5 bis 20 Ma.-% einer Fettkomponente dem Fermentationsmedium zugegeben. Nach Abschluß der Aromabildung erfolgt eine mechanische Abtrennung des mit den Aromastoffen angereicherten Fettes.



Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Gemäß einem Verfahren von Luksas (US-PS 3 720 520) wird z. B. ein Medium aus 10 % Natriumcaseinat und 5 % Butterfett ca. 5 Tage bei 25 °C mit einer Sporenabschwemmung von *Penicillium roqueforti* fermentiert. Nach Lashkari (DE-AS 1 517 133) wird ein Rahm-Medium mit 40 - 60 % Fettgehalt mit einer Sporenabschwemmung von *Penicillium roqueforti* beimpft und ca. 48 h bei 25 - 30 °C fermentiert. Während die oben erwähnten Verfahrenslösungen ohne den Einsatz von Enzymen arbeiten, wird in anderen Verfahren ein durch vorherigen oder gleichzeitigen Einsatz eines Lipaseenzym bzw. Lipasebildners lipolyzierter Fettanteil im Medium verwendet.

Gemäß einem Verfahren von Knight (US-PS 3 100 153) wird z. B. zur Herstellung eines Roquefort-Käsearoma ein pasteurisiertes, homogenisiertes Milchmedium (Vollmilch, Magermilch, Rahm) nach Zusatz von lipolisiertem Milchfett und Kochsalz mit einer Sporenabschwemmung von *Penicillium roqueforti* beimpft und bis zu 3 Tagen bei 25 - 30 °C fermentiert. Watts und Nelson (US-PS 3 072 489) verwenden ein homogenisiertes Milchmedium, dem in gestaffelter Form bis zu 3 % Butteröl und 5 % Salz zugesetzt werden, und es wird unter Druck 3 Tage bei Raumtemperatur fermentiert. Nach einem Verfahren von Amu und Jarvis (GB-PS 1 361 817) wird als Medium zur Erzeugung von Edelschimmel-Käsearoma ein nach Ansäuerung und Dicklegung der Milch und Entfernung der Molke erhaltener Bruch verwendet, welcher nach 24 h mit 4 - 5 % Kochsalz und 5 - 10 % eines vorher lipolyzierten Fett- oder Ölanteils versetzt wird. Die Fermentation mit der Sporenabschwemmung erfolgt unter aeroben Bedingungen 2 - 10 Tage bei 25 °C.

Außerdem Patentschrifttum gibt es auch in der Zeitschriftenliteratur vereinzelt Angaben über verschiedene Verfahrenswesen zur Produktion von Edelschimmel-Käsearoma. Kinsella und Hwang (Biotechnol. Bioeng. 18 (1976) 927) geben eine Übersicht über bekannte Lösungswege. Von der Produktion

eines Edelpilz-Käsearomas mittels submerser Fermentation von *Penicillium roqueforti* berichtet Nelson (Food Chem. 18 (1970) 567), wobei das Medium auch hier aus autoklavierter Milch (Vollmilch, Magermilch, Molke) mit Zusatz von hydrolysiertem Milchlipp und Kochsalz besteht.

Ausführliche Beispiele für die Produktion von Edelpilz-Käsearoma werden in den Arbeiten von Dwivedi und Kinsella (J. Food Sci. 39 (1974) 620; J. Food Sci. 39 (1974) 83) vorgestellt. Die Autoren berichten über die Entwicklung eines semikontinuierlichen Prozesses zur Produktion einer solchen Aromakomposition. Nach mehrstufiger Anzucht des Pilzes in einem Maisquellwasser-Saccharose-Medium erfolgt die Aromaproduktion in einem Gefäß mit kontinuierlichem Zustrom von lipolysiertem, gepuffertem Rahm bei 25 °C unter aeroben Bedingungen. Die Dauer der Fermentation beträgt ca. 2 Wochen.

Jolly und Kosikowski (J. Dairy Sci. 58 (1975) 1 272) stellen Edelpilz-Käsearoma durch Mischen eines Magermilchmediums mit einer fettreichen Substanz (Rahm, Kokosfett, Butterfett) her, die vorher unter Einsatz von Sporen der Art *Penicillium roqueforti*, einer mikrobiellen Lipase oder einer Starterkultur von Milchsäurebakterien 49 h bei 20 °C fermentiert wurde. Diese Autoren beschreiben des weiteren die Herstellung eines Edelpilz-Käsearomas unter Verwendung von Milchpulver, Butter (bzw. Kokosfett), einer mikrobiellen Lipase sowie einer Sporenabschwemmung von *Penicillium roqueforti* (J. Food Sci. 40 (1975) 285).

Die bisher vorliegenden technischen Lösungen zur Herstellung von Edelpilz-Käsearoma bergen jedoch noch Unzulänglichkeiten und Mängel hinsichtlich Aromaanreicherung, Aromaqualität und Haltbarkeit in sich. So wird in vielen Patenten und Veröffentlichungen über die Verwendung der gesamten aromahaltigen Kulturlösung bzw. eines durch Sprühtrocknung hergestellten Trockenpräparates berichtet.

Da der Anreicherung von Aromastoffen in mikrobiellen Kulturansätzen physiologisch bedingte Schranken gesetzt sind, müssen zur Aromatisierung von Lebensmitteln relativ große Flüssigkeitsmengen mit allen Inhaltsstoffen zugesetzt werden, so daß der Charakter des zu aromatisierenden Produktes ungünstig beeinflusst werden kann. Hinzu kommt, daß diese Kulturmedien nur begrenzte Haltbarkeit besitzen. Diese Nachteile versucht man häufig dadurch zu umgehen, daß das wasser- und enzymreiche aromahaltige Kulturmedium bzw. -filtrat einem Trocknungsprozeß (z. B. Sprühtrocknung, Gefriertrocknung) unterworfen wird. Da ein großer Teil der für das Käsearoma maßgeblichen Komponenten jedoch leicht flüchtig ist, führt jede Art der Trocknung zu hohen Verlusten an Aromasubstanz bzw. unter Umständen zu qualitativen Veränderungen des Aromas.

#### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Edelschimmelpilz-Käsearoma in hoher Konzentration mit nur geringen Verlusten und bei zugleich hoher Qualität auf fermentationstechnischem Wege zu gewinnen und anzureichern.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur fermentationstechnischen Gewinnung sowie zur Anreicherung eines Edelschimmelpilz-Käsearomas zu entwickeln, das bei der Herstellung von Lebensmitteln zur Aromatisierung verwendet werden kann.

Es wurde nun gefunden, daß die vorangehend genannten Nachteile beseitigt werden, wenn der in der Kulturlösung vorhandene und für die mikrobielle Aromabildung erforderliche Fettanteil zugleich als Extraktionsmittel bzw. Anreicherungsphase für die entstehenden Aromastoffe genutzt wird. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von

Edelpilz-Käsearoma durch Einwirkung von Lipase, gegebenenfalls nach vorangegangener Vorkultivierung von Lipasebildnern, auf ein Fermentationsmedium, das mindestens eine Fettkomponente enthält, mit Einsatz einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti* ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Fettkomponente, vorzugsweise Butterfett, in Anteilen von 5 bis 20 Masse % dem Fermentationsmedium zugegeben wird und, daß nach Abschluß der Aromabildung eine mechanische Abtrennung des mit den Aromastoffen angereicherten Fettes von der wäßrigen Phase und der Biomasse erfolgt.

Das Edelpilz-Käsearoma wird hergestellt, indem ein fetthaltiges Medium mit Lipase versetzt und anschließend mit einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti* beimpft wird. Als Fettkomponente dienen vorzugsweise Rahm und Butter in einer Konzentration von 5 - 20 Masse %. Außerdem enthält das Medium C- und N-Quellen, z. B. Magermilch, Milchpulver, Molke sowie Salze, z. B. NaCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ . Die Fermentation verläuft 24 - 72 h bei 30 °C in zwangsbelüfteten Fermentern unter Rührung. Anstelle des Lipasepräparates können auch lipolytisch aktive Mikroorganismen (z. B. *Candida lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*) verwendet werden. In diesem Fall wird ein Vorkulturmedium (ähnliche Zusammensetzung wie das Fermentationsmedium, jedoch mit nur 1 - 3 % Fettgehalt) mit den Lipasebildnern beimpft und 24 - 48 h lang bei 30 °C unter Belüftung und Rührung fermentiert. Anschließend wird dem Medium vorzugsweise die Fettkomponente (Rahm, Butter) zugesetzt (Endkonzentration 5 - 20 Masse %) und mit einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti* beimpft. Die Fermentation verläuft dann wie bereits geschildert.

Nach Abschluß der mikrobiellen Aromasynthese erfolgt erfindungsgemäß eine mechanische Abtrennung des mit den Aromastoffen angereicherten Fettes von der wäßrigen Phase sowie von der Biomasse, vorzugsweise durch Separation oder Zentrifugieren. Da die Anreicherung der meisten

Aromakomponenten in der Ölphase hoch ist (z. B. bei 10 % Fett im Gesamtsystem eine etwa 8fache Konzentrierung), wird bei der ersten Abtrennung bereits der größte Teil der Gesamtaromamenge gewonnen. Zur weiteren Verbesserung der Ausbeutebilanz ist ein nochmaliges Mischen der wäßrigen Phase mit frischem Öl möglich, hierbei steigt die Gesamtausbeute jedoch auf Kosten des Anreicherungsgrades; nach einer entsprechenden Verweildauer wird die mit Aroma angereicherte Fettphase wieder abgetrennt.

Neben der Anreicherung von Edelpilz-Käsearoma sind mit der Isolierung der aromatischen Fettphase folgende Vorteile verbunden:

- Durch die starke Bindung der Aromastoffe an die Fettphase sind Aroma-Verluste, wie sie durch andersartige Konzentrierungsverfahren auftreten, durch Erhitzungsprozesse bei der Verarbeitung in Lebensmitteln stark gemindert.
- Im Vergleich zur wasserreichen aromahaltigen Flüssigkeit ist die Lagerstabilität der Fettphase wesentlich erhöht.
- Die Abtrennung der Aromakomponenten von Biomasse und wäßriger Phase führt zu einer sensorischen Verbesserung des Produktes.
- Die Entfernung der Biomasse vermindert toxikologisch-lebensmittelhygienische Probleme.
- Ein zusätzlicher, ökonomisch aufwendiger Aufarbeitungs- bzw. Konzentrierungsschritt entfällt, da die Fettphase ohne Qualitätsbeeinträchtigung in die zu aromatisierenden Lebensmittel eingearbeitet werden kann.

#### Ausführungsbeispiele

##### A) Einstufenkultur

###### Beispiel 1

*Penicillium roqueforti* wird auf Bierwürzeagar 5 - 7

Tage bei 25 °C kultiviert. Mit 5 ml einer Sporensuspension (ca.  $10^9$  Sporen/ml) werden in 500 ml Kulturkolben 100 ml eines sterilen Mediums folgender Zusammensetzung beimpft:

Molkenpulver	15 Masse %
NaCl	3 Masse %
Butterfett	10 Masse %
pH	6,0

Gleichzeitig werden 10 mg % Lipasepräparat zugesetzt. Die Fermentation erfolgt 24 - 48 h lang bei 30 °C auf einem Rotationsschwingtisch mit 210 U/min. Die aromahaltige Fettphase wird nach Beendigung der Fermentation durch Zentrifugieren (z. B. 500 U/min, 20 min) abgetrennt, dekantiert und bei 4 °C gelagert.

#### Beispiel 2

Wie Beispiel 1 mit folgenden Abänderungen. 1 l Medium in einem 2 l Glasfermentor wird mit 50 ml Sporensuspension beimpft. Die Fermentation erfolgt 48 h lang bei 30 °C unter Luftzufuhr (500 ml/min) und einer Rührgeschwindigkeit von 200 U/min.

#### Beispiel 3

Wie Beispiel 1 mit folgenden Abänderungen. 15 l Medium in einem 30 l Glasfermentor wird mit 750 ml Sporensuspension beimpft. Die Fermentation erfolgt 48 h lang bei 30 °C bei einer Rührgeschwindigkeit von 250 U/min und einer Luftzufuhr von 3 l/min. Die Abtrennung der Fettphase von der Kulturlösung wird mittels Separator vorgenommen.

#### B) Zweistufenkultur

##### Beispiel 4

Die Anzucht des Lipasebildners *Candida lipolytica* erfolgt auf einem Nähragar 24 h bei 30 °C. 1 ml einer Zellsuspension wird in einem 500 ml Kulturkolben übertragen,

der mit 100 ml eines Kulturmediums folgender Zusammensetzung befüllt ist:

Molkenpulver	15 Masse %
NaCl	2 Masse %
Butter	10 Masse %
pH	6,0

Die Kultivierung erfolgt auf einem Rotationsschütteltisch (210 U/min), bei 30 °C. Nach 48 h wird durch 30 minütiges Erhitzen auf 100 °C der Lipasebildner inaktiviert. Nach Abkühlung auf 30 °C wird mit 5 ml einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti* (ca. 10<sup>9</sup> Sporen/ml) beimpft und 48 h bei 30 °C auf den Schwingtisch weiterkultiviert. Die Abtrennung der aromahaltigen Fettphase erfolgt wie in Beispiel 1.

#### Beispiel 5

Wie Beispiel 4 mit folgenden Abänderungen. 1 l Medium in 2 l Glasfermentoren wird mit 50 ml einer Zellsuspension von *Candida lipolytica* beimpft. Die Fermentation erfolgt 48 h lang bei 30 °C, einer Luftzufuhr von 500 ml/min sowie einer Rührgeschwindigkeit von 200 U/min. Nach Hitzeinaktivierung des Lipasebildners wird mit 50 ml einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti* beimpft.

#### Beispiel 6

Wie Beispiel 4 mit folgenden Abänderungen. 15 l Medium in einem 30 l Glasfermentor werden mit 750 ml Zellsuspension beimpft. Die Fermentation erfolgt 48 h lang bei 30 °C, einer Rührgeschwindigkeit von 250 U/min und einer Belüftung mit 3 l/min. Die Abtrennung der Fettphase erfolgt mittels Separator.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Edelpilz-Käsearoma durch Einwirkung von Lipase, gegebenenfalls nach vorausgegangener Vorkultivierung von Lipasebildnern, auf ein Fermentationsmedium, das mindestens eine Fettkomponente enthält, und Einsatz einer Sporensuspension von *Penicillium roqueforti*, dadurch gekennzeichnet, daß eine Fettkomponente, vorzugsweise Butterfett, in Anteilen von 5 bis 20 Masse % dem Fermentationsmedium zugegeben wird und nach Abschluß der Aromabildung eine mechanische Abtrennung des mit den Aromastoffen angereicherten Fettes von der wäßrigen Phase und der Biomasse erfolgt.
2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß 10 % des Butterfettes dem Fermentationsmedium zugegeben werden.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mechanische Abtrennung des Fettes durch Abscheiden oder Zentrifugieren erfolgt.