DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **248 501 A1**

4(51) **A 23 C 19/032**
A 23 C 19/00
C 12 P 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 23 C / 274 594 8	(22)	29.03.85	(44)	12.08.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Quehl, Adelheid, Dipl.-Biol.; Engst, Wolfram, Dr.; Leuchtenberger, Andreas, Dr. Dipl.-Biol.; Schalinatus, Edith, Dr. Dipl.-Chem.; Ruttloff, Heinz, Prof. Dr. Dipl.-Lebensmittelchem., DD

(54) Verfahren zur Gewinnung von Käsearoma oder von Käsearomakomponenten

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Käsearoma oder Käsearomakomponenten durch Fermentation in einem Medium mit mindestens einer Fettkomponente unter Verwendung ausgewählter Stammvarianten von Penicillium roqueforti. Erfindungsgemäß wird zum Aufschluß der Fettkomponente vorzugsweise die Stammvariante Penicillium roqueforti IMET 43 739 durch eine Vorkultur in einem speziellen Medium zur Bildung lipolytischer Enzyme angeregt. Ein Teil dieser Vorkultur wird mit einer zweiten, zur Bildung bestimmter Aromastoffe besonders befähigten Stammvariante dem Hauptmedium zugegeben und die Fermentation bei vorgegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das entstehende Käsearoma wird durch Abtrennung der aromahaltigen Fettphase gewonnen.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung von Käsearoma oder von Käsearomakomponenten durch Submerskultur von Penicillium roqueforti in einem Fermentationsmedium mit vorgegebener, an sich bekannter Zusammensetzung, in Gegenwart von mindestens einer Fettkomponente im Medium, in einem Temperaturbereich von 25 bis 30 °C, **dadurch gekennzeichnet,** daß zum Aufschluß der Fettkomponente eine ausgewählte Stammvariante von Penicillium roqueforti mit hoher lipolytischer Aktivität, vorzugsweise die Stammvariante Penicillium roqueforti IMET 43 739 – hinterlegt in der Zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena –, durch die Vorkultur in einem speziellen Medium zur Bildung lipolytischer Enzyme angeregt wird und ein Teil dieser Vorkultur, gegebenenfalls unter Zusatz einer zweiten Stammvariante von Penicillium roqueforti mit besonderer Fähigkeit zur Bildung bestimmter Aromastoffen, vorzugsweise die Stammvariante IMET 43 740, dem Fermentationsmedium zugegeben, und die Fermentation durchgeführt wird, worauf das entstehende Käsearoma durch Abtrennung der aromahaltigen Fettphase gewonnen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß bei Abbruch der Fermentation nach 20 bis 30 Stunden ein käseartiges Grundaroma, bei Abschluß der Fermentation nach 40 bis 50 Stunden ein blaukäseartiges Aroma erhalten wird.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß in der Vorkultur zum Zwecke der verstärkten Lipasebildung ein spezielles Medium mit der Zusammensetzung 2,5 % Sojamehl, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % KH_2PO_4 und 0,1 % $(NH_4)_2SO_4$ (*p*H 9,0) eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Käsearoma oder von Käsearomakomponenten durch Fermentation in einem Medium mit mindestens einer Fettkomponente unter Verwendung ausgewählter Stammvarianten von Penicillium roqueforti.
Die erfindungsgemäß hergestellten Aromen oder Aromakomponenten können zur Aromatisierung bzw. Aromaverstärkung von bestimmten Lebensmitteln – vorzugsweise Molkereiprodukten – eingesetzt werden, die ein käseartiges Grundaroma bzw. ein spezifisches blaukäseartiges Aroma erhalten sollen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Im Zusammenhang mit der biotechnologischen Herstellung von Käsearomakonzentraten sind eine Reihe von Verfahren bekannt. Dabei werden im allgemeinen die zur Synthese von Aromastoffen fähigen Mikroorganismen in einem speziellen Medium unter bestimmten Bedingungen gezüchtet und der entstehende Aromakomplex durch Trocknung der Kulturlösung gewonnen. Die biotechnologische Erzeugung eines Käsearomas vom Roqueforttyp kann z. B. auf enzymatisch-mikrobiellem Wege, durch Kultivation von Penicillium roqueforti in natürlichen Medien, wie Milch, Molke, Rahm, Käsebruch bei einer Temperatur von 25–30 °C erfolgen. Die grundlegende Voraussetzung für die Gewinnung eines derartigen Käsearomatyps ist der Aufschluß der Fettkomponente im Medium, was bekanntermaßen durch Zusatz von Lipasepräparaten vorgenommen wird (WP 147 499, WP 208 545). Diese Verfahrensweise des Zusatzes eines Lipasepräparates ist jedoch mit einer Reihe von Nachteilen verbunden.
Einer dieser Nachteile besteht darin, daß zur Vermeidung von off-Flavour durch Fremdinfektion im Fermentationsansatz ein keimfreies Lipasepräparat benötigt wird, da dieses verfahrensgemäß erst nach Sterilisation des Mediums zugesetzt werden kann. Wegen der häufig schlechten Löslichkeit solcher Präparate ist die Keimfreimachung mit Schwierigkeiten verbunden (Quehl u. a. 1983).
Eine weitere bekannte Möglichkeit zum Aufschluß der Fettkomponente des Mediums besteht im Einsatz lipolytischer Mikroorganismen (z. B. Candida lipolytica). In einem 2stufigen Verfahren erfolgt in der 1. Fermentationsphase die Lipasebildung durch einen geeigneten Mikroorganismus. Nach Inaktivierung des Lipasebildners durch schonende Hitzeeinwirkung wird diese Kulturlösung in der 2. Phase zum Zweck der Aromabildung mit Konidien von Penicillium roqueforti beimpft (WP 147 499).
Ein Nachteil dieser Verfahrensvariante besteht in der Notwendigkeit der vollständigen Inaktivierung des Lipasebildners. Bei Anwendung schonender Methoden besteht die Gefahr einer unvollständigen Abtötung des Mikroorganismus und damit die Möglichkeit der Entstehung unerwünschter Aromanoten; eine drastische Verfahrensweise hingegen bewirkt eine Schädigung gewünschter bzw. Produktion unerwünschter Aromavorläufer.
Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß bisher nur ein spezifischer Endaromakomplex erzeugt und die Gewinnung einzelner Aromakomponenten und damit eine Erweiterung des Applikationsfeldes nicht aufgezeigt wurde.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist eine vereinfachte Verfahrensweise zur Gewinnung von Käsearoma oder von Käsearomakomponenten durch gezielte Auswahl besonders geeigneter Stämme von Penicillium roqueforti.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine einfache Verfahrensweise zur biotechnologischen Gewinnung von Käsearoma oder Käsearomakomponenten unter Vermeidung unerwünschter Aromanoten zu entwickeln.
Erfindungsgemäß wird in der Weise verfahren, daß zum Aufschluß der Fettkomponente eine ausgewählte Stammvariante von Penicillium roqueforti mit hoher lipolytischer Aktivität, vorzugsweise der Stamm Penicillium roqueforti IMET 43 739 – hinterlegt in der zentralen Stammsammlung der DDR im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena –, durch eine Vorkultur in einem speziellen Medium zur Bildung lipolytischer Enzyme angeregt wird. Ein Teil dieser Vorkultur wird gemeinsam mit einer zweiten, zur Bildung bestimmter Aromastoffe besonders befähigten Stammvariante von Penicillium roqueforti, vorzugsweise die Stammvariante IMET 43 740, dem Hauptkulturmedium zugegeben und die Fermentation in einem Temperaturbereich von 25 bis 30 °C bei Einhaltung bestimmter Belüftungs- und Rührbedingungen durchgeführt. Das entstehende Käsearoma reichert sich überwiegend in der Fettphase an und wird mit dieser vom Medium abgetrennt. In Abhängigkeit von der Fermentationsdauer ist es möglich, Aroma unterschiedlicher Qualität zu gewinnen. Während bei Abbruch der Fermentation nach 20–30 Stunden ein käseartiges Grundaroma vorliegt, erhält man nach 40–50 Stunden ein blaukäseartiges Aroma.
Es wurde desweiteren gefunden, daß durch submerse Kultivierung ausgewählter Stammvarianten von Penicillium roqueforti unterschiedliche Käsearomakomponenten produziert werden können. Zur Vermeidung der oben genannten Nachteile wird zunächst eine lipolytisch sehr aktive Stammvariante von Penicillium roqueforti – als besonders geeignet erwies sich der Stamm IMET 43 739 – in einem speziellen Medium vorkultiviert und zur Lipaseproduktion angeregt. Das zu diesem Zweck verwendete Medium, bestehend aus 2,5 % Sojamehl, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat und 0,1 % Ammoniumsulfat, wird auf den für die Lipaseproduktion des Pilzes optimalen *p*H-Wert (vorzugsweise 8–10) eingestellt. Nach einer Kulturdauer von 20 bis 30 Stunden werden 10 bis 20 % dieser Vorkultur dem eigentlichen Fermentationsansatz hinzugefügt. Im Verlaufe einer Fermentationsdauer von 20 bis 30 Stunden wird in der im Hauptkulturmedium enthaltenen Butterfettphase ein Gemisch aus vorwiegend kurzkettigen Fettsäuren akkumuliert. Durch Abtrennung dieser Fettphase kann dieses Gemisch gewonnen und als Käsearomakomponente vorwiegend solchen Lebensmitteln zugefügt werden, die ein Grundkäsearoma erhalten sollen.
Zum anderen kann durch einen weiteren, gleichzeitig mit der Vorkultur vorgenommenen Zusatz einer zur Bildung spezifischer Aromastoffe beitragenden Stammvarianten, vorzugsweise von Penicillium roqueforti IMET 43 740, zur Hauptkultur ein mikrobieller Umsatz dieser Fettsäuren zu den für das Blaukäsearoma typischen Methylketonen u. a. Substanzen erreicht werden. Nach 40 bis 50 Stunden Fermentationsdauer enthält die abgetrennte Fettphase ein Gemisch aus Fettsäuren und Methylketonen, das vorwiegend solchen Lebensmitteln zugesetzt werden kann, die ein Blaukäsearoma erhalten sollen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
Die Stammvariante Penicillium roqueforti IMET 43 739 wird auf steriler Hirse 8 bis 12 Tage bei 30 °C kultiviert. Danach wird mit steriler physiologischer Kochsalzlösung eine Konidiensuspension hergestellt, die ungefähr 10^7 bis 10^8 Konidien/ml enthält. 100 ml eines Vorkulturmediums bestehend aus 2,5 % Sojamehl, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % KH_2PO_4 und 0,1 % $(NH_4)_2SO_4$, werden mit der Konidienabschwemmung der genannten Stammvariante in 300 ml Erlenmeyerkolben beimpft, (Endkonzentration 1×10^5 Konidien/ml). Eine optimale Lipasebildung erfolgt, wenn der *p*H-Wert des Mediums 9,0 beträgt. Es wird auf einem Fanalschütteltisch mit 180 U/min bei 28 °C bis 30 °C 20 bis 30 Stunden kultiviert.
Die Hauptkultur erfolgt in einem Medium, das aus 10 bis 20 % Butterfett, 1 % Caseinpepton, 2,2 % NaCl und 1,7 % Saccharose besteht. Der *p*H-Wert wird mit NaOH auf 6,0 eingestellt. 100 ml dieses Mediums werden mit 10 ml Vorkultur beimpft und auf einem Fanalschüttler bei 180 U/min und 28 bis 30 °C 20 bis 30 Stunden kultiviert. Danach wird durch Zentrifugation die Fettphase abgetrennt, die ein käseartiges Grundaroma enthält.

Beispiel 2
Wie Beispiel 1 mit folgenden Abänderungen. Es wird eine Konidiensuspension der Stammvariante Penicillium roqueforti IMET 43 740 wie im Beispiel 1 hergestellt und die Hauptkultur zusätzlich mit diesen Konidien (Endkonzentration 5×10^4 Konidien/ml) beimpft. Die Dauer der Hauptkultur beträgt 40 bis 50 Stunden. Die durch Zentrifugation erhaltene Fettphase enthält ein blaukäseartiges Aroma.

Beispiel 3
Wie Beispiel 1 mit folgenden Abänderungen. 2 Liter Hauptkulturmedium werden in einem 5 l Rührfermentor mit 200 ml Vorkultur der Stammvariante IMET 43 739 beimpft. Die Fermentation erfolgt 20 bis 30 Stunden bei 28 bis 30 °C unter geringer Luftzufuhr (2 l/min) bei einer Rührung von maximal 100 U/min. Mittels Zentrifugation wird die das käseartige Grundaroma enthaltende Fettphase vom Medium abgetrennt.

Beispiel 4
Wie Beispiel 3 mit folgenden Abänderungen. Es wird eine Konidiensuspension der Stammvariante IMET 43 740 wie in Beispiel 1 hergestellt und die Hauptkultur zusätzlich mit diesen Konidien (Endkonzentration 10^6 Spo/ml) beimpft. Die Dauer der Hauptkultur beträgt 40 bis 50 Stunden. Die durch Abtrennung erhaltene Fettphase enthält ein blaukäseartiges Aroma.