

(19)



Deutsches
Patent- und Markenamt



(10) **DE 600 18 267 T3 2014.02.06**

(12)

Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 162 889 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 18 267.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK00/00109**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 91 0566.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/054601**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.02.2005**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **10.10.2012**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.02.2014**

(51) Int Cl.:

A23C 19/04 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

36899 16.03.1999 DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

NIELSEN, Per, Munk, DK-3400 Hiller d, DK

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler LLP,
81675, München, DE**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KÄSE**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Käse aus Enzym-behandelter Käseremilch.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Bei Käseprodukten ist der Zustand der Fettphase wichtig für die Eigenschaften des Käses. Die Fettphase ist von besonderer Wichtigkeit für die Stabilisierung des Käses während der Herstellung und Reifung, aber auch für den endgültigen Käse, der verwendet, als solcher gegessen oder in vorbereiteten verzehrbereiten Gerichten, z. B. Pizza, Toast oder Burger, verwendet werden soll.

[0003] Außerdem stellen die Ölabscheidungs-Eigenschaften von Käseprodukten einen wichtigen Qualitätsparameter dar. Die Ölabscheidung ist die Neigung, bei der Lagerung und dem Schmelzen freies Öl zu bilden. Übermäßige Ölabscheidung ist ein zumeist mit erhitzten Produkten, in denen Käse verwendet wird, z. B. Pizza und verwandten Lebensmitteln (vgl. z. B. Kindstedt J. S.; Rippe J. K. 1990, J Dairy Sci. 73: 867–873), verbundener Fehler. Es wird immer wichtiger, diesen Fehler zu kontrollieren/zu beseitigen, weil die Bedenken der Verbraucher wegen den Fettgehalten von Lebensmitteln zunehmen. Freies Öl/Fett in einem Produkt wird als hoher Fettgehalt aufgefasst und ist im Allgemeinen unerwünscht.

[0004] In anderen Lebensmittelprodukten ist die Fettphase häufig durch mechanische Emulgierung, z. B. Homogenisierung, stabilisiert. Diese Technologie ist bei der Käseherstellung im Allgemeinen nicht anwendbar, weil die Homogenisierung der Käseremilch eine negative Auswirkung auf die Koagulationseigenschaften der Käseremilch und auf die Ausbeute sowie den Geschmack des daraus hergestellten Käses hat.

[0005] In GB 1,525,929 wird es als bekannt offenbart, stabilisierte Öl-in-Wasser-Emulsionen unter Verwendung von Monoacyl-Glycerophosphatid herzustellen, das erhalten wird, indem Diacyl-Glycerophosphatid der Aktivität von Phospholipase A unterworfen wird. GB 1,525,929 beschreibt weiter die Verwendung von Phospholipase-A-behandeltem Phospholipoprotein-enthaltendem Material für die Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen, d. h. die Verwendung von Phospholipase-behandeltem Material als einen Emulsionsstabilisator für Öl-in-Wasser-Emulsionen, von denen Saucen, Dressings und Mayonnaise erwähnt werden. Käse ist in GB 1,525,929 nicht offenbart.

[0006] Eine sogenannte Lecithinaseaktivität, offenbart als Phospholipaseaktivität, wurde für bakterielle Kontaminanten in Milch berichtet, so wie die Verwendung solcher Milch für die Käseherstellung: "J. J. Owens, Observations on lecithinases from milk contaminants, Process Biochemistry, Bd. 13, Nr. 1, 1978, Seite 10–18" und "J. J. Owens, Lecithinase Positive Bacteria in Milk, Process Biochemistry, Bd. 13, Seite 13–15, 1978".

[0007] Umanskii et al., Molochnaya Promyshlennost' 1980 vses. Nauchno-issled. Inst. Maslodel'noi i Syrodel'noi promyshlennosti, Uglich, USSR, Nr. 11, 1980, Seiten 21–25, 47, offenbart, dass hohe Expressionsniveaus von Phospholipase von Starterbakterien unerwünscht bei der Herstellung von Käse sind.

[0008] US 4,861,610 offenbart ein Verfahren zur Herstellung einer Käsezusammensetzung, d. h. verarbeitetem Käse, für die Aufnahme in Lebensmittelmaterial, wobei Monoacyl-Glycerophospholipid, Fett, Wasser und Schmelzsalz zu dem Käse zugegeben wird. Das Verfahren umfasst eine Hitzebehandlung, um den Käse vor der Zugabe von Fett aufzulösen (wobei der Käse unter anderem mit Monoacyl-Glycerophospholipid gemischt wird). Nachfolgend wird die Käsezusammensetzung mittels eines Mixers emulgiert. US 4,861,610 offenbart keine Behandlung von Milch mit Phospholipase und Herstellung von Käse aus der Enzym-behandelten Milch.

[0009] Es besteht ein Bedarf an einem verbesserten Verfahren zur Herstellung von Käse, insbesondere einem Verfahren zur Verbesserung der Stabilität von Fett in Käse.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die Erfindung stellt ein wie im angefügten Anspruch 1 definiertes Verfahren für die Herstellung von Käse bereit.

[0011] Die Fettstabilität von Käse und Käsereimilch wird durch die vorliegende Erfindung verbessert. Der Erfinder hat gefunden, dass eine Enzymbehandlung von Käsereimilch die Stabilität von aus der besagten Phospholipase-behandelten Käsereimilch hergestelltem Käse während einer Hitzebehandlung signifikant erhöht. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Ausbeute der Käseherstellung erhöht.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Käse, das die Schritte umfasst:

- a) Behandeln von Käsereimilch oder einer Käsereimilchfraktion mit einer Phospholipase ausgewählt aus Phospholipase A₁, Phospholipase A₂, Phospholipase B und Kombinationen davon; und
- b) Herstellen von Käse aus der Enzym-behandelten Käsereimilch aus Schritt a),

wobei Schritt a) vor Schritt b) und/oder gleichzeitig mit Schritt b) durchgeführt wird und die Phospholipase ein Enzym ist, das im Wesentlichen nur Phospholipaseaktivität aufweist.

[0013] Somit können Schritt a) und b) des erfindungsgemäßen Verfahrens gleichzeitig durchgeführt werden, d. h. die Phospholipase reagiert in der Käsereimilch mehr oder weniger zu der selben Zeit, zu der das Milchkoagulans das Koagulum bildet.

Käsereimilch und die Herstellung von Käse:

[0014] In dem vorliegenden Zusammenhang kann der Ausdruck "Käse" eine beliebige Art von Käse sein und schließt z. B. natürlichen Käse, Käseanaloga und verarbeiteten Käse ein. Der Käse kann durch jedes beliebige, in der Technik bekannte Verfahren, wie z. B. enzymatische Koagulation der Käsereimilch mit Lab oder durch saure Koagulation der Käsereimilch mit lebensmittelunbedenklicher Säure oder durch Bakterienwachstum produzierte Milchsäure, erhalten werden. In einer Ausführungsform ist der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Käse Käse aus Lab-Käsebruch. Somit wird der Käse in einer Ausführungsform mit Lab hergestellt. In Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Käsereimilch einem herkömmlichen Käseherstellungsverfahren unterzogen werden. Lab ist kommerziell z. B. als Naturen[®] (tierisches Lab), Chy-max[®] (durch Fermentation hergestelltes Chymosin), Microlant[®] (durch Fermentation hergestelltes mikrobielles Koagulans), alle von Chr-Hansen A/S Dänemark, erhältlich.

[0015] Verarbeiteter Käse kann aus natürlichem Käse oder Käseanaloga durch Kochen und Emulgieren des Käses unter Einschluss von emulgierenden Salzen (z. B. Phosphaten und Citrat) hergestellt werden und kann auch Gewürze/Würzmittel einschließen. In einer Ausführungsform ist das Käseprodukt des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht verarbeiteter Käse.

[0016] Unter Käseanaloga werden Käse-ähnliche Produkte verstanden, bei denen ein Teil der Zusammensetzung nicht-Milch-Bestandteile, wie z. B. pflanzliches Öl, sind. Ein anderes Beispiel eines Käseanalogs ist Cheese-Base. Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Herstellung von Käseanaloga verwendbar, solange das Produkt Fett (z. B. Milchfett, wie z. B. Sahne) als Teil der Zusammensetzung enthält.

[0017] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Käse umfassen alle Arten von Käse, wie z. B. Campesino, Chester, Danbo, Drabant, Herregård, Manchego, Provolone, Saint Paulin, Weichkäse, Svecia, Taleggio, Weisskäse, einschließlich durch Lab-Koagulation des Käsebruchs hergestellten Käse aus Lab-Käsebruch; gereifte Käse, wie z. B. Cheddar, Colby, Edamer, Münster, Gruyère, Emmentaler, Camembert, Parmesan, Romano; Frischkäse, wie z. B. Mozzarella und Feta; Säurekoagulierte Käse, wie z. B. Sahnefrischkäse, Neufchatel, Quark, Cottage Cheese und Queso Blanco; und Pasta-Filata-Käse. Eine Ausführungsform bezieht sich auf die Herstellung von Pizzakäse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0018] Bei der Käseherstellung kann die Koagulation des Kaseins in der Milch auf zwei Weisen durchgeführt werden: die sogenannten Käse aus Lab-Käsebruch und Käse aus Säure-Käsebruch. Bei der Käseherstellung stellen diese beiden Typen von Käsebrüchen die zwei Hauptgruppen von Käsetypen dar. Frische Käse aus Säure-Käsebruch beziehen sich auf diejenigen Arten von Käse, die durch Koagulation von Milch, Sahne oder Molke durch Ansäuerung oder eine Kombination von Säure und Hitze hergestellt werden, und die bereit für den Verzehr sind, sobald die Herstellung ohne Reifung abgeschlossen ist. Frische Käse aus Säure-Käsebruch unterscheiden sich im Allgemeinen von Käsearten aus Lab-Käsebruch (z. B. Camembert, Cheddar, Emmentaler), bei denen die Koagulation normalerweise durch die Wirkung von Lab bei pH-Werten 6,4–6,6 ausgelöst wird, dadurch, dass die Koagulation normalerweise nahe bei dem isoelektrischen Punkt von Kasein durchgeführt wird, d. h. z. B. bei pH 4,6 oder bei höheren Werten, wenn erhöhte Temperaturen verwendet werden, z.

B. bei Ricotta pH 6,0 und 80°C. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung gehört der Käse zu der Klasse von aus Lab-Käsebruch hergestellten Käsen. In weiteren Ausführungsformen schließt der Ausdruck Käse auch Käse aus Säure-Käsebruch, einschließlich frischen Käses aus Säure-Käsebruch, ein.

[0019] Mozzarella ist ein Mitglied der sogenannten Pasta-Filata oder des gezogenen Käsebruchs, Käsen, die sich normalerweise durch eine einzigartige Plastifizierungs- und Knetbehandlung des frischen Käsebruchs in heißem Wasser auszeichnen, die dem fertiggestellten Käse seine charakteristische faserige Struktur, sowie Schmelz- und Zugeigenschaften verleiht, vgl. z. B. "Mozzarella and Pizza cheese" von Paul S. Kindstedt, Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Band 2: Major Cheese groups, zweite Auflage, Seite 337–341, Chapman & Hall. Pizzakäse schließen wie hierin verwendet Käse ein, die geeignet für Pizzas sind, und sie sind gewöhnlich Pasta-Filata-/gezogener-Käsebruch-Käse. In einer Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren außerdem eine Hitze/Zug-Behandlung wie für Pasta-Filata-Käse, wie zum Beispiel für die Herstellung von Mozzarella.

[0020] Die durch das erfindungsgemäße Verfahren zu behandelnde Käseriemilch kann eine oder mehrere der folgenden Milchfraktionen umfassen: Magermilch, Sahne, Vollmilch, Buttermilch aus der Produktion süßer oder gesäuerter Butter, Molkenprotein-Konzentrat und Butter oder Butterschmalz. Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Phospholipase zu behandelnde Käseriemilch kann auch Rohmilch umfassen.

[0021] In weiteren Ausführungsformen der Erfindung wird die mit Phospholipase zu behandelnde Käseriemilch vollständig oder zum Teil aus Trockenmilchfraktionen, wie z. B. Vollmilchpulver, Magermilchpulver, Kasein, Kaseinat, Gesamt-Milchprotein oder Buttermilchpulver oder einer beliebigen Kombination davon, hergestellt.

[0022] Der Ausdruck "Käseriemilch", insbesondere in Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist die Zusammensetzung auf Milchbasis, aus der der Käse hergestellt wird. Somit kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren der Käse aus einer Zusammensetzung auf Milchbasis ("der Käseriemilch") hergestellt werden, die vollständig oder nur zu einem Teil einer Phospholipasebehandlung unterzogen wurde. Der Ausdruck "Käseriemilch" kann, wie hierin verwendet, den Ausdruck "Fraktion der Käseriemilch" einschließen, sofern es aus dem Zusammenhang klar ist, dass beide Ausdrücke sich auf verschiedene Bedeutungen beziehen.

[0023] Der Ausdruck "Fraktion der Käseriemilch" bedeutet im Zusammenhang der Erfindung, insbesondere in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens, die Fraktion der Käseriemilch, die der erfindungsgemäßen enzymatischen Behandlung unterzogen wird. "Die Fraktion der Käseriemilch" kann eine oder mehrere der wie hierin definierten Milchfraktionen, d. h. z. B. Magermilch, Sahne, Vollmilch, Buttermilch aus der Produktion süßer oder gesäuerter Butter, Molkenprotein-Konzentrat, Butter und Butterschmalz umfassen. Die Butter kann z. B. in einer geschmolzenen Form vorliegen. Die Fraktion der zu behandelnden Käseriemilch kann auch Rohmilch umfassen und sie kann auch, wie bereits hierin beschrieben, aus Trockenmilchfraktionen hergestellt werden. Der Ausdruck "Fraktion der Käseriemilch" bedeutet im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere Komponenten der zu behandelnden Käseriemilch. Wenn eine Fraktion der Käseriemilch in Schritt a) mit Phospholipase behandelt wird, dann wird Schritt a) vor und nicht während Schritt b) durchgeführt. Nach der enzymatischen Behandlung der Fraktion der Käseriemilch wird die Fraktion mit einer oder mehreren Milchfraktionen kombiniert, um die Käseriemilch herzustellen, aus der in Schritt b) der Käse hergestellt wird.

[0024] Die Enzymbehandlung in Schritt a) kann an einer Fraktion der Käseriemilch durchgeführt werden oder kann an der Käseriemilch als solcher durchgeführt werden. Somit befindet sich im Umfang der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Käse, das die Schritte umfasst: Schritt i) Behandeln einer Fraktion von Käseriemilch mit einer Phospholipase; Schritt ii) Herstellen von Käseriemilch aus der behandelten Fraktion aus Schritt i); und Schritt iii) Herstellen von Käse aus der Milch aus Schritt ii). Es wird auch in Betracht gezogen, dass in Schritt ii) die Enzymbehandelte Käseriemilch-Fraktion aus Schritt i) mit (einer) nicht mit Phospholipase und/oder (einer) Phospholipase-behandelten Käseriemilch-Fraktion(en) kombiniert werden kann, um die Käseriemilch bereitzustellen, aus der in Schritt iii) der Käse hergestellt wird. Schritt i) entspricht Schritt a); und Schritt iii) entspricht, wie hierin verwendet, Schritt b).

[0025] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst oder besteht die Käseriemilch oder die Käseriemilch-Fraktion, die Enzym-behandelt werden soll, aus Sahne. In weiteren Ausführungsformen umfasst oder besteht die Käseriemilch oder die Käseriemilch-Fraktion, die Enzym-behandelt werden soll, aus Butter. In noch weiteren Ausführungsformen umfasst oder besteht die Käseriemilch oder die Käseriemilch-Fraktion, die Enzym-behandelt werden soll, aus Buttermilch. In einer Ausführungsform wird die Enzym-behandelte Milch aus Schritt a) vor Schritt b) nicht getrocknet. In weiteren Ausführungsformen schließt das erfindungsgemäße Verfahren keinen

bestimmten Schritt zur Verringerung des Gesamtfettgehalts des Käses, wie z. B. das in EP 531 104 A2 offenbare Verfahren, ein, das sich auf ein Verfahren zur Verringerung des Lipidgehalts in Lebensmitteln bezieht.

[0026] Milch von verschiedenen Tierarten kann bei der Herstellung von Käse verwendet werden. Somit kann "Milch" die durch Melken, z. B. von Kühen, Schafen, Ziegen, Büffeln oder Kamelen, erhaltene Milchsekretion sein.

[0027] Die Milch für die Herstellung von Käse kann durch Entfernen eines Teils oder der Gesamtmenge eines beliebigen der Rohmilchbestandteile und/oder durch Zugabe zu dieser von zusätzlichen Mengen solcher Bestandteile bis zu einer gewünschten Zusammensetzung standardisiert werden. Dies kann durch Separation der Rohmilch in Sahne und Magermilch bei der Ankunft in der Molkerei durchgeführt werden. Somit kann die Käsereimilch wie herkömmlich hergestellt werden, indem die Rohmilch fraktioniert und die Fraktionen rekombiniert werden, um die gewünschte endgültige Zusammensetzung der Käsereimilch zu erhalten. Die Separation kann in kontinuierlichen Zentrifugen durchgeführt werden, was zu einer Magermilchfraktion mit einem sehr geringen Fettgehalt (d. h. z. B. < 0,5%) und Sahne mit z. B. > 35% Fett führt. Die "Käsereimilch" kann durch Mischen von Sahne und Magermilch zusammengestellt werden. in einer bevorzugten Ausführungsform stammt die Käsereimilch oder die Fraktion der Käsereimilch, die mit Phospholipase behandelt werden soll, nicht von Käse ab.

[0028] Die Käsereimilch, einschließlich der Käsereimilchfraktion, die mit Phospholipase behandelt werden soll, umfasst Phospholipide, wie z. B. Lecithin. Die Käsereimilch kann einen beliebigen Gesamtfettgehalt haben, der als geeignet für den durch das erfindungsgemäße Verfahren herzustellenden Käse befunden wird, wie z. B. in etwa 25% Fett (der Trockenmasse), wie z. B. in dem Bereich von 10–50% Fett, wovon, z. B. in etwa 0,06% Phospholipide sind, wie z. B. 0,02–5% (Gew/Gew) des Gesamtgehalts Phospholipide sind.

[0029] Herkömmliche Schritte können angewendet werden, um niedrige Bakterienzahlen in der Käsereimilch sicher zu stellen. Es ist im Allgemeinen bevorzugt, die Magermilch nicht zu pasteurisieren, weil hitzedenaturierte Proteine in der Käsereimilch einen negativen Einfluss auf die Koagulation der Milch haben und die Reifung des Käses verzögern. Die Bakterienzahl der Magermilchfraktion kann somit durch andere Technologien, wie zum Beispiel Mikrofiltration oder Bactofugation, verringert werden. Die Sahne kann pasteurisiert werden, um die niedrige Bakterienzahl in dem Produkt zu erhalten.

[0030] Das erfindungsgemäße Verfahren kann außerdem den Schritt von c) Unterziehen der behandelten Käsereimilch oder Käsereimilchfraktion einer Hitzebehandlung nach Schritt a) und vor Schritt b) umfassen. In einer Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die Schritte: Schritt i) Behandeln einer Fraktion von Käsereimilch (wie z. B. Sahne) mit einer Phospholipase; Schritt ii) Unterziehen der Enzym-behandelten Fraktion aus Schritt i) einer Hitzebehandlung; Schritt iii) Kombinieren der Milchfraktion aus Schritt ii) mit (einer) nicht-Enzym- und/oder (einer) Phospholipase-behandelten Milchfraktion(en), um die Käsereimilch zu erhalten, aus der das Käseprodukt hergestellt wird; und Schritt iv) Herstellen von Käse aus der Käsereimilch aus Schritt iii), wobei Schritt i) dem Schritt a) entspricht; und Schritt iv) dem wie hierin verwendeten Schritt b) entspricht. Folglich kann das erfindungsgemäße Verfahren in einer Ausführungsform, bei dem die Fraktion der Käsereimilch Sahne ist, außerdem den Schritt umfassen, die Sahne einer Pasteurisierung nach Schritt a) und vor Schritt b) zu unterziehen.

[0031] In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Käsereimilch oder die Fraktion der Käsereimilch vor der Herstellung von Käse, wie z. B. bei der Herstellung von Dänischem Blauschimmelkäse, einem Homogenisierungsverfahren unterzogen werden. Die Homogenisierung kann vor und/oder nach der Behandlung mit der Phospholipase angewendet werden. In anderen Ausführungsformen wird die Käsereimilch in Schritt b) jedoch nicht einem Homogenisierungsverfahren vor der Herstellung von Käse unterzogen.

Die enzymatische Behandlung:

[0032] Die enzymatische Behandlung in dem erfindungsgemäßen Verfahren kann durch Dispergieren der Phospholipase in die Käsereimilch oder eine Fraktion der Käsereimilch und ermöglichen des Ablaufs der Enzymreaktion während einer geeigneten Verweildauer bei einer geeigneten Temperatur durchgeführt werden. Die Behandlung mit Phospholipase kann unter Bedingungen durchgeführt werden, die gemäß in der Technik wohlbekannter Prinzipien als geeignet für das ausgewählte Enzym ausgewählt werden. Die enzymatische Behandlung ist eine Behandlung, bei der die Milchfett-Fraktion der Käsereimilch mit Phospholipase behandelt wird.

[0033] Die enzymatische Behandlung kann bei jedem pH, wie z. B. in dem Bereich 2–10, wie z. B. bei einem pH von 4–9 oder 5–7, durchgeführt werden. Es kann bevorzugt sein, einen pH von 5,5–7,0 zu verwenden.

[0034] Das erfindungsgemäße Verfahren kann als eine Phospholipasebehandlung von Käseremilch oder einer Fraktion der Käseremilch während kalter Lagerung bei 3–7°C, z. B. für wenigstens 2 Stunden, z. B. in dem Bereich von 2–48 Stunden oder wenigstens 5 Stunden, z. B. 5–24 Stunden, durchgeführt werden. Das Verfahren kann auch so durchgeführt werden, dass der Phospholipase erlaubt wird, bei den Koagulationsbedingungen 30–45°C (z. B. für wenigstens 5 Minuten, wie z. B. für wenigstens 10 Minuten oder wenigstens 30 Minuten, z. B. für 5–60 Minuten) während z. B. dem Käseherstellungsverfahren von Schritt b), zu reagieren. Außerdem kann das Verfahren so durchgeführt werden, dass vor der Koagulation der Käseremilch der Phospholipase erlaubt wird, mit einer Milchfraktion, z. B. Sahne, bei dem Temperaturoptimum der Phospholipase, z. B. bei 45–80°C, wie z. B. 47–80°C oder 50–80°C, z. B. für wenigstens 10 Minuten, wie zum Beispiel wenigstens 30 Minuten, z. B. in dem Bereich von 10–180 Minuten, zu reagieren.

[0035] Wahlweise wird das Phospholipaseenzym-Protein nach der enzymatischen Behandlung entfernt/verringert und/oder das Enzym wird inaktiviert.

[0036] Eine geeignete Enzymdosierung wird gewöhnlich in dem Bereich von 0,01–1% (Gew/Gew) des Fettgehalts sein, wie z. B. 0,1–1,0%, insbesondere 0,2% (Gew/Gew), entsprechend 2000 IU pro 100 g Fett. Eine IU (Internationale Einheit) ist als die Menge an Enzym definiert, die 1 Mikromol freie Fettsäure pro Minute unter Standardbedingungen produziert: Eidottersubstrat (in etwa 0,4% Phospholipide), pH 8, 40°C, 6 mM Ca⁺⁺.

[0037] Das analytische Verfahren AF 280 ist auf Anfrage von Novo Nordisk A/S erhältlich und ist in den Beispielen beschrieben. Die Enzymdosierung basiert auf dem Gew/Gew-Fettgehalt der behandelten Käseremilch, wie z. B. Sahne, wie in den Beispielen erläutert. Alternativ kann die Enzymdosierung wie hierin beschrieben durch andere Tests bestimmt werden.

[0038] Die enzymatische Behandlung kann diskontinuierlich, z. B. in einem Tank unter Röhren, durchgeführt werden, oder sie kann kontinuierlich, z. B. eine Reihe von gerührten Tankreaktoren, sein.

[0039] In einer Ausführungsform wird die Phospholipase zu der Sahnefraktion zugegeben, um eine getrennte Phospholipasebehandlung dieser Fraktion bei einer Temperatur in dem Bereich 45–80°C durchzuführen. In weiteren Ausführungsformen wird die Phospholipase unmittelbar vor oder zu der gleichen Zeit wie das Käse-Lab, z. B. bei 32–36°C, zugegeben.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendende Enzyme:

[0040] Das in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendete Enzym schließt eine Phospholipase, wie z. B. Phospholipase A₁, Phospholipase A₂ und Phospholipase B ein. In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Phospholipasebehandlung durch eine oder mehrere Phospholipasen, wie zum Beispiel zwei oder mehr Phospholipasen, z. B. zwei Phospholipasen, einschließlich, ohne Beschränkung, einer Behandlung mit sowohl Typ A und B; sowohl Typ A₁ und A₂; sowohl Typ A₁ und B; sowohl Typ A₂ und B; oder eine Behandlung mit zwei verschiedenen Phospholipasen desselben Typs, bereitgestellt werden. Eingeschlossen ist auch eine Behandlung mit einem Typ von Phospholipase, wie z. B. A₁, A₂ oder B.

[0041] Phospholipide, wie zum Beispiel Lecithin oder Phosphatidylcholin, bestehen aus Glycerin, das mit zwei Fettsäuren an einer äußeren (sn-1) und der mittleren (sn-2) Position verestert ist und mit Phosphorsäure an der dritten Position verestert ist; die Phosphorsäure kann ihrerseits an einen Aminoalkohol verestert sein. Phospholipasen sind Enzyme, die an der Hydrolyse von Phospholipiden beteiligt sind. Verschiedene Typen von Phospholipaseaktivität können unterschieden werden, die die Phospholipasen A₁ und A₂, die eine Fettacylgruppe (in der sn-1- bzw. sn-2-Position) hydrolysieren, um Lysophospholipid zu bilden; und die Lysophospholipase (oder Phospholipase B) einschließen, die die verbleibende Fettacylgruppe in dem Lysophospholipid hydrolysieren kann. Somit bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von Enzymen, die die Fähigkeit besitzen, eine und/oder beide Fettacylgruppen in einem Phospholipid zu hydrolysieren.

[0042] Phospholipase A₁ ist gemäß der Standard-Enzym-EC-Klassifizierung als EC 3.1.1.32 definiert.

Offizieller Name: Phospholipase A₁

Katalysierte Reaktion:

**[0043]** Kommentar(e)

hat eine viel breitere Spezifität als EC 3.1.1.4.

[0044] Phospholipase A₂ ist gemäß der Standard-Enzym-EC-Klassifizierung als EC 3.1.1.4 definiert.Offizieller Name: Phospholipase A₂

Alternativer) Name(n): Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase, Lecithinase a, Phosphatidase oder Phosphatidolipase.

Katalysierte Reaktion:

**[0045]** Kommentar(e): reagiert auch mit Phosphatidylethanolamin, Cholinplasmalogen und -phosphatiden, wobei es die an die 2-Stellung gebundene Fettsäure entfernt.**[0046]** Der hierin in Verbindung mit einem erfindungsgemäßen Enzym verwendete Ausdruck "Phospholipase A" soll ein Enzym mit Phospholipase A₁- und/oder Phospholipase A₂-Aktivität umfassen.**[0047]** "Phospholipase B": Phospholipase B ist gemäß der Standard-Enzym-EC-Klassifizierung als EC 3.1.1.5 definiert.

Offizieller Name: Lysophospholipase.

Alternative(r) Name(n): Lecithinase b; Lysolecithinase; Phospholipase b; oder plb.

Katalysierte Reaktion:

**[0048]** Der hierin in Verbindung mit einem erfindungsgemäßen Enzym verwendete Ausdruck "Phospholipase" soll Enzyme umfassen, die eine wie hierin definierte Enzymaktivität gegenüber Phospholipiden besitzen. Der hierin verwendete Ausdruck Phospholipase schließt Enzyme mit Phospholipaseaktivität ein, d. h. z. B. Phospholipase A- (A₁ oder A₂) oder Phospholipase B-Aktivität. Die Phospholipase-Enzymaktivität wird von einem Enzym bereitgestellt, das im wesentlichen nur Phospholipaseaktivität aufweist, und bei dem die Phospholipase-Enzymaktivität nicht nur eine Nebenaktivität ist.**[0049]** Die Phospholipase kann von beliebigem Ursprung sein, z. B. von tierischem Ursprung (wie z. B. Säugern), z. B. aus der Bauchspeicheldrüse (z. B. Rinder- oder Schweinebauchspeicheldrüse) oder Schlangengift oder Bienengift. Alternativ kann die Phospholipase mikrobiellen Ursprungs sein, z. B. aus filamentösen Pilzen, Hefe oder Bakterien, wie zum Beispiel die Gattung oder Spezies *Aspergillus*, z. B. *A. niger*, *Dictyostelium*, z. B. *D. discoideum*; *Mucor*, z. B. *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, z. B. *N. crassa*; *Rhizomucor*, z. B. *R. pusillus*; *Rhizopus*, z. B. *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, z. B. *S. libertiana*; *Trichopyton*, z. B. *T. rubrum*; *Whetzelinia*, z. B. *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, z. B. *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, z. B. *C. freundii*; *Enterobacter*, z. B. *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwards/ella*, *E. tarda*; *Erwinia*, z. B. *E. herbicola*; *Escherichia*, z. B. *E. coli*; *Klebsiella*, z. B. *K. pneumoniae*; *Proteus*, z. B. *P. vulgaris*; *Providencia*, z. B. *P. stuartii*; *Salmonella*, z. B. *S. typhimurium*; *Serratia*, z. B. *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, z. B. *S. flexneri*; *Streptomyces*, z. B. *S. violeceoruber*, *Yersinia*, z. B. *Y. enterocolitica*. Somit kann die Phospholipase aus Pilz sein, z. B. aus der Klasse Pyrenomycetes, wie zum Beispiel die Gattung *Fusarium*, wie zum Beispiel ein Stamm von *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, oder ein Stamm von *F. oxysporum*. Die Phospholipase kann auch von einem filamentösen Pilzstamm innerhalb der Gattung *Aspergillus*, wie zum Beispiel einem Stamm von *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*

oder Aspergillus oryzae stammen. In weiteren Ausführungsformen ist die Phospholipase eine wie in PCT/DK 00664 (Novo Nordisk A/S, Dänemark) offenbarte Phospholipase.

[0050] Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Phospholipase kann von jeder der hierin erwähnten Quellen abstammen oder daraus erhältlich sein. Der Ausdruck "abstammen" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Enzym aus einem Organismus isoliert worden sein kann, in dem es natürlicher Weise vorliegt, d. h. die Identität der Aminosäuresequenz des Enzyms ist mit einem natürlichen Enzym identisch. Der Ausdruck "abstammen" bedeutet auch, dass die Enzyme rekombinant in einem Wirtsorganismus hergestellt wurden, wobei das rekombinant hergestellte Enzym entweder eine mit einem natürlichen Enzym identische Identität oder eine modifizierte Aminosäuresequenz hat, z. B. wobei eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, insertiert und/oder substituiert sind, d. h. ein rekombinant hergestelltes Enzym, das eine Mutante und/oder ein Fragment einer natürlichen Aminosäuresequenz ist. In der Bedeutung eines natürlichen Enzyms sind natürliche Varianten eingeschlossen. Außerdem schließt der Ausdruck "abstammen" synthetisch durch z. B. Peptidsynthese hergestellte Enzyme ein. Der Ausdruck "abstammen" umfasst auch Enzyme, die z. B. durch Glycosylierung, Phosphorylierung etc., ob in vivo oder in vitro, modifiziert wurden. Der Ausdruck "erhältlich" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Enzym eine mit einem natürlichen Enzym identische Aminosäuresequenz hat. Der Ausdruck umfasst ein Enzym, das aus einem Organismus isoliert wurde, in dem es natürlicher Weise anwesend ist, oder einem, in dem es rekombinant in dem gleichen oder einem anderen Organismustyp exprimiert wurde, oder Enzyme, die synthetisch durch z. B. Peptidsynthese hergestellt wurden. Im Hinblick auf rekombinant hergestellte Enzyme beziehen sich die Ausdrücke "erhältlich" und "abstammen" auf die Identität des Enzyms und nicht auf die Identität des Wirtsorganismus, in dem es rekombinant hergestellt wurde.

[0051] Demnach kann die Phospholipase unter Verwendung einer beliebigen geeigneten Technik aus einem Mikroorganismus erhalten werden. Zum Beispiel kann eine Phospholipase-Enzymzubereitung durch Fermentation eines geeigneten Mikroorganismus und nachfolgende Isolierung einer Phospholipasezubereitung aus der erhaltenen fermentierten Brühe oder Mikroorganismus durch in der Technik bekannte Verfahren erhalten werden. Die Phospholipase kann auch durch die Verwendung rekombinanter DNA-Techniken erhalten werden. Ein solches Verfahren umfasst normalerweise die Kultivierung einer mit einem rekombinanten DNA-Vektor transformierten Wirtszelle, der eine DNA-Sequenz umfasst, die die fragliche Phospholipase kodiert, wobei die DNA-Sequenz funktionsfähig mit einem geeigneten Expressionssignal verbunden ist, so dass sie in der Lage ist, die Phospholipase in einem Kulturmedium unter Bedingungen zu exprimieren, die die Expression des Enzyms und die Gewinnung des Enzyms aus der Kultur erlauben. Die DNA-Sequenz kann auch in das Genom der Wirtszelle inkorporiert sein. Die DNA-Sequenz kann genomischen, cDNA- oder synthetischen Ursprungs oder eine beliebige Kombination davon sein und kann gemäß in der Technik bekannter Verfahren isoliert oder synthetisiert werden.

[0052] Geeignete Phospholipasen sind kommerziell erhältlich. Als typische Beispiele der Enzyme für den praktischen Gebrauch wird vorzugsweise Phospholipase A₂ aus Bauchspeicheldrüse, wie zum Beispiel Lecitase® (hergestellt von Novo Nordisk A/S), verwendet.

[0053] In weiteren Ausführungsformen ist die Quelle der Phospholipase in dem erfindungsgemäßen Verfahren aus der Expression des Enzyms durch einen Starterorganismus, der bei der Herstellung von Käse verwendet wird, wie z. B. durch Überexpression der Phospholipase in einem Milchsäurebakterium, einschließlich z. B. Lactobacillus. Alternativ wird die Behandlung der Kässereimilch oder der Fraktion der Kässereimilch mittels der Zugabe der Phospholipase, wahlweise in Kombination mit der wie hierin beschrieben von der Starterkultur bereitgestellten Phospholipase, durchgeführt.

[0054] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Phospholipase nicht aus mikrobiellen Milchkontaminanten erhalten. Demgemäß wird die Phospholipase-Enzymbehandlung in dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht durch die Enzymwirkung einer Phospholipase bereitgestellt, die von einer mikrobiellen Milchkontaminante exprimiert wird, die in der Milch oder Milchfraktion, zumindest nicht zu einem Hauptteil, anwesend ist. Die mikrobiellen Milchkontaminanten können eines oder mehrere der Gruppe, bestehend aus *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter liquefaciens* (*Klebsiella cloacae*), *Alcaligenes viscolactis*, *coryneformes* Stäbchen sein. In einer Ausführungsform wird die Phospholipase nicht aus diesen Kontaminaten erhalten. In weiteren Ausführungsformen ist die Phospholipase nicht mit den in "J. J. Owens, Observations on lecithinases from milkcontaminants, Process Biochemistry, Bd. 13 Nr. 1, 1978, Seite 10–18" und "J. J. Owens, Lecithinase Positive Bacteria in Milk, Process Biochemistry, Bd. 13, Seite 13–15, 1978" offenbarten Enzymen identisch.

[0055] In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Phospholipasebehandlung durch In-Kontakt-Bringen der Käsereimilch und/oder der Käsereimilch-Fraktion mit einer gereinigten Phospholipase durchgeführt werden. Der Ausdruck "gereinigt" umfasst, wie hierin verwendet, Phospholipaseenzym-Protein, das frei von Bestandteilen des Organismus ist, von dem es abstammt. Der Ausdruck "gereinigt" umfasst auch Phospholipaseenzym-Protein, das frei von Bestandteilen des nativen Organismus ist, aus dem es erhalten wird, dies wird auch als "im Wesentlichen reine" Phospholipase bezeichnet und kann besonders relevant für Phospholipasen sein, die natürlicher Weise vorkommende Phospholipasen sind und die nicht genetisch, wie zum Beispiel durch Deletion, Substitution oder Insertion einer oder mehrerer Aminosäurereste, verändert wurden.

[0056] Demgemäß kann die Phospholipase gereinigt sein, d. h. wobei nur geringe Mengen anderer Proteine anwesend sind. Der Ausdruck "andere Proteine" bezieht sich insbesondere auf andere Enzyme. Der Ausdruck "gereinigt" bezieht sich, wie hierin verwendet, auch auf Entfernen anderer Bestandteile, insbesondere anderer Proteine und in besonderer Weise anderer Enzyme, die in der Herkunfts zelle der Phospholipase vorhanden sind. Die Phospholipase kann "im Wesentlichen rein" sein, d. h. frei von anderen Bestandteilen des Organismus in dem sie produziert wird, d. h. z. B. eines Wirtsorganismus für die rekombinant hergestellte Phospholipase. Vorzugsweise sind die Enzyme wenigstens zu 75% (Gew/Gew) rein, bevorzugter wenigstens 80%, 85%, 90% oder sogar wenigstens 95% rein. In einer noch bevorzugteren Ausführungsform ist die Phospholipase eine wenigstens zu 98% reine Enzymprotein-Zubereitung. In anderen Ausführungsformen ist die Phospholipase eine in Milch nicht natürlich vorkommende Phospholipase.

[0057] Der Ausdruck Phospholipase schließt beliebige Hilfsbestandteile ein, die für die katalytische Aktivität des Enzyms notwendig sein können, wie z. B. einen geeigneten Akzeptor oder Cofaktor, der in dem Reaktionssystem natürlich vorkommen kann oder nicht.

[0058] Die Phospholipase kann in einer beliebigen, für die fragliche Verwendung geeigneten Form vorliegen, wie z. B. in der Form eines trockenen Pulvers oder Granulats, eines nicht-staubenden Granulats, einer Flüssigkeit, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms. Granulat können, z. B. wie in US 4,106,991 und US 4,661,452 beschrieben, hergestellt werden und können wahlweise mittels in der Technik bekannter Verfahren beschichtet werden. Flüssige Enzymzubereitungen können zum Beispiel durch Zugabe von Stabilisatoren, wie zum Beispiel einem Zucker, einem Zuckerkalkohol oder einem anderen Polyol, Milchsäure oder einer anderen organischen Säure, gemäß üblicher Verfahren stabilisiert werden. Geschützte Enzyme können gemäß dem in EP 238,216 offenbarten Verfahren hergestellt werden.

[0059] Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann der Lecithingehalt des Käses um wenigstens 5%, wie zum Beispiel wenigstens 10%, wenigstens 20%, wenigstens 30%, wenigstens 50%, wie zum Beispiel in dem Bereich von 5–95%, im Vergleich zu einem ähnlichen Käse-Herstellungsverfahren, jedoch ohne die enzymatische Behandlung in Schritt a), verringert werden.

[0060] In Kuhmilch bildet Lecithin normalerweise mehr als 95% der Phospholipide in der Milch, wogegen Lysolecithin annähernd 1% der Phospholipide bildet. Obwohl die Phospholipide normalerweise weniger als 1% der gesamten Lipide in Kuhmilch darstellen, spielen sie eine besonders wichtige Rolle, da sie hauptsächlich in der Milchfettglobuli-Membran vorhanden sind. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann der Lecithingehalt in dem Käse von Schritt b) weniger als 90%, wie z. B. weniger als 80%, z. B. weniger als 60% oder weniger als 50%, des Gesamtgehalts an Phospholipid in dem Käse betragen. In anderen Ausführungsformen der Erfindung stellt der Lysolecithingehalt in dem Käse wenigstens 5%, wie zum Beispiel wenigstens 10%, wenigstens 20%, wenigstens 30%, wenigstens 50%, wie z. B. in dem Bereich 5–99%, z. B. 5–90%, 10–90% oder 30–90% oder 40–80%, des Gesamtgehalts an Phospholipiden in dem Käse dar. Der Lecithin- oder Lysolecithingehalt kann durch ein beliebiges, dem Fachmann bekanntes Verfahren, z. B. durch HPLC, gemessen werden.

[0061] In einer bevorzugten Ausführungform, ist zu verstehen, dass die relative Menge von Lecithin gegenüber Lysolecithin in dem hergestellten Käse durch Umwandlung von Lecithin in Lysolecithin durch die Behandlung der Käsereimilch oder der Käsereimilch-Fraktion mit Phospholipase bereitgestellt wird. In Käse beträgt der Fettgehalt im Allgemeinen 65% (Gew/Gew), wie zum Beispiel in dem Bereich von 10–60%.

[0062] Der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Käse kann in weiterverarbeiteten Lebensmittelprodukten wie verarbeitetem Käse, Pizza, Burgern, Toast, Saucen, Dressings, Käsepulver oder Käsearomen verwendet werden.

[0063] In weiteren Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße Verfahren außerdem den Schritt, den Käse aus Schritt b) einer Hitzebehandlung, wie z. B. in dem Bereich von 150–350°C, zu unterziehen.

[0064] In einer Ausführungsform weist der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Käse eine verringerte Diffusion von Fett/Öl, wie z. B. eine Abnahme des "ölichen" Durchmessers von wenigstens 5%, wie zum Beispiel wenigstens 10%, wenigstens 20%, wenigstens 40%, z. B. eine Abnahme des "ölichen" Durchmessers in dem Bereich von 20–800%, z. B. 20–600%, auf; wobei der "ölige" Durchmesser, wie hierin in Beispiel 1 oder 2 definiert, gemessen wird.

[0065] Durch die vorliegende Erfindung wird ein Käseherstellungsverfahren bereitgestellt, das zu einer höheren Ausbeute des Käses und einer besseren Stabilität der Fettphase des nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Käses führt. Die Erhöhung der Fettausbeute in dem erfindungsgemäßen Verfahren kann wenigstens 0,5%, wie z. B. in dem Bereich 0,5–10%, wie zum Beispiel in dem Bereich 0,5–5%, betragen, gemessen wie z. B. wie in Beispiel 3 beschrieben, als "Fett als Differenz".

Weitere Aspekte der Erfindung:

[0066] Es wird ein Verfahren zur Stabilisierung des Fetts einer Milchzusammensetzung offenbart, das Behandeln einer Milch oder einer Fraktion der Milch mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe der Phospholipasen, umfasst. Der Erfinder hat gefunden, dass die Emulsionsstabilität einer Milchzusammensetzung verbessert werden kann, indem sie mit Phospholipase behandelt wird. Somit wird auch ein Verfahren zur Stabilisierung der Fettemulsion einer Milchzusammensetzung offenbart, das das Behandeln einer Milch oder einer Fraktion der Milch mit einer Phospholipase umfasst. Das Verfahren kann wie in Schritt a) des hierin beschriebenen Verfahrens durchgeführt werden.

[0067] Es wird auch ein Verfahren zur Herstellung verbesserter ultrahocherhitzter Sahne offenbart, die insbesondere eine verbesserte Fettstabilität aufweist, wobei das Verfahren zur Herstellung von ultrahocherhitzter Sahne die Schritte umfasst: Schritt a) Behandeln von Sahne mit einer Phospholipase; und Schritt b) Unterziehen der Phospholipase-behandelten Sahne aus Schritt a) einer Ultrahocherhitzung, wobei Schritt a) vor Schritt b) durchgeführt wird. Außerdem wird eine durch solch ein Verfahren erhältliche oder erhaltene ultrahocherhitzte Sahne offenbart. Schließlich wird auch die Verwendung einer Phospholipase bei der Herstellung ultrahocherhitzter Sahne offenbart.

[0068] Ein Verfahren zur Herstellung einer Sahneflüssigkeit umfasst die Schritte: Schritt a) Behandeln einer Milchzusammensetzung (wie z. B. Sahne) mit einer Phospholipase; und Schritt b) Herstellen einer Sahneflüssigkeit aus der Enzym-behandelten Milchzusammensetzung. Außerdem wird eine durch solch ein Verfahren erhältliche oder erhaltene Sahneflüssigkeit offenbart. Schließlich wird die Verwendung einer Phospholipase zur Herstellung von Sahneflüssigkeit offenbart.

[0069] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen, die in keinerlei Weise den Umfang der Erfindung beschränken sollen, weiter veranschaulicht.

BEISPIELE

Bestimmung der Phospholipaseaktivität:

[0070] Die Bestimmung der Phospholipaseaktivität kann gemäß den im Folgenden beschriebenen Prinzipien durchgeführt werden. Bei diesem Verfahren wird Eidotter als ein Lecithin-reiches Substrat verwendet. Prinzip: pH-Stat-Titration. Homogenisierter, Phospholipide enthaltender Eidotter wird durch Phospholipase in der Anwesenheit von Kalzium und Natriumdesoxycholat bei pH 8,0 und 40°C in einem pH-Staten hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden mit 0,1 N Natriumhydroxid titriert, und das Volumen der Base wird als eine Funktion der Zeit überwacht. Eine Phospholipase-Einheit ist als die Enzymmenge definiert, die unter Standardbedingungen ein Mikroäquivalent freier Fettsäure produziert.

Reagenzien:

0,016 M Natriumdesoxycholat ($C_{24}H_{39}NaO_4$), 0,32 M Kalziumchlorid, 0,01 N Salzsäure, 0,1 N Natriumhydroxid.

Substrat: Einen Eidotter zu 100 ml Wasser geben und in einem Disperger homogenisieren. Das homogene Substrat durch doppelte Gaze filtrieren. 5 ml 0,32 M Kalziumchlorid zugeben, um das Filtrat zu stabilisieren. Titrationsmischung: 100 ml des Substrats mit 50 ml 0,016 M Natriumdesoxycholat mischen.

[0071] Alternativ können die folgenden Tests für eine qualitative oder quantitative Bestimmung von Phospholipaseaktivität, wie in DK 99/00664 (Novo Nordisk A/S, Dänemark) beschrieben, verwendet werden: "Phospholipaseaktivität (PHLU)", "Phospholipaseaktivität (LEU)", "Phospholipase Monolayertest", "Plattentest 1" und "Plattentest 2", oder wie in WO 98/26057 (Novo Nordisk A/S) beschrieben: der "NEFA-C-Test".

BEISPIEL 1 PHOSPHOLIPASEBEHANDLUNG VON SAHNE FÜR DIE KÄSEHERSTELLUNG

[0072] In diesem Beispiel wurde Sahne mit Phospholipase behandelt, bevor sie mit Magermilch kombiniert wurde, um Käsereimilch herzustellen.

Rohmaterialien

Zusammensetzung der Käsereimilch:

Magermilch	0,1% Fett	1820 ml
Sahne	38,0% Fett	180 ml
Buttermilch (umfassend die Starterkultur)		50 ml
CaCl ₂		0,4 g

Enzyme:

- 1) Lab (Saure Aspartyl-Rhizomucor-miehei-Protease – EC 3.4.23.6) Dosierung: 0,107 g
- 2) Lecitase® (Phospholipase A₂ aus Bauchspeicheldrüse, erhältlich von Novo Nordisk A/S), Dosierung (basierend auf Fett): 0,2% (Gew/Gew)

Käseherstellung

[0073] Verfahren: Die Sahne wurde getrennt mit Phospholipase (Lecitase®, hergestellt von Novo Nordisk A/S, Dänemark; Dosierung 0,2% (basierend auf Gew/Gew Fettgehalt)) durch Inkubieren der Mischung in einem 50°C-Wasserbad für 30 Minuten behandelt. Die behandelte Sahne wurde mit der Magermilch bis zu einem Gesamtfettgehalt der Mischung von 3,5% (Gew/Gew) gemischt und in ein 33–35°C-Wasserbad gestellt. CaCl₂ wurde zu 2 Litern der Käsereimilch zugegeben, und eine Starterkultur (d. h. Buttermilch) wurde zugegeben, und die Mischung wurde für 5–10 Minuten gerührt. Die Milch wurde für 30 Minuten ohne irgendein Rühren belassen. Dann wurde Lab (saure Aspartyl-Rhizomucor-miehei-Protease) zugegeben, und die Milch wurde für 1 Minute gerührt. Anschließend wurde der Gerinnungspunkt definiert (in etwa 12 Minuten), und die Milch wurde vor dem Schneiden für in etwa 25–26 Minuten stehen gelassen.

[0074] Der Gerinnungspunkt (Gerinnungszeit) ist die von der Zugabe des Labs bis zu dem ersten Anzeichen einer Flockung vergangene Zeit und wird durch Bewegen eines schwarzen Stabs in der Milch bestimmt, d. h. der Gerinnungspunkt ist der Punkt, an dem die erste sichtbare Ausfällung von Paracasein auf dem Stab beobachtet wird.

[0075] Die tatsächliche Schneidezeit wurde definiert, indem ein Test wie folgt durchgeführt wurde: Mit einem Gerinnungsstock wurde ein kleiner Schnitt auf der Oberfläche des Käses ausgeführt, der Stock wurde unter den Schnitt geführt und aufwärts bewegt, als der Käse mit zwei scharfen Rändern getrennt wurde und die Molke sich zwischen den beiden Rändern sammelte, dann war der Käse bereit für das Schneiden.

[0076] Der Käse wurde behutsam mit einem Schneebesen gerührt, um ihn aufzubrechen, und wurde für zwei Minuten belassen. Nach den zwei Minuten wurde der Käse während 10–15 Minuten gelegentlich gerührt, um die Molke von dem Käsebruch zu trennen. Die stetig auftretende Molke und der Käsebruch wurden auf ein Sieb überführt, das ein Tuch enthielt. Die Molke floss durch das Tuch für 1–2 Stunden ab. Ein 0,6-kg-Gewicht wurde auf den oberen Teil des Käses gelegt, um mehr Molke zu entfernen, und danach wurde der Käse über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

[0077] Ergebnis: Die Käse-Herstellungsdaten (Gerinnungszeit, Schneidezeit, Menge der Molke, Protein in der Molke und Menge des Käses) sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Schmelzen von Käse

[0078] Verfahren: Vor dem Schmelzen wurde der Käse in Stücke mit einer Höhe von in etwa 2,5 cm und einem Durchmesser von in etwa 8 cm geschnitten. Die Käseproben wurden in einem Ofen bei 250°C für 8 Minuten erhitzt. Der Durchmesser des Käses nach dem Erhitzen wurde als der Mittelwert von zwei Durchmessern gemessen. Ergebnis: vgl. Tabelle 1 unten.

Diffusion von Fett/Öl

[0079] Verfahren: Bevor der Diffusionstest durchgeführt wurde, wurde der Käse in Stücke mit einer Höhe von in etwa 2,5 cm und einem Durchmesser von in etwa 8 cm geschnitten. Die Diffusion von Fett/Öl wurde nach Erhitzen der Käseproben in einem Ofen bei 200°C für 3 Minuten gemessen. Der Durchmesser auf der auf einem Filterpapier – Whatman 40 – ausdiffundierten Flüssigkeit nach dem Erhitzen wurde als der Mittelwert von vier Durchmessern bestimmt. Ergebnis: vgl. Tabelle 1 unten.

[0080] Die Messungen von in Beispiel 1 erhaltenen Proben sind in der Tabelle 1 gezeigt

[0081] Die Versuche wurden als zwei Versuchssätze durchgeführt, wobei verschiedene Chargen von Milch/Sahne-Ausgangsmaterialien verwendet wurden. Ein Satz ist die Spalte 1 und 2. Der zweite Satz ist die Spalte 3, 4 und 5.

TABELLE 1. Versuche mit für die Behandlung von Sahne bei der Käseherstellung verwendeter Phospholipase.

Versuch Nr.	1 Kontrolle	2 mit Lecitase	3 Kontrolle	4 mit Lecitase	5 mit Lecitase
Daten aus Käseherstellung					
Gerinnung, Minuten	13 ³⁰	14 ¹⁵	16 ²⁰	17 ⁰⁰	16 ⁰⁰
Schneiden, Minuten	31 ³⁰	31 ³⁰	35 ⁵⁰	35 ⁵⁰	34 ³⁰
Gewicht der Molke	1635,5	1660,1	1625,8	1645,8	1668,7
Gewicht des Käses	314,75	295,74	327,44	322,75	318,77
% Protein in Molke	0,96	0,92	0,84	0,83	0,83
g Protein in Molke	15,7	15,3	13,7	13,7	13,9
Ergebnis Schmelzen von Käse	8,0	7,5	8,0	7,3	7,3
Durchschnittlicher Durchmesser nach Erhitzen, cm					
Ergebnis Diffusion von Fett/Öl	6,6	5,8	6,8	5,4	5,4
"Öliger" Durchmesser auf Filterpapier nach Erhitzen, cm					

Versuche 1 und 3, keine Lecitase® zugegeben. Versuch 1 ist die Kontrolle für Versuch Nr. 2, und Versuch 3 ist die Kontrolle für Versuche Nr. 4-5.

[0082] Aus der Ergebnistabelle (vgl. "Schmelzen von Käse" und "Diffusion von Fett/Öl" dargestellt im unteren Bereich der Tabelle 1) wird deutlich ersichtlich, dass Käse, der mit einer anfänglichen Phospholipasebehandlung der Sahne hergestellt wurde, die Stabilität des Käses während einer Hitzebehandlung verbessert. Dies ist an den Messungen des durchschnittlichen Durchmessers der Probe nach dem Erhitzen zu sehen, der kleiner ist, wenn die Sahne für die Käseemilch mit Phospholipase behandelt wurde. Außerdem ist der ölige Durchmesser auf dem Filterpapier verringert, wenn die Sahne mit Phospholipase behandelt wird.

[0083] Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Stabilitätsverbesserung von Käse während einer Hitzebehandlung zu erreichen.

BEISPIEL 2 PHOSPHOLIPASEBEHANDLUNG VON SAHNE, UM DEN STABILISIERENDEN EFFEKT AUF DIE SAHNE ZU TESTEN

[0084] Verfahren: Sahne (200 g) wurde 15 Minuten bei 50°C mit 3 verschiedenen Dosierungen von Lecitase® 101 (Novo Nordisk A/S, Dänemark) (Dosierung basierend auf geschätztem Fett = 36%) inkubiert:

1. Dosierung 0%
2. Dosierung 0,2% (= 0,0725% der Sahne)
3. Dosierung 1,0% (= 0,36% der Sahne)

[0085] Nach der Inkubation wurde die Sahne auf 5°C abgekühlt. Die Sahne wurde auf eine standardisierte Weise geschlagen (Philips Mixer 5 Geschwindigkeiten, die ersten 2 Minuten bei der Geschwindigkeit 4 betrieben, und Geschwindigkeit 5 für den Rest der Zeit). 100 g geschlagene Sahne wurden in einen Trichter gefüllt und konnten für 1 Stunde bei Raumtemperatur abtropfen.

Proben und Ergebnisse:

[0086] Probe 1 wurde für 7 Minuten und 25 Sekunden geschlagen. In etwa 300 ml Sahne. Menge des Abtropfs nach 1 Stunde in dem Trichter = 2,5 ml.

[0087] Probe 2 wurde für 20 Minuten geschlagen, und es wurde keine Schaumbildung beobachtet. Die Probe wurde ein wenig dicker und erhielt eine hellgelbe Farbe.

[0088] Probe 3 wurde für 15 Minuten geschlagen, und es wurde keine Schaumbildung beobachtet. Die Probe wurde ein wenig dicker und erhielt eine hellgelbe Farbe.

[0089] Die Fähigkeit, Schaum zu bilden, wurde durch die Lecitase®-Behandlung zerstört. Die Schaumbildung in Sahne beruht auf dem Kolabieren der Fettglobuli und der Bildung einer kontinuierlichen Fettphase, die den Schaum bildet. In Übereinstimmung mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung zeigen die obigen Ergebnisse, dass Lecitase®-Behandlung die Emulgierung und Stabilisierung des Fetts in der Sahne verbessert.

BEISPIEL 3 PHOSPHOLIPASEBEHANDLUNG VON SAHNE FÜR DIE HERSTELLUNG VON MOZZARELLAKÄSE

[0090] In diesem Beispiel wurde Sahne mit Phospholipase behandelt, bevor sie mit Magermilch kombiniert wurde, um Käsereimilch herzustellen.

Rohmaterialien

Zusamensetzung der Käsereimilch:

Magermilch, pasteurisiert	0,83% Fett	13,63 1
Sahne	30% Fett	1,37 1
CaCl ₂		0,4 g/2 kg Sahne

[0091] Starterkulturen LH100 und TA061 (Milchsäurebakterien) von Rhodia Foods (Rhodia Inc, Madison, WI, USA) 0,6 g von jeder.

Enzyme:

- 1) Lab (Saure Aspartyl-Rhizomucor-miehei-Protease – EC 3.4.23.6) Dosierung w 50 KRU/g (KRU-Verfahren erhältlich von Novo Nordisk A/S): 0,60 g
- 2) Lecitase® (Phospholipase A2 aus Bauchspeicheldrüse, erhältlich von Novo Nordisk A/S), Dosierung (basierend auf Fett): 0,2% (Gew/Gew)

Käseherstellung

[0092] Verfahren: Die Sahne wurde getrennt mit Phospholipase (Lecitase®, hergestellt von Novo Nordisk A/S, Dänemark; Dosierung 0,2% (basierend auf Gew/Gew Fettgehalt)) behandelt, indem die Mischung in einem 50°C-Wasserbad für 30 Minuten mit CaCl₂ inkubiert wurde. Die behandelte Sahne wurde mit der Magermilch

bis zu einem Gesamtfettgehalt von 3,5% gemischt und in einen 15-l-Käse-Bottich (unter Verwendung einer Käseeinheit mit 2 × 15-l-Bottichen, erhältlich von GEA Liquid processing, Haderslevvej 36, 6000 Kolding, Dänemark) gegeben. Die Milch wurde auf 34,4°C äquilibriert und Starterkultur wurde zugegeben, dann wurde die Mischung sanft für 4–5 Minuten bewegt, bevor das Lab zugegeben wurde. Dann wurde Lab (saure Aspartyl-Rhizomucor-miehei-Protease) zugegeben, und die Milch wurde für 3 Minuten gerührt. Danach stand die Milch für in etwa 35 Minuten vor dem Schneiden.

[0093] Die tatsächliche Schneidezeit wurde definiert, indem ein Test wie folgt durchgeführt wurde: Mit einem Gerinnungsstock wurde ein kleiner Schnitt auf der Oberfläche des Käses ausgeführt – dann wurde der Stock unter den Schnitt geführt und aufwärts bewegt, so dass der Käse mit zwei scharfen Rändern getrennt wurde und die Molke sich zwischen den beiden Rändern sammelte. Das Schneiden wurde mit 1/2-Zoll-Messern durchgeführt.

[0094] Der geschnittene Käsebruch wurde dann auf 41,1°C (benötigt in etwa 30 min) erhitzt. Der Käse wurde dann sanft bewegt, bis der pH des Käsebruchs pH 5,90 erreichte, wonach die Molke abgelassen wurde, und wurde auf eine 5-cm-Matte geschichtet. Der Käsebruch wird in 1,5-inch-Würfel geschnitten, als der pH 5,25 erreicht, und für 15 min mit kaltem Leitungswasser bedeckt. Der Käsebruch wird gewogen, nachdem das Leitungswasser abgeleitet wurde. NaCl (0,2% des Käseemilch-Gewichts) wurde in 3 Portionen trocken zu dem gewürfelten Käsebruch zugegeben. Der Käsebruch wurde dann bei 63°C bei 9 upm mittels einer Streckvorrichtung mit zwei Schrauben (Supreme Micro Mixing Machine, erhältlich von Stainless Fabricating Inc., Columbus, WI, USA) gezogen, wonach der gezogene Käsebruch in 7°C-Wasser für 30 min und 7°C-F-Salzwasser (23% NaCl) für weitere 90 Minuten gegeben wird.

[0095] Die Käseherstellungsdaten (Protein im Käse, gemessen mittels des Dumas-Verbrennungsverfahrens (LECO), Feuchtigkeit, gemessen mittels OEM Automatic Volatile Computer, Modell AVC-80 von OEM Corp., Matthews, NC, 28108, und Fett als Differenz) sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

[0096] Ergebnis: vgl. Tabelle 2 unten.

Diffusion von Fett/Öl

[0097] Verfahren: Die Diffusion von Fett/Öl wurde an in dem Ofen bei 90°C für 5 Minuten erhitzten Käseproben getestet. Bevor der Diffusionstest durchgeführt wurde, wurde der Käse in einem Osterizer-Mixer gerieben, um die Einförmigkeit der Probe zu erreichen. Danach wurden 2,0 Gramm in einem Metallring (2 cm) eingeformt und auf die Mitte eines Whatman-Filter # 4 gestellt. Der Ölaustritt wurde als die Differenz der Flächen zwischen dem Ring aus Öl und dem Kreis des Käses bestimmt (dreifache Bestimmungen). Ergebnis: vgl. Tabelle 2 unten.

Schmelzbarkeit

[0098] Verfahren: Squeeze-Flow-Rheometrie, Ref. Ak, M. M. und Gunasekaran. 1995. J. Texture Stud. 26: 695–711. Parameter: 0,1 mm/sek Crosshead-Geschwindigkeit auf Stable Micro Systems, TA-XT2 Texturanalysator. Zylindrische Proben (Durchmesser 25 mm, Höhe 15 mm) wurden für 5 min in ein 50°C-Wasserbad gestellt, um die Temperatur zu äquilibrieren.

[0099] Die Schmelzbarkeiten der P-Lipase-behandelten Proben waren nur geringfügig niedriger als ihre jeweiligen Kontrollen.

[0100] Die in Beispiel 3 erhaltenen Messungen von Proben sind in der Tabelle 2 gezeigt

[0101] Wo verschiedene Chargen von Milch/Sahne-Ausgangsmaterialien verwendet wurden, wurden die Versuche als zwei Sätze von Versuchen durchgeführt.

TABELLE 2. Daten für Versuch 3: Versuche mit für die Behandlung von Sahne bei der Käseherstellung verwendeter Phospholipase.

Versuch Nr.	1	1- Kontrolle	2	2 Kontrolle
Daten aus Käseherstellung				
Protein in Käse	18,8%	18,1%	20,4%	20,5%

Feuchtigkeit	43,1%	45,1%	46,3%	46,9%
Fett als Differenz	38,1%	36,8%	33,3%	33,6%
Ergebnis des Ausölens "Ölige" Fläche auf Filterpapier nach Erhitzen, in Prozent der Käsefläche	57%	176%	< 10%	61%

*Versuche 1 und 2 mit zugegebener Lecitase®. Versuch-1-Kontrolle und -2-Kontrolle sind die entsprechenden Versuche, die parallel, aber ohne Lecitase® durchgeführt wurden. In Experiment 1 wurde das Ausölen nach 5 Tagen in der Kühlung gemessen, und in Experiment 2 wurde das Ausölen nach der Lagerung in der Kühlung für 8 Tage gemessen.

[0102] Aus der Ergebnistabelle 2 wird deutlich ersichtlich, dass Mozzarellakäse, der mit einer anfänglichen Phospholipasebehandlung der Sahne hergestellt wurde, das Ausölen signifikant verringert, das einen Schlüsselelement für Mozzarella darstellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, mit dem erfundungsgemäßen Verfahren eine Stabilitätsverbesserung von Käse während einer Hitzebehandlung zu erreichen. Es wird außerdem beobachtet, dass die Phospholipase den Fettgehalt des Käses erhöht, was wahrscheinlich durch einen verringerten Fettverlust während der Verarbeitung verursacht wird. Somit führt die anfängliche Behandlung mit Phospholipase zu einer erhöhten Ausbeute bei der Käseherstellung.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Käse, das die Schritte umfasst:
 - a) Behandeln von Käseremilch oder einer Käseremilchfraktion mit einer Phospholipase, ausgewählt aus Phospholipase A₁, Phospholipase A₂, Phospholipase B und Kombinationen davon; und
 - b) Herstellen von Käse aus der Käseremilch oder der Käseremilchfraktion, wobei Schritt a) vor und/oder während Schritt b) durchgeführt wird und das Phospholipid ein Enzym ist, das im Wesentlichen nur Phospholipaseaktivität aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Phospholipase eine Phospholipase A₁ oder eine Phospholipase A₂ ist.
3. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phospholipase aus Bauchspeicheldrüse stammt.
4. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Käseremilchfraktion Sahne ist.
5. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–4, wobei Schritt a) vor Schritt b) durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–4, wobei Schritt a) während Schritt b) durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei Schritt a) an einer Käseremilchfraktion durchgeführt wird, wobei die Fraktion Sahne ist und das Verfahren weiter den Schritt umfasst, die Sahne nach Schritt a) und vor Schritt b) einer Pasteurisierung zu unterziehen.
8. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, weiter umfassend den Schritt, den Käse einer Hitzebehandlung zu unterziehen.
9. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Käseremilch oder die Käseremilchfraktion vor der Herstellung von Käse einem Homogenisierungsschritt unterzogen wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Käse Dänischer Blauschimmelkäse ist.

11. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–9, wobei der Käse aus der Gruppe, bestehend aus Campesino, Chester, Danbo, Drabant, Herregård, Manchego, Provolone, Saint Paulin, Weichkäse, Svecia, Taleggio, Weisskäse, Cheddar, Colby, Edamer, Münster, Gruyere, Emmentaler, Camembert, Parmesan, Romano, Mozzarella, Feta; Sahnefrischkäse, Neufchatel, Quark und Queso Blanco, ausgewählt ist.
12. Verfahren nach einem beliebigen der Ansprüche 1–9, wobei der Käse aus der Gruppe, bestehend aus durch Lab-Koagulation des Käsebruchs hergestelltem Käse aus Lab-Käsebruch; gereiften Käsen, Frischkäsen und Säure-koagulierten Käsen, ausgewählt ist.
13. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, weiter umfassend den Schritt der Verarbeitung des Käses zu einem Lebensmittelprodukt oder einem Bestandteil in anderen Lebensmittelprodukten.
14. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phospholipase eine gereinigte Phospholipase ist.
15. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phospholipaseenzym-Dosierung in dem Bereich von 0,01–1% (Gew/Gew) des Fettgehalts ist.
16. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Lysolecithin-Gehalt in dem Käse wenigstens 5% des Gesamtgehalts an Phospholipiden in dem Käse bildet.
17. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Lecithin-Gehalt des Käses um wenigstens 5% im Vergleich zu einem ähnlichen Verfahren, jedoch ohne die Behandlung mit Phospholipase, verringert ist.
18. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, weiter umfassend den Schritt des Inaktivierens oder Entfernen der Phospholipase nach der Phospholipasebehandlung.
19. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren die Koagulation durch Verwendung von Lab umfasst.
20. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phospholipase in der Form eines trockenen Pulvers oder Granulats, eines nicht-staubenden Granulats, einer Flüssigkeit, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms vorliegt.
21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Phospholipase durch Expression in einem Milchsäurebakterium, das als ein Starterorganismus bei der Käseherstellung verwendet wird, bereitgestellt wird.
22. Verfahren nach einem beliebigen der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phospholipase durch Verwendung rekombinanter Techniken erhalten wird.

Es folgen keine Zeichnungen