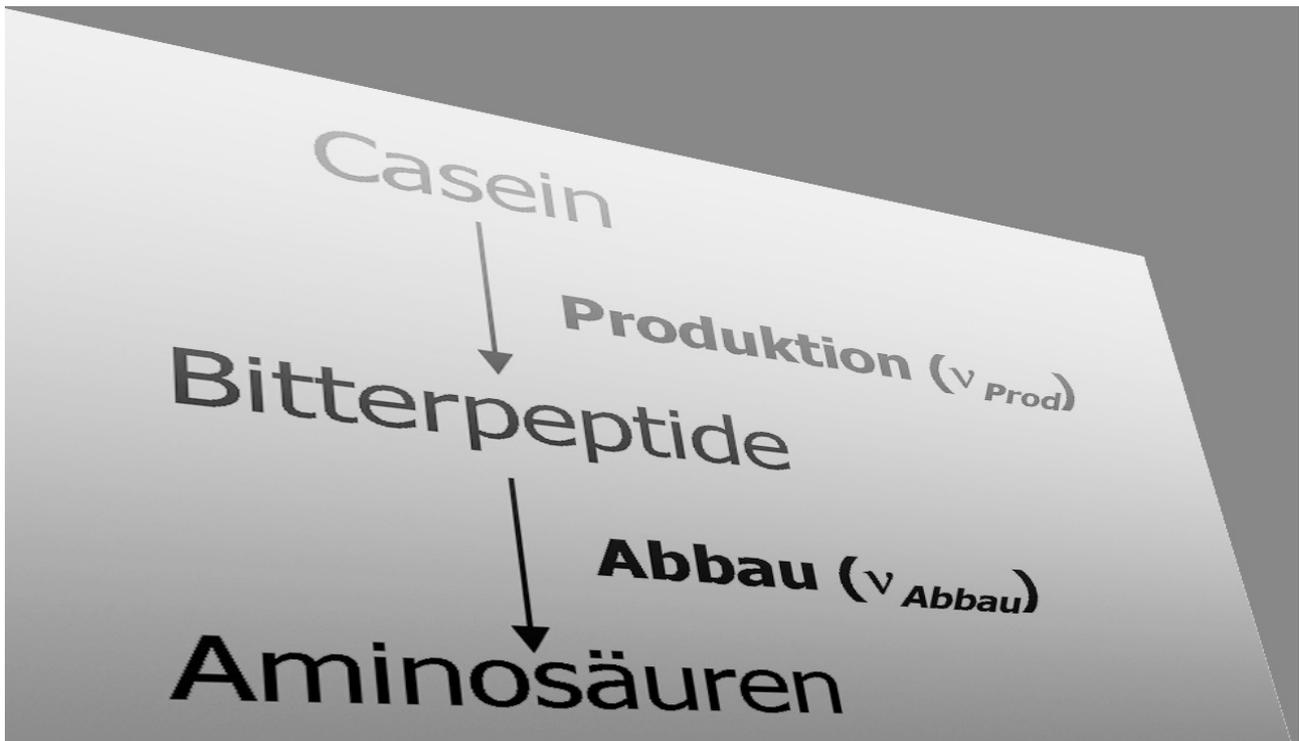


# BITTERGESCHMACK VON KÄSE

Diskussionsgruppen



## Inhalt

1	Einleitung	3
2	Die Wahrnehmung von Bitterstoffen	3
2.1	Der Geschmackssinn	3
2.2	Individuelle Wahrnehmung von Bitterkeit	4
2.3	Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Geschmacksstoffen	4
3	Bitter schmeckende Käseinhaltstoffe	4
3.1	Mineralstoffe	5
3.2	Proteolytisch bedingte Bitterstoffe	5
4	Die Bildung der Bitterpeptide	6
4.1	Die Proteolyse	6
4.2	An der Proteolyse beteiligte Enzyme	7
4.3	Quellen von Bitterpeptiden	8
5	Einflussfaktoren	9
5.1	Zusammensetzung der Käse	9
5.2	Milchqualität	9
5.3	Technologische Einflussfaktoren	10
6	Massnahmen gegen Bittergeschmack	14
7	Methoden zur Untersuchung auf Bitterpeptide	15
8	Ausblick	15
9	Zusammenfassung	16
10	Quellen	16

## 1 Einleitung

Eine leicht bittere Note gehört bei einigen Käsesorten, wie z.B. dem Fribourger Vacherin zum typischen Geschmack. Bei den meisten anderen Käse gilt bitterer Geschmack dagegen als Käsefehler und ist entsprechend gefürchtet. Anfällig auf Bitterkeit sind vor allem Halbhartkäse, schimmelgereifte Weichkäse sowie Käse mit reduziertem Fettgehalt.

Der vorliegende Diskussionsgruppenstoff fasst die heutigen Erkenntnisse zum Thema Bitterkeit von Käse zusammen und stellt die komplexen Vorgänge dar, die zu bitterem Geschmack führen können. Es werden mögliche Massnahmen zur Bekämpfung von Bitterkeit des Käseteigs diskutiert.

## 2 Die Wahrnehmung von Bitterstoffen

### 2.1 Der Geschmackssinn

Bitter ist eine der fünf heute bekannten Geschmacksrichtungen, die unser Geschmackssinn wahrnehmen kann. Diese fünf Grundqualitäten sind: süß, sauer, salzig, bitter und umami.

Da die Geschmacksrichtung «umami» noch weniger bekannt ist, sei hierzu noch soviel vermerkt: Der Begriff kommt aus dem Japanischen und heisst übersetzt so viel wie «fleischartig», «wohlschmeckend». Die Empfindung «umami» wird z.B. durch Glutaminsäure, eine in reifen Hartkäsen besonders reichlich vorhandene Aminosäure ausgelöst.

Für jede Geschmacksrichtung gibt es spezielle Rezeptoren. Diese befinden sich in den Geschmackspapillen, die auf der Zunge und zu einem kleineren Teil auch in Gaumen und im Rachen zu finden sind. Abb. 1 zeigt, in welchem Bereich der Zunge die verschiedene Geschmacksrichtung besonders gut wahrgenommen werden. Danach wird Bitterkeit vor allem im hinteren Bereich der Zunge wahrgenommen. Die Theorie der örtlich streng begrenzten Wahrnehmungsfelder ist allerdings überholt.

Interessant ist, dass die Eigenschaften süß und bitter sehr nahe beieinander liegen. Oft genügt eine minimale chemische Modifikation eines Süsstoffmoleküls und es schmeckt bitter (und umgekehrt).

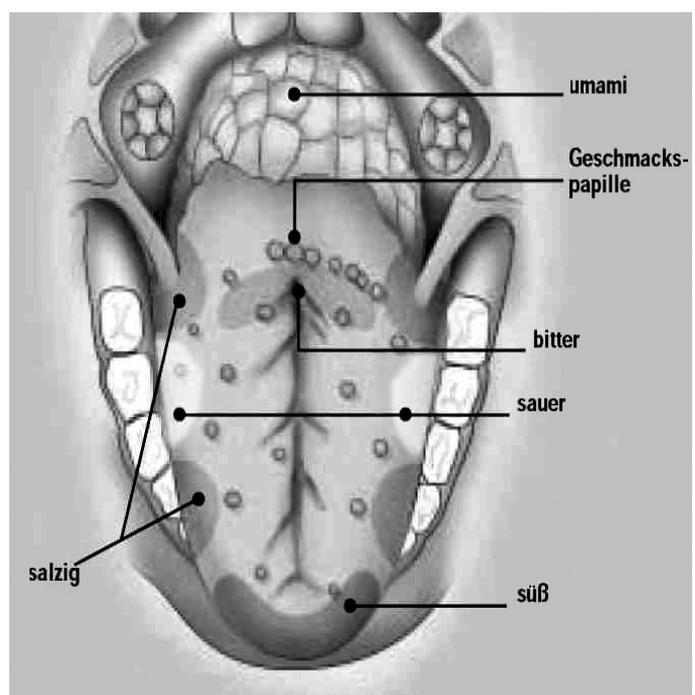


Abb. 1: Wahrnehmung der fünf Geschmacksrichtungen in der Mundhöhle (Bildquelle [1])

## 2.2 Individuelle Wahrnehmung von Bitterkeit

Menschen haben eine natürlich Abneigung gegen Bitterstoffe. Biologen erklären sich dies dadurch, dass viele pflanzliche Giftstoffe einen bitteren Geschmack aufweisen.

Bittergeschmack ist also vermutlich ein Warnsignal, das vor der Aufnahme unbekömmlicher Nahrung schützen soll. Diese These wird dadurch gestützt, dass alle Wirbeltiere auf Bitterstoffe reagieren und dass zumindest der Mensch mehrere Typen von Bitterrezeptoren besitzt, die spezifisch auf bestimmte Gruppen von Bitterstoffen reagieren.

Nicht alle Menschen nehmen Bitterkeit mit gleicher Intensität wahr. So reagieren Kinder empfindlicher als Erwachsene. Mit zunehmendem Alter geht die Empfindlichkeit des Geschmackssinns gegenüber manchen Bitterstoffen zurück. Es bestehen aber auch ethnische Unterschiede. Gemäss einer Studie ist die Toleranz der Asiaten gegenüber Bittergeschmack in Käse wesentlich geringer als jene der Iren oder der weissen Bevölkerung Australiens.

## 2.3 Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Geschmacksstoffen

Es ist eine jedermann vertraute Tatsache, dass die negative Geschmacksempfindung eines bitteren Tees oder eines allzu sauren Fruchtsaftes durch Süssen gemildert werden kann. Solche Wechselwirkungen sind auch beim Käse bekannt. So werden Bitterstoffe im Käse bei höheren Kochsalzgehalten weniger stark wahrgenommen.

Erwähnung verdient auch die Feststellung, wonach die oft leicht bittere Note von kalt degustiertem Raclettekäse im geschmolzenen Zustand nicht mehr wahrnehmbar ist.

## 3 Bitter schmeckende Käseinhaltsstoffe

Im Käse gibt es eine Vielzahl von Stoffen, die oberhalb gewisser Konzentrationen bitter schmecken (Tab. 1).

Tab. 1: Bitter schmeckende Stoffe in Käse

Stoffgruppe	Verbindung	Herkunft
Mineralstoffe	Calcium, Magnesium und Kalium in Form freier Ionen	Natürlicher Milchinhaltstoff
Aminosäuren - hydrophobe AS  - basische AS	Tryptophan, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Valin, Lysin, Arginin	Proteolyse (Reifung in die «Tiefe»)
Bitterpeptide (hydrophobe Peptide)	Mittelgrosse Oligopeptide, die reich an hydrophoben AS sind (s. oben)	Proteolyse (Reifung in die «Breite»)
Biogene Amine	Cadaverin	Abbauprodukt der Aminosäure Lysin
Sekundäre gebildete Aminosäuren	Ornithin, Citrullin	Abbauprodukte von Arginin
Andere Verbindungen	Langkettige Ketone, Isofettsäuren, Monoglyceride	Abbauprodukte von Aminosäuren und Lipiden

Die gleichzeitige Gegenwart verschiedener Bitterstoffe kann die Wahrnehmung von Bitterkeit verstärken.

### 3.1 Mineralstoffe

#### Calcium und Magnesium

Die Salze der beiden Metalle schmecken stark bitter, sofern sie gut wasserlöslich sind und in freie Ionen dissoziieren. Käse enthält bis zu 13 g Calcium und 0.4 g Magnesium pro kg. Der grösste Teil davon ist aber an das Casein bzw. in Phosphat-Komplexen gebunden, also nicht in Form freier Ionen vorliegend. Einen gewissen Einfluss auf die Bitterkeit von Käse können Ca und Mg allenfalls dann haben, wenn der ionisierte Anteil erhöht ist. Dies kann unter Umständen bei tiefem pH-Wert bzw. hohem Milchsäuregehalt der Fall sein. Insgesamt ist aber der Calcium- und Magnesiumgehalt von Käse für die Entstehung von bitterem Geschmack von untergeordneter Bedeutung.

Der Zusatz von Calciumchlorid zur pasteurisierten Kessmilch ist für den Geschmack unerheblich. Mit den nach GHP verwendeten Mengen wird der Gesamtcalciumgehalt der Milch um weniger als 1 % erhöht.

#### Kalium

Auch Kaliumsalze schmecken bitter. Die im Käse vorhandenen Mengen von 0.5 bis 1 g/kg sind aber unbedeutend. Beim Einsatz von Kaliumchlorid zur Herstellung von kochsalzarmen Käsen (Ersatz von NaCl durch KCl) stellt aber die Entstehung von Bitterkeit ein Hindernis dar.

### 3.2 Proteolytisch bedingte Bitterstoffe

#### Bitterpeptide

Die weitaus wichtigste Ursache von Bitterkeit ist die Anreicherung von Bitterpeptiden im Käseteig. Diese entstehen beim enzymatischen Abbau des Caseins während der Käsereifung. Bitterpeptide haben folgende Eigenschaften:

- hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren (siehe Tab. 1).
- stark hydrophob, d.h. wasserabstossend und tendenziell fettlöslich.
- Molekulargewicht: 500 bis 4000 Dalton (Kettenlänge 4-30 Aminosäuren)

Die bittersten Peptide weisen eine Kettenlänge zwischen 5 und 10 Aminosäuren auf.

#### Bittere Aminosäuren

Auch einige Aminosäuren schmecken bitter. Es sind dies die hydrophoben Aminosäuren (siehe Tab. 1) sowie die beiden basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Peptide, die reich an diesen Aminosäuren sind, schmecken aber weitaus bitterer als eine entsprechende Mischung der freien Aminosäuren. Der Proteinabbau in die Tiefe bewirkt also meist eine Entbitterung.

#### Citrullin und Ornithin, Cadaverin

Bei Citrullin und Ornithin Verbindung handelt es sich um zwei bitter schmeckende Abbauprodukte der Aminosäure Arginin. Citrullin und Ornithin sind chemisch betrachtet ebenfalls Aminosäuren. In Proteinen kommen sie aber nicht vor.

Cadaverin gehört zu biogenen Aminen und wird bei der Abspaltung von CO<sub>2</sub> aus der Aminosäure Lysin gebildet. Da Lysin für diesen Prozess als freie Aminosäure vorliegen muss, entsteht Cadaverin erst im reiferen Käse. Die für die CO<sub>2</sub>-Abspaltung verantwortlichen Enzyme (Decarboxylasen) werden v.a. von Enterokokken, einigen fakultativ heterofermentativen Lb sowie Schmierebakterien gebildet.

## 4 Die Bildung der Bitterpeptide

### 4.1 Die Proteolyse

Der Proteinabbau (Proteolyse) im Käse vollzieht sich als mehrstufiger Prozess. Zunächst spalten Proteasen und Endpeptidasen das para-Casein bestehend aus  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -Casein und para-K-Casein (Tab. 2) in kleinere und grössere Peptide.

Man nennt dies die **primäre Proteolyse** oder Proteolyse «in die Breite». Sie äussert sich in einem Anstieg des wasserlöslichen Stickstoffs im Käse. Verantwortlich für die primäre Proteolyse sind auf die Spaltung von Proteinen und grossen Polypeptiden spezialisierte **Endopeptidasen** (Proteasen). Sie spalten Peptidbindungen innerhalb der Kettenmoleküle (Abb. 2).

Bei der **sekundären Proteolyse** werden die Proteinfragmente weiter bis auf die Stufe der Aminosäuren abgebaut. Man spricht auch von der Proteolyse «in die Tiefe», messbar am Gehalt der Käse

an freien Aminosäuren (OPA-Wert). Dabei kommt vor allem den sogenannten **Exopeptidasen** eine grosse Bedeutung zu, welche vom **Kettenende** her kleinste Peptide oder einzelne Aminosäuren abspalten.

Da die Bitterpeptide mit einer Kettenlänge von 4 bis 30 Aminosäuren im Bereich der mittel-grossen Peptide zu finden sind, kann allgemein gesagt werden, dass die Proteolyse in die Breite die Bildung von Bitterkeit begünstigt, während die Proteolyse «in die Tiefe» zu einer Entbitterung führt. Dies als Folge des weiteren Abbaus der Bitterpeptide zu Di- und Tripeptiden sowie Aminosäuren. Nicht selten ist darum Bitterkeit eine vorübergehende Erscheinung. So wird Gruyère-käse bei der Taxation zuweilen als bitter beanstandet. Bei ausgereiftem Gruyère ist Bitterkeit dagegen selten.

Tab. 2: Zusammensetzung von labgeronnenem Casein

Caseinfraktion	Anteil	Molekulargewicht	Kettenlänge (Anzahl Aminosäuren)
$\alpha_{s1}$ -Casein	40%	23'500	199
$\alpha_{s2}$ -Casein	11%	25'100	207
$\beta$ -Casein	40%	23'980	209
para-K-Casein	9%	12'271	105

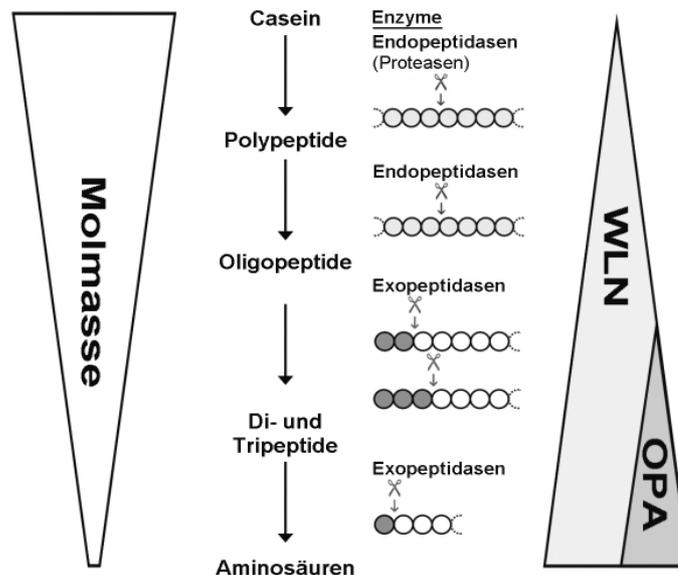


Abb. 2 Ablauf der Proteolyse im Käse und beteiligte Enzymtypen

## 4.2 An der Proteolyse beteiligte Enzyme

Der Proteinabbau im Käse ist das Werk einer Armada verschiedenster Proteasen und Peptidasen (Tab. 3). Jedes dieser Enzyme reagiert nämlich sehr spezifisch. Enzyme der Familie der Prolylpeptidasen z.B. können nur gerade Peptidbindungen zwischen Prolin und einer darauffolgenden Aminosäure spalten. Damit ist klar, dass der Proteinabbau im Käse je nach vorliegendem Peptidasenmix recht unterschiedlich verlaufen kann.

Die primäre Proteolyse ist zuallererst das Werk der Milchgerinnungsenzyme und der milcheigenen Proteasen (Abb. 3). Eine nicht minder wichtige Rolle spielen die zellwandgebunden Proteasen der Milchsäurebakterien, bei oberflächengereiften Käse auch die Proteasen der Schmierflora bzw. der Schimmelpilze.

Die sekundäre Proteolyse, d.h. der Abbau der (teilweise bitteren) Oligopeptide wird fast ausschliesslich von den Peptidasen der Milchsäurebakterien geleistet. Diese Peptidasen, insbesondere die Exopeptidasen, sind hauptsächlich in der Zellflüssigkeit lokalisiert. Damit diese im Käse ihre volle Wirkung entfalten können, müssen die Bakterienzellen lysieren, so dass die Enzyme freigesetzt werden. Tatsächlich haben Versuche gezeigt, dass mit schlecht lysierenden Milchsäurebakterienstämmen hergestellte Käse stärker zu Bittergeschmack neigen.

Tab. 3: Die wichtigsten proteolytischen Enzyme in Käse

Herkunft	Typ	Vertreter	pH-Optimum	Bemerkung
Labgerinnungsenzyme	Proteasen (Endopeptidasen)	Chymosin Pepsin	<5	Hitzelabil
Milcheigene Proteasen	Proteasen (Endopeptidasen)	Plasmin Cathepsin	7.5 <5	Hitzestabil
Proteasen der Milchsäurebakterien - Zellwand gebundene	Proteasen (Endopeptidasen)	Lactocepine Andere	5.5-6.5 6-8	
- intrazelluläre	Exopeptidasen	Amino-peptidasen	6.5-8	z.B. LAP

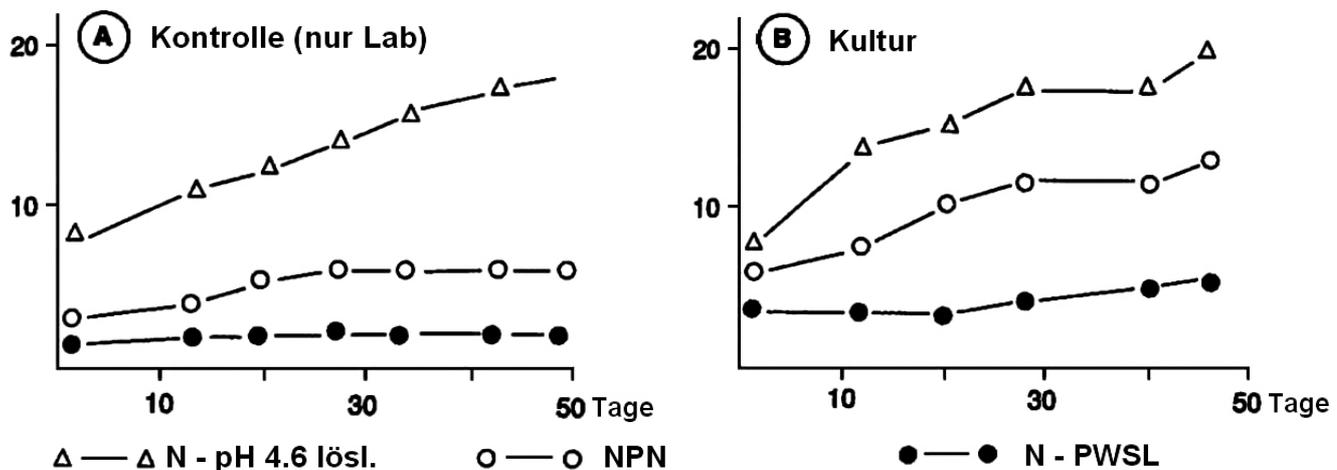


Abb. 3: Beitrag der proteolytischen Enzyme des Labes und der Kulturen zum Proteinabbau im Käse (Quelle: [6]).

Experiment A: steriler Käse ohne Kultur (gesäuert mit GDL). Experiment B: mit Kultur gesäuert.

N-pH 4.6: bei pH 4.6 löslicher Stickstoff → Peptide + Aminosäuren

NPN: Nichtproteinstickstoff → Oligopeptide + Aminosäuren

N-PWSL: Phosphorwolframsäurelöslicher N → Di- & Tripeptide + Aminosäuren

### 4.3 Quellen von Bitterpeptiden.

Die Caseine sind relativ hydrophobe Proteine. Innerhalb der Moleküle gibt es zudem Abschnitte, die besonders reich an hydrophoben Aminosäuren und Prolin sind. Werden diese durch bestimmte Enzyme freigesetzt, bilden sich besonders hydrophobe Peptide, die teilweise sehr stark bitter schmecken. Die meisten der bekannten Bitterpeptide leiten sich von  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Casein ab. Dies auch deshalb, weil diese Caseine mengenmässig dominieren (vgl. Tab. 2). Doch auch  $\alpha_2$ -Casein und das sehr hydrophobe para-K-Casein sind potentielle Quellen von Bitterpeptiden. In UF-Käse käme auch das  $\beta$ -Laktoglobulin als Quelle in Betracht. In Versuchen zeigten Molkenproteinhydrolysate jedoch deutlich weniger Bitterkeit als Caseinhydrolysate.

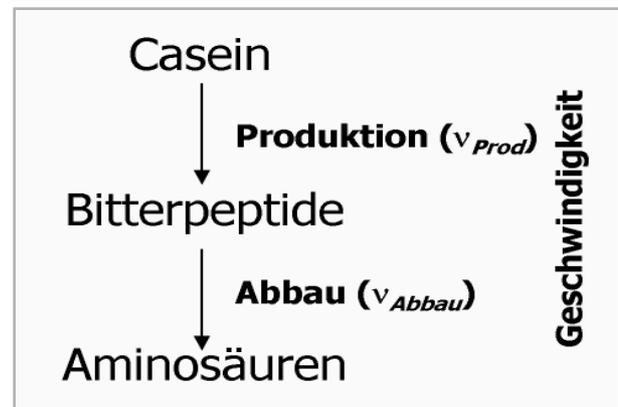
Arg<sup>1</sup>-glu-**leu**-glu-glu-**leu**-asn-**val**-pro-gly<sup>10</sup>-glu-**ile**-**val**-glu-ser-**leu**-serP-serP-serP-glu<sup>20</sup>-glu-ser-**ile**-thr-arg-**ile**-asn-lys-lys-**ile**<sup>30</sup>-glu-lys-**phe**-gln-serP-glu-glu-gln-gln-gln<sup>40</sup>-thr-glu-asp-glu-**leu**-gln-asp-lys-**ile**-his<sup>50</sup>-**pro-phe**-ala-gln-thr-gln-ser-**leu**-**val**-tyr<sup>60</sup>-**pro-phe**-pro-gly-**pro-ile**-pro-asn-ser-**leu**<sup>70</sup>-pro-gln-asn-**ile**-pro-pro-**leu**-thr-gln-pro<sup>80</sup>-**pro-val**-**val**-pro-pro-**phe**-**leu**-gln-pro<sup>90</sup>-glu-**val**-met-lys-**val**-ser-lys-**val**-lys-glu<sup>100</sup>-alamet-ala-pro-lys-his-lys-glu-met-pro<sup>110</sup>-**phe**-pro-lys-**tyr**-pro-**val**-gln-pro-**phe**-thr<sup>120</sup>-glu-ser-gln-ser-**leu**-thr-**leu**-thr-asp-val<sup>130</sup>-glu-asn-leu-his-**leu**-pro-pro-**leu**-**leu**-**leu**<sup>140</sup>-gln-ser-**trp**-met-his-gln-pro-his-gln-pro<sup>150</sup>-**leu**-pro-pro-thr-**val**-met-**phe**-pro-pro-gln<sup>160</sup>-ser-**val**-**leu**-ser-**leu**-ser-gln-ser-lys-**val**<sup>170</sup>-**leu**-pro-**val**-pro-glu-lys-ala-**val**-pro-**tyr**<sup>180</sup>-pro-gln-arg-asp-met-**pro-ile**-gln-ala-**phe**<sup>190</sup>-**leu**-**leu**-**tyr**-gln-gln-pro-**val**-**leu**-gly-pro<sup>200</sup>-**val**-arg-gly-**pro-phe**-**pro-ile**-**ile**-**val**<sup>209</sup>-OH

Abb. 4: Aminosäuresequenz von  $\beta$ -Casein A<sup>2</sup>. Die hydrophoben Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Besonders hydrophobe Abschnitte, aus denen Bitterpeptide hervorgehen sind unterstrichen.

Bis heute wurden über ein Dutzend Bitterpeptide aus Käse isoliert. Das bekannteste ist das Peptid  $\beta$ -Cn f193-209, welches das Endstück ab Position 193 der Aminosäurekette des  $\beta$ -Caseinmoleküls umfasst, also insgesamt 17 Aminosäuren lang ist (Abb. 4).  $\beta$ -Casein ist ziemlich reich an Prolin. Prolinreiche Bitterpeptide sind relativ proteolyseresistent, da die Peptidbindungen des Prolins nur durch prolinspezifische Peptidasen abgebaut werden können. Die Fähigkeit der Milchsäurebakterien zur Bildung solcher Peptidasen scheint daher ein wichtiges Merkmal von «entbitterenden» Stämmen zu sein.

#### Anreicherung von Bitterpeptiden

Bitterpeptiden entstehen grundsätzlich in jedem Käse. Bitterkeit wird aber nur wahrgenommen, wenn die Konzentration den sensorischen Schwellenwert überschreitet. Dies hängt davon ab, welcher Prozess schneller abläuft, die Bildung oder der Abbau der Bitterpeptide (Abb. 5).



#### Anreicherung von Bitterpeptiden wenn ...

$$v_{Prod} > v_{Abbau}$$

$v_{Prod}$  = Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung

$v_{Abbau}$  = Reaktionsgeschwindigkeit des Abbaus

Abb. 5: Bedeutung der Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung und des Abbaus von Bitterpeptiden für die Entstehung von Bittergeschmack im Käse (nach B. Mietton, ENILBIO, Poligny F)

## 5 Einflussfaktoren

### 5.1 Zusammensetzung der Käse

Dass bestimmte Käsesorten stärker zu Bitterkeit neigen als andere, liegt teilweise an der Zusammensetzung. Von Bedeutung sind vor allem:

#### Wassergehalt

Ein hoher Wassergehalt im fettfreien Käse fördert die Proteolyse in die Breite gegenüber dem Abbau in die Tiefe, was die Bildung von Bitterpeptiden begünstigt. Weich- und Hartkäse sind daher häufiger von Bitterkeit betroffen als Hartkäse.

#### Fettgehalt

Käse mit reduziertem Fettgehalt sind besonders anfällig auf Bitterkeit. Fett maskiert Bitterkeit bis zu einem gewissen Grad. Der Grund liegt darin, dass die hydrophoben Bitterpeptide fettlöslich sind. Im Fett gelöste Bitterstoffe können nicht so leicht mit Bitterrezeptoren im Mund in Kontakt treten.

#### Kochsalzgehalt

Das Salzen des Käses nimmt auf zwei ganz unterschiedlichen Ebenen Einfluss auf die Bitterkeit von Käse, nämlich durch

1. Maskierung von Bittergeschmack (Verminderte Wahrnehmung von Bitterstoffen)
2. Beeinflussung der Proteolyse

Die Beeinflussung der Proteolyse durch Kochsalz erfolgt auf vielfältige Weise. Die Veränderungen mit steigendem Salzgehalt:

- Geringere Hydratisierung (Wasserbindung) der Caseine, so dass diese für die Proteasen schlechter angreifbar sind.
- Abnahme der Aktivität der meisten Proteasen (gilt besonders für Chymosin und Pepsin, das Aktivitätsmaximum der Labstoffe liegt bei 2.5-4 % Kochsalz in der wässrigen Phase).
- Verschiebung der proteolytischen Aktivität zugunsten der Peptidasen ab 4 % NaCl in der wässrigen Phase: Zunahme der entbitternden Aminopeptidaseaktivität der Laktokokken).

### 5.2 Milchqualität

Bezüglich der Rohmilchqualität sind v.a. zwei Faktoren wichtig:

- Keimflora
- Eutergesundheit

Stark proteolytische Fremdkeime, zu welchen besonders die Vertreter der psychrotrophen Flora (Pseudomonaden, Bacillus spp., Hefen) gehören, sind bekannte Bildner von Bitterpeptiden, speziell in Milch. Auch Wildstämme fakultativ heterofermentativer Laktobazillen, die im reifenden Käse hohe Keimzahlen erreichen können, sind je nach Stamm in der Lage, die Proteolyse negativ zu beeinflussen.

Mastitismilch weist eine markant höhere Plasminaktivität auf. Das kann so weit gehen, dass die plasminempfindlichen Caseine ( $\alpha_{s2}$ -Cn und  $\beta$ -Cn) in einem entsprechenden Gemelk schon nach 24 h zu einem erheblichen Teil abgebaut sind. In Milch kann dies zu Bitterkeit führen. Ob dies auch für Käse gilt, ist umstritten. Immerhin sind drei Bitterpeptide bekannt, welche durch Plasmin aus  $\alpha_{s2}$ -Casein freigesetzt werden.

#### Als Faustregel gilt:

- Mit steigendem Salzgehalt nimmt die proteolytische Aktivität im Käse ab.
- Der Abbau von Bitterpeptide wird gegenüber der Neubildung begünstigt.
- Steigendes Risiko für Bitterkeit bei Kochsalzgehalten < 5.0% NaCl in der wässrigen Phase.

### 5.3 Technologische Einflussfaktoren

#### Milcherhitzung

Verschiedene Autoren weisen darauf hin, dass Halbhartkäse aus Rohmilch anfälliger ist auf Bitterkeit als entsprechende Käse aus pasteurisierter Milch. Bei Hartkäse ist es gerade umgekehrt. Dies mag verdeutlichen, dass die zur Bildung von Bittergeschmack führenden Vorgänge sehr komplex sind.

Die Erhitzung der Milch führt zur Inaktivierung der Rohmilchflora, erhöht aber die Plasminaktivität. Im Zusammenwirken mit den für Halbhart- bzw. Hartkäse typischen Prozessparametern und Gehaltsmerkmalen wirkt sich dies offensichtlich ganz unterschiedlich auf die Balance zwischen Bitterpeptidbildung und –abbau aus.

#### Labstoffe

Versuche mit sterilem Käse (Säuerung mit Glucono- $\delta$ -lacton) haben gezeigt, dass die Gerinnungsenzyme einen wesentlichen Beitrag zur primären Proteolyse des para-Caseins leisten (Abb 3, Seite 7). Sowohl die tierischen Labstoffe als auch die mikrobiellen Labersatzstoffe können grundsätzlich zur Bildung von Bitterpeptiden beitragen, indem sie solche teilweise selbst freisetzen oder nicht bittere Peptide bilden, die in einem weiteren Proteolyseschnitt zu Bitterpeptiden abgebaut werden. Die Eigenschaften der verschiedenen Labstoffe sind von erheblicher Bedeutung (Tab. 4 und 5a/b).

Tab. 4: Eigenschaften technologisch genutzter Milchgerinnungsenzyme.

Enzyme	Unspezifische Proteolyse	Bevorzugtes Substrat	Thermostabilität
Chymosin	+	$\alpha_{S1}$ -Casein	Mässig
Pepsin	++++	alle Caseine	Mässig
R. miehei-Protease	++	$\alpha_{S1}$ -Cn und $\beta$ -Cn	(Hoch)*
C. parasitica-Protease	++++	$\alpha_{S1}$ -Cn und $\beta$ -Cn	Gering

\* Gilt nur für die native Protease, nicht für die heute erhältlichen kommerziellen Labstoffe aus *R. miehei*.

Tab. 5 a: Eigenschaften technologisch genutzter Milchgerinnungsenzyme [6].  
Im Käsebruch verbleibende Restaktivität der Gerinnungsenzyme  
(in % der Aktivität der geschütteten Labmenge)

Enzyme	pH 5.2	pH 6.0	pH 6.4
Kälberlab	83 %	70 %	47 %
M. pusillus-Protease	11 %	12 %	13 %
R. miehei-Protease	19%	19 %	18 %

Tab. 5 b: Eigenschaften technologisch genutzter Milchgerinnungsenzyme [6].  
Hitzestabilität der Gerinnungsenzyme (Restaktivität nach Erhitzung auf 63.3°C/1 min.)

Enzyme	pH 5.2	pH 5.6	pH 6.0
Kälberlab	10 %	4 %	0 %
M. pusillus-Protease	33%	8 %	0 %
R. miehei-Protease	99%	80 %	60%
C. parasitica-Protease	3%	2 %	1%

Die proteolytische Wirkung der mikrobiellen Labersatzstoffe ist im Allgemeinen weniger spezifisch als jene von Chymosin, weshalb diese immer wieder mit Bittergeschmack in Verbindung gebracht wurden. Dies gilt insbesondere für die Protease von *Cryphonectria parasitica* (z.B. *Suparen*), welche bei Weichkäse und Halbhartkäse bekanntermassen Bittergeschmack verursacht. Die Protease kommt deshalb nur bei der Herstellung von Hartkäse zum Einsatz, wo aufgrund der höheren Brenntemperatur eine weitgehende Inaktivierung des Enzyms erfolgt.

Bezüglich der heute angebotenen Labersatzstoffe aus *Rhizomucor miehei* ist zu betonen, dass diese eine aufgereinigte und chemisch modifizierte Protease enthalten, die bezüglich Spezifität und Thermostabilität dem Chymosin recht nahe kommt.

Für die Bildung von Bitterpeptiden ist neben den proteolytischen Eigenschaften des Labstoffs vor allem dessen Restaktivität im Käse entscheidend. Wie Tabelle 5 zeigt, sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Labstoffen gerade bezüglich der pH-Sensitivität teilweise deutlich verschieden.

**Die Restaktivität des Milchgerinnungsenzyms im Käse ist abhängig von:**

- Labmenge
- Brenntemperatur  
(tiefer bei höherer Temperatur)
- pH-Wert beim Ausziehen  
(höher bei tieferem pH)
- pH-Verlauf im Käse  
(höher bei tiefem pH)

**Labmenge**

Höhere Labmengen erhöhen das Risiko von Bitterkeit. Dies gilt besonders bei niedrig gebrannten Käsesorten, da hier die Gerinnungsenzyme in weit bescheidenerem Umfang inaktiviert werden als bei den hohen Brenntemperaturen der Hartkäse. Je höher die Restaktivität des Labstoffs im Käse, desto stärker die Proteolyse in Breite. Im Falle von Kälberlab findet man dann vermehrt von  $\alpha_{s1}$ -Casein abgeleitete Bitterpeptide.

**Kultur**

Hinsichtlich der Entwicklung von Bittergeschmack kommt den eingesetzten Milchsäurebakterienkulturen ohne Zweifel die grösste Bedeutung zu. Einerseits bilden sie Proteasen, die Bitterpeptide freisetzen können. Andererseits sind sie – zumindest im Pastmilchkäse – die einzige Quelle von potentiell «entbitternden» Peptidasen. Am besten erforscht sind heute die Laktokokken, speziell im Zusammenhang mit Bittergeschmack von Cheddar.

**«Bittere Stämme» von Laktokokken zeigen typischerweise folgende Eigenschaften:**

- schnell säuernd
- schwache oder fehlende Aminopeptidaseaktivität
- schlechte Autolysefähigkeit, d.h. die Zellen setzen die im Zellinnern lokalisierten Exopeptidasen nur langsam frei.

«Entbitternde» Stämme von *Lc. lactis ss. lactis* und *Lc. lactis ss. cremoris* werden heute schon technologisch genutzt, z.B. als Bestandteile mesophiler Kulturen. Auch die Enzympräparate «Accelase®» und «Debitrase®» (Danisco) sind Produkte dieser Forschung. Dabei handelt es sich um Laktokokken-Rohextrakte, die verschiedene Proteasen und Aminopeptidasen enthalten [3].

Die Laktobazillen sind noch weniger gut erforscht. Im Vergleich zu den Laktokokken sind sie allgemein stärker proteolytisch und zeigen eine höhere Peptidaseaktivität als Laktokokken. Dies ist mit ein Grund, weshalb Bitterkeit beim Einsatz von thermophilen Starterkulturen seltener auftritt. Speziell entbitternde Eigenschaften werden *Lb. helveticus* zugeschrieben.

### Brenntemperatur

Auch die Brenntemperatur kann sich auf die Bildung von Bitterpeptiden auswirken. Wilkinson (Zitat [4]) beispielsweise stellte fest, dass unter Einsatz von *Lc lactis ss. cremoris* hergestellte Cheddardkäse bei einer Brenntemperatur von 36°C Bittergeschmack entwickelten, bei 40°C dagegen nicht.

Die Brenntemperatur und Ausrühdauer wirken sich folgendermassen auf die Proteolyse aus:

1. teilweise Inaktivierung der Milchgerinnungsenzyme
2. Abtötung der hitzlabilen Rohmilchflora
3. Selektion der Gärungsorganismen zugunsten hitzeresistenterer Stämme
4. Aktivierung temperenter (lysogener) Phagen, d.h. Induktion einer späteren Zellysis der Milchsäurebakterien

Wie Abb. 6 am Beispiel von Tilsiterkäse zeigt, führt die höhere Brenntemperatur beim Rohmilch-Tilsiter zu einem deutlich schwächeren Abbau des  $\alpha_{s1}$ -Caseins; dies als Folge der stärkeren Inaktivierung der Labenzyme beim Brennen.

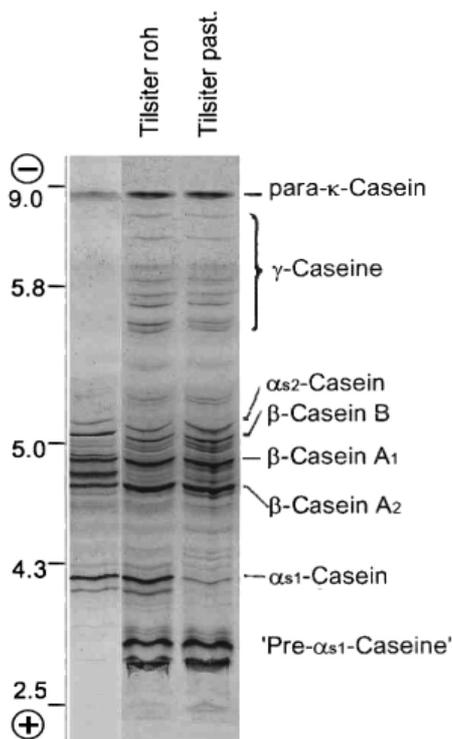


Abb. 6: Elektropherogramm der Milchproteine in Milch und Käse. Bahn 1) labbehandelte Rohmilch, 2) Tilsiter roh, 3) Tilsiter pasteurisiert

### Säuerungsverlauf und pH-Wert im Käse

Der pH-Verlauf während der Fabrikation und Reifung von Käse hat ebenfalls einen grossen Einfluss auf die Proteolyse. Denn sowohl die Aktivität der Enzyme (vgl. Tab. 3) als auch die Spaltbarkeit der Proteine ist pH-abhängig. Die wichtigsten Zusammenhänge:

#### pH-Wert beim Ausziehen

- je tiefer der pH-Wert beim Ausziehen desto mehr Labstoffaktivität geht in den Käseteig über (vgl. Tab. 5).

#### pH-Wert im Käse nach 24 h

tiefer pH-Wert bedeutet:

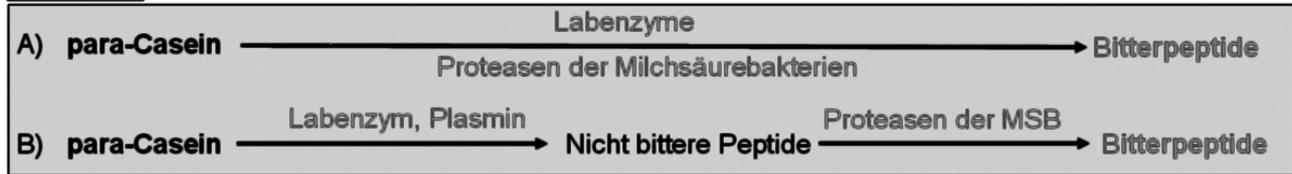
- reduzierte Hydratisierung des Caseins  
→ reduzierte Spaltbarkeit
- erhöhte Aktivität der Proteasen aus den Labstoffen (v.a. bei tierischen Labstoffen) und einiger Proteasen der Milchsäurebakterien (Lactocepine)
- tiefere Plasminaktivität
- reduzierte Aminopeptidaseaktivität
- insgesamt langsamere Proteolyse und verändertes Proteolysegleichgewicht (Bitterkeit geht nicht selten mit einer zu intensiven Säuerung einher).

#### pH-Anstieg während der Reifung

- bessere Hydratisierung der Proteine  
→ erleichterte Spaltung durch Proteasen
- Zunahme der Plasminaktivität (beschleunigter Abbau von  $\alpha_{s2}$ - und  $\beta$ -Casein)
- Rückgang der Aktivität saurer Proteasen (Gerinnungsenzyme und diverse Starterproteasen)
- Steigende Aktivität der Aminopeptidasen.

In Abbildung 7 sind die Vorgänge bei der Bildung und dem Abbau der Bitterpeptide sowie die wichtigsten Einflussfaktoren zusammengefasst:

## Reaktion 1



### Einflussfaktoren

1. **Kultur**
  - proteolytisches System der Milchsäurebakterien
  - Keimzahl
  - Verhältnis von langsam und schnell säuernden Stämmen
  - Schüttmenge
  - Brenntemperatur
  - Phageninfektionen
2. **Lab**
  - Labsorte (Spezifität, Thermolabilität)
  - Restaktivität im Käse
  - Brenntemperatur
  - Labmenge
  - pH-Verlauf
  - Schüttmenge
  - Aktivität der Kultur
3. **Aktivität der Proteasen**
  - Salzgehalt des Käses
  - Wassergehalt des Käses
  - pH-Wert im Käse
  - Lagertemperatur

## Reaktion 2



### Einflussfaktoren

1. **Kultur**
  - proteolytisches System der MSB
2. **Aktivität der Peptidasen**
  - Salzgehalt des Käses
  - pH-Wert im Käse

Abb. 7: Schematische Übersicht über die Bildung und den Abbau von Bitterpeptiden im Käse (mod. nach Stadhouders & Hup, Neth. Milk Dairy J. 29, 335, 1975)

## Sonstige Einflussfaktoren

### Zutaten pflanzlicher Herkunft

Pflanzen enthalten teilweise sehr starke Proteasen. Die Verwendung von Gewürzen und Kräutern als Zutaten von Käse kann daher zu starker Bitterkeit führen. Abhilfe kann die Verwendung der hitzebehandelten Zutaten schaffen.

### Verunreinigungen im Salzbad

Kammerlehner [4] berichtet, dass ein zu hoher Säuregrad der Salzlake zu vermeiden ist und dass stark verunreinigte Salzlake zu «heftiger» Bitterkeit von Käse Anlass geben kann. Dafür verantwortlich sollen stark proteolytisch wirkende Hefen und Pseudomonaden sein.

### Schimmelgereifte Käse

Schimmelpilze sind ebenfalls starke Proteolyten. Bei Weisseschimmelkäse manifestiert sich Bitterkeit meist am stärksten in der Rindezone. Dies kann verhindert werden durch Verwendung von Pilzstämmen mit geringerer Proteaseaktivität sowie durch den Einsatz von *Geotrichum candidum*. Die positive Wirkung von *G. candidum* beruht auf dessen Peptidaseaktivität und der raschen Verwertung des Restzuckers. Letzteres verhindert ein exzessives Wachstum von *P. camemberti*.

## 6 Massnahmen gegen Bittergeschmack

Aufgrund der oben aufgezeigten Zusammenhänge kann auf recht vielen Ebenen auf die Entwicklung von Bittergeschmack im Käse Einfluss genommen werden. Grundvoraussetzung für gezielte Eingriffe ist ein gut standardisierter (kontrollierter) Herstellungsprozess.

Grundsätzlich zielen alle Massnahmen darauf ab, die Proteaseaktivität (primäre Proteolyse) zu hemmen und/oder die Peptidasenaktivität (sekundären Proteolyse) zu fördern.

Eingriffsebene	Massnahme, Effekt	Einfluss auf Bitterpeptide	
		Bildung	Abbau
<b>Milchqualität</b>	nicht zu hohe Zellzahl (Plasminaktivität)	x	
	tiefe Keimzahl	x	(x)
	Lagerung (Zeit, Temperatur)	x	
<b>Einlaben</b>			
Labstoff	hoher Chymosinanteil	x	
Labmenge	reduzieren durch höhere Einlabungstemperatur	x	(x)
	reduzieren durch pH-Senkung mit CO <sub>2</sub> statt Kultur	x	
<b>Kulturen</b>			
Kulturenwahl	nicht zu schnell säuernde Kultur	x	
	Kultur mit mässiger Proteaseaktivität	xx	
	Kultur mit höherer Peptidaseaktivität und guter Autolysefähigkeit		xx
Kulturenmenge	Schüttmenge reduzieren → Limitieren der Keimzahl der MSB	x	x
<b>Wasserzusatz</b>	Wassermenge erhöhen → Höhere pH-Wert 24h → Limitieren der Keimzahl der MSB	x	x
<b>Brennen</b>	Brenntemperatur/-dauer erhöhen	x	x
<b>Ausziehen</b>	bei höherem pH	x	
<b>Salzen</b>	Salzgehalt gegen das obere Limit erhöhen	x	xx
<b>Reifungstemperatur</b>	senken	xx	(x)

Bei Problemen mit Bittergeschmack mögen oben aufgelistete Korrekturmassnahmen (evt. kombiniert angewendet) Abhilfe schaffen. Der Praktiker weiss aber, dass diese Massnahmen auch auf andere Eigenschaften des Käses Einfluss nehmen, die es möglichst nicht zu verändern gilt. Daher sind die Massnahmen mit Bedacht anzuwenden und bezüglich ihrer Auswirkungen sorgfältig zu überwachen. Gegebenfalls empfiehlt sich, die Käsebereitung zu Rate zu ziehen.

## 7 Methoden zur Untersuchung auf Bitterpeptide

Traditionell werden folgende Parameter zur Charakterisierung der Proteolyse gemessen:

- Wasserlöslicher Stickstoff
- pH-4.6 löslicher Stickstoff
- NPN
- Aminosäure-Stickstoff (OPA-Wert)

Diese Werte geben Auskunft über das Verhältnis von primärer zu sekundärer Proteolyse. Ein offensichtliches Ungleichgewicht lässt sich damit erkennen. Darüber hinaus sagen die Stickstofffraktionen aber wenig Konkretes hinsichtlich der Ursachen einer Bitterkeit.

Spezifischere Methoden kommen in der Forschung zum Einsatz. Dazu gehören insbesondere die Flüssigchromatographie und massenspektrometrische Methoden wie z.B. LC-MS. Letztere erlauben eine Quantifikation sowie Identifikation der Peptide, so dass diese bestimmten Abschnitten der Caseine zugeordnet werden können. Für die Routine sind diese Methoden aber zu teuer.

Aufschlussreich wäre auch die Bestimmung verschiedener Peptidasen, um eine Prognose über den Verlauf der Proteolyse machen zu können. Die bekannte Leucinaminopeptidase ist bezüglich der Entwicklung von Bittergeschmack kaum aussagekräftig. Interessanter wäre die Bestimmung der für den Abbau von Bitterpeptiden mitverantwortlichen prolinspezifischen Peptidaseaktivität. Doch werden solche Messungen noch nicht routinemässig angeboten.

## 8 Ausblick

Dank der Techniken der Molekularbiologie und der immer leistungsfähigeren Methoden der Proteinanalytik können Mikroorganismen heute wesentlich besser charakterisiert werden. Bei den Kulturorganismen betrifft dies u.a. auch die Kenntnisse über die gebildeten Proteasen und Peptidasen. Aufgrund dieser Kenntnisse können Stämme mit bestimmten proteolytischen oder anderen Eigenschaften wesentlich einfacher selektioniert werden. Es daher zu erwarten, dass in Zukunft vermehrt Spezialkulturen auf den Markt kommen. Zum Beispiel solche, die entbitternd wirken.

Die Gentechnik wird noch einen Schritt weitergehen und Kulturorganismen genetisch modifizieren, so dass sie z.B. Peptidasen bilden, die im Abbau von Bitterpeptiden besonders effektiv sind. Solche genetisch veränderten Mikroorganismen können auch zur Gewinnung von solchen Enzymen genutzt werden. Wie stark sich solche Produkte dereinst im Markt durchsetzen, wird sich zeigen. ALP und die Sortenorganisationen der Schweiz bekennen sich zur klar zur GVO-freien Käseproduktion.

## 9 Zusammenfassung

Die Proteolyse im Käse ist ein sehr komplexer Vorgang, gekennzeichnet durch das Zusammenspiel von milcheigenden Proteasen, den Gerinnungsenzymen sowie den Proteasen und Peptidasen der Milchsäurebakterien. Dieses Zusammenspiel wird durch die einzelnen Herstellungsschritte wie z.B. Brennen, Salzen ebenso empfindlich beeinflusst wie durch die Art des Labstoff, die Wahl der Kultur und die Qualität der Rohmilch. Bitterer Käse ist die Folge eines gestörten Gleichwichts zwischen der Bildung von Bitterpeptiden im Zuge der Proteolyse in die Breite und dem Abbau dieser Peptide durch Peptidasen der Milchsäurebakterien. Massnahmen zur Bekämpfung von Bitterkeit müssen darauf abzielen, die potentiell entbitternde Peptidaseaktivität zu fördern und die Proteolyse in die Breite zu kontrollieren. Aufgrund der Komplexität der Vorgänge gibt es dafür keine Patentrezepte, aber eine Vielzahl von Eingriffsmöglichkeiten. Diese sind jedoch sorgfältig auszutesten.

## 10 Quellen

1. Anon.: Das schmeckt mir aber. Informationsschrift der Bundesverbandes der Betriebskrankenkassen (Hrsg), BKK Bundesverband, D-45128 Essen. (2005)
2. Fox PF, McSweeney P, Cogan T, Guinee T (Hrsg): Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd Edition. Vol. 1, General Aspects. Elsevier Publishers, London (2004)
3. Habibi-Najafi MB, Lee BH: Bitterness in cheese. A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36 →(5): 397-411 (1996)
4. Kammerlehner J: Käsetechnologie. Verlag Freisinger Künstlerpresse, Freising (D). (2003)
5. Singh TK, Drake MA, Cadwallader KR: Flavor of Cheddar Cheese. A Chemical and Sensory Perspective. Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety. 2, 139-162 (2003)
6. Eck A, Gillis JC (Hrsg): Cheesemaking. From science to quality assurance. 2nd Ed., Intercept Ltd Andover, UK (2000)

Aufgrund der praxisorientierten Behandlung des Themas wurde auf die Nennung der Primärliteratur verzichtet und lediglich auf einige Übersichtsartikel und Standardwerke der milchwissenschaftlichen Literatur verwiesen.