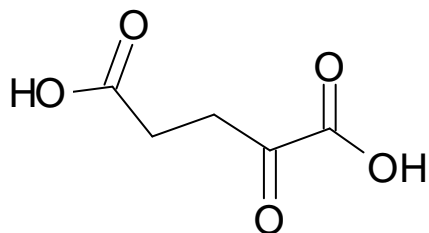
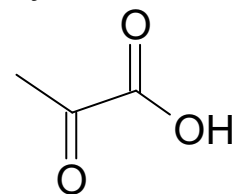


$\alpha$ -Ketoglutar säure

Pyruvat



Ketosäuren und Käsearoma!

## Inhaltsverzeichnis:

|   |    |
|---|----|
| 1. Einleitung   | 3  |
| 2. Literatur  | 3  |
| 3. Material und Methoden                                    | 3  |
| 4. Ergebnisse   | 4  |
| 4.1. Die Zugabe von $\alpha$ -Ketoglutar säure              | 4  |
| 4.1.1. Konzentration von $\alpha$ -Ketoglutar säure in Käse | 4  |
| 4.1.2. Sensorische Untersuchung (Fachpanel, Modellkäserei)  | 4  |
| 4.1.3. Chemische und biochemische Untersuchungen            | 6  |
| 4.1.4. Freie Aminosäuren                                    | 7  |
| 4.1.5. Flüchtige Aroma-Komponenten                          | 10 |
| 4.2. Die Zugabe von Pyruvat                                 | 11 |
| 4.2.1. Sensorische Untersuchung (Fachpanel, Modellkäserei)  | 11 |
| 4.2.2. Chemische und biochemische Untersuchungen            | 12 |
| 4.2.3. Freie Aminosäuren                                    | 13 |
| 4.2.4. Flüchtige Komponenten (GC-MS)                        | 14 |
| 5. Schlussfolgerung   | 15 |
| 6. Dank   | 15 |
| 7. Literatur  | 15 |

## Erstveröffentlichung

### Impressum:

Herausgeber:  
FAM  
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft  
Liebefeld  
CH-3003 Bern  
Telefon +41 (0)31 323 84 18  
Fax +41 (0)31 323 82 27  
<http://www.fam-liebefeld.ch>  
e-mail [info@fam.admin.ch](mailto:info@fam.admin.ch)

### Autoren:

M.-T. Fröhlich-Wyder, M.G. Casey, J.O. Bosset, U. Bütikofer

### Kontaktadresse für Rückfragen:

Dr. Marie-Therese Fröhlich-Wyder  
e-mail [marie-therese.froehlich@fam.admin.ch](mailto:marie-therese.froehlich@fam.admin.ch)  
Telefon +41 (0)31 323 82 23  
Fax +41 (0)31 323 82 27

### Erscheinungsweise:

In unregelmässiger Folge mehrmals jährlich.

### Ausgabe:

Oktober, Nr. 447

ISBN 3-905667-02-9

ISSN 1660-2587

# Ketosäuren und Käsearoma!

M.-T. Fröhlich-Wyder, M.G. Casey, J.O. Bosset, U. Bütikofer  
Eidgenössische Forschungsanstalt  
für Milchwirtschaft (FAM),  
Liebefeld, CH-3003 Bern

## 1. Einleitung

Der Aminosäurekatabolismus, im Speziellen der Transaminierungsprozess, spielt für die Entwicklung des Aromas im Käse eine wesentliche Rolle. Dabei werden die Aminosäuren zu Ketosäuren abgebaut, indem die Aminogruppen auf einen Akzeptor übertragen werden. Ein wichtiger Akzeptor ist die  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure, die Ketosäure von Glutaminsäure. Die hierbei entstehenden Ketosäuren sind Vorläufer verschiedener Aromakomponenten von Käse. Bei diesem Transaminierungsschritt ist somit der Gehalt an  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure der limitierende Faktor für die Aromaentwicklung. Pyruvat, die Ketosäure von Alanin, ist ebenfalls ein Aminogruppenakzeptor. Da Pyruvat im Stoffwechsel der Mikroorganismen gebildet wird und somit zur Verfügung steht, soll seine Rolle im Transaminierungsprozess ebenfalls in Betracht gezogen und untersucht werden.

Die in diesem Bericht dokumentierten Versuche hatten zum Ziel, die Bedeutung der  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure und des Pyruvats für das Aroma von Käse zu bestimmen. Somit wäre deren Freisetzung durch Gärungsorganismen ein mögliches Screeningkriterium bei der Selektion. Diese FAM-Info hat die Absicht, die Ergebnisse aus den in der FAM ausgeführten Versuchen festzuhalten. Ausgewählte Aspekte sollen in der Arbeit von Casey et al. (eingereicht bei Int. Dairy Journal im 2002) veröffentlicht werden.

## 2. Literatur

Die oben erwähnten Publikation enthält eine ausführliche Literaturübersicht.

## 3. Material und Methoden

Auf eine detaillierte Beschreibung der Methoden und des Materials wird verzichtet, da diese in der oben erwähnten Publikation dokumentiert sind. Die Ergebnisse stammen aus einem Versuch mit  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure und weiteren Versuchen mit Pyruvat. Die Versuche wurden im Pilotplant der FAM durchgeführt, wobei für den ersten Modell-Raclette und Modell-Gruyère und für die weiteren nur noch Modell-Gruyère fabriziert wurden. Die verwendeten Konzentrationen von  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure ( $\alpha$ -KGA) richteten sich nach den Angaben von Yvon et al. (1998). Angestrebte Konzentrationen im Käse: 1.2, 2.4 und 3.6 g/kg. Wenn die Ketosäure zur Milch gegeben wird, muss der Verlust mit der Molke berücksichtigt werden. Es wurde angenommen, dass die Konzentration in der wässrigen Phase im Käse konstant bleibt. Als Berechnungsgrundlage galt: ca.  $1/3$  des Käse ist Wasser, d.h.  $c_{\text{Milch}} * 1/3 \approx c_{\text{Käse}}$ . Diese Annahme ergab folgende Zugabemengen von  $\alpha$ -KGA pro Liter Milch: 4, 8 und 12 g/L.

Für die Versuche mit Pyruvat wurde die mittlere Konzentrationsstufe ausgewählt und die entsprechende molare Konzen-

tration für Pyruvat (MG 110.05 g/mol) errechnet. Das angestrebte Ziel war 12.7 mmol/kg Käse (1.4 g), d.h. somit 4.5 g/L Milch.

Folgende Kulturen kamen zur Anwendung: Bei Modell-Raclette Flora Danica (*Lc. lactis* ss. *cremoris*&*lactis*; *Leuc. mesenteroides* ss. *cremoris*, *Lc. Lactis* ss. *diacetylactis*) und bei Modell-Gruyère eine RMK (*Lb. delbrückii* ss. *lactis*; *Str. salivarius* ss. *thermophilus*).

Die Auswertung der Ergebnisse fand mittels Varianzanalyse (ANOVA) bzw. mittels eines t-Testes (gepaart, 2seitig) statt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Zugabe von $\alpha$ -Ketoglutar-säure

Die Gerinnungsdauer wurde durch die  $\alpha$ -KGA stark beeinflusst. Beim Modell-Gruyère führte dies zu längeren Zeiten. Beim Modell-Raclette wurde mit einer erhöhten Labzugabe die Gerinnungsdauer ausgeglichen.

### 4.1.1. Konzentration von $\alpha$ -Ketoglutar-säure in Käse

Die Abbildung 1 zeigt die gemessenen Konzentrationen an  $\alpha$ -KGA nach 1 bzw. 70 Tagen im Käse. Generell wurde weniger  $\alpha$ -KGA im Käseteig zurückbehalten als errechnet. So hätten schon auf der Stufe 2.4 g 14.3 mmol  $\alpha$ -KGA nachgewiesen werden sollen. Im Vergleich zu Modell-Raclette wurde im Modell-Gruyère pro Konzentrationsstufe ca. 5 mmol mehr  $\alpha$ -KGA zurückbehalten. Im weiteren kann der Abbildung 1 entnommen werden, dass  $\alpha$ -KGA während der Reifezeit verbraucht worden ist.

### 4.1.2. Sensorische Untersuchung (Fach-panel, Modellkäserei)

Bei der sensorischen Untersuchung wurden nur die in der Tabelle 1 aufgeführten Merkmale gemäss einem speziellen Formular beurteilt (Skala 1 – 5). Es fällt auf, dass die sensorischen Eigenschaften stark beeinflusst wurden durch die Zugabe von  $\alpha$ -KGA. Eine Zugabe von  $\alpha$ -KGA führte zu höherer Aromaintensität und Beliebtheit (Abb. 2 – 3). Die Merkmale salzig und sauer waren jedoch hauptsächlich Sorten spezifisch.

**Abbildung 1:**  
Konzentration und  
Zugabe an  $\alpha$ -KGA  
in den Modell-Käse  
(• = 1 Tag, X = 10  
Wochen)

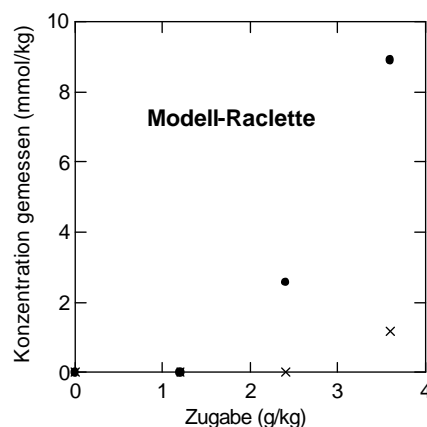
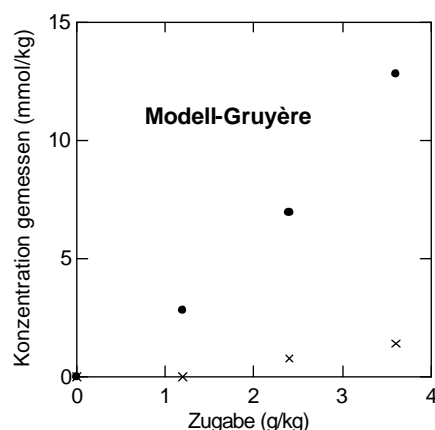


Tabelle 1: Sensorische Untersuchungen nach 6 und 10 Wochen (Fachpanel)

| Skala 1 – 5  | Beliebtheit | Aromaintensität | salzig | sauer | süß |
|--|-------------|-----------------|--------|-------|-----|
| Modell-Raclette                                    | 2.9         | 3.5             | 3.0    | 3.2   | 1.7 |
| Modell-Gruyère                                     | 2.3         | 2.2             | 1.9    | 1.7   | 1.5 |
| <b>Alter</b>                                       |             |                 |        |       |     |
| 6 Wochen   | 2.3         | 2.5             | 2.3    | 2.6   | 1.7 |
| 10 Wochen  | 2.8         | 3.2             | 2.6    | 2.3   | 1.5 |
| <b>Zugabe <math>\alpha</math>-Ketoglutar säure</b> |             |                 |        |       |     |
| 0.0 g/kg   | 2.0         | 2.1             | 2.2    | 2.4   | 1.5 |
| 1.2 g/kg   | 2.8         | 2.8             | 2.3    | 2.2   | 1.8 |
| 2.4 g/kg   | 2.9         | 3.2             | 2.6    | 2.7   | 1.6 |
| 3.6 g/kg   | 2.7         | 3.3             | 2.7    | 2.5   | 1.6 |
| <b>ANOVA</b>                                       |             |                 |        |       |     |
| Sorte  | ***         | ***             | ***    | ***   | ns  |
| Alter  | ***         | **              | ns     | ns    | ns  |
| Zugabe   | ***         | **              | ns     | ns    | ns  |

ns, nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Zwei wichtige Ergebnisse sollen hier erwähnt werden:

- (1) Die beiden Käsesorten verhalten sich nicht gleich. Im Gegensatz zu Modell-Gruyère haben nach 10 Wochen alle Modell-Raclette einen vergleichbaren Reifegrad; die Wirkung der  $\alpha$ -KGA ist nur im jüngeren Stadium sensorisch deutlich wahr-

nehmbar (Abbildung 3).

- (2) Es besteht offensichtlich ein Optimum der Konzentration an  $\alpha$ -KGA; der Zusammenhang zwischen Zugabe und sensorische Eigenschaften ist nicht linear. So führt die höchste Konzentrationsstufe nicht zwangsläufig zum intensivsten Aroma.

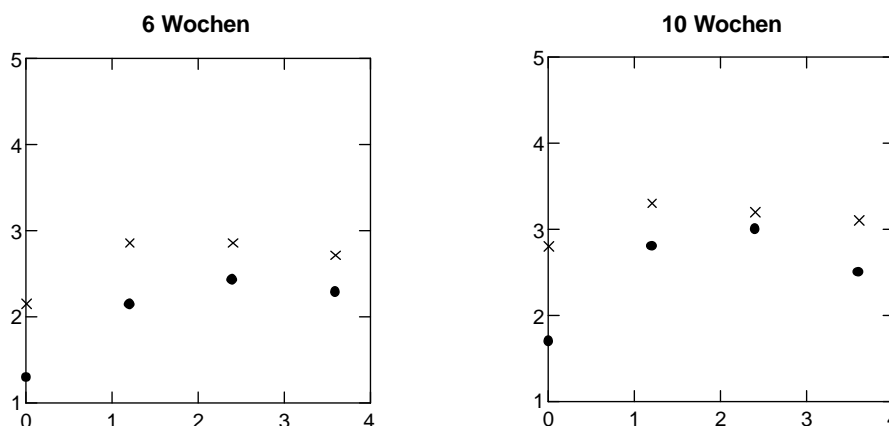
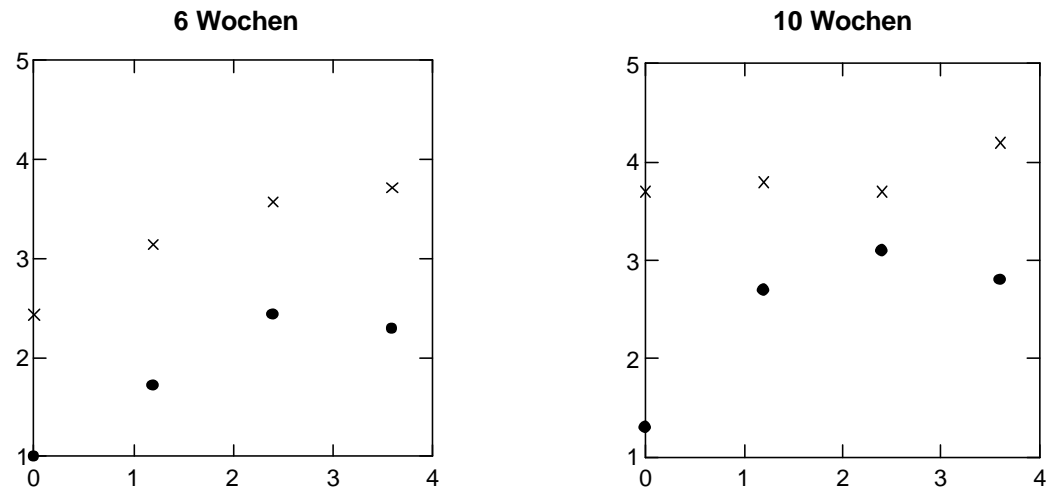


Abbildung 2: Beurteilung der Beliebtheit mit einer Skala von 1 - 5 (x-Achse: Zugabe  $\alpha$ -Ketoglutar säure in g/kg) • = Modell-Gruyère, X = Modell-Raclette

Abbildung 3:  
Beurteilung der  
Aromaintensität mit  
einer Skala von 1 -  
5 (x-Achse: Zugabe  
 $\alpha$ -Ketoglutarate  
in g/kg) • = Modell-  
Gruyère, X = Modell-  
Raclette



#### 4.1.3. Chemische und biochemische Untersuchungen

Es werden nur diejenigen Ergebnisse aufgeführt, die entweder statistisch signifikant und/oder relevant sind (Tabelle 2). Der Gehalt an biogenen Aminen wurde durch die Zugabe von  $\alpha$ -KGA nicht beeinflusst (nicht veröffentlichtes Ergebnis).

Der Wassergehalt, wesentlich beeinflusst durch die Synärese im Käse, steigt mit zunehmender Konzentration der  $\alpha$ -KGA Zugabe, eine Folge der verlängerten Gerinnungszeit und der langsameren Säuerung (Tabelle 2, pH nach 4 Stunden). Dies erklärt auch die Zunahme der anderen in der Tabelle 2 aufgeführten

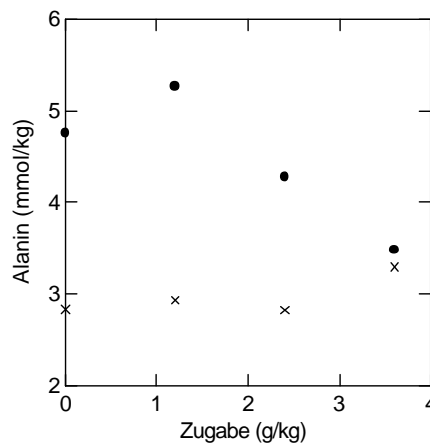
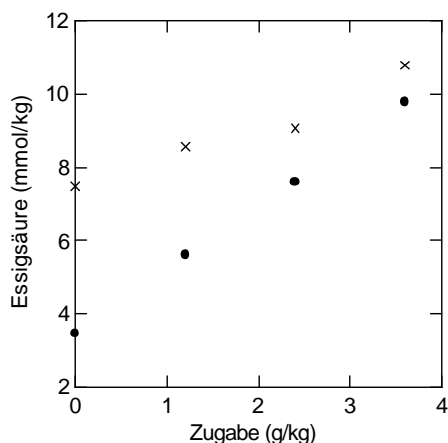
Tabelle 2: Chemische und biochemische Analysen nach 90 Tagen in Modell-Käse (pH nach 4h; FI.FS = flüchtige Fettsäuren, NPN = Nicht Protein-N, WLN = Wasserlöslicher N)

|                                       | Succinat<br>(mmol/kg) | FI. FS<br>(mmol/kg) | Acetat<br>(mmol/kg) | Propionat<br>(mmol/kg) | Wasser<br>(g/kg) | pH<br>4h | NPN<br>(g/kg) | WLN<br>(g/kg) |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------|----------|---------------|---------------|
| Raclette                              | 0.608                 | 12.811              | 8.964               | 0.462                  | 452.63           | 5.59     | 4.67          | 25.54         |
| Gruyère                               | 1.322                 | 8.745               | 6.609               | 0.438                  | 365.00           | 6.10     | 4.48          | 10.90         |
| <b>Zugabe <math>\alpha</math>-KGA</b> |                       |                     |                     |                        |                  |          |               |               |
| 0.0 g/kg                              | 0.730                 | 7.858               | 5.462               | 0.557                  | 393.00           | 5.68     | 4.75          | 12.27         |
| 1.2 g/kg                              | 0.860                 | 9.975               | 7.074               | 0.335                  | 394.25           | 5.82     | 4.88          | 17.31         |
| 2.4 g/kg                              | 1.115                 | 11.155              | 8.330               | 0.445                  | 413.00           | 5.90     | 4.50          | 21.07         |
| 3.6 g/kg                              | 1.155                 | 14.123              | 10.278              | 0.463                  | 435.00           | 6.00     | 4.16          | 22.24         |
| <b>ANOVA</b>                          |                       |                     |                     |                        |                  |          |               |               |
| Sorte                                 | ***                   | **                  | *                   | ns                     | ***              | **       | ns            | **            |
| Zugabe                                | **                    | *                   | ns                  | ns                     | *                | ns       | ns            | ns            |

ns, nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Analyseresultate wie die flüchtigen Säuren und Succinat, sowie auch des WLN. Der NPN wird tendenziell kleiner mit zunehmender  $\alpha$ -KGA Konzentration. Dies kann auf die verlangsamte Säuerung bzw. den dadurch höheren Wassergehalt und tieferen pH nach 1 Tag, zurückgeführt werden. Ein tieferer pH ist nachteilig für die proteolytischen Enzyme. Die Essigsäure nimmt mit steigender  $\alpha$ -KGA Konzentration stetig zu (Abbildung 4). Dieser beinahe lineare Zusammenhang weist auf einen hoch signifikanten Trend hin, der mittels Ancova einen P-Wert von  $> 0.001$  hat. Dieser lineare Zusammenhang ist einmalig. –

Die Essigsäure stammt mehrheitlich aus der heterofermentativen Milchsäuregärung, denn durch die verlangsamte Milchsäuregärung und den erhöhten Wassergehalt bleibt auch mehr Lactose im Käseteig zurück. Der Gehalt an Propionsäure weist auf keine aussergewöhnliche Propionsäuregärung hin. Somit entfällt die Möglichkeit, dass Essigsäure von Propionsäurebakterien zusätzlich gebildet wurde. Essigsäure entsteht aber auch aus dem Katabolismus von Alanin, woraus bei der Transaminierung zuerst Pyruvat entsteht. Beim Gehalt an Alanin ist eine Abnahme um maximal 2 mmol zu beobachten (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Essigsäure und Alanin in Modell-Raclette (x) und -Gruyère (•) (x-Achse: Zugabe  $\alpha$ -Ketoglutaric acid)

#### 4.1.4. Freie Aminosäuren

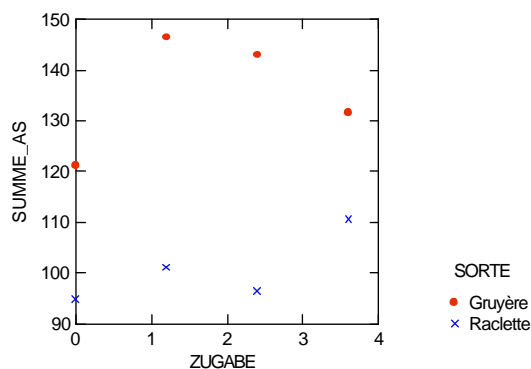
Die freien Aminosäuren sind gesondert dokumentiert, da diese durch die Zugabe von  $\alpha$ -KGA gezielt beeinflusst werden. In der Abbildung 5 sind einige dieser Einflüsse ersichtlich. Zum einen wird der absolute Gehalt an freien Aminosäuren durch die Zugabe von  $\alpha$ -KGA erhöht, bei Modell-Raclette weniger ausgeprägt als bei Modell-Gruyère. Dies könnte aber auch auf den Einfluss des höheren Wassergehaltes zurückgeführt werden. Weiter ist zu beobachten, dass sich Modell-Raclette und -Gruyère nicht gleich verhalten. Bei Modell-Raclette ist kaum eine Veränderung zwischen den Varianten zu beobachten, bei Modell-Gruyère

jedoch erfolgt mit zunehmender  $\alpha$ -KGA-Konzentration eine Abnahme des Gehaltes an freien Aminosäuren. Die beiden Aminosäuren Methionin und Valin veranschaulichen diese Entwicklung (Abbildung 6), die bei anderen hier nicht dargestellten Aminosäuren ebenso zu beobachten ist (Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin). Diese Abnahme deutet auf einen Abbau der Aminosäuren hin, was im Einklang mit dem Verbrauch an  $\alpha$ -KGA steht (Abbildung 1): Wird eine Aminosäure desaminiert, so wird die frei werdende Aminogruppe von einem  $\alpha$ -KGA-Molekül aufgenommen. Es entsteht die Aminosäure Glutaminsäure.

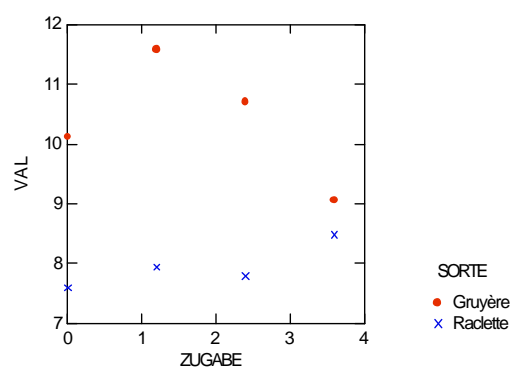
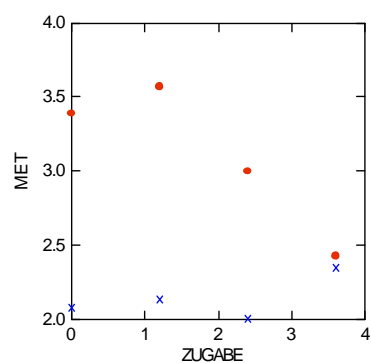
Aus dem Transaminierungsprozess sollte infolgedessen mit zunehmender  $\alpha$ -KGA-Konzentration mehr Glutaminsäure entstehen. Wie aus Abbildung 7 deutlich wird, weisen die Käse mit Zugabe von  $\alpha$ -KGA tatsächlich mehr Glutaminsäure auf als die Käse ohne  $\alpha$ -KGA. Mit zunehmender Konzentration an  $\alpha$ -KGA sinkt

jedoch der Gehalt an Glutaminsäure in Gruyère wieder, was auf die Entstehung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure zurückzuführen ist (Abbildung 7).  $\gamma$ -Aminobuttersäure entsteht aus der Decarboxylierung von Glutaminsäure.

**Abbildung 5:**  
Summe der freien Aminosäuren in mmol/kg in Modell-Käse nach 90 Tagen (x-Achse: Zugabe an  $\alpha$ -KGA in g/kg)



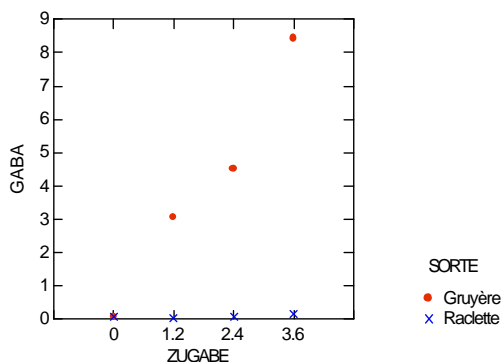
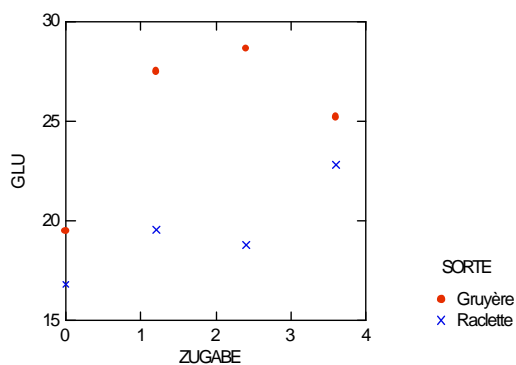
**Abbildung 6:**  
Methionin (Met) und Valin (Val) in mmol/kg in Modell-Käse nach 90 Tagen (x-Achse: Zugabe an  $\alpha$ -KGA in g/kg)





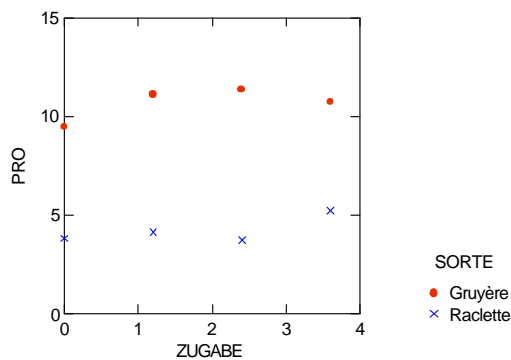
Bei Modell-Raclette verhalten sich die einzelnen Aminosäuren ähnlich ihrer Summe wie in Abbildung 5 dargestellt. Bei dieser Sorte scheint somit ein Mehrangebot an  $\alpha$ -KGA die Freisetzung von Aminosäuren im gleichen Masse zu

erhöhen wie deren Abbau, so dass die Konzentration an Aminosäuren konstant bleibt. Es konnte nämlich ein Verbrauch an  $\alpha$ -KGA beobachtet werden (Abbildung 1).



**Abbildung 7:** Glutaminsäure (Glu) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) in mmol/kg in Modell-Käse nach 90 Tagen (x-Achse: Zugabe an  $\alpha$ -KGA in g/kg)

Prolin ist neben Histidin und Tryptophan die einzige Aminosäure, die in Modell-Gruyère keinen Abbau erfuhr (Abbildung 8). Prolin ist eine Iminosäure, hat keine freie Aminogruppe, und kann somit nicht desaminiert werden. Sie bleibt also von der Transaminierung unangetastet. Die beiden anderen erwähnten Aminosäuren haben ebenfalls einen Fünfer Ring mit einem N, besitzen aber zusätzlich eine freie Aminogruppe. Dieser Sachverhalt unterstützt die Tatsache, dass der beobachtete Abbau von Aminosäuren hauptsächlich auf die Transaminierung zurückzuführen ist.



**Abbildung 8:** Prolin (Pro) in mmol/kg in Modell-Käse nach 90 Tagen (x-Achse: Zugabe an  $\alpha$ -KGA in g/kg)

#### 4.1.5. Flüchtige Aroma-Komponenten

Die Tabelle 3 fasst die Ergebnisse aus der GC/MS-Untersuchung zusammen. Daraus wird ersichtlich, dass die Zugabe von  $\alpha$ -KGA die Freisetzung von flüchtigen Komponenten beeinflusst, und dies bei Raclette und Gruyère nicht gleich.

**Tabelle 3: GC/MS Resultate nach 90 Tagen in Modell-Gruyère (G) und -Raclette (R). Pfeile geben eine Zu- bzw. Abnahme in den Käse mit Zugabe von  $\alpha$ -KGA im Vergleich zu den Käse ohne Zugabe (RT=Retentionszeit in Minuten)**

| Peak | RT    | Name der Sbstanz                          | Möglicher Vorläufer      |
|------|-------|---|--------------------------|
| 1    | R↓    | 5.461 Ethanol                             | Essigsäure, Ethanal      |
| 2    | R↓    | 5.64 Ethanol                              | Essigsäure, Ethanal      |
| 3    | R↑    | 6.273 2-Propanon (Aceton)                 | Alanin, 2-Propanol       |
| 5    | R↓    | 6.763 2-Propanol                          | Alanin, Aceton           |
| 6    | GR↑   | 7.099 Unbekannt                           |                          |
| 7    | G↑    | 7.297 Pentan                              | Fettsäure                |
| 11   |       | 9.716 1-Propanol                          | Propionsäure, Propanal   |
| 12   | R↓    | 11.119 2,3-Butanedion                     | Pyruvat                  |
| 13   | GR↑   | 11.855 2-Butanon                          | 2-Butanol                |
| 14   | GR↑   | 12.492 Unbekannt                          |                          |
| 15   | R↓    | 12.981 Unbekannt                          |                          |
| 16   | G↑    | 14.016 Essigsäure ethyl ester             | Essigsäure, Ethanol      |
| 17   | R↑    | 15.423 Unbekannt                          |                          |
| 19   | G↓    | 17.175 Butanal, 3-methyl-                 | Leucin                   |
| 21   | G↓    | 18.058 Unbekannt                          |                          |
| 22   | G↓    | 18.333 1-Butanol                          | Buttersäure, Butanal     |
| 24   | G↓    | 19.707 2-Pentanon                         | 2-Pentanol               |
| 27   | G↑    | 20.657 Methyl thio acetat                 | Essigsäure               |
| 29   | R↑    | 23.521 1-Butanol, 3-methyl-               | Leucin                   |
| 30   | G↓ R↑ | 23.698 1-Butanol, 2-methyl-               | Isoleucin                |
| 31   | G↑    | 24.241 Disulfide, dimethyl-               | Methionin                |
| 32   | G↓ R↑ | 24.623 2-Pentanone, 3-methyl-             | Isoleucin                |
| 33   |       | 26.081 Toluol                             |                          |
| 35   |       | 27.268 Hexanal                            | Fettsäure                |
| 39   | GR↓   | 32.19 2-Heptanon                          | Fettsäure                |
| 40   | GR↓   | 32.769 2-Heptanol                         | Fettsäure                |
| 41   | R↑    | 35.64 Benzaldehyd / oder $\alpha$ -Pinene | Tryptophan, Phenylalanin |
| 44   | G↓ R↑ | 41.066 2-Nonanon                          | Fettsäure                |

## 4.2. Die Zugabe von Pyruvat

### 4.2.1. Sensorische Untersuchung (Fachpanel, Modellkäserei)

Die Käse wurden gemäss dem Standardprotokoll der FAM beurteilt. Die Käse mit Pyruvat-Zusatz wurden in der Qualität durchwegs besser bewertet als die Käse ohne Pyruvat (Noten in Tabelle 4). Sie wurden vom Fachpanel im Vergleich zu den Referenzen als eher fest und trocken, sowie salzig, würzig und nach Bouillon schmeckend beschrieben. Auch die Aromaintensität und die Beliebtheit fielen signifikant höher aus. Im Fachpanel wurde in einer Diskussion übereinstimmend festgehalten, dass die Käse mit Pyruvat ca. 2 Monate reifer wirkten. Somit entspricht eine um einen Punkt höhere Aromaintensität einem Käse, der um einen Monat reifer ist. Der höheren Aromaintensität ist die Teig-eigenschaft entgegenzuhalten: die Käse

mit Pyruvat waren insgesamt kürzer und trockener. Der Teig schien nicht dieselbe Entwicklung wie das Aroma durchgemacht zu haben. Der erste Eindruck bei der Degustation der Käse ist leicht verwirrend, weil im Gegensatz zum Aroma der Teig einen jüngeren Käse glauben macht. Dieser markante Unterschied zwischen Teig und Aroma ist darauf zurückzuführen, dass der Teig wesentliche Veränderungen durch die Proteolyse erfährt, das Aroma jedoch durch den Aromasäurenkatabolismus. Pyruvat ist als Aminogruppen-Akzeptor am Aminosäuren-Katabolismus beteiligt, nicht aber an der Proteolyse. In einem Versuch wurden 2 Käse auch im Alter von 30 Tagen degustiert. Schon zu diesem frühen Reifestadium wurde eine Aromaintensität des Käses mit Pyruvat (2.75) festgestellt, die um 1.5 Punkte höher war als diejenige der Referenz ohne Pyruvat (1.25).

Tabelle 4: Sensorische Untersuchungen von Modell-Gruyère nach 90 Tagen

|                         | ohne Pyruvat<br>(n=5) | mit Pyruvat<br>(n=5) | t-Test |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|--------|
| Note Äusseres (1 – 6)   | 5.7                   | 5.8                  | ns     |
| Note Lochung (1 – 6)    | 5.4                   | 5.8                  | ns     |
| Note Teig (1 – 6)       | 5.1                   | 5.4                  | ns     |
| Note Aroma (1 – 6)      | 4.3                   | 5.2                  | ***    |
| Gesamt (4 – 24)         | 20.5                  | 22.0                 | ***    |
| Beliebtheit (1 – 6)     | 4.3                   | 5.2                  | ***    |
| Lagerfähigkeit (1 – 3)  | 3.0                   | 3.0                  | –      |
| Loch-Anzahl (0 – 5)     | 0.5                   | 1.7                  | **     |
| Loch-Grösse (1 – 5)     | 1.4                   | 2.9                  | *      |
| Teiglänge (1 – 7)       | 5.4                   | 4.3                  | **     |
| Teigfestigkeit (1 – 7)  | 4.1                   | 3.6                  | ns     |
| Aromaintensität (1 – 7) | 2.8                   | 4.5                  | **     |
| Bitter (0 – 4)          | 0.7                   | 0.4                  | ns     |
| Sauer (0 – 4)           | 0.6                   | 0.7                  | ns     |
| Süss (0 – 4)            | 0.3                   | 0.2                  | ns     |
| Salzig (0 – 4)          | 0.3                   | 0.6                  | **     |

ns, nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

#### 4.2.2. Chemische und biochemische Untersuchungen

Die Säuerung im Käse verlief zwischen den Varianten mit und ohne Zugabe von Pyruvat leicht unterschiedlich. Die Pyruvat-Käse hatten nach 4 h einen um ca. 0.1 – 0.2 Einheiten höheren pH-Wert (Tabelle 5). So war auch der Wassergehalt höher in der Variante mit Pyruvat. Der Stoffwechsel der beteiligten Mikroorganismen, sei es aus der Starter- oder Sekundär-Flora, scheint mit Zugabe von Pyruvat verstärkt abgelaufen zu sein: Proteolyse und flüchtige Säuren weisen höhere Werte auf. Der höhere Gehalt an Essigsäure kann massgeblich auf die Dekarboxylierung von Pyruvat zurückgeführt werden, das im Überangebot

zur Verfügung steht. Ein weiterer Teil könnte aus einer Propionsäuregärung stammen. Der Gehalt an Propionsäure weist nämlich auf eine leicht verstärkte Aktivität der Propionsäurebakterien hin. Der im Vergleich zu den mit  $\alpha$ -KGA hergestellten Käse tiefere Gehalt an Asparagin und Asparaginsäure, sowie der höhere Succinat-Gehalt unterstützen diese Aussage. Der erhöhte Gehalt an Buttersäure bzw. 1-Butanol (Tabelle 7) kann aus dem Katabolismus von Pyruvat entstanden sein.

Die i-Säuren wurden durch die Pyruvat-Zugabe vermehrt freigesetzt. i-Buttersäure ist ein Produkt, das aus Valin entsteht; i-Valeriansäure aus Leucin.

**Tabelle 5: Chemische und biochemische Analysen nach 90 Tagen in Modell-Gruyère (NPN = Nicht Protein-N; WLN = Wasserlöslicher Stickstoff; fak. het. Lb. = fakultativ heterofermentative Laktobazillen)**

| Parameter       | N | Einheit | ohne Pyruvat | mit Pyruvat | t-Test |
|-----------------|---|---------|--------------|-------------|--------|
| Wasser          | 5 | g/kg    | 365.50       | 373.60      | ***    |
| pH 4 h          | 5 |         | 6.02         | 6.15        | ***    |
| pH 24 h         | 5 |         | 5.20         | 5.19        | ns     |
| pH 90 d         | 5 |         | 5.63         | 5.70        | *      |
| Totales N (TN)  | 5 | g/kg    | 43.11        | 42.06       | *      |
| WLN             | 5 | g/kg    | 8.49         | 9.80        | **     |
| NPN             | 5 | g/kg    | 4.23         | 5.28        | *      |
| Fl. Säuren      | 5 | mmol/kg | 7.98         | 12.55       | **     |
| Ameisensäure    | 5 | mmol/kg | 0.86         | 0.60        | ns     |
| Essigsäure      | 5 | mmol/kg | 4.81         | 7.92        | **     |
| Propionsäure    | 5 | mmol/kg | 1.41         | 1.97        | ns     |
| n-Buttersäure   | 5 | mmol/kg | 0.66         | 1.38        | *      |
| i-Buttersäure   | 5 | mmol/kg | 0.05         | 0.21        | *      |
| i-Valeriansäure | 5 | mmol/kg | 0.05         | 0.10        | *      |
| n-Caprinsäure   | 5 | mmol/kg | 0.11         | 0.14        | ns     |
| i-Caprinsäure   | 5 | mmol/kg | 0.04         | 0.23        | *      |
| fak. het. Lb.   | 3 | KBE/g   | 2.5E+07      | 7.5E+06     | ns     |
| Succinat        | 3 | mmol/kg | 1.14         | 1.43        | ns     |
| Pyruvat         | 3 | mmol/kg | 0.11         | 0.07        | ns     |
| Citrat          | 3 | mmol/kg | 6.77         | 5.90        | ns     |

ns, nicht signifikant; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001

#### 4.2.3. Freie Aminosäuren

Die freien Aminosäuren sind in Tabelle 6 als Kennzahlen ausgedrückt. Das Verhältnis zu Prolin wurde gewählt, weil die Iminosäure Prolin nicht desaminieren werden kann. Somit bleibt diese Aminosäure vom Transaminierungsprozess verschont. Da der Einfluss von Pyruvat auf die Transaminierung von Aminosäuren aufgezeigt werden soll, stellt Prolin eine gute Vergleichsbasis dar. Wie Tabelle 6 zeigt, wurden die verschiedensten Aminosäuren im Käse mit Pyruvat-Zusatz stärker abgebaut. Eine detaillierte Diskussion dieser Ergebnisse ist in der eingangs erwähnten Publikation nachzulesen. Trotzdem sollen hier noch einige Erläuterungen gemacht werden. Citrulin und Ornithin sind beide Abbauprodukte der Aminosäure Arginin. Daher

werden diese drei zusammengerechnet.

Die wichtigsten Unterschiede zur Verwendung von  $\alpha$ -KGA als Ketosäure sind im Gehalt an  $\gamma$ -Aminobutyrat zu finden.  $\alpha$ -KGA war indirekt verantwortlich für einen markanten Anstieg der genannten Aminosäure, das aus der Dekarboxylierung von Glutamat stammt. Glutamat wiederum ist das Produkt, das neben der Freisetzung aus Casein auch bei der Transaminierung aus  $\alpha$ -KGA entsteht. Ein Überschuss an Glutamat von der Transaminierung bewirkt offensichtlich, dass diese Aminosäure vermehrt auch dekarboxyliert wird. Bei der Verwendung von Pyruvat jedoch entsteht beim Transaminierungsprozess kein Glutamat, der Gehalt an  $\gamma$ -Aminobutyrat bleibt unverändert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Freie Aminosäuren in Modell-Gruyère nach 90 Tagen (Resultate als Konzentrationsverhältnis Aminosäure:Prolin x 1000)**

| Aminosäure                     | ohne Pyruvat<br>(n=5) | mit Pyruvat<br>(n=5) | t-Test |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|--------|
| Alanin                         | 464                   | 420                  | *      |
| $\alpha$ -Aminobutyrat         | 3                     | 5                    | ns     |
| Arginin + Citrullin + Ornithin | 596                   | 623                  | ns     |
| Asparagin                      | 746                   | 631                  | ***    |
| Aspartat                       | 214                   | 207                  | ns     |
| $\gamma$ -Aminobutyrat         | 3                     | 3                    | ns     |
| Glutamin                       | 385                   | 411                  | **     |
| Glutamat                       | 1905                  | 175                  | **     |
| Glycin                         | 402                   | 371                  | **     |
| Histidin                       | 300                   | 298                  | ns     |
| Isoleucin                      | 442                   | 466                  | *      |
| Leucin                         | 1567                  | 1333                 | ***    |
| Lysin                          | 1482                  | 1343                 | ***    |
| Methionin                      | 350                   | 307                  | ***    |
| Phenylalanin                   | 609                   | 550                  | ***    |
| Serin                          | 297                   | 297                  | ns     |
| Threonin                       | 459                   | 447                  | ns     |
| Tryptophan                     | 40                    | 35                   | *      |
| Tyrosin                        | 284                   | 268                  | **     |
| Valin                          | 1046                  | 964                  | ***    |
| Total Aminosäuren              | 12614                 | 11607                | ***    |

ns, nicht signifikant; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001

#### 4.2.4. Flüchtige Komponenten (GC-MS)

Die Tabelle 7 fasst die Untersuchungen der flüchtigen Komponenten zusammen. Da es sich um relative Ergebnisse handelt (Peakhöhe), wurde auch das

Verhältnis zwischen den Käse mit und ohne Pyruvat-Zusatz angegeben. Dieses zeigt auf, ob eine Komponente eine Zunahme durch die Zugabe von Pyruvat erfuhr oder nicht.

**Tabelle 7: GC/MS Ergebnisse in Modell-Gruyère von 90 Tagen (Angaben als Peakhöhe FID, willkürliche Einheit)**

| Flüchtige Komponente        | Aroma-Eigenschaft (gemäss Literaturangaben)                           | ohne Pyruvat (n=3) | mit Pyruvat (n=3) | Verhältnis mit:ohne | t-Test |
|-----------------------------|---|--------------------|-------------------|---------------------|--------|
| Ethanol                     |   | 22013              | 35615             | 1.62                | ns     |
| Aceton (2-Propanone)        | süsslich, fruchtig  | 14873              | 14187             | 0.95                | ns     |
| 2-Propanol                  |   | 426                | 605               | 1.42                | ns     |
| Pentan                      |   | 944                | 1621              | 1.72                | ns     |
| DMS (Sulfid, dimethyl-)     | schweflig, gekochtes Gemüse, unangenehm                               | 2110               | 2311              | 1.10                | ns     |
| Propanal                    |   | 417                | 779               | 1.87                | ns     |
| 1-Propanol                  | ätherisch   | 673                | 1257              | 1.87                | ns     |
| Diacetyl                    | frische Butter, Rahm, milchig, Karamel                                | 970                | 7436              | 7.67                | ns     |
| 2-Butanon                   | süsslich (Kuchen, Milch), pflanzlich                                  | 2737               | 3209              | 1.17                | ns     |
| C2-ethylester               |   | 352                | 469               | 1.33                | ns     |
| Furanon                     | Karamel, Kaffee (?)   | 184                | 274               | 1.49                | *      |
| Butanal, 3-methyl-          | käsigt, stechend, Buttersäure, ranzig, intensiv                       | 522                | 882               | 1.69                | *      |
| 2-Butanon, 3-methyl-        | Gras, Heu, Schweiss   | 182                | 398               | 2.18                | ns     |
| Butanal, 2-methyl-          | tierisch, Stall, Malz, gekocht, verbrannt                             | 268                | 427               | 1.59                | *      |
| 1-Butanol                   | ?   | 724                | 1919              | 2.65                | ns     |
| 2-Pentanon                  |   | 3091               | 3131              | 1.01                | ns     |
| Acetonitril                 |   | 226                | 221               | 0.98                | ns     |
| 1-Butanol, 3-methyl-        |   | 425                | 459               | 1.08                | ns     |
| 1-Butanol, 2-methyl-        |   | 210                | 224               | 1.07                | ns     |
| DMDS (Disulfide, dimethyl-) | Zwiebel, Lauch, Pilze, erdig, Kartoffel                               | 278                | 2435              | 8.75                | *      |
| 2-Pentanon, 3-methyl-       |   | 404                | 444               | 1.10                | *      |
| Toluol                      |   | 6204               | 5914              | 0.95                | ns     |
| Buttersäure                 | käsigt, Buttersäure, ranzig, Schweiss, Schabziger, tierisch, intensiv | 204                | 323               | 1.58                | ns     |
| 3-Octen                     |   | 1095               | 1050              | 0.96                | ns     |
| Octan                       |   | 388                | 392               | 1.01                | ns     |
| Benzol                      |   | 225                | 227               | 1.01                | ns     |
| 2-Heptanon                  |   | 5028               | 4117              | 0.82                | ns     |
| 2-Nonanon                   | Bouillon, erdig, muffig, holzig                                       | 259                | 379               | 1.46                | ns     |

ns, nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Die Mehrzahl der gebildeten Komponenten blieb unverändert durch die Zugabe von Pyruvat, doch einige erfuhren eine Zunahme. In der letzt genannten Gruppe stammen folgende aus dem Aminosäurenkatabolismus: 3-Methyl-butanal (aus Leucin), 3-Methyl-2-butanon (aus Leucin), 2-Methyl-butanal (aus Isoleucin) und DMS bzw. DMDS (aus Methionin). 1-Butanol und Diacetyl erfuhren ebenso eine starke Zunahme. Es muss angenommen werden, dass diese direkt aus Pyruvat gebildet wurden. Wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist, tragen die meisten dieser Komponenten durch ihre individuelle Aromaisogruppe wesentlich zum Aroma-Bouquet des Käses bei. Tendenziell tragen diese Aromaeigenschaften (wie Zwiebel, Stall, tierisch) zu einem intensiveren Empfinden und höheren Reifegrad bei. Der spezifische Charakter des Käses bleibt jedoch unverändert.

## 5. Schlussfolgerung

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die beiden Ketosäuren  $\alpha$ -KGA und Pyruvat die Eigenschaften – Sensorik und Inhaltsstoffe – von Käse wesentlich zu beeinflussen vermögen. Dieser Einfluss ist generell positiv bewertet. Bei den sensorischen Eigenschaften wird das Aroma intensiver, der Reifegrad höher und die Beliebtheit ebenso. Einzig die Teigigenschaften und Lagerfähigkeit bleiben unbeeinflusst. Im Bereich Inhaltsstoffe sind mehr Stoffwechselprodukte (flüchtige Fettsäuren) und Abbauprodukte von Aminosäuren (Aromakomponenten) nachgewiesen worden. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Ketosäuren ist bei der Bildung von Aroma-Komponenten zu finden. Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Ketoglutarsäure wird Pyruvat selber auch zu Aroma-Komponenten abgebaut, im Speziellen zu Diacetyl. Die Zugabe der reinen Komponenten Pyruvat und  $\alpha$ -KGA ist aus verschiedenen Gründen für die Käseherstellung keine Option (Preis, Zusatzstoff, Natürlichkeit der Produkte). Jedoch der

Einsatz von Zusatzkulturen mit der Fähigkeit, vermehrt Ketosäuren freizusetzen, wäre durchaus eine zweckmässige Möglichkeit. Ketosäuren sind Substanzen, die natürlicherweise im Stoffwechsel von Mikroorganismen gebildet werden. So bilden Propionsäurebakterien relativ viel Pyruvat, das in den Zellen nachgewiesen werden kann. Die stammspezifischen Unterschiede können markant sein (nicht publizierte Ergebnisse). In einem nächsten Schritt werden daher Stämme auf ihre Fähigkeit Pyruvat zu produzieren getestet. Es soll anschliessend untersucht werden, ob unterschiedliche Pyruvat-Produktion einen messbaren Einfluss auf die Käseeigenschaften hat.

## 6. Dank

Diese Arbeit wurde wesentlich von den Diskussionen im Projektteam geprägt. K. Schafroth ist die Produktion der Käse zu verdanken. Dank geht auch an die Gruppen von J. Meyer, M. Dalla Torre und R. Badertscher für die verschiedensten Analysen.

## 7. Literatur

Casey, M.; Bosset, J.O., Bütikofer, U., Fröhlich-Wyder, M.T. (2002): Effect of Pyruvate on the Development of Flavour in Swiss Cheese (eingereicht bei Int. Dairy J)

Yvon M., Berthelot S., Gripon J.C. (1998): Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds, Int.Dairy J.(8) 889-898