ETH zürich

ETH Library

Die Anwendung einer Bacillus subtilis-Protease als Labersatzstoff

Doctoral Thesis

Author(s):
Puhan, Zdenko

Publication date:
1966

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000133455

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. Nr. 3861

Die Anwendung einer Bacillus subtilis-Protease als Labersatzstoff

ABHANDLUNG

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften

der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

ZDENKO PUHAN
dipl. Ing.-Agr. Universität Beograd
geboren am 6. Dezember 1935
jugoslawischer Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. Zollikofer, Referent
Prof. Dr. L. Ettlinger, Korreferent

Juris Druck + Verlag Zürich
1966

Seite Leer /
Blank leaf

Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Seite Leer /
Blank leaf

Die vorliegende Arbeit wurde am Milchtechnischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. E. ZOLLIKOFER

spreche ich meinen aufrichtigen Dank für seine stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung aus.

Seite Leer /
Blank leaf

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 9

II. LITERATURUEBERSICHT 12

1. Die Labersatzstoffe 12

a. Labersatzstoffe von höheren Tieren 12

b. Labersatzstoffe aus höheren Pflanzen 13

c. Labersatzstoffe von Mikroorganismen 15

2. Bisheriger Erfolg mit den Labersatzstoffen in der Praxis 17

a. Die Milchgerinnung mit Labersatzstoffen 18

b. Physikalische Eigenschaften der Gallerte und des Käsekorns 22

c. Reifung und Qualität der hergestellten Käse 23

d. Ausbeute und Fettverlust 27

III. EIGENE VERSUCHE 29

1. Die Herkunft des milchgerinnenden Enzyms 29

a. Wahl des Mikroorganismus 29

b. Optimale Wachstumsbedingungen für die Bacillus subtilis -Protease Bildung 30

2. Die Enzymreinigung 35

3. Eigenschaften der Bacillus subtilis-Protease 47

a. Die Milchgerinnung 47

b. Kinetik der Enzym-Wirkung 54

c. Syneresis (Molkenlässigkeit) 73

d. Wärmeinaktivierung 77

e. Proteolytische Wirkung 79

4. Käseherstellung mit der Bacillus subtilis-Protease 81

a. Hartkäsefabrikation 81

b. Versuche zur Regulierung des Wassergehaltes (Molkengehaltes) im Bacillus subtilis-Protease-Käse 83

c. Beobachtungen an Hartkäsen während der Reifung 88

d. Molkenanalyse 100

e. Weichkäsefabrikation 102

IV. ZUSAMMENFASSUNG 105

V. LITERATURVERZEICHNIS 112

I. EINLEITUNG

Das Kasein ist im polydispersen System Milch kolloidal dispergiert.

Bei der Käsefabrikation wird dieses Phosphoproteid entweder durch Säure beim isoelektrischen Punkt ausgefällt oder durch milchgerinnende Enzyme zur Koagulation gebracht.

Die Hartkäse und die meisten Weichkäse sind das Produkt einer enzymatischen Milchgerinnung. Dazu dient das Chymosin (Lab), das aus dem Labmagen von mit Milch genährten Kälbern stammt.

Die heutige Theorie der Labgerinnung unterteilt den Gerinnungsvorgang in 2 Phasen. Die erste Phase umfasst den Enzymangriff auf das Kasein. Aus der Kasein-Mizelle soll von der Kappa-Kasein-Fraktion ein Glykomakropeptid abgespalten werden. Die Schutzwirkung des Kappa-Kaseins wird aufgehoben. Die anderen Kaseine zeigen dadurch eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft. Unter dem Einfluss des vorhandenen Calciums koaguliert dieser Kasein-Komplex (zweite Phase). Es besteht die Auffassung, dass die Abspaltung des Glykomakropeptids aus dem Kappa-Kasein keine Proteolyse darstellt, sondern als Spaltung einer Art von Ester-Bindung betrachtet werden muss [47] .

Der Jahresbedarf an Labstoff (Labstärke 1:100 000) dürfte in den wichtigsten milchwirtschaftlichen Ländern überschlagsmässig 300 000 kg ausmachen und gegenwärtig einen Wert von ca. 30-40 Millionen Franken repräsentieren.

Das Chymosin als Bestandteil des Labmagens ist nicht identisch mit den übrigen in der Natur vorkommenden proteolytischen Enzymen, die zumeist ebenfalls eine milchgerinnende Wirkung haben.

Da das Chymosin nur in beschränkten Mengen zur Verfügung steht und bei zunehmender Weltproduktion an Käse ein Mangelartikel werden kann, fehlt es nicht an Versuchen, es durch andere Enzyme zu ersetzen.

Wegweisend dürften dafür schon die Hinweise aus dem Altertum sein, wo u.a. Enzyme gewisser Pflanzenextrakte zur Milchgerinnung benützt wurden.

Die Griechen haben z.B. gewusst, dass Säfte von verschiedenen Pflanzen

die Milch zur Gerinnung bringen können. Bei einigen Völkern dürften es sehr oft religiöse Gründe gewesen sein, die sie veranlasst haben, Pflanzenextrakte für die Käseherstellung zu gebrauchen. Bekanntlich ist nach Auffassung der Hindureligion die Kuh ein heiliges Tier, das nicht getötet werden darf. Das Kälberlab wird für die Käseherstellung abgelehnt. Eine ähnliche Situation besteht auch bei den orthodoxen Juden. Die Kälber müssen koscher geschlachtet werden, damit ihr Lab gebraucht werden darf. Es gibt deshalb Koscherkäse, die mit Pflanzenlab hergestellt werden.

Diese Probleme zählen mit bei der Suche nach Labersatzstoffen. Indische Wissenschaftler arbeiten intensiv an der Gewinnung pflanzlicher Labersatzstoffe. In diesem Zusammenhang schrieben SRINIVASAN et al. [61] : "A suitable substitute for calf rennet either from plant or microbial source would render the important dairy product, cheese, acceptable to all without any sentimental reservation in India and thereby the cheese industry would make such headway in this country. There have been earlier attempts in India and in few other countries in this direction."

MAASS [38] begann seine Versuche, weil in den Kriegs- und Nachkriegsjahren ein Mangel an Kälbern die Labherstellung eingeschränkt hat. EMANUILOFF [15] begründet die Intensivierung der Forschung auf dem Gebiete der Labersatzstoffe mit dem zunehmenden Mangel an Kälberlab und der Labpreiserhöhung. Allerdings behaupteten DAVIS und BERRIDGE [10] im Jahre 1940, dass ein Labersatzstoff von Bakterien das 10-fache des üblichen Kälberlabs kosten würde.

Um die Jahrhundertwende findet man die ersten systematischen Versuche über milchgerinnende Enzyme bei GORINI [23] , CONN [6] , LOEB [37] und anderen Forschern. GERBER [21] gelang es, ein solches Enzympräparat aus Ficus carica zu gewinnen. Es wurden in der Folge immer neue milchgerinnende Enzyme gefunden.

Die Bezeichnungen für Enzyme mit milchgerinnender Eigenschaft waren vorerst von verwirrender Vielfalt. GORINI [23] nannte sein Enzym Chymase;

CONN [6] , LOEB [37] und WAHLIN [73] Labferment; MAASS [38] Labaustauschstoff; EMANUILOFF [16] , TSUGO und YAMAUCHI [69] Protease; ROTINI [51] Zymase. Bei der Milchgerinnung mit allen diesen Enzymen handelt es sich vermutlich um einen ähnlichen Vorgang wie bei der Wirkung des Chymosins (Kälbermagenlab).

In der Enzymklassifikation nach DIXON und WEBB [12] ist das Lab unter den Peptidasen eingeordnet, während man es früher als Protease bezeichnet hat [29] . Wir möchten uns an die letztere Einteilung halten und die milchgerinnenden Enzyme als Proteasen bezeichnen, wobei die Quelle, aus welcher das Enzym gewonnen wird, zu erwähnen ist. (z.B. Ficus carica-Protease; Bacillus subtilis-Protease, u.s.w.)

II. LITERATURUEBERSICHT

1. Die Labersatzstoffe

Proteolytische Enzyme sind in der Natur weit verbreitet. Es wurden milchgerinnende Enzyme in den Magenauszügen von Schweinen, Truthahn, Haifisch, ferner in vielen Pflanzen, und schliesslich bei Mikroorganismen gefunden. Natürlich können bei weitem nicht alle als Labersatzstoffe betrachtet werden.

Die bis jetzt mit mehr oder weniger Erfolg angewandten Labersatzstoffe stammen von:

a. Höheren Tieren

b. Höheren Pflanzen

c. Mikroorganismen

a. Labersatzstoffe von höheren Tieren

Das Lab (Chymosin) wird aus den Labmägen der jungen Kälber (nicht älter als 3-4 Wochen) gewonnen. Es ist selbstverständlich, dass man auch Labmägen anderer Wiederkäuer für den gleichen Zweck zu brauchen versucht hat. So berichten RIVAS und LAURIDSEN [49] , dass Ziegenlab für die Einlabung von Ziegenmilch bei der Herstellung italienischer Käsesorten wie Provolone und Pecorino gebraucht werden kann. Für die Herstellung von Fiore Sardo (Schafmilchkäse) hat man mit gutem Erfolgt das Lab von Lämmern verwendet [10] .

Milchgerinnende Enzyme wurden ebenfalls aus anderen Körperteilen isoliert, z.B. aus Herz, Pankreas und aus Magen von Nichtwiederkäuern.

Das am meisten gebrauchte Ersatz-Enzym für das Lab ist in den nichtasiatischen Ländern das Pepsin. Es wird aus Schweinemagen isoliert. Früher bestand die Auffassung, dass Lab und Pepsin identisch seien, wobei die milchgerinnende Aktivität bei pH 6.4 und die proteolytische Aktivität bei pH 2.0 ihr Optimum

haben [10] . In den Vereinigten Staaten ist das Präparat "Metroclot", das auschliesslich aus Pepsin besteht, mit Erfolg in der Cheddar-Fabrikation eingesetzt worden [41] . Die Einlabungstemperatur ist gleich wie beim Lab. Es ist jedoch zu betonen, dass die Milchgerinnungsaktivität des Pepsins im pH-Bereich 6.0 - 6.8 H-Ionen-empfindlicher ist als diejenige des Labes. Bei pH 6.8 hat das Pepsin keine milchgerinnende Wirkung mehr [18] .

Für die Käseherstellung kann Pepsin allein oder im Gemisch mit Lab verwendet werden. Nach Empfehlungen des "Research Committee of the National Cheese Institute USA", soll Pepsin nicht der volle Ersatz für Lab sein. Die Anwendung sollte nur dort erfolgen, wo die hergestellten Käse nicht lange gelagert werden [72] .

Ein weiteres Enzym ist das Trypsin aus dem Pankreas. Trypsin bringt die Milch zum Gerinnen, die Gallerte ist aber weich und ungeeignet für die Verarbeitung. Das Kasein wird vor oder während der Gerinnung abgebaut. Versuche zur Käseherstellung haben zu keinem Erfolg geführt. Die Käse wurden bitter und seifig im Geschmack [72, 74] .

Chymotrypsin besitzt ebenfalls milchgerinnende Eigenschaften. Das pH-Optimum für die Milchgerinnung liegt bei pH 7.0.

Nach den bisherigen Erfahrungen vermochte sich als Labersatz tierischen Ursprungs nur das Pepsin mit einem gewissen Erfolg durchzusetzen.

b. Labersatzstoffe aus höheren Pflanzen

Die gebräuchlichsten Labersatzstoffe in den asiatischen Ländern werden aus höheren Pflanzen gewonnen. Wie PEJIC [43] berichtet, braucht man solche Labersatzstoffe auch in manchen Berggegenden.

Bei pflanzlichen Labersatzstoffen liegt die optimale Gerinnungstemperatur viel höher als beim Lab, z.B. beim Latex von Ficus carica zwischen 50 und 60°C. Sehr interessant ist die Feststellung von KRISHNAMURTI und SUBRAHMANYAN [31] , wonach mit pflanzlichen Labersatzstoffen Kuh- und

Pflanzenmilch (Sojabohnen- und Erdnussmilch) gerinnen kann. Dagegen bringt das Lab (Chymosin) Pflanzenmilch auch dann nicht zur Koagulation, wenn der Calcium-Gehalt demjenigen der Kuhmilch angeglichen wird. DASTUR [8] stellt fest, dass grosse Mengen von pflanzlichen Enzymen nötig sind, um die Milch zum Gerinnen zu bringen. Durch Zugabe von 0,1 % Calcium vervielfacht sich die Wirkung des Enzyms. DASTUR verspricht sich von der kombinierten Verwendung mehrerer pflanzlicher Enzyme für die Käseherstellung grösseren Erfolg.

Tabelle 1 gibt eine Uebersicht über Pflanzen, aus denen die Labersatzstoffe gewonnen wurden:

Tabelle 1

Pflanzen aus denen Labersatzstoffe gewonnen wurden

Name der Pflanze	Enzym gewonnen aus	Literatur
Ficus carica religiosa bengalensis glomerata krishna macrophylla	Latex (Ficin)	[8] [31] [34] [35] [75] [10]
Withania coagulans	Beeren	[8] [9] [10]
Carica papaya	Blätter, Früchte (Papain)	[8] [10]
Solanum elaeagnifolium		[8]
Streblus asper	Blätter	[8] [10] [32] [64]
Cynara cardunculus	Blütenkopf	[10] [51] [74]
Datura stramonium		[43]
Euphorbia lathyris		[10]
Galium mollugo		[43]

c. Labersatzstoffe von Mikroorganismen

Mikroorganismen werden in Zukunft vielleicht die wichtigste Quelle für die Gewinnung von Labersatzstoffen sein. Ihre milchgerinnenden Enzyme sind erst in neuerer Zeit eingehender erfasst worden.

Tabelle 2 zeigt eine Uebersicht derjenigen Mikroorganismen, deren proteolytische Enzyme bis heute als eventuelle Labersatzstoffe in der Literatur beschrieben worden sind:

Tabelle 2

Mikroorganismen, die milchgerinnende Enzyme bilden

Name des Mikroorganismus	Literatur
Bacillus brevis	[72]
cereus	[61] [62]
fusiformis *) (cf.Fusobacterium fusiforme)	[72]
liquefaciens (cf.Achromobacter liquefaciens)	[72]
mesentericus (cf.B.subtilis)	[2] [15] [16] [17]
prodigiosus (cf.Serratia marcescens)	[23] [73]
subtilis	[46] [61] [62] [69] [72]
Bacterium synxanthum (cf.Pseudomonas synxantha)	[66]
Pseudomonas myxogenes	[69] [72]
Serratia marcescens	[72]
Streptomyces griseus	[69] [72]
Aspergillus flavus	[2]
oryzae	[2] [69] [72]
parasiticus	[2]
terricola	[13]
Ascochyta pisi	[1]
Colletotrichum atramentarium	[1]
Mucor Rouxii	[72]
Rhizopus delemar	[1]
niveus	[1]
nodosus	[1]
peka	[1]
pseudochinensis	[1]
Sclerotium oryzae-sativae	[1]

*) Die Mikroorganismen sind mit den gleichen Namen wie in der Literaturangabe aufgeführt. Sie stimmen mit der heutigen Klassifikation nicht mehr in allen Fällen überein. Die von uns in Klammer aufgeführten Bezeichnungen entsprechen den Synonymen nach nach Bergey [3] .

Es ist festzustellen, dass die aeroben Sporenbildner einen wichtigen Platz einnehmen. Auch mit Schimmelpilzen führten besonders japanische [1, 69] und sowjetische [2, 13] Forscher zahlreiche Studien durch.

Die milchgerinnenden Enzyme werden aus dem Nährsubstrat, in welchem der entsprechende Mikroorganismus gewachsen ist, gewonnen. Nach der Feststellung von BARKAN et al. [2] ist das Enzym von Bacillus mesentericus in der Aktivität dem Lab am ähnlichsten. Es sind von EMANUILOFF [15] auch vielversprechende Ergebnisse bei der Anwendung von Bacillus mesentericus-Protease zur Käseherstellung erzielt worden.

2. Bisheriger Erfolg mit den Labersatzstoffen in der Praxis

Bevor die Labersatzstoffe bei der Käseherstellung überhaupt mit Erfolg angewendet werden können, müssen sie einige Bedingungen erfüllen. TSUGO und YAMAUCHI [70] stellen folgende Anforderungen an ein "milchgerinnendes Enzym, das nicht Lab ist":

1. Die Ausbeute an Käsemasse soll nicht kleiner sein als bei Anwendung von Lab;
2. Das Käsegel (Käsebruch) soll die gleichen physikalischen Eigenschaften besitzen;
3. Der Fettverlust soll niedrig sein;
4. Aromaunterschiede dürfen nicht auftreten.

VERINGA [72] ist ebenfalls der Meinung, dass der Käsebruch, gewonnen mit einem Labersatzstoff, vergleichbare physikalische Eigenschaften mit dem durch Lab hergestellten Gel aufweisen soll.

Unser nachstehendes Literaturstudium berücksichtigte deshalb vor allem folgende Punkte:

a. Die Milchgerinnung mit Labersatzstoffen
b. Physikalische Eigenschaften der Gallerte und des Käsekorns
c. Reifung und Qualität der hergestellten Käse
d. Ausbeute und Fettverlust

a. Die Milchgerinnung mit Labersatzstoffen

Da die milchgerinnenden Enzyme Proteolyten sind, ist es sehr wichtig, das Mass ihrer proteolytischen Wirkung zu kennen. Dieses hat einen entscheidenden Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Gallerte. Bei starker Proteolyse wird das Kasein rasch abgebaut. Es entsteht eine zu weiche Gallerte, die sich noch weitgehender auflösen kann [72] .

TSUGO und YAMAUCHI [70] haben die proteolytische Wirkung mehrerer milchgerinnender Enzyme bei 35°C geprüft. Sie bestimmten den Anteil geronnenen Eiweisses in der Molke nach der Milchgerinnung, und zwar 15 und 120 Min. nach Zugabe des Enzyms. Die Gerinnungszeit war bei allen Versuchen ungefähr gleich lang. Als Substrat diente rohe Magermilch mit einem pH-Wert von 6.7. Die Resultate sind in Tabelle 3 festgehalten.

Lab und Pepsin haben bei pH 6.7 annähernd die gleiche proteolytische Wirkung. Bacillus subtilis-Protease und Chymotrypsin zeigen eine starke Proteolyse, die sich nicht nur auf die Milchgerinnung beschränkt, sondern auch nach der Gerinnung intensiv weitergeht. Die gleiche Feststellung bezüglich Pepsin machten auch MELACHOURIS und TUCKEY [41] . Sie bewiesen, dass Pepsin im pH-Bereich 6,5-5,3 eine schwächere proteolytische Wirkung als das Lab aufweist. Allerdings waren ihre Untersuchungen nicht auf den Zeitpunkt von 120 Minuten nach der Enzymzugabe begrenzt, sondern erstreckten sich über 30 Tage.

Tabelle 3

Proteolytische Wirkung einiger milchgerinnender Enzyme [70]

Enzym	Gerinnungszeit in Minuten	Anteil geronnenen Eiweisses in % des Gesamt-Eiweisses	
		nach 15 Min.	nach 120 Min.
Lab	7,7	69,8	69,7
Pepsin	7,0	69,8	69,8
Chymotrypsin	7,0	54,7	32,8
Ficin	7,5	66,6	64,3
Aspergillus-Protease	7,3	60,6	41,0
Streptomyces-Protease	8,0	62,9	44,7
B.subtilis-Protease	8,0	62,9	44,7
Ps.myxogenes-Protease	8,0	67,1	62,2

Stickstoff-Gehalt der Magermilch = 4,64 mg/ml

DYACHENKO und SLAVYANOVA [13] bestimmten die milchgerinnende und proteolytische Aktivität eines Enzympräparates von Aspergillus terricola. Sie konnten keine Gesetzesmässigkeit in der Beziehung Milchgerinnung : Proteolyse feststellen und kamen zum Schluss, dass nicht das gleiche Enzym für die Milchgerinnung und die Proteolyse verantwortlich sei.

Beachtenswert sind die Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen an Milch, die mit verschiedenen Enzymen geronnen wurde [70] . Mit zunehmender Proteolyse ändert sich das elektrophoretische Bild. Lab und Pepsin verändern nur leicht den α-Kasein-Komplex. Andere Enzyme verursachen eine deutliche Veränderung des α-Kasein-Komplexes und des β-Kaseins. Pseudomonas-Protease weist eine spezifische destruktive Wirkung auf das β-Kasein auf, während der α-Kasein-Komplex nur leicht verändert wird.

Die Temperatur spielt für die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen eine wichtige Rolle. Der Bereich ist aber durch die Temperaturempfind-

lichkeit der Enzyme begrenzt. Manche Enzyme werden schon bei 45-50°C irreversibel geschädigt.

Bei der Käseherstellung ist es in der Regel erwünscht, die Milch zwischen 25° und 45°C gerinnen zu lassen [72] . Die Labersatzstoffe weisen im allgemeinen eine höhere Optimumstemperatur als das Lab auf.

Tabelle 4 gibt die optimale Temperatur verschiedener Enzyme für die Milchgerinnung an.

Tabelle 4

Temperatur-Optima einiger milchgerinnender Enzyme

Enzym	opt.Temp.	Literatur
Pepsin	43°C 37°C	VERINGA [72] TSUGO et al. [69]
Chymotrypsin	53°C	TSUGO et al. [69]
Ficin	76°C 70°C 67°C	VERINGA [72] TSUGO et al. [69] ROTINI [51]
Asp.oryzae - Protease	68°C 60°C	ROTINI [51] TSUGO et al. [69]
Str.griseus - Protease	70°C	TSUGO et al. [69]
B.subtilis - Protease	70°C	TSUGO et al. [69]
B.mesentericus - Protease	65°C	EMANUILOFF [17]
Ps.myxogenes - Protease	70°C	TSUGO et al. [69]
Lab (als Vergleich)	40-42°C	JENNESS et al. [27]

Wie aus der Literatur festzustellen war, hat sich EMANUILOFF [17] am intensivsten mit dem Problem der Temperaturabhängigkeit der Gerinnung befasst.

Entscheidend für den Ablauf einer enzymatischen Reaktion ist auch die Konzentration der H-Ionen. Bei der Milchgerinnung beeinflusst das pH nicht nur die Wirkung der milchgerinnenden Enzyme, sondern auch die Stabilität des

Substrates Kasein. [27] .

Mit dem Sinken des pH-Wertes steigt die Menge der Calcium-Ionen. Die Stabilität des Kaseins ist dadurch gefährdet.

Das Problem des pH-Optimums für die einzelnen milchgerinnenden Enzyme ist nicht eingehend studiert worden. Nach Arbeiten von EMANUILOFF [17] , ROTINI [51] und DAVIS [10] sind die pH-Optima für Pepsin 6.4, Ficin 6.5, Asp.-Protease 5.7 und B.mesentericus-Protease 6.5. Auch hier stammen die eingehendsten Untersuchungen von EMANUILOFF [17] . TSUGO und YAMAUCHI [69] , die diese Fragen ebenfalls bearbeitet haben, geben keine Zahlen an, stellen jedoch fest, dass Pepsin am stärksten, Lab weniger, Chymotrypsin und die mikrobiellen Enzyme am wenigsten bei der Gerinnung der Milch durch das pH beeinflusst werden.

Ueber den Einfluss des Calciums auf die Milchgerinnung informiert die Literatur im Zusammenhang mit Labersatzstoffen noch mangelhaft. TSUGO und YAMAUCHI [69] stellen fest, dass die Gerinnungszeit durch Zugabe von Calciumchlorid herabgesetzt wird. Den grössten Einfluss merkten sie bei Pepsin und Ficin, den kleinsten bei den mikrobiellen Proteasen.

Als Grundregel bei der Milchgerinnung mit Lab (Chymosin) gilt das Storch-Segelcke'sche Gesetz [48] :

$$E \cdot t = \text{konstant}$$

E = Enzymkonzentration; t = Gerinnungszeit

VERINGA [72]bemerkt in seiner Literaturzusammenfassung, dass diese Regel auch bei der Anwendung der Labersatzstoffe Geltung haben soll. Hier stimmen die Angaben der einzelnen Forscher nicht überein. SRINIVASAN et al. [63] haben eine grössere Anzahl von Bakterien und Schimmelpilzen (ohne Angaben welche) auf ihre milchgerinnenden Enzyme geprüft. Sie behaupten, dass in allen Fällen (ausser wenn die Enzymlösung mehr als 5-fach verdünnt wurde) die Gerinnungszeit umgekehrt proportional zu der Enzymaktivität war. Sie verwendeten pasteurisierte Milch. Die angewendeten Gerinnungszeiten sollen stets

kurz gewesen sein. Demgegenüber haben TSUGO und YAMAUCHI [69] beobachtet, dass nur bei Lab und bei der Pseudomonas-Protease E.t = konstant ist. Bei anderen Enzymen wie Pepsin, Chymotrypsin, Ficin, Aspergillus-, Streptomyces- und Bacillus-Protease traf dies in ihren Versuchen nicht zu. Es zeigten sich beträchtliche Abweichungen. Für alle diese Versuche wurde rohe Milch verwendet.

b. Physikalische Eigenschaften der Gallerte und des Käsekorns

Nach der Gerinnung der Milch liegt eine Gallerte vor. Der weitere Arbeitsgang in der Käseherstellung wird so geleitet, dass je nach Art des Käses aus dem Käsebruch mehr oder weniger Molke austritt. Während der Bearbeitung der Gallerte muss eine bestimmte Festigkeit und Elastizität vorhanden sein. Eine weiche und zarte Gallerte zerfällt durch die mechanischen Eingriffe. Es bildet sich viel Käsestaub.

Die Labersatzstoffe ergeben nach DAVIS [10] fast immer eine zarte Gallerte mit physikalischen Eigenschaften, die denjenigen der Labgallerte nicht gleich sind. Diese Beobachtungen bestätigen auch SCHWARZ und MUMM [56], die bei der Herstellung von Tilsiterkäse mit einem bakteriellem Enzympräparat eine Gallerte erhalten haben, die nicht so elastisch wie die Labgallerte und etwas bröckelig war. Bei deren Weiterverarbeitung bildete sich trotz aller Vorsicht ein zu feiner Bruch. ARIMA und IWASAKI [1] haben dagegen mit milchgerinnenden Enzymen von Rhizopus-Arten einen Bruch von befriedigender Konsistenz erhalten. EMANUILOFF [15] erreichte mit Bacillus mesentericus-Protease eine Gallerte von festerer Konsistenz als mit Lab.

Die mit Labersatzstoff hergestellte Gallerte weist im Vergleich zur Labgallerte eine schwächere Syneresis auf. Das Käsekorn bleibt feuchter und ist weniger elastisch. Nach SCHWARZ und MUMM [56] gab ein Gemisch von Lab + Labersatzstoff ein Käsekorn, das am Ende der Fabrikation im Griff dem Labkorn entsprach.

Genau erfasste Daten über den unterschiedlichen Verlauf der Syneresis fehlen in der Literatur. Als einziges Beispiel dient nur der Trockenmassegehalt von zwei 17-wöchigen Tilsitern [56] . Der Labkäse hatte 49,57 %, der Labersatzstoffkäse 53,0 % Wasser.

c. Reifung und Qualität der hergestellten Käse

Während der Reifung eines Käses, (u.a. enzymatischer Abbau von Kasein) wird die Käsemasse in einen geschmeidigen, für jede Käsesorte typischen Zustand übergeführt. Die Teigbeschaffenheit und der Geschmack sind weitgehend von der Intensität des Eiweissabbaus abhängig und für jede Käsesorte charakteristisch.

Für den Kaseinabbau sind proteolytische Enzyme verschiedener Herkunft verantwortlich: 1. Enzyme von in der Rohmilch vorkommenden Mikroorganismen; 2. Enzyme der zugesetzten Milchsäurebakterienkulturen; 3. Die milchgerinnenden Enzyme.

Wenige Sorten von Käse sind bisher versuchsweise mit Labersatzstoffen hergestellt worden. Hauptsächlich waren es Schnittkäse wie Tilsiter [56] , Cheddar [31, 40, 41, 60, 62, 76] , Holländerkäse [2, 39] , Brinza [14, 15] , Kachkaval [14] und Weichkäsesorten wie Limburger [38] und Camembert [4] . Ausser bei Kachkaval und Brinza (aus Schafmilch) brauchte man zur Herstellung der Käse Kuhmilch.

Als Vergleich bei der Beurteilung von mit Labersatzstoff hergestelltem Käse dienten stets die entsprechenden mit Lab (Chymosin) fabrizierten Produkte. Es wurden beträchtliche Unterschiede im Eiweissabbau und in der Qualität der Käse festgestellt.

Amerikanische Autoren [40, 41] berichten über den Verlauf der Reifung von Cheddar-Käse, hergestellt mit Pepsin. MELACHOURIS und TUCKEY [41] fabrizierten mehrere Paare Cheddarkäse (mit Lab und Pepsin). Die Käse wurden auf den Gehalt an eiweissfreiem N und Amino-N untersucht, sowie organoleptisch beurteilt. Der Gehalt an eiweissfreiem N war beim Labkäse et-

was höher. Bei den freien Aminosäuren konnte ausser in der Konzentration kein Unterschied festgestellt werden. In Zahl und Art waren es nach 130 Tagen Reifezeit die gleichen. Die organoleptische Beurteilung der Käse ergab weder im Teig noch im Aroma deutliche Unterschiede zwischen den beiden Käsen. Der Pepsinkäse blieb im Teig während der Reifung längere Zeit körnig, der Geschmack war rein, aber im Vergleich zum Labkäse etwas milder. Bitterer Geschmack konnte bei keinem der Käse festgestellt werden. Die Autoren kamen zur Ueberzeugung, dass Pepsin in der Cheddarfabrikation mit Erfolg angewendet werden kann. Die Reifung nimmt aber eher einen langsameren Verlauf als beim Labkäse.

Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen von MARAGOUDAKIS et al. [40] überein. Sie stellten fest, dass der Labkäse nach 30, 60 und 90 Tagen einen typischeren Teig und ein kräftigeres Aroma hat, und im allgemeinen besser beurteilt werden konnte als der Pepsinkäse. Nach 150 Tagen hatte aber der Pepsinkäse ein gutes Aroma.

Mit den pflanzlichen Labersatzstoffen hatte man bisher weniger Glück. Bei fast allen Versuchen trat ein mehr oder weniger ausgeprägter bitterer Geschmack und ein weicher, manchmal sogar pappiger Teig auf. Die milchgerinnenden Enzyme von Pflanzen besitzen eine starke proteolytische Wirkung; der Kaseinabbau geht weiter als beim Lab. Es werden Polypeptide gebildet, von denen einige für den bitteren Geschmack verantwortlich sind. Auch die unerwünschten Teigeigenschaften sind auf die tiefgreifende Proteolyse zurückzuführen.

WINDLAN und KOSIKOWSKY [76] prüften neben anderen Labersatzstoffen auch die Eignung von Papain für die Cheddarfabrikation. Das Ergebnis befriedigte nicht. Die Käse waren ungeniessbar bitter.

Ficin, das meistgebrauchte Pflanzenenzym, wurde von KRISHNAMURTI und SUBRAHMANYAN [33] für die Cheddarfabrikation gebraucht. Nach 8-monatiger Reifung hatte der Käse eine gute Qualität. Die gleichen Autoren führten auch mit Blätterauszügen von Streblus asper Versuche durch. Diese Cheddarkäse wiesen eine geringere Haltbarkeit als die Kontrollkäse auf.

KOTHAVALLA und KHUBCHANDANI [72] bereiteten Cheddarkäse mit Auszügen aus den Beeren von Withania coagulans. Nach 3-monatiger Reifung zeigte der Teig zwar eine Abweichung von den Labkäsen, der Geschmack und das Aroma waren aber normal. Mit dem gleichen Enzym stellte auch DASTUR [9] Hartkäse her. Die Ergebnisse waren nicht befriedigend. Die Käse wurden leicht bitter.

Die Versuche von CHRISTEN und VIRASORO [4] sind deswegen interessant, weil erstmals Camembert, also ein Weichkäse, auf diese Art hergestellt wurde. Ein leicht bitterer Geschmack war am Anfang feststellbar, der aber nach vollendeter Reifung verschwand. Die Autoren sind mit ihren Ergebnissen zufrieden. Die Qualität der Käse war in jeder Beziehung gut.

Mehrere Forscher befassten sich mit der Verwendung bakterieller Proteasen. EMANUILOFF [14,15] isolierte das milchgerinnende Enzym von Bacillus mesentericus. Er stellte in seinen Versuchen [15] einen weissen Schafmilchkäse her. Zur Klärung der Frage, ob die bakterielle Protease für eine Anwendung in der Praxis geeignet sei, wurden die freien Aminosäuren während der Reifung erfasst. Die papierchromatographischen Bestimmungen ergaben folgendes Resultat:

Die Zahl der freien Aminosäuren im frischen Käse ab der Presse beträgt bei Bacillus mesentericus-Käse 8, beim Labkäse 5. Der Autor schliesst daraus, dass die bakterielle Protease schon während der Gerinnung eine tiefgreifende Proteolyse des Milcheiweisses verursacht. Nach 6 Tagen erhöht sich die Zahl der freien Aminosäuren in beiden Käsen. Während der weiteren Reifung schwankte die Zahl der freien Aminosäuren. Nach 25 Tagen wies der Bacillus mesentericus-Käse 12, der Labkäse 9 freie Aminosäuren auf.

In einer früheren Arbeit [14] berichtete EMANUILOFF über die Herstellung von Brinza und Kachkavalkäse mit bakterieller Protease. Die Ergebnisse führten den Autor zur Feststellung, dass die bakteriellen Proteasen das Lab in der Käseherstellung ersetzen können.

Eingehende Versuche wurden auch von SCHWARZ und MUMM [56] durchgeführt. Die Autoren stellten Tilsiterkäse mit dem von MAASS entwickelten

bakteriellen Labersatzstoff "Azolon M" her. Nach einer Lagerungszeit von 17 Wochen war der Trockenmassegehalt des Labkäses um 3,43 % höher als derjenige des Labersatzstoffkäses. Ein unterschiedlicher Wassergehalt war schon beim Abfüllen der Käse deutlich erkennbar. Der Bruch mit Labersatzstoff war feucht und weich. Der Gehalt an wasserlöslichem N, phosphorwolframsäurefällbarem N und Ammoniak-N zeigte höhere Werte beim Labersatzstoffkäse.

In einem gewissen Widerspruch zu diesem Befund stehen die Ergebnisse eines zweiten Versuches der gleichen Autoren. Ein Vergleich von Käsen mit Lab, Lab + Labersatzstoff und Labersatzstoff ergab nach 12-wöchiger Reifung einen Trockenmassegehalt, der in allen 3 Fällen fast gleich hoch war. Der Gehalt an wasserlöslichem N zeigte auch keine deutlichen Unterschiede.

Demgegenüber fiel die organoleptische Beurteilung eindeutig nachteilig für den Labersatzstoff aus. Nach 7-wöchiger Reifung hatte der Labersatzstoffkäse einen leicht bitteren Geschmack und der Teig war leicht kreidig und bröckelig. Nach 17-wöchiger Lagerung ging die Qualität der Käse noch stärker zurück. Der Geschmack war stark bitter, der Teig ausgesprochen kreidig. Der zweite Versuch bestätigte den ersten bezüglich organoleptischen Eigenschaften. Der Käse, hergestellt mit einem Gemisch von Lab + Labersatzstoff, stand qualitätsmässig zwischen Labkäse und Labersatzstoffkäse.

MAASS [39] versuchte mit seinem Präparat "Azolon M" Gouda-Käse herzustellen. Nach 5-wöchiger Reifung konnte kein bitterer Geschmack festgestellt werden. Sehr gute Erfolge hatte der Autor auch bei der Herstellung von Limburgerkäse [38] .

Eine der neuesten Versuche stammt von BARKAN et al. [2]. Holländerkäse wurden mit milchgerinnendem Enzym von Bacillus mesentericus gemacht. Auch hier wurde nach 3-monatiger Reifung ein schneller Eiweissabbau, d.h. ein 50-100 % höherer Gehalt an wasserlöslichem N gegenüber dem Labkäse festgestellt. In diesem Versuch zeigte sich wiederum ein bitterer Geschmack bei den B.mesentericus-Käsen.

SREENIVASAN et al. [60, 62] fabrizierten Cheddarkäse, wobei die