

Strukturbildung und -regenerierung in fermentierten Milchprodukten durch Laccasen aus Speisepilzen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger
Forschungsstelle II:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Milchwissenschaft und -technologie Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin Projektkoordinatorin: Dr. Regina Schuster Karwendel-Werke Huber GmbH & Co. KG, Buchloe
Laufzeit:	2012- 2015
Zuwendungssumme:	€ 363.100,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

In Produktionsprozessen fermentierter Milchprodukte, wie Rührjoghurt oder Frischkäse, wird in großen Fermentationstanks (20 bis 50 m³) zunächst in Ruhe ein Gel ausgebildet. Um die Fermentation zu stoppen, wird das Gel leicht aufgerührt und mittels schonend fördernder Pumpen über Wärmetauscher gekühlt. Die fermentierte Milch (= Mikrogelesuspension) wird im Fall von Rührjoghurt häufig bei ca. 20 °C und von Frischkäse bei <10 °C in einem Puffertank zwischengestapelt. Hier wäre eine enzymatische Nachbehandlung einfach zu integrieren. Anschließend wird das Produkt mit Pumpen abgezogen, ggf. mit Zutaten vermischt, dem Füller mit den Dosierstationen zugeführt und verpackt. In den verschiedenen Prozessstufen erfolgt auf Grund der mechanischen Belastung der empfindlichen Mikrogelepartikel ein Strukturabbau. Dieser wird in der Praxis aktuell entweder durch einen erhöhten Rohstoffeinsatz (0,1–0,4 % Protein) oder durch Zusatz von Verdickungsmitteln kompensiert. Der Ansatz, Laccasen zur Strukturregenerierung („Rebodying“), also zum Vernetzen und Stabilisieren der Mikrogelepartikel im bereits fermentierten Milchprodukt, zu nutzen, wurde bisher

nicht verfolgt. Könnten auf biokatalytischem Wege verarbeitungsbedingte Strukturverluste in fermentierten Milchprodukten kompensiert werden, ließe sich einerseits der Rohstoffeinsatz optimieren und andererseits könnte auf stabilisierende Zusätze verzichtet werden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, Laccasen aus Speisepilzen als strukturbildende bzw. als strukturregenerierende Enzyme für den Einsatz in fermentierten Milchprodukten verfügbar zu machen. Dazu sollte das Anforderungsprofil an die Laccasen durch proteinanalytische, technologische, rheologische und sensorische Untersuchungen in Hinblick auf die Anwendung in fermentierten Milchprodukten erforscht werden.

Forschungsergebnis:

In Forschungsstelle 1 wurden neben dem kommerziellen Referenz-Laccasepräparat aus *Trametes versicolor* (Lcc C) gereinigte Laccasen aus anderen Basidiomyceten-Stämmen (*Funalia troglia*, *Trametes versicolor* und *Meripilus giganteus*) nach Einrühren in kommerziellen Magermilchjoghurts hinsichtlich der erwünschten Strukturmodifikation gescreent. Die viskoelasti-

schen Parameter (komplexe Viskosität η^* , Speichermodul G' und Verlustmodul G'') wurden erhöht. Durch Zusatz von Food-Grade-Mediatoren konnte die Vernetzungseffizienz der Enzyme weiter gesteigert werden. Mit Vanillin steht ein beliebter, in Milcherzeugnissen verbreitet verwendeter Aromastoff als Mediator zur Verfügung. Die Vernetzung in kommerziellen Magermilchjoghurt mit Lcc C zur Erhöhung der Viskosität war effizienter als die Erhöhung der Proteinkonzentration im Joghurt.

In einem Screening von 20 Pilzstämmen wurde die Laccase aus *Pleurotus eryngii* in Gegenwart der natürlich in Milch vorkommenden Ionen (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Phosphat, Citrat) weniger inhibiert als das Referenzenzym Lcc C. Die gereinigte Laccase aus *P. eryngii* zeigte ein schmales Optimum für die Vernetzung der Milchproteine in Gegenwart des Mediators Vanillin. Höhere Enzymdosen führten zu Fragmentierungsreaktionen und zum Strukturabbau. Unerwünschte oxidative Veränderungen an empfindlichen Inhaltsstoffen, wie Fett- und der Aminosäuren, infolge von Laccase-katalysierten Nebenreaktionen wurden im Rahmen der analytischen Grenzen nicht nachgewiesen.

In Forschungsstelle 2 wurden im Technikumsmaßstab Standardprozesse für Magermilchjoghurt, Vollmilchjoghurt und Frischkäse der Magerstufe aufgebaut und durchgeführt. Integriert war jeweils eine standardisierte Nachbehandlung mittels Scherventil, die eine industrielle mechanische Belastung simuliert. Die so mechanisch vorbelasteten fermentierten Systeme wurden ohne (Standard) und mit dem Referenzenzym Lcc C behandelt, strukturell charakterisiert und sensorisch evaluiert. Analysiert wurde u. a. der Speichermodul bei 10 °C (10 rad/s), als ein Maß für die Festigkeit der Rührjoghurts bzw. Frischkäses, sowie die Scherviskosität (10 °C, 50 1/s), die mit der sensorischen Wahrnehmung korreliert. In den im Technikumsmaßstab hergestellten Joghurt- und Frischkäsesystemen mit simulierter mechanischer Belastung wurde nach Zusatz des Referenzzyms Laccase C im Vergleich zum Standard keine signifikante Erhöhung des Speichermoduls und der Scherviskosität beobachtet. Im Rahmen einer sensorischen Untersuchung wurden die enzymatisch behandelten Proben, unabhängig von der Zugabe von Vanillin als Mediator, im Vergleich zur Referenzprobe (Mager- bzw. Vollmilchjoghurt) als niedrigviskoser wahrgenommen. Zusätzlich wurden die mit

Laccase C versehenen Joghurtproben als untypisch beschrieben.

In Modellexperimenten wurde im Folgenden gemeinsam mit Forschungsstelle 1 verstärkt der Frage nachgegangen, durch welche Inhaltsstoffe des komplexen Milchsystems (z.B. Ionen, Sauerstoff, Antioxidanzien) und welche Prozessparameter (Temperatur, Zeit, Enzymdosis) die Reaktionen der Lacc C beeinflusst werden. Z.B. wurde ein Modellsystem bestehend aus Natriumcaseinat mit Lcc C vorbehandelt und anschließend mit Glucono- δ -lacton direkt gesäuert. Gegenüber dem Modellsystem ohne Enzymzusatz konnte in einem Penetrationsversuch ein reduzierter Kraftanstieg und eine reduzierte Maximalkraft gemessen werden. Folglich lag ein schwächer ausgeprägtes Gelnetzwerk vor.

Ferner zeigte eine Mikrostrukturvisualisierung mithilfe CLSM (Confocal-Laser-Scanning-Microscopy) für Mager- und Vollmilchjoghurt, für Frischkäse der Magerstufe sowie für das Natriumcaseinat-Modellsystem jeweils gegenüber den enzymfreien Referenzproben ein aufgrund von großen Molkeinschlüssen (erhöhte Synärese) aufgelockertes, heterogenes Gelnetzwerk. Außerdem wurden fragmentierte Proteinaggregate beobachtet.

Mit dem Forschungsvorhaben wurde gezeigt, dass Laccasen Milchproteine mit und ohne Mediatoren im sauren Milieu vernetzen können. Für das Screening nach Laccasen ist zu beachten, dass Milchinhaltsstoffe, wie z.B. Salze und Antioxidanzien, die Aktivität reduzieren können und dass ggf. Nebenprodukte entstehen, die auch in geringer Konzentration zu sensorischen Abweichungen führen. Es besteht weiterhin Forschungsbedarf, um mit einem tieferen Verständnis geeignete Laccasen für den Einsatz in Milchprodukten gezielt auszuwählen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes helfen Enzymherstellern und Molkereiunternehmen, innovative Anwendungsoptionen für strukturmodifizierende Enzyme in Milchprodukten zu erschließen. Weniger als 1 % der auf dem Markt verfügbaren Enzyme werden bisher für technische Anwendungen im Bereich der Lebensmittel genutzt. Das Projekt hat einen Beitrag geleistet, diese Wissenslücke zu schließen.

So können zukünftig kleine und mittlere Enzymproduzenten auf Basis der erarbeiteten Kriterien gezielter nach strukturbildenden Enzymen für Milchprodukte screenen. Milchunternehmen profitieren von den vorwettbewerblich gewonnenen Erkenntnissen, um die gestiegenen Anforderungen bei Exportprodukten zu erfüllen, da technologische Optionen für qualitativ hochwertige und lagerstabile fermentierte Milchprodukte aufgezeigt wurden.

Der deutsche Milchverarbeitungssektor umfasst rund 100 Unternehmen und beschäftigt ca. 36.000 Mitarbeiter. Mit etwa 19 Mrd. € Umsatz erzielt er knapp 14 % des Gesamtumsatzvolumens der deutschen Lebensmittelindustrie. Die sog. Weiße Produktlinie (Joghurt, Quark etc.) ist mit 5,7 Mrd. € der umsatzstärkste Bereich. Insbesondere kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) dieses Wirtschaftssektors stehen in einem starken internationalen Wettbewerb und sind gefordert, kostengünstig qualitativ hochwertige und lagerstabile fermentierte Milchprodukte zu produzieren.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Mookoonlall, A., Pfannstiel, J., Struch, M., Berger, R.G. und Hinrichs, J.: Structure modification of stirred fermented milk gel due to laccase-catalysed protein crosslinking. *Innov. Food Sci. Emer. Technol.* 33, 563-570 (2016).
3. Nöbel, S., Kern, C., Sonne, A., Bähler, B. und Hinrichs, J.: Apparent voluminosity of casein micelles in the temperature range 35 - 70°C. *Intern. Dair. J.* 59, 80–84 (2016).
4. Mookoonlall, A., Sykora, L., Pfannstiel, J., Nöbel, S., Weiss, J. und Hinrichs, J.: A feasibility study on the application of a laccase-mediator system in stirred yoghurt at the pilot scale. *Food Hydrocoll.* 60, 119–127 (2016).
5. Mookoonlall, A., Hippich, M., Struch, M., Berger, R. G., Weiss, J. und Hinrichs, J.: Antioxidant activity of milk suppresses laccase induced radicals and the subsequent modification of acidified milk protein gels. *Intern. Dair. J.* 60, 24–31 (2016).
6. Struch, M., Krahe, N.-K., Linke, D., Mookoonlall, A., Hinrichs, J. und Berger, R. G.: Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 1144–1152 (2016).
7. Struch, M., Linke, D., Mookoonlall, A., Hinrichs, J. und Berger, R.G.: Laccase catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators. *Intern. Dair. J.* 49, 89-94 (2015).
8. Nöbel, S., Hahn, C., Hitzmann, B. und Hinrichs, J.: Rheological properties of microgel suspensions: Viscoelastic modelling of microstructural elements from casein micelles to fermented dairy products. *Intern. Dair. J.* 39 (1), 157-166 (2014).
9. Struch, M., Linke, D. und Berger, R.G.: Strukturbildung in Joghurt durch Laccase-katalysierte Quervernetzung. *Lebensmittelchem.* 67, 76. (2013).
10. Nöbel, S., Weidendorfer, K. und Hinrichs, J.: Apparent voluminosity of casein micelles determined by rheometry. *J. Coll. Interf. Sci.* 386 (1), 174-180 (2012).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hannover
 Institut für Lebensmittelchemie
 Wunstorfer Str. 14, 30453 Hannover
 Tel.: +49 511 762-4582
 Fax: +49 511 762-4547
 E-Mail: rg.berger@lci.uni-hannover.de

Universität Hohenheim
 Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
 FG Milchwissenschaft und -technologie
 Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart
 Tel.: +49 711 459-23792
 Fax: +49 711 459-23617
 E-Mail: jh-lth@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.