

## Reduktion der Bitterkeit von fermentierten Milchprodukten mit erhöhtem Calciumgehalt durch Selektion geeigneter Starterkulturen – Einfluss milchendogener und exogener Peptidasen



Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle(n):	<p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene Prof. Dr. Herbert Schmidt/Dr. Agnes Weiß</p> <p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Milchwissenschaft und -technologie Prof. Dr. Dr. Jörg Hinrichs</p> <p>Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft Prof. Dr. Lutz Fischer/Dr. Sabine Lutz-Wahl</p>
Industriegruppe(n):	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
Projektkoordinator:	<p>Dr. Bernd Hammelehle Ehrmann AG, Oberschöneck</p> <p>Dr. José Toro Kraft Foods R&amp;D Inc. Zweigniederlassung München, Unterhaching</p>
Laufzeit:	2017 – 2020
Zuwendungssumme:	€ 448.130,--

### **Ausgangssituation**

In fermentierten Milchprodukten, wie konzentriertem Joghurt, Frisch- und Schnittkäse, können Bitterpeptide enthalten sein, die durch die Spaltung von Milchproteinen durch Peptidasen gebildet werden. In höherer Konzentration werden diese Peptide von den Konsumenten sensorisch wahrgenommen und können zur Ablehnung des Produkts führen. Peptidasen können endogen in der Milch enthalten sein, wie Cathepsine und Plasmin, Bitterpeptide können aber auch durch die enzymatische Aktivität der Starterkulturen entstehen. So ist z. B. von der als Starterkultur eingesetzten Spezies *Lactococcus lactis* bekannt, dass zellwandgebundene Peptidasen, sog. cell envelope peptidases (CEP; Lactocepine), gebildet werden, die Caseine spalten können. Es werden z. B. aus  $\alpha$ S1-Casein wasserlösliche Peptide freigesetzt, wobei neben erwünschten Vorstufen von Aromakomponenten auch Bitterpeptide entstehen. Die wasserlöslichen Peptide werden durch ein Oligopeptid-transportsystem in die Bakterienzelle aufgenommen. Bereits die Aufnahme der Peptide in die Bakterienzelle entspricht in gewisser Weise einer Entbitterung, da sie dann nicht mehr sensorisch wahrgenommen werden

können. Milchsäurebakterien verfügen im Zellinneren über eine Vielzahl von Endo- und Exopeptidasen, die diese Peptide weiter abbauen und somit weiter entbitternd wirken.

Das Spektrum vorhandener Endo- und Exopeptidasen ist jedoch von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Neben der genetischen Ausstattung der Mikroorganismen, bestimmte Enzyme bilden zu können, hängt deren Expression auch von den Umgebungsbedingungen ab. So wurde beispielsweise für *Lactobacillus helveticus* und *L. rhamnosus* gezeigt, dass die Peptidaseexpression in stickstoffreicher Umgebung reduziert war.

Zum Vermeiden bzw. Reduzieren der sensorischen Bitterkeit von fermentierten Milchprodukten sind damit folgende Strategien zielführend: a) das Minimieren der enzymatischen Bildung von Bitterpeptiden und b) die mikrobielle Aufnahme und/oder der Abbau von gebildeten Bitterpeptiden.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Bitterkeit von fermentierten Milchprodukten zu reduzieren oder gänzlich zu vermeiden. Dazu sollten die milchendogenen Peptidasen sowie die Peptidasen der Starterkulturen näher betrachtet werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf den Einfluss des Calciumgehalts gelegt werden, da in konzentrierten Milchprodukten ein erhöhter Gehalt von Calciumionen vorliegt und solche fermentierten Produkte eine verstärkte Bitterkeit aufweisen. Weiterhin sollte der Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Expression der Peptidasegene und Oligopeptidtransportsysteme sowie die enzymatischen Aktivitäten der Starterkulturen bzw. die enzymatische Bildung von Bitterpeptiden in einem Modellsystem untersucht werden, um hieraus Lösungsstrategien für die Hersteller abzuleiten.

### Forschungsergebnis

Es wurde ein Mikro-Frischkäsesystem für CoF (Konzentration-Fermentation)- und FCo (Fermentation-Konzentration)-Frischkäse etabliert. Die Endprodukte wurden sensorisch und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Zusätzlich wurde micellares Caseinpulver mit nativem und reduziertem Calciumgehalt hergestellt und  $\beta$ -Casein mit hoher Reinheit gewonnen. Diese Pulver können im Mikro-Frischkäsesystem variabel miteinander kombiniert werden, um verschiedenste Zusammensetzungen und Proteingehalte zu simulieren. Die Hypothese, dass Peptidasenegative Lactococcus-Stämme zu CoF-Frischkäse mit signifikant reduzierter Bitterkeit führen, wurde bestätigt. Bei Fermentation von micellarem Casein mit reduziertem  $\beta$ -Caseingehalt zu CoF-Frischkäse wurde sowohl mittels instrumenteller Analytik als auch mittels sensorischer Verkostung kein Unterschied zu FCo-Frischkäse aus dem Handel detektiert.

Ein Assay zur Transkriptionsanalyse der Gene *prtP* (zellwandgebundene Peptidase), *oppA* (A-Untereinheit des Oligopeptidtransporters) und *codY* (globaler Regulator) des proteolytischen Systems von *Lactococcus* wurde etabliert. Die Transkriptmengen aller Gene waren während der Kultivierung unter stark erhöhten Calciumkonzentrationen stark erniedrigt, in Milch-Zitrat-Bouillon (MCB) pH 5,5 sowie MCB + 5 mM  $\text{CaCl}_2$  wurden erhöhte Transkriptionslevels für *prtP* sowie erniedrigten Transkriptionsniveaus von *oppA* und *codY* detektiert. Die Transkriptionsstärke aller Gene war während der Kultivierung in zwei Milchkonzentrat-Ansätzen, die im Rahmen dieses Projektes hergestellt wurden, vermindert. Es ist davon auszugehen, dass die sensorisch festgestellte Bitterkeit von der Transkription der Gene der Proteine des proteolytischen Systems unabhängig ist.

Es wurden ein quantitativer Nachweis der milchendogenen Peptidase Cathepsin D mittels Fluoreszenz-Substrat sowie ein qualitativer Western Blot etabliert. Weder in *Escherichia coli* noch in der Hefe *Komagataella phaffii* wurde eine ausreichende Menge an Cathepsin D hergestellt. Die Versuche wurden daher mit kommerziellem Cathepsin durchgeführt. Cathepsin D wird durch gängige Pasteurisation (72°C, 32 s) nicht vollständig inaktiviert. Durch Abtrennung der in Rohmilch enthaltenen somatischen Zellen wurde die Cathepsin-D-Aktivität um 40 % gesenkt, und durch eine anschließende Hoherhitzungsbehandlung konnte eine Milch ohne nachweisbare Cathepsin-D-Aktivität hergestellt werden. Es wurde in MCB gezeigt, dass eine Verringerung des pH-Wertes, eine Erhöhung der Calciumkonzentration oder des Proteingehaltes die *PrpP*-Aktivität erhöht.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Handlungsempfehlungen zur Herstellung calcium- und proteinreicher fermentierter Milchprodukte erstellt. Diese können flexibel in bestehende Betriebsabläufe integriert werden und erfordern kein neues Equipment. Zur Selektion von Starterkulturen sollten neben klassischen



Kulturtechniken und molekularbiologischen Techniken zur Analyse der Anwesenheit und der Transkription von Genen auch enzymatische Assays angewendet werden, da nach aktuellem Kenntnisstand die Bildung von Bitterpeptiden hauptsächlich auf Enzymebene beeinflusst wird.

### ***Wirtschaftliche Bedeutung***

Auf der Basis der Ergebnisse wurden Handlungsempfehlungen für die Wirtschaft formuliert. Basierend auf diesen Empfehlungen können Prozessschritte und Rezepturen angepasst werden, um die Bildung von Bitterpeptiden zu minimieren oder ganz zu vermeiden. Dadurch könnten kurzfristig auch neue calciumangereicherte, nicht-bittere Produkte auf den Markt gebracht werden. Frische fermentierte, milchprotein- und calciumangereicherte Lebensmittel besitzen ein steigendes Marktpotenzial und sind damit gerade für kleine und mittlere Unternehmen interessant.

Des Weiteren ist zu erwarten, dass die Suche nach neuen Starterkulturen für die Fermentation von calcium- und proteinreichen Milchkonzentraten und deren Einsatz durch die in diesem Projekt etablierten Techniken und Selektionskriterien erheblich beschleunigt wird. Es wurden neue Konzepte und Technologien für die Milchbehandlung etabliert, um die Aktivität von Cathepsin D und damit das Risiko einer sensorischen Bitterkeit bei fermentierten und lang haltbaren Produkten zu reduzieren.

Kleine und mittelständische Unternehmen der Milchindustrie werden auf dieser Basis innovative Produkte für Menschen mit besonderer Ernährungsanforderung, z.B. für Sportler und Senioren, entwickeln können.

### ***Publikationen (Auswahl)***

1. FEI-Schlussbericht (2020).
2. Forler, B., Horstmann, G., Schäfer, J., Michel, C., Weiss, A., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J. & Schmidt, H.: Effects of Protein, Calcium, and pH on Gene Transcription, Cell-Envelope Peptidase Activity of *Lactococcus lactis* Strains, and the formation of Bitter Peptides. *Foods* 10 (7), 1588 (2021).
3. Heck, A., Schäfer, J., Nöbel, S. & Hinrichs, J.: Fat-free fermented concentrated milk products as milk protein-based microgel dispersions: Particle characteristics as key drivers of textural properties. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 1-32 (2021).
4. Schäfer, J., Hinrichs, J., Kohlus, R., Huppertz, T. & Atmer, Z.: Pilot scale processing and characterisation of calcium-reduced micellar casein concentrate powders. *Intern. Dair. J.* 113 (14), 104888 (2021).
5. Nöbel, S., Seifert, B., Daffner, K., Schäfer, J. & Hinrichs, J.: Instantaneous gelation of acid milk gels via customized temperature-time profiles: Screening of concentrations and pH suitable for temperature triggered gelation towards 3D-printing. *Food Hydrocoll.* 113, 106450 (2021).
6. Schäfer, J., Schubert, T. & Atamer, Z.: Pilot-scale  $\beta$ -casein depletion from micellar casein via cold microfiltration in the diafiltration mode. *Int. Dair. J.* 97, 222-229 (2019).
7. Schäfer, J., Sebald, K., Hofmann, T., Rosenthal, I., Schuster, R., Atamer, Z. & Hinrichs, J.: A feasibility study on the pilot scale manufacture of fresh cheese from skim milk retentates without acid whey production: Effect of calcium content on bitterness and texture. *Int. Dair. J.* 93, 72-80 (2019).
8. Schäfer, J., Mesch, I., Atamer, Z., Nöbel, S., Kohlus, R. & Hinrichs, J.: Calcium reduced skim milk retentates obtained by means of microfiltration. *J. Food Eng.* 247, 168-177 (2019).
9. Horstmann, G., Schäfer, J., Forler, B., Weiß, A., Schmidt, H., Hinrichs, J., Stressler, T. & Fischer, L.: Reduktion der Bitterkeit von fermentierten Milchprodukten mit erhöhtem Protein- und Calciumgehalt – Welchen Einfluss haben die Starterkulturen und milchendogene Peptidasen? *DMW; Milchwirt.* 3, 98-100 (2019).
10. Schäfer, J., Daffner, K., Schöner, L. & Hinrichs, J.: Die Proteinase Cathepsin D in Milch - ein Review. *DMW; Milchwirt.* 9, 206-209 (2018).

### **Weiteres Informationsmaterial**

Universität Hohenheim  
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
FG Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene  
Garbenstraße 28  
70593 Stuttgart  
Tel.: +49 711 4592-3156  
Fax: +49 711 4592-4199  
E-Mail: herbert.schmidt@uni-hohenheim.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

Universität Hohenheim  
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft  
Garbenstraße 25  
70599 Stuttgart  
Tel.: +49 711 459-22311  
Fax: +49 711 459-24267  
E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 125  
53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

### **Förderhinweis**

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

Gefördert durch:



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 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.