

Innovative Technologien in der Käseforschung

Die Rolle von Mikroorganismen in der Käseerei

Die Käseherstellung ist eines der schönsten und ältesten Beispiele für die Biotechnologie. Traditionell wird gekäst, um die Milch in eine lagerbare Form zu überführen. Dafür wird sie mit Milchsäurebakterien und Lab – einem Extrakt aus dem Labmagen von Wiederkäuern – gemischt und dickgelegt. Während dieses Prozesses verbrauchen die Milchsäurebakterien primär den Milchzucker und bilden dabei Milchsäure, die das Wachstum pathogener oder verderbniserregender Keime unterdrückt. Am Ende entsteht eine weisse Gallerte. Sie wird geschnitten und dieser Käsebruch in sortentypische Formen gefüllt und anschliessend darin gepresst. Die entstehenden Käselaike werden nach einem Salzbad aufenthalt gereift. Während der tages- bis monatelangen Käsereifung spielen die Milchsäurebakterien weiterhin eine entscheidende Rolle. Sie bauen allmählich Kohlenhydrate, Fette und Proteine ab, wodurch viele Käsearten erst ihr charakteristisches Aroma und ihre Textur erhalten.

Es gibt zahlreiche Beispiele, die demonstrieren, dass die Stoffwechselaktivitäten von Milchsäurebakterien ein Schlüsselfaktor für die Aromabildung sind; so entwickeln zum Beispiel keimfreie Käse nur sehr wenig Aroma. Weitere Beispiele sind Tilsiter und

Camembert. Tilsiter wird sowohl aus Rohmilch als auch aus pasteurisierter Milch hergestellt, wobei die Rohmilchvariante in Geschmack und Geruch generell mit mehr Nuancen beurteilt wird. In Frankreich verzichten die Hersteller von Camembert zunehmend auf die Verarbeitung von Rohmilch, weil sie befürchten, dass die Rohmilchflora zu hohe Gesundheitsgefahren birgt. Sie verwenden deshalb thermisierte oder mikrofiltrierte Milch, um die Keimzahl zu reduzieren und potentiell pathogene Keime abzutöten bzw. zu entfernen. Dies missfällt den Käseliebhabern, denn zwischen einem Camembert aus Rohmilch und einem aus pasteurisierter Milch liegen geschmacklich Welten.

Die Mikroorganismen, die in der Käseherstellung und -reifung eine Rolle spielen, lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden die Starterkulturen; sie werden von den Käseherstellern und Kulturenproduzenten sorgfältig ausgewählt und eingesetzt. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Nichtstarter-Milchsäurebakterien; sie werden nicht zugegeben, sondern ihr Ursprung ist in der Rohmilch und der Käseumgebung zu suchen.

In der ersten Gruppe unterscheidet man primäre und sekundäre Starter. Die primäre Starterkultur sorgt für den konstanten Abbau des Milchzuckers zu Milch-

säure und beeinflusst auch den Protein- und Fettabbau während der Reifung. Durch die Säuerung, aber auch die Bildung von Bakteriozinen – das sind Substanzen mit antimikrobieller Wirkung – schützen sie den Käse auf biologische Art und Weise vor Kontamination durch Fremdkeime. Die sekundäre Starterkultur wird in einigen Käsevarianten für die Aromabildung eingesetzt. Hierzu zählen die Propionsäurebakterien, welche zusätzlich zur Aroma- auch zur Lochbildung im Emmentaler beitragen, oder *Penicillium camemberti* und *Penicillium roqueforti*, die bei der Herstellung von Weiss- und Blauschimmelkäsen zum Zug kommen.

Die Gruppe der Nichtstarter-Milchsäurebakterien spielt eine entscheidende Rolle in vielen Rohmilchkäsen. Diese Käse enthalten am Anfang der Reifung generell 100 bis 1000 Nichtstarter-Milchsäurebakterien pro Gramm Käse, die sich innerhalb einiger Wochen bis zu 100 Millionen (10^8) Bakterien pro Gramm Käse vermehren. Die Stoffwechselfähigkeit dieser Bakterien hat neben den Aktivitäten der Starterkulturen einen entscheidenden Einfluss auf die Aromabildung.

Die in den letzten Jahren entwickelten Produktions- und Verarbeitungsverfahren haben dazu geführt, dass Rohmilch einerseits eine hohe mikrobiologische Qualität und Sicherheit aufweist. Andererseits geht damit

eine drastische Reduktion der erwünschten (Nichtstarter-)Bakterien einher. Diesen Nachteil möchten die Milchverarbeiter durch Zugabe von Zusatzkulturen kompensieren, um den Konsumenten zusätzlich zur Sicherheit ein Produkt mit sehr guten sensorischen Eigenschaften anzubieten. Grosse Erwartungen werden hierbei in die funktionelle Genomforschung gesetzt, mit dem Ziel, die Physiologie der Starter- und Nichtstarter-Milchsäurebakterien besser zu verstehen und das Potential dieser Mikroorganismen gezielt für die Käseherstellung zu nutzen und einzusetzen.

Mit der Erforschung von «Omen» zu neuen Erkenntnissen und Kulturen

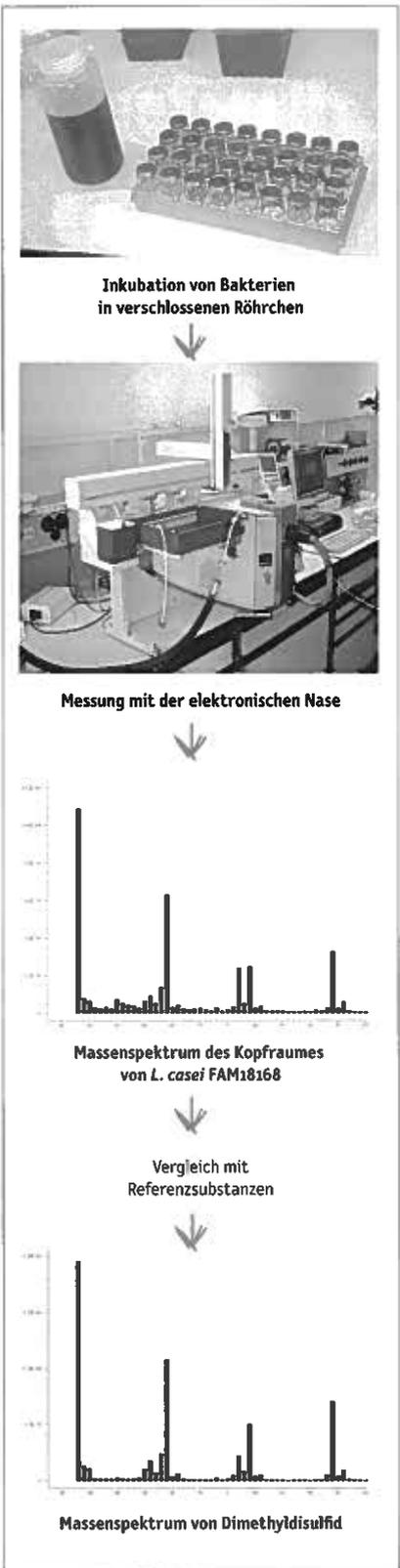
Unter funktioneller Genomforschung versteht man die Entwicklung und Anwendung von Methoden, die die Mechanismen von Genen und Genprodukten sowie ihre Wechselwirkungen untereinander und mit ihrer Umgebung studieren. Die Begriffe Proteom und Metabolom wurden analog zu Genom gebildet, das die Gesamtheit der vererbaren Information einer Zelle bezeichnet. Proteom steht für die Gesamtheit aller Proteine, Metabolom für jene aller Stoffwechselprodukte (Metaboliten) in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Lebewesen. Ein zentraler Bestandteil der Proteom- und Metabolomforschung ist die Massenspektrometrie, mit der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse gemessen werden. Damit lässt sich bei bekannter Ladung die Masse von Teilchen bestimmen. Mit dieser Technologie kann man sowohl Proteine als auch Metaboliten aufspüren und identifizieren.

Unsere Arbeitsgruppe an der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) hat aus diesen Techniken die mikrobielle Proteom- und Metabolomforschung ausgewählt, um die mikrobielle Aromabildung aufzuklären und das Wissen zur Identifizierung und Entwicklung aromabildender Kulturen in der Käseherstellung einzusetzen. Solche Kulturen haben

[ABB. 1] Messen der Bildung flüchtiger Verbindungen mit einer elektronischen Nase. Die Moleküle im Kopfraum von Bakterienproben werden ionisiert und die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse bestimmt. Im Kopfraum des Stammes FAM18168 wurden Ionen mit den Massen 48, 64, 77, 79 und 94 nachgewiesen. Die Interpretation dieses Massenspektrums und der Vergleich mit Spektren von Referenzsubstanzen deuten darauf hin, dass das Bakterium den schwefelhaltigen Aromastoff Dimethyldisulfid gebildet hat.

das Potential, die organoleptischen Eigenschaften von Käsen aus pasteurisierter oder thermisierter Milch zu verbessern und die Reifungszeit zu verkürzen.

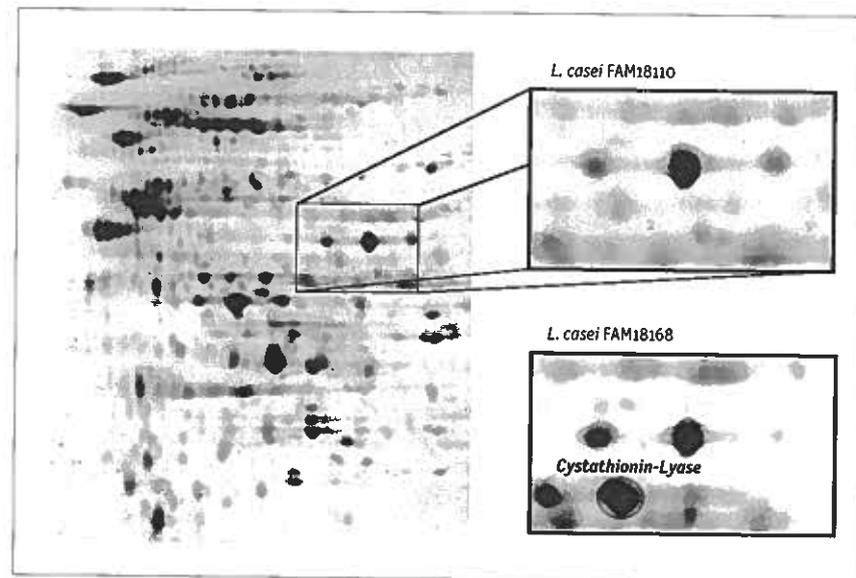
Am Anfang des Projekts wurden die Nichtstarter-Milchsäurebakterien von sechs Monate alten Hartkäsen aus drei verschiedenen Käseereien analysiert. Dabei wurde *Lactobacillus casei* als dominanter Vertreter der mikrobiellen Flora identifiziert, was darauf hinweist, dass er sehr wahrscheinlich einen grossen Einfluss auf die Aromabildung hat. Anschliessend wurden 81 *L. casei*-Isolate mit genetischen Unterschieden auf die Fähigkeit zur Bildung flüchtiger Verbindungen untersucht. Da Aminosäuren die Vorläufermoleküle für eine Vielzahl von Aromastoffen sind, wurden die Bakterien in einer Aminosäuremischung inkubiert und die Produktion flüchtiger Verbindungen mit einer auf Massenspektrometrie basierten elektronischen Nase gemessen. Hierbei wurden die flüchtigen Verbindungen aus dem Kopfraum der Bakterienproben ionisiert und die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse der vorhandenen Teilchen ohne Trennung gemessen. Mit diesem Verfahren können grosse Probenmengen in kurzer Zeit durchgemessen und damit grosse Datenmengen erfasst werden. Sie lassen sich zudem mit statistischen Verfahren, zum Beispiel einer Hauptkomponentenanalyse, so weit reduzieren, dass man sie zweidimensional abbilden kann. Wie etwa die Produktion gewisser Aromakomponenten zeigt, können Bakterien mit ähnlichen Eigenschaften dadurch grup-



piert werden. Der Vergleich der Massenspektren mit denjenigen von Referenzsubstanzen lässt zusätzlich Rückschlüsse auf die flüchtigen Komponenten zu. In unserem Fall wurden Bakterien identifiziert, die flüchtige Verbindungen aus den Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Methionin bildeten. Das Massenspektrum des Kopfraumes von Stamm FAM18168, der Methionin zu einer flüchtigen Schwefelverbindung (in diesem Fall Dimethyldisulfid) abbaute, ist weiter oben dargestellt [ABB. 1].

Dimethyldisulfid (DMDS) ist eine wichtige Aromakomponente in zahlreichen Käsetypen. Um die Enzyme (oder das Enzym) zu identifizieren, die an der Bildung dieser Komponente beteiligt sind, haben wir das Proteom eines DMDS-produzierenden Stammes (FAM18168) mit einem minder bildenden Stamm (FAM18110) verglichen. Für die Kartierung und den Vergleich der Proteome wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert und mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dieses Verfahren, mit dem viele hundert Proteine auf einmal dargestellt und studiert werden können, trennt die Proteine in einem elektrischen Feld einerseits nach dem Gehalt an basischen und sauren Aminosäuren und andererseits nach ihrer molekularen Grösse auf. Wir haben damit rund 300 Proteine dargestellt und ein Protein im Stamm FAM18168 identifiziert, das sich im Stamm FAM18110 nicht nachweisen liess [ABB. 2]. Die Untersuchung der biochemischen Eigenschaften dieses Proteins ergab, dass es sich um ein Enzym des Schwefelstoffwechsels (Cystathionin-Lyase) handelt und dass es in der Lage ist, DMDS aus Methionin freizusetzen. Mit der Proteomanalyse konnte somit ein einzelnes Enzym aus mehreren hundert anderen Proteinen identifiziert werden, und es kann als Marker für die Selektion von Bakterien herangezogen werden, die flüchtige schwefelhaltige Verbindungen bilden.

[ABB. 2] Ausschnitt aus dem Proteom von *Lactobacillus casei*. Wir haben den Proteinextrakt von Stamm FAM18110 mit elektrophoretischen Techniken aufgetrennt und die Proteine anschliessend mit einem proteinbindenden Farbstoff visualisiert. Auf dem Bild erscheinen links rund 300 Proteine als dunkle Flecken (Spots). Rechts ist je ein Bereich von Stamm FAM18110 und Stamm FAM18168 zum Vergleich vergrössert dargestellt. Man sieht deutlich, dass Stamm FAM18168 ein Protein bildet, das im Stamm FAM18110 nicht zu finden ist. Die massenspektrometrische Untersuchung hat das Protein als eine Cystathionin-Lyase identifiziert, ein Enzym, das im Schwefelstoffwechsel eine zentrale Rolle spielt.



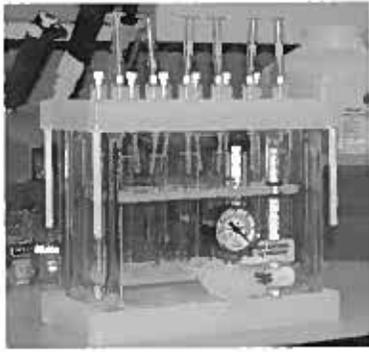
Metabolome sind Biomarker für Mikroorganismen und Lebensmittel

In der Vergangenheit konzentrierte sich die Analytik auf Nachweis und Charakterisierung von ein bis zwei Molekülen. Zur Metabolomforschung von heute, die mit einem einzigen Verfahren mehrere hundert Moleküle analysiert, haben die Entwicklung hochauflösender und robuster Massen- und Kernspinresonanz (NMR)-Spektrometer sowie neuer Softwareprogramme geführt, die chromatographische Daten schnell prozessieren können. Diese Technologie ist in der Omik-Forschung relativ neu und konzentriert sich auf die Hochdurchsatz-Identifikation und Quantifizierung kleiner Moleküle wie Peptide, Aminosäuren, Nukleinsäuren, Zucker, organische Säuren, Vitamine, Polyphenole und andere.

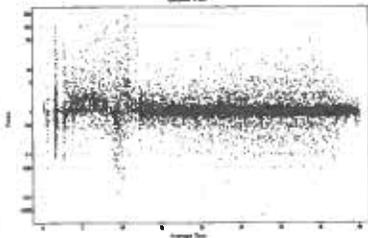
In unserem Fachgebiet wird die Metabolomforschung aus zwei Gründen eingesetzt. Einerseits möchten wir die unbekanntenen Stoffwechselwege von

Milchsäurebakterien studieren und verstehen, um Kulturen auf der Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse für die Herstellung neuer Milchprodukte entwickeln zu können. Andererseits können wir diese Technologie auf ein komplexes Lebensmittelprodukt anwenden, um dessen Zusammensetzung, Qualität und Ursprung zu ermitteln.

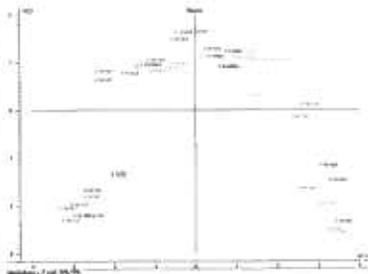
Um den Stoffwechsel von schwefelhaltigen Komponenten zu verstehen, haben wir mehrere *Lactobacillus casei*-Stämme sieben Tage mit Methionin inkubiert, anschliessend die Metaboliten extrahiert, durch Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und massenspektrometrisch detektiert. Mit dieser Technik wurden rund 20 000 Signale pro Bakterienstamm aufgezeichnet, eine Datenmenge, die nur mit computergestützten, multivariaten statistischen Verfahren weiterverarbeitet und reduziert werden kann. Die grundlegenden Informationen liessen sich auch hier zweidimensional abbilden [ABB. 3]. Das Verfahren



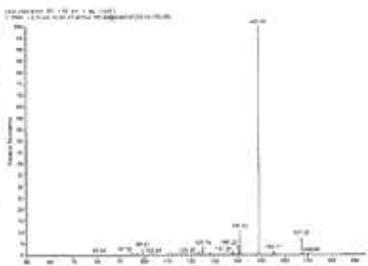
Metabolitensextraktion



Massenspektrometrie



Softwaregestützte Datenprozessierung



Metabolitenidentifikation

[ABB. 3] Chemometrische Untersuchung bakterieller *Lactobacillus casei*-Metabolome. Die Metaboliten wurden von Bakterienstämmen extrahiert, aufgetrennt und durch Massenspektrometrie detektiert (rund 20 000 Signale pro Bakterienstamm). Die Auswertung der Daten gruppiert die Bakterien entsprechend der Zusammensetzung ihres Metaboloms. Zusätzlich zur Klassifizierung der Bakterien können die stammspezifischen Metaboliten identifiziert werden.

ermöglichte die Unterscheidung und Gruppierung von Stämmen aufgrund ihres Metaboloms. Zukünftige Untersuchungen mit Käseproben werden zeigen, welche Auswirkung die Stoffwechselaktivitäten dieser Bakterien auf das «Käsemetabolom» haben.

Die Omik-Technologien und vor allem Metabolomstudien haben das Potential, anhand weniger Analysen die komplexe Zusammensetzung von Zellen, Geweben und Organen, aber auch von Lebensmitteln zu studieren. Sie werden sich daher in Zukunft entscheidend auf die Nahrungsmittel- und Ernährungsforschung auswirken. Es ist zu erwarten, dass in den

nächsten Jahren, vergleichbar zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms, auch die «Lebensmittelmetabolome» aufgeklärt und in öffentlich zugänglichen Datenbanken gespeichert werden, zur Nutzung durch Lebensmittelwissenschaftler und Ernährungsphysiologen, um beispielsweise den Einfluss der Verarbeitung und Konservierung auf die Zusammensetzung von Lebensmitteln zu verfolgen, Produktionsprozesse reproduzierbarer zu gestalten, Qualität und Ursprung eines Lebensmittels zu ermitteln oder Verfälschungen nachzuweisen.

Von «Omik» und «Omik»

Viele Spezialbereiche in der Biotechnologie enden auf -omik, dies deshalb, weil der Begriff für den Gegenstand ihres Spezialgebiets jeweils auf -om endet (z. B. Genom, Metabolom, Proteom, Nutrigenom).

So zielt zum Beispiel die Metabolomik auf die Untersuchung der Gesamtheit der Stoffwechselprodukte (das Metabolom) in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Lebewesen ab und die Proteomik auf die Erforschung der Gesamtheit der Proteine (das Proteom) im Genom.