

Gärungsvorgänge im Käse

Milchsäuregärung
Propionsäuregärung
Gemischtsäuregärung ("Colityp")
Buttersäuregärung
Proteolyse & Lipolyse

3. Auflage, Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	3
1. Einleitung	4
2. Heute geltende Bezeichnungen für milchwirtschaftlich bedeutsame Milchsäurebakterien	4
3. Milchsäuregärung	6
3.1 Allgemein	6
3.2 Milchsäurebakterien	6
3.3 Definitionen der Milchsäuregärungs-Typen	8
3.4 Eigenschaften käsereitechnologisch wichtiger Milchsäurebakterien	8
3.5 Die homofermentative Milchsäuregärung	9
3.6 Die heterofermentative Milchsäuregärung	11
3.7 Technologische Bedeutung der fakultativ heterofermentative Laktobazillen	12
3.8 Verlauf der Milchsäuregärung (Beispiel Emmentaler)	13
3.9 Enzyme und Metaboliten der Milchsäuregärung und deren Nachweisverfahren	15
3.10 Die durchschnittlichen Milchsäuregehalte in verschiedenen Käsesorten	17
3.11 Die technologische Bedeutung der Milchsäure im Käse	19
4. Propionsäuregärung	20
4.1 Metabolismus der Propionsäurebakterien	20
4.2 Merkmale der Propionsäurebakterien	22
4.3 Angaben im Zusammenhang mit der Emmentaler-Herstellung	24
4.4 Die Bedeutung der Endprodukte der Propionsäuregärung	26
4.5 Nachweis einer Propionsäuregärung	28
5. Gemischtsäuregärung (Ameisensäuregärung)	31
5.1 Enterobacteriaceen	32
5.2 Vorkommen und Eigenschaften	32
5.3 Nachweis im Käse	33
6. Buttersäuregärung	34
6.1 Herkunft der Clostridien	34
6.2 Wichtige Vertreter der Clostridien	34
6.3 Eigenschaften der Clostridien	35
6.4 Nachweis der Buttersäurebakterien und der Buttersäuregärung	36
7. Proteolyse	37
7.1 Beeinflussung der Eigenschaften des Käses durch die Proteolyse	38
7.2 Nachweisverfahren der Proteolyse im Käse	39
8. Lipolyse.....	42
8.1 Vorkommen von Lipasen	42
8.2 Analytik zum Problem Fettspaltung	43
8.3 Ursachen und Massnahmen bei Lipolyseproblemen	44
9. Zusammenfassung der Fermentationstypen	45

Vorwort

Der ursprüngliche Autor der vorliegenden Schrift und langjährige Mitarbeiter unserer Forschungsanstalt, Heinz Sollberger, gilt als hervorragender Kenner der Gärungsvorgänge im Käse. Sein Beitrag „Gärungsvorgänge im Käse“ entstand 1993 als Schulungsunterlage für Käsereiinspektoren und -berater. Im Jahr 1999 erschien eine aktualisierte 2. Auflage. Aufgrund der umfassenden und doch praxisnahen Behandlung des Themas wird die Schrift immer wieder verlangt. Nachdem Heinz Sollberger im Jahre 2003 den wohlverdienten Ruhestand antrat haben wir uns entschlossen, seine Vorlage in etwas überarbeiteter und aktualisierter Form in einer 3. Auflage erscheinen zu lassen.

8. Juni 2005

Ernst Jakob, Elisabeth Eugster, Marie-Therese Fröhlich-Wyder

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AS	Aminosäure(n)
CI	Clostridium
E	Enterococcus
FH	Fakultativ heterofermentativ
IE	Internationale Einheiten (Mass für die Enzymaktivität)
L	Leuconostoc
Lb	Laktobacillus, Laktobazillen
Lc	Lactococcus
MS	Milchsäure
Msb	Milchsäurebakterien
Msg	Milchsäuregärung
NPN	Nichtproteinstickstoff
OPA	ortho-Phthaldialdehyd (Reagenz zur Bestimmung der freien Aminosäuren)
P	Propionibacterium, Propionsäurebakterien
Sc	Streptococcus
ss	Subspezies
TN	Gesamtstickstoff
TW	Toleranzwert
WLN	Wasserlöslicher Stickstoff

1. Einleitung

Ohne die durch die Gärungsorganismen herbei geführten Gärungsprozesse wäre Käse ein optisch und sensorisch ziemlich uninteressantes und leicht verderbliches Produkt, welches nie die Vielfalt der heute bekannten Käsesorten und deren grosse Beliebtheit bei den Konsumenten erlangt hätte.

Im vorliegenden Beitrag werden die verschiedenen erwünschten und unerwünschten Gärungsvorgänge im Käse erläutert und deren Zusammenhänge diskutiert. In den Lehrbüchern werden die Gärungsvorgänge oft isoliert behandelt. In der Praxis, insbesondere in der Rohmilch-Käsefabrikation, gibt es diese isolierte Form der Gärung natürlich nur bedingt. Die mehr oder weniger allgegenwärtige Begleitflora kann gewünschte Gärungsergebnisse massgeblich beeinflussen.

Unter dem Begriff Gärung (Fermentation) verstehen Mikrobiologen primär die anaerobe Verstoffwechslung energieliefernder Substrate. Im Sinn der ursprünglichen Bedeutung des Wortes Ferment werden in diesem Beitrag auch enzymatische Prozesse wie die Lipolyse und die Proteolyse als Gärungsprozesse behandelt, obwohl diese teilweise auch nicht mikrobiologisch bedingt sind. Sie tragen aber ebenfalls wesentlich zur Entstehung des Aromas und der Konsistenz einer jeden Käsesorte bei und können auch zur Entstehung von Käsefehlern führen.

2. Heute geltende Bezeichnungen für milchwirtschaftlich bedeutsame Milchsäurebakterien

Bei der Namensgebung von Mikroorganismen gibt es laufend Veränderungen. Dies aufgrund neuer Erkenntnisse, v.a. aus vergleichenden Untersuchungen der Erbsubstanz. Die mit molekularbiologischen Methoden festgestellten Verwandtschaften können ganz anders sein als mit den klassischen Methoden. Nicht selten halten sich ältere Bezeichnungen für Mikroorganismen über Jahre, da sie kürzer, besser bekannt oder vertraut sind. Daher gibt es in vielen Fällen mehrere Synonyme.

Streptokokken (heute, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser)	(früher)
<i>Sc salivarius</i> ss <i>thermophilus</i>	<i>Sc thermophilus</i>
<i>Lc lactis</i> ss <i>lactis</i>	<i>Sc lactis</i>
<i>Lc lactis</i> ss <i>cremoris</i>	<i>Sc cremoris</i>
<i>Lc lactis</i> ss <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>Sc diacetylactis</i>

Mesophile Streptokokken sind eine eigene Gattung (Genus), *Lactococcus*, und werden als Laktokokken bezeichnet, abgekürzt L oder Lc (ss = Subspezies).

Laktobazillen

<i>Lb delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>	<i>Lb lactis</i>
<i>Lb delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>	<i>Lb bulgaricus</i>
<i>Lb helveticus</i>	<i>Lb helveticus</i>
<i>Lb acidophilus</i>	

Heterofermentative Streptokokken (Leuconostoc)

<i>L mesenteroides</i> ss <i>cremoris</i>	<i>L cremoris</i>
<i>L mesenteroides</i> ss <i>dextranicum</i>	<i>L dextranicum</i>
<i>L lactis</i>	<i>L citrovorum</i>

Enterokokken

E faecalis
E faecium
E casseliflavus

Die Enterokokken (E für Enterococcus) werden nicht mehr als Streptokokken bezeichnet. Sie sind eine eigene Gattung (Genus).

Propionsäurebakterien

P freudenreichii (ALP unterscheidet Subspezies oder Biovar)
P. freudenreichii ss *shermanii*
P jensenii
P thönii
P acidipropionici

Die Fähigkeit zur Vergärung bestimmter Zuckerarten und Pigmentbildung sind bei der klassischen Differenzierung die Hauptkriterien zur Unterscheidung der einzelnen Spezies, respektive Subspezies.

Obligat heterofermentative Laktobazillen

Lb fermentum
Lb brevis
Lb reuteri
Lb kefirii

Fakultativ heterofermentative Laktobazillen

Lb casei ss *casei*
Lb rhamnosus
Lb paracasei ss *paracasei*
Lb paracasei ss *tolerans*
Lb plantarum

3. Milchsäuregärung

3.1 Allgemein

Die Milchsäuregärung ist die milchwirtschaftlich bedeutendste Gärung. Mit ganz wenig Ausnahmen weisen alle Käsesorten und dazu alle Sauermilchprodukte eine Milchsäuregärung auf.

Die Milchsäurebakterien (Msb) verwenden den Milchzucker als Energiequelle und wandeln diesen in Milchsäure um. Ihr Ziel ist die Energiegewinnung und nicht die Säureproduktion!

Die technologisch ursprünglichste Bedeutung der Milchsäuregärung (Msg) bestand in der konservierenden Wirkung. Diese ist ausser bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte wie Käse und Joghurt z.B. auch in der Silage- oder Sauerkrautherstellung von Bedeutung.

Definition:

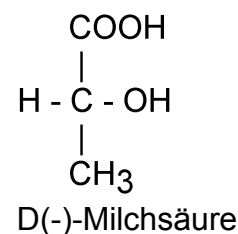
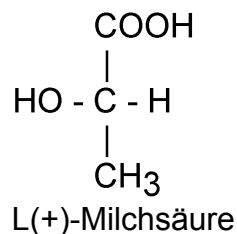
Unter Milchsäuregärung versteht man den anaeroben Abbau von Kohlehydraten (in der Milchwirtschaft meist Lactose) zu Milchsäure durch Mikroorganismen.

Schreibarten der Milchsäure und der isomeren Formen L und D:

Milchsäure (Lactat): $C_3H_6O_3$ oder $CH_3-CHOH-COOH$

Die molare Masse beträgt 90 g/mol

Milchsäure-Isomere:



L respektive D bezieht sich auf die Stellung der OH-Gruppe (L=links, D=rechts). Das (+) respektive (-) bezeichnet die optische Aktivität, d.h. die Drehung der Schwingungsebene von polarisiertem Licht (+ bedeutet rechtsdrehend, im Uhrzeigersinn).

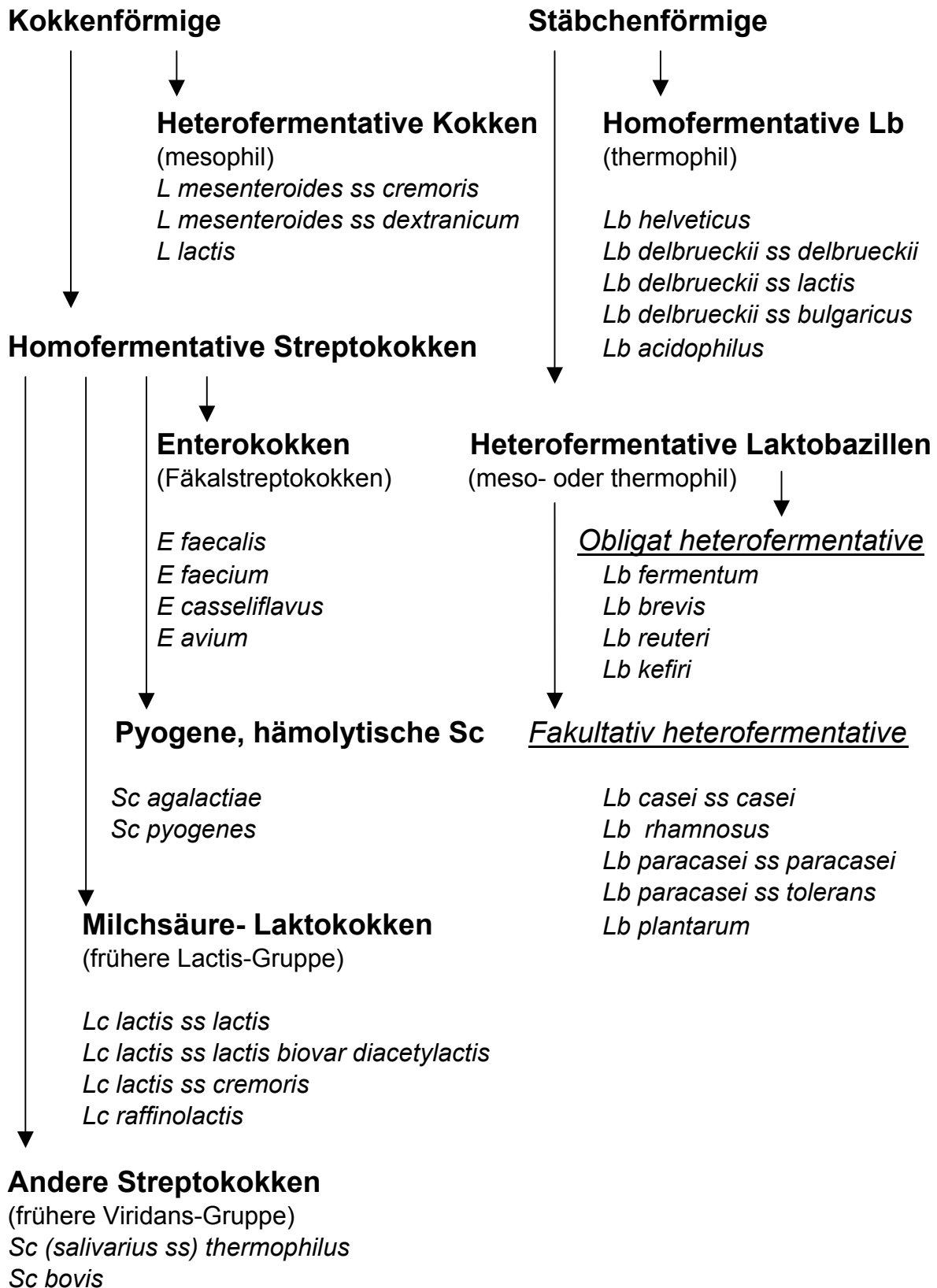
3.2 Milchsäurebakterien

Man unterscheidet vor allem nach Formen (Morphologie), Temperaturanspruch und Gärungstyp:

- Laktobazillen (Lb) Streptokokken (Sc) und Laktokokken (Lc)
- Thermophile Mesophile
- Homofermentative Heterofermentative Fakultativ heterofermentative

Abbildung 1: Einteilung der wichtigsten Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien



3.3 Definitionen der Milchsäuregärungs-Typen

Homofermentative MSG

Mehr als 90% des abgebauten ("vergorenen") Milchzuckers erscheint in Form von Milchsäure. Andere Endprodukte sind nur in geringem Mass anzutreffen.

Praktisch alle Milchsäurebakterien, die zum Zweck der Milchsäuregärung eingesetzt werden, gehören zu diesem Typ.

Heterofermentative MSG

Mindestens 50%, aber höchstens 90% des vergorenen Milchzuckers erscheinen als Milchsäure. Andere Endprodukte sind **Essigsäure**, **CO₂** sowie eventuell **Alkohol** und **Diacetyl**.

Bis vor wenigen Jahren wurden nur die heterofermentativen Milchsäurebakterien des Rahmsäureweckers technologisch genutzt. Aromabildung und teilweise Lochbildung im Weich- und Halbhartkäse waren die Zielsetzungen.

Fakultative heterofermentative Milchsäurebakterien

Heute ist die Bedeutung der fakultativ heterofermentativen Laktobazillen (FH-Lb) mindestens ebenso gross. Interessanterweise sind diese Keime in der Lage, je nach Energiequelle und Wachstumsbedingungen, den homo- oder heterofermentativen Gärungstyp zu vollziehen.

Als Säuerungskulturen haben heterofermentative Msb kaum eine Bedeutung. Ihre Fähigkeit Säure zu bilden ist im Verhältnis zu den "Säuerungskulturen" bescheiden.

3.4 Eigenschaften käseereitechnologisch wichtiger Milchsäurebakterien

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Merkmale der in der Käseherstellung genutzten Milchsäurebakterien zusammengestellt. Hierzu noch einige Ergänzungen:

Bei den Streptokokken ist zu erwähnen, dass *Lc lactis* ss *lactis* den **Milchzucker** im Käse komplett vergären kann, während dies bei *Sc thermophilus* bei weitem nicht der Fall ist.

Milchsäurekonfiguration: *Lb helveticus* kann im Unterschied zu den anderen thermophilen Lb nicht nur D-Laktat, sondern auch L-Laktat bilden. Andererseits ist *Lb paracasei* ss *paracasei* der einzige *Lb casei* mit D-Lactat-Bildung (auch *Lb rhamnosus* bildet nur L-Lactat). Inbezug auf die Milchsäureproduktion im Käse ist letzteres aber

fast bedeutungslos, weil FH-Lb während der Fabrikation und auf der Presse bis zum Zeitpunkt „Käse 24h“ fast kein Wachstum zeigen.

Die Angaben zur **Proteolyse** von schwach bis stark sind sehr zu relativieren. Es handelt sich hier nur um einen Vergleich innerhalb der Milchsäurebakterien und die sind an sich keine starken Proteolyten. Die Angaben beziehen sich somit auf diesen Quervergleich. Auch innerhalb einer Spezies, d.h. von Stamm zu Stamm, gibt es naturgemäss recht grosse Unterschiede.

Tabelle 1: **Merkmale käseereitechnologisch wichtiger Milchsäurebakterien**

Eigenschaft	<i>Lc lactis</i> (<i>ss lactis</i>)	<i>Sc salivarius</i> (<i>ss thermoph.</i>)	<i>Lb helveticus</i>	<i>Lb delbrueckii</i> (<i>ss lactis</i>)	<i>Lb casei</i> (<i>ss casei</i>)
Generation (Min)	15-20	20-25	35-45	35-45	35-45
Milchsäure (mmol/kg)	90–145	90–110	> 220	110–190	< 30
Milchs.-Konfiguration	L	L	L und D	D	L (ev.D)
Temp.-Optimum (°C)	25-35	42*	38-42	40-45	36-38
pH-Optimum	6.0	6.0-6.8	5.2-5.5	5.1-5.3	> 6.0
Proteolyse	mittel	schwach	stark	stark	stark

* Optimales Wachstum, z.B. in der Kultur, jedoch schlechte Säuerung im Käse.

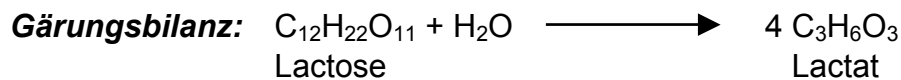
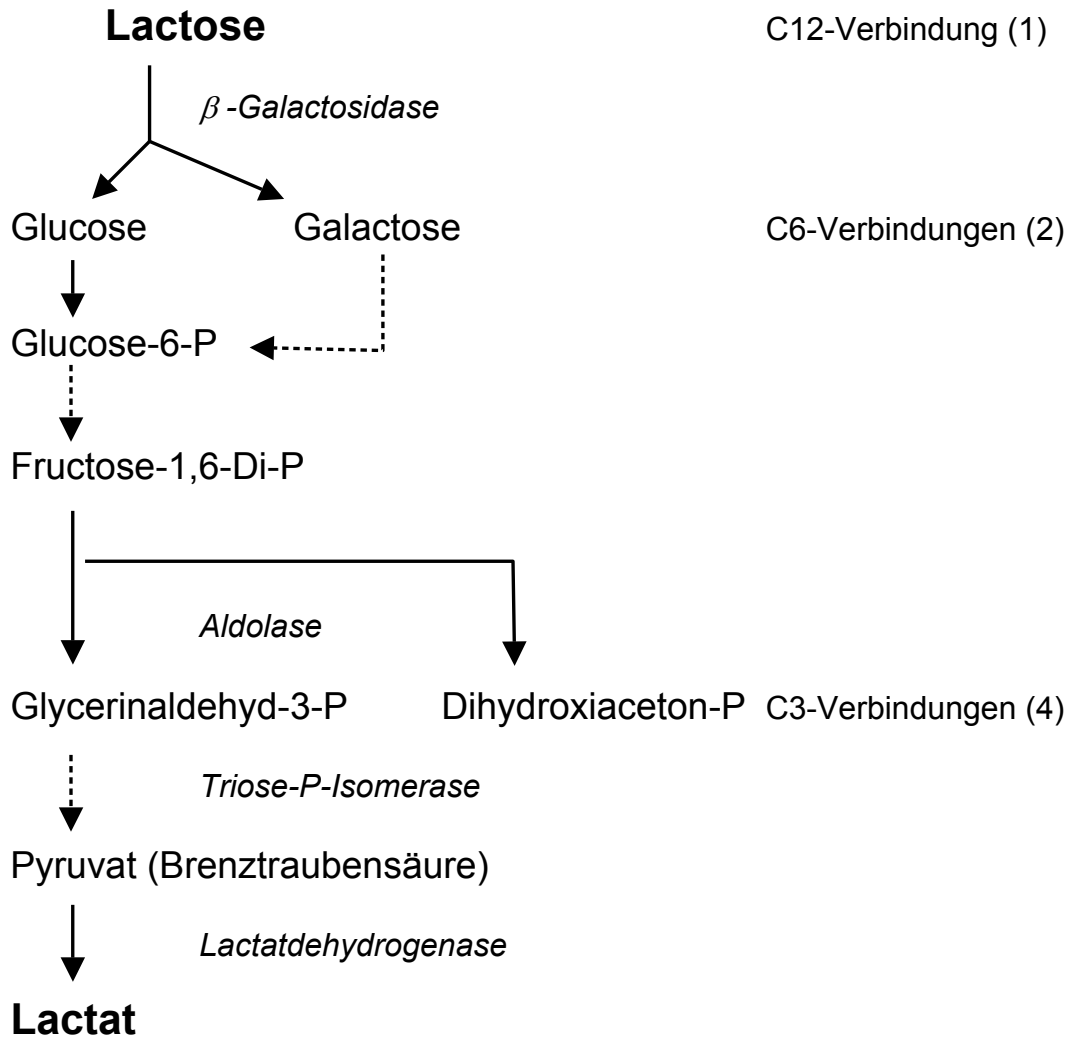
3.5 Die homofermentative Milchsäuregärung

Die Vergärung der Lactose geschieht über mehrere Stufen (Abbildung 2). Dabei entstehen Zwischenprodukte, die man Metaboliten nennt. Jeder einzelne Schritt wird erst durch ein spezifisches Enzym ermöglicht.

Den homofermentativen Glucoseabbau bezeichnet man als Glykolyse, den begangenen Weg als "Embden-Meyerhof-Weg".

Bei der Vergärung von Milchzucker ist noch ein vorangehender Schritt erforderlich, nämlich die Spaltung der Laktose in Glucose und Galactose.

Abbildung 2: **Homofermentative Milchsäuregärung (Gärschema)**

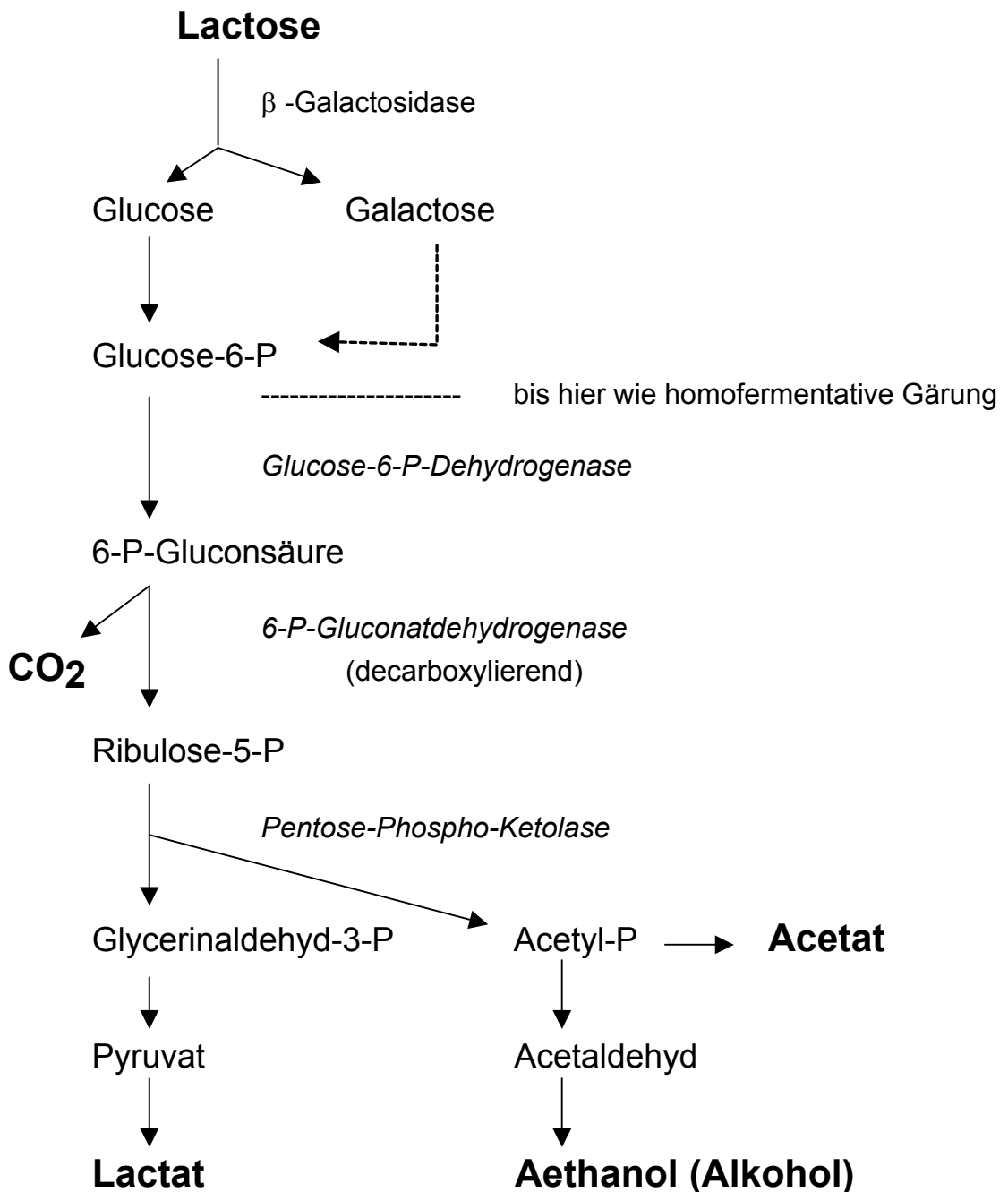


Es ist für die Milchsäurebakterien einfacher, Glucose abzubauen als Galactose. Aus diesem Grund findet man in Käse mit unvollständiger Milchzuckervergärung nur dann noch Lactose, wenn gleichzeitig mindestens 30 mmol/kg Galactose vorliegen. (Milchsäurebakterien verwerten Glucose fortlaufend, die Galactose erst, wenn keine Glucose, bzw. keine Lactose mehr vorliegt, siehe Abb. 5, Kapitel 3.8).

3.6 Die heterofermentative Milchsäuregärung

Wie bei der homofermentativen Msg wird die Laktose auch beim heterofermentativen Gärungstyp zuerst in Glucose und Galactose gespalten. Der Glucoseabbau verläuft jedoch nicht auf dem Weg der Glykolyse weil dazu Schlüsselenzyme, die Aldolase und die Triose-P-Isomerase, fehlen.

Abbildung 3: **Heterofermentative Milchsäuregärung (Gärschema)**



Gärungsbilanz:

Eine Bilanz, wie bei der homofermentativen Milchsäuregärung, ist kaum möglich. Je nach den Umständen sind die einen oder die andern Produkte stärker vertreten.

Mit dem Wechsel vom 6-er zum 5-er Zucker (Ribulose) geht das Heterofermentative einher. Essigsäure und auch Ameisensäure sind typische Produkte dieser Gärung. Das CO₂ führt im Käse allenfalls zu Lochbildung.

Heterofermentative Organismen können nicht nur Milchzucker abbauen, sondern (mindestens zum Teil) auch Citrat (Zitronensäure) vergären.

- *Leuconostoc* können auf diese Art neben einer allfälligen Lochbildung auch Aromastoffe, wie Diacetyl und Acetoin bilden.
- Obligat heterofermentative Laktokokken sind wegen der Aromabildung ein wichtiger Bestandteil der Butterungs-Kulturen. In der Halbhartkäse-Fabrikation sollen sie zu einem zahlreicheren Lochansatz führen.
- Obligat heterofermentative Laktobazillen werden in der Käsefabrikation nicht oder nur unbewusst genutzt. *Lb fermentum* galt früher - im Zusammenhang mit der Verwendung von Magenlab - noch als Verursacher von Frühsatz (so genannte "Delta-Störung"). Heute ist dieser Fehler kaum mehr anzutreffen.

3.7 Technologische Bedeutung der fakultativ heterofermentative Laktobazillen

Fakultativ heterofermentative Laktobazillen (heute oft FH-Kulturen oder einfach „Fak Het“ genannt) sind gärungstechnisch besonders interessant, weil sie in der Lage sind, **sowohl** den homofermentativen **als auch** den heterofermentativen Gärungstyp zu vollziehen.

- *Lb casei*, *Lb rhamnosus* und *Lb plantarum* können ausserdem **Citrat vergären**. Nach bisherigen Kenntnissen machen sie das allerdings erst, wenn kein Zucker als Gärsubstrat mehr zur Verfügung steht. Beim Zusatz von FH-Lb in der Emmentaler-Produktion vollzieht sich der Citratabbau hauptsächlich im Alter zwischen 2 und 3 Wochen.
- Beim Emmentaler werden in fast allen Käseereien fakultativ heterofermentative Laktobazillen eingesetzt, um Nachgärungen zu verhindern.
- Im Halbhartkäse aus Rohmilch (Tilsiter, Appenzeller) verwendet man sie zu einem kleinen Teil zur Förderung der Lochbildung und zum grösseren Teil zur Verhütung von Tupfen oder Nachgärung verursacht durch Propionsäurebakterien.
- Beim Gruyère ist der Einsatz wenig erfolgreich verlaufen. Atypischer Geschmack und unsaubere, z.T. zu grosse Lochung waren die hauptsächlichsten Fehler. Jüngere Forschungsarbeiten von ALP haben aber gezeigt, dass die FH-Lb der Rohmilchflora für die Reifung von Gruyère eine bedeutende Rolle spielen.

Es ist noch nicht geklärt, warum fakultativ heterofermentative Laktobazillen eine so deutliche Hemmwirkung auf die Propionsäurebakterien und die Enterokokken zeigen. Entweder wird ein Stoff verbraucht, den diese Bakterien essentiell benötigen oder es wird ein Hemmstoff gebildet.

Die bis jetzt verwendeten FH-Lb (*Lb rhamnosus* und *Lb casei* ss *casei*) sind im Sbrinzkäse jeweils gewachsen. Dies bedeutet, dass die Temperaturreistenz ziemlich gross sein muss. Von *Lb rhamnosus* weiss man, dass er sowohl bei 15°C wie auch bei 45°C gut wächst. *Lb casei* und insbesondere *Lb plantarum* und *Lb paracasei* ss *paracasei* gelten als weniger hitzeresistent.

Zur Gasbildung sei noch das Folgende bemerkt: Bei hohen Fabrikationstemperaturen wie sie bei Emmentaler und Sbrinz vorliegen wurde immer Lochbildung festgestellt, beim Halbhartkäse jedoch nur manchmal.

3.8 Verlauf der Milchsäuregärung (Beispiel Emmentaler)

Im Normalfall geht man davon aus, dass innerhalb 24 Stunden ein vollständiger Milchezuckerabbau vollzogen wird. Dies ist ein "Gemeinschaftswerk" von thermophilen Streptokokken und Laktobazillen.

Wie Abb. 4 zeigt, steigt beim Emmentaler der D-Laktat-Anteil mit fortschreitender Säuerung an, sofern diese normal verläuft. Grund: Der Beitrag der säuretolanteren Laktobazillen zum Gärgeschehen nimmt zu. Bei Verwendung einer sehr jungen Kultur (aktive Lb fehlen) wird erwartungsgemäss sehr wenig D-Laktat gebildet. Und der Gesamtlaktatgehalt erreicht deutlich tiefere Werte (grössere Lactoseverluste auf der Presse, unvollständiger Zuckerabbau).

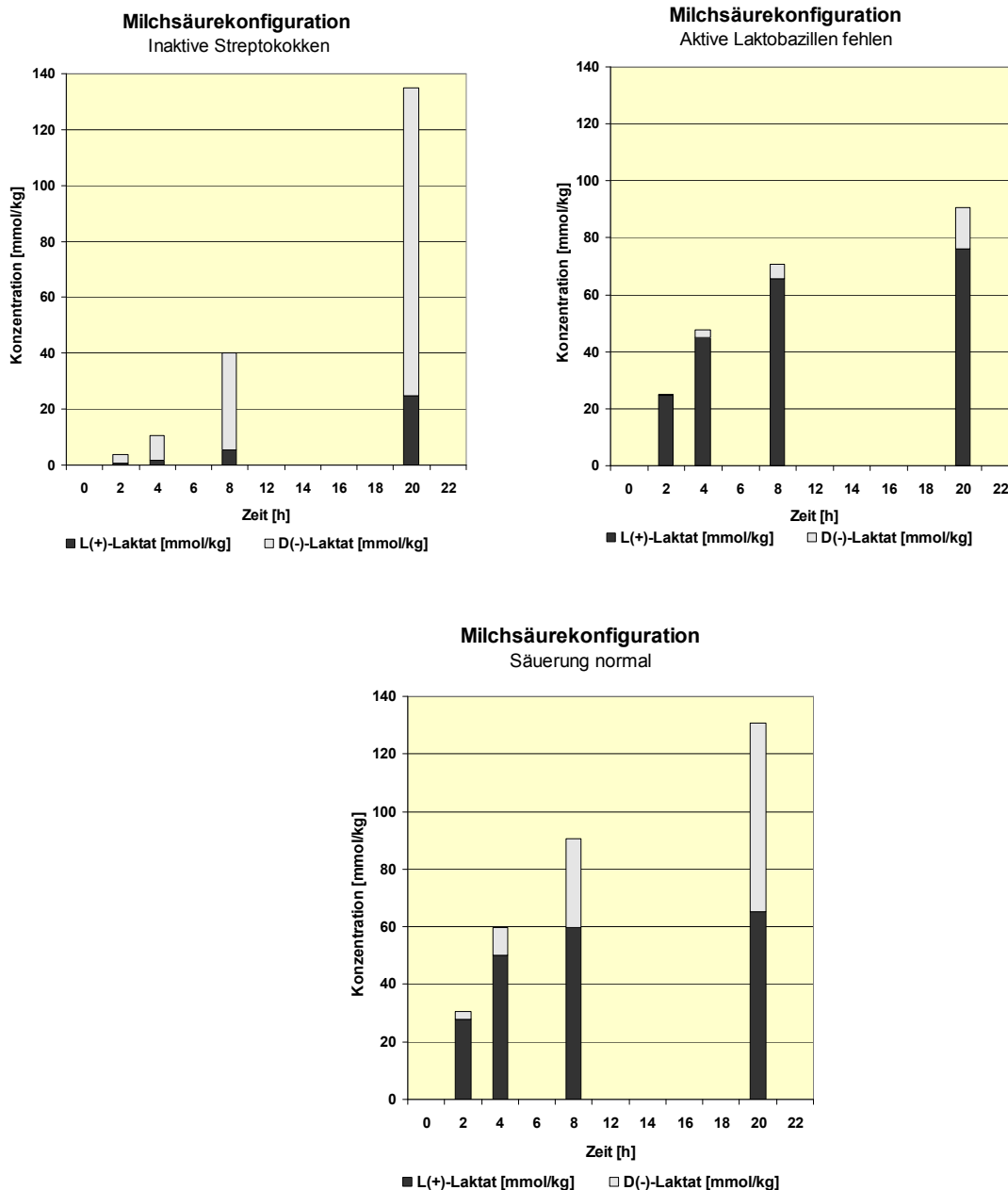


Abbildung 4: **Verlauf der Milchsäuregärung im Emmentalerkäse in Abhängigkeit vom Zustand der Kultur.**

In pasteurisierten Halbhartkäsen sind es die mesophile Streptokokken, welche den Milchzuckerabbau gewährleisten sollen. Die Geschwindigkeit ist sehr stark von der Käsesorte abhängig.

Neben den klassischen Käsen, mit vollständigem Milchzuckerabbau, gibt es auch solche mit nur geringer Säuerung oder z.T. auch nur mit Säurezusatz (Mozarella, Hüttenkäse, Frischkäse u.ä.).

Werden einzig thermophile Streptokokken eingesetzt, steigt der Gehalt an Milchsäure im Käse auf maximal 80 mmol/kg. Es handelt sich dabei ausschliesslich um L-Lactat.

Allfällig vorhandenes D-Lactat wäre die Folge einer Lb-Kontamination aus der Rohmilch.

Mit Blick auf die thermophilen Lactobazillen werden heute beim Emmentaler und Sprinz sogenannte „**Lactis-Verhältnisse**“ angestrebt. Wir verstehen darunter das Vorherrschen von „Lb lactis“ (heute *Lb delbrueckii* ss *lactis*) gegenüber *Lb. helveticus*, erkennbar am höheren Anteil von D-Lactat. (*Lb. helveticus* bildet im Unterschied zu *Lb delbrueckii* neben D-Lacat auch L-Lactat; vgl. Tab. 1)

Ein *Lb casei*-Einsatz beeinflusst in der Regel weder den Milchsäuregehalt noch die Konfiguration im grünen Käse. Dies wegen der geringen Säurebildung der FH-Lb.

3.9 Enzyme und Metaboliten der Milchsäuregärung und deren Nachweisverfahren

Lactose

Im Rahmen der Käsebereitung ist ein Lactose-Nachweis nicht üblich und auch nicht sinnvoll (siehe Kapitel 3.5). Es existieren chemische und enzymatische Nachweisverfahren. Bei ALP wird der Nachweis enzymatisch vorgenommen.

$$100 \text{ mmol Lactose /kg Käse} = 36 \text{ g/kg} \quad (= 3.6\%)$$

Aus 1 mol Lactose entstehen bei homofermentativer Milchsäuregärung 4 mol Milchsäure. Die molare Masse („Molekulargewicht“) von Lactosehydrat ist 360 g/mol, diejenige von Lactat 90 g/mol.

β-Galaktosidase

Dieses Enzym spaltet die Lactose in Glucose und Galactose (es spaltet die β-glycosidische Bindung). Die Aktivität wird in internationalen Einheiten (IE oder IU) angegeben. ALP ist in der Lage, diese Analyse auszuführen. Der käsetechnologische Nutzen dieser Analyse ist allerdings begrenzt.

Definition IE: Eine IE ist die Enzymaktivität, die pro Minute unter optimalen (definierten) Bedingungen 1 μmol Substrat umsetzt.

Galactose

Glucose ist im Käse höchstens in ganz kleinen Mengen vorhanden und Lactose nur bei völlig ungenügender Milchsäuregärung. Ein Nachweis von Laktose und Glucose ist demnach höchstens von wissenschaftlichem Interesse. Wenn also nicht Hemmstoffe eine totale Verhinderung der Milchsäuregärung im Käse bewirken, ist Galactose wahrscheinlich der einzige Zucker, der nach 24 Stunden noch vorliegen kann.

Der Galactose-Nachweis gehört im Enzymlabor zur Routine. Bei offensichtlich ungenügender Milchsäuregärung ist es angebracht, erst die Verhältnisse zu normalisieren und dann - falls noch erforderlich - den Galactose-Nachweis machen zu lassen. Es existiert übrigens auch ein Praxistest, die Bräunungsprüfung im Bachofen.

Hohe Galactose-Konzentrationen im 24-stündigen Käse können bedingt sein durch:

- Ungenügende Aktivität der Milchsäurebakterien (v.a. Phagen)
- Hemmstoffe
- Extreme Temperaturen (hohe Brenn- und Ausziehtemperatur)
- Zu starkes Abkühlen in der Randzone, bei Halbhartkäse auch durch zu tiefe Abtropftemperatur

$$100 \text{ mmol Galactose/kg Käse} = 18 \text{ g /kg} \quad (= 1.8\%)$$

Aus 1 mol Galactose entstehen bei homofermentativer Milchsäuregärung 2 mol Milchsäure. Die molare Masse von Galactose ist 180, diejenige von Lactat 90 g/mol.

Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Die LDH katalysiert die Reaktion Pyruvat (Brenztraubensäure) zu Lactat. Diese Analyse kann bei ALP ausgeführt werden.

Der Nutzen ist jedoch bescheiden, weil kaum ein Zusammenhang zwischen den Analyseresultaten und den qualitätsrelevanten Grössen im Käse besteht.

Lactat (Milchsäure)

Streng genommen ist Lactat das Anion der Milchsäure wie es in Salzen vorliegt. Da das Pufferungsmaximum (\rightarrow freie Säure/Salz = 1/1) der Milchsäure bei pH 3.1 liegt, ist beim pH-Wert von Käse der grösste Teil der Säure als Lactat vorhanden; v.a. als Ca-Lactat sowie ionisch gebunden an die Aminogruppen der basischen Aminosäurereste des Caseins (\rightarrow Pufferwirkung des Caseins!).

Der Nachweis der Milchsäure erfolgt durch verschiedene, indirekte und direkte Methoden. Jede Methoden hat ihre Vor- und Nachteile.

Indirekte Verfahren

Titration, Bestimmung des Säuregrades

- Schnelle, billige Methode; dient für rasche Groborientierung (vor allem in wässrigen Lösungen)
- Andere Säuren neben der Milchsäure werden auch miterfasst.
- Die sauren Gruppen der Proteine werden auch titriert (man beachte z.B. den Säuregrad frischer Milch ohne Milchsäurebildung!)

- Die Titration einer Käseemulsion gegen Phenolphthalein ist wegen des kaum erkennbaren Farbumschlagpunktes fast nicht machbar. Die potentiometrische Titration auf einen bestimmten pH-Wert ist schon viel besser.

pH-Messung

- Im Vergleich zur Milchsäurebestimmung ist die pH-Messung viel rascher und kostengünstiger.
- Im Käse ist ein pH-Wert nie eine absolute Grösse. Das unterschiedliche Pufferungsvermögen der Käse relativiert die Werte.
- Der im 24-stündigen Käse interessante Messbereich ist relativ schmal, d.h. der Aussagewert ist begrenzt.

Der grösste Nutzen der pH-Messung liegt darin, den Säuerungsverlauf im Käse (unter den üblicherweise gut standardisierten Fabrikationsbedingungen) vor Ort zu überprüfen, um ggf. sofort Korrekturmassnahmen ergreifen zu können.

Direkte Methoden

Chemische oder enzymatische Bestimmung der Milchsäure

- Bei ALP wird routinemässig die enzymatische Methode ausgeführt.
- Der Hauptvorteil liegt darin, dass die beiden Isomere L(+) und D(-) bestimmt werden und einen Rückschluss auf die Aktivität der Kokken respektive der Laktobazillen erlauben.
- Die verbesserte Aussage muss durch deutlich höhere Analysenkosten erkaufte werden.

100 mmol Milchsäure/kg Käse = 9 g /kg (= 0.9%)

3.10 Die durchschnittlichen Milchsäuregehalte in verschiedenen Käsesorten

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der 24-stündigen Käseproben des Milchjahres 1997/98 aufgeführt. Die Angaben für Past-Tilsiter und Walliser Raclette stammen von 1992. In der letzten Spalte finden sich Angaben zu handelsreifen Käsen, wobei die mit einem Stern bezeichneten Daten aus Gärungsverlaufsstudien stammen (nur Käse von guter Qualität). Die übrigen Zahlen stammen aus kleinen Serien, die zu informativem Zweck analysiert wurden.

Soweit die aufgeführten Käse ähnlich Anfangswerte (Gesamt-MS) aufweisen, erklären sich die Unterschiede im Rest-Milchsäuregehalt der reifen Käsen durch einen unterschiedlichen Milchsäureabbau in der Rinde sowie eine mehr oder weniger starke Protonsäuregärung.

Tabelle 2: Milchsäuregehalt verschiedener Käsesorten

Käsesorte	N	Gesamt-MS 24 h		L(+)-Lactat 24 h		D(-)-Lactat 24 h		Rest-MS handelsreif X
		x	s	x	s	x	s	
Emmentaler	1602	125	4	63	5	62	6	39.5 *
Gruyère	682	145	7	66	10	79	12	106.6 *
Sbrinz	112	142	6	62	9	80	9	147.6 *
Rohtilsiter	82	137	6	94	16	43	18	48.3 *
Past-Tilsiter	37	156	21	145	28	11	12	101.9
Appenzeller	335	131	7	85	18	47	18	44.9 *
¼ fetter App.	15	163	7	80	4	83	7	
Raclette past.	10	132	16	127	23	5	11	110.4
Walliser Racl.	53	133	17	98	32	35	28	72.7

Im Emmentaler und im Sbrinz, wo fast ausnahmslos "Lactis-Verhältnisse" (siehe Kapitel 3.8) angestrebt werden und auch anzutreffen sind, sind die Verhältnisse ziemlich einheitlich. Auch beim Gruyère ist im Vergleich zu 1992 ein verstärkter Einsatz von Kulturen mit *Lb delbrueckii* unverkennbar

Milchzuckerabbau → Milchsäure

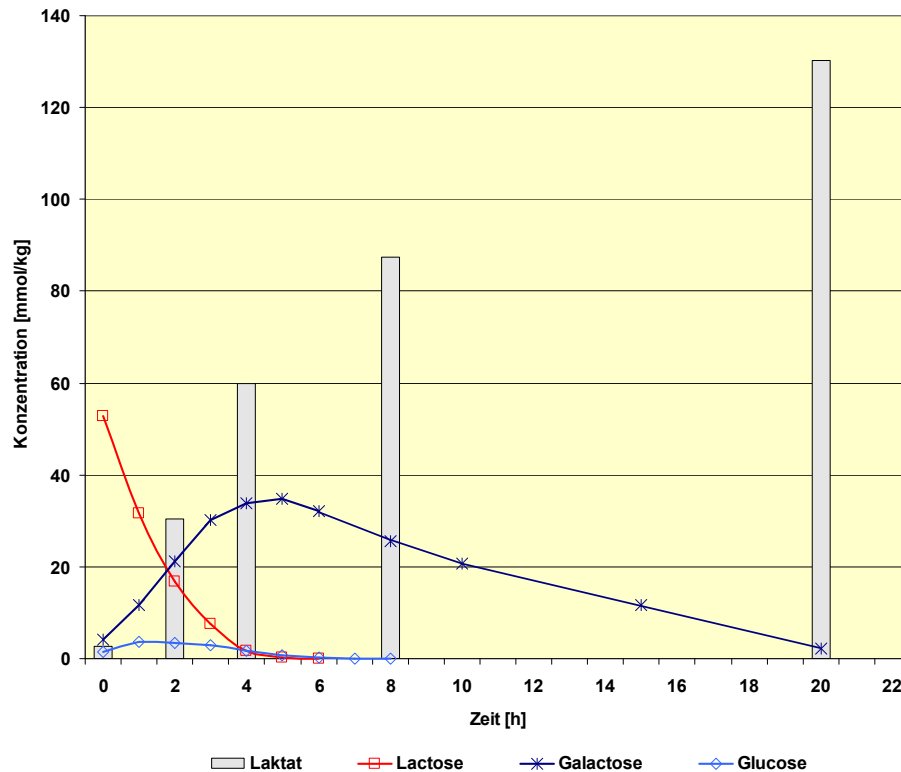


Abbildung 5: Lactosespaltung und Milchsäurebildung im Emmentalerkäse

Früher wurde bei Milchsäurewerten unter einer bestimmten Limite jeweils die Galactose bestimmt. Beim Emmentaler lag der Gehalt bei etwa 5% aller Proben unterhalb von 4 mmol/kg. Heute sind wir der Auffassung, dass die übrigen Parameter (Wasserzusatz, Sondenwert, Wassergehalt und pH-Wert) als Interpretationshilfe des Milchsäuregehaltes miteinbezogen werden sollen. Eine Galactose-Bestimmung erübrigt sich damit in den meisten Fällen.

Stöchiometrisch (1mol Lactose → 4mol Lactat) würden aus der Lactose, wie sie im 0-stündigen Käse vorhandenen ist, etwa 210 mmol Lactat entstehen. Der Grund, weshalb die Gärungsbilanz nicht aufgeht, liegt darin, dass vom "Käse 0 Std" noch etwa 10% des Käsegewichtes durch Molkeentzug verloren geht. Das entspricht etwa 30% der Lactose. Ferner liegt nach 24 Stunden noch ein Milchsäurepotential von etwa 10 mmol in Form verschiedener Metaboliten vor.

3.11 Die technologische Bedeutung der Milchsäure im Käse

Konservierung

Die Bildung von Milchsäure bewirkt eine pH-Absenkung. Durch diese werden proteolytische Bakterien (Fäulniserreger) in ihrem Wachstum gehemmt. Die Hemmung bezieht sich vor allem auf Enterobakterien und *Cl sporogenes*, den Putrifikus-Verursacher. Letzterer wird durch die nicht dissoziierte Milchsäure weitgehend unterdrückt.

Entsirtung (Wasserentzug)

Die Entsirtung des Käsekorns ist weitgehend durch die Säurebildung bedingt. Rasche Anfangssäuerung bewirkt eine grössere Molkenabgabe und führt dadurch zu einem festeren Käseteig.

Teigbeeinflussung

Der Milchsäuregehalt beeinflusst auch die Teigstruktur. Die nicht dissoziierte Milchsäure entzieht dem Käsegerüst (para-Casein-Ca-Phosphat-Komplex) das Calcium. Dadurch verliert das Caseingerüst an Festigkeit.

- zu viel Milchsäure: übersauer, bröckelig, kurz (allgemein eher weich)
- zu wenig Milchsäure: zäh, fest, hart, weiss

Substrat für spätere Gärungen

Dies betrifft in erster Linie die Propionsäuregärung, speziell beim Emmentaler. Doch auch bei Käsen mit Schimmel- oder Schmierereifung ist die Milchsäure von Bedeutung. Schimmelpilze und die Oberflächenflora bauen die Milchsäure ab und lösen dadurch eine Migration der Milchsäure aus, d.h. sie wandert von innen nach aussen. Als Folge davon steigt der pH-Wert im Käse, was die Proteolyse beschleunigt.

Einflussfaktoren für den maximalen Milchsäuregehalt im Käse

- Wassergehalt des Käses
- Milchzucker-Konzentration (Ultrafiltration, Wasserzusatz, Bruchwaschen usw.)
- Fabrikationsparameter (Ausdickungsgrad, Synärese, Bruchbereitung)
- Zeitlicher Verlauf der Milchsäuregärung

4. Propionsäuregärung

Die Propionsäuregärung ist vor allem als zweite typische Gärung des Emmentalers bekannt. In andern Käsen, wie z.B. Sbrinz oder auch Gruyère, ist die Propionsäuregärung ein sehr gravierender Fehler. Er ist fast gleichbedeutend mit Nachgärung. Anders ausgedrückt: Die Nachgärung im Sbrinz ist zum weitaus grössten Teil die Folge einer Propionsäuregärung.

Für die Herstellung von Emmentaler werden bekanntlich Kulturen von *Propionibacterium freudenreichii* verwendet. Wenn die Käse bei Temperaturen von 20 – 24 °C gelagert werden, beginnt die Propionsäuregärung etwa 30 Tage nach der Herstellung und dauert ca. 7 Wochen. Ist der Käse konsumreif, so finden sich normalerweise etwa 10^8 – 10^9 Propionsäurebakterien pro g Käse.

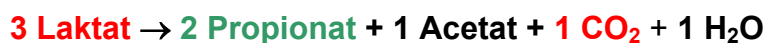
4.1 Metabolismus der Propionsäurebakterien

Bei der klassischen Propionsäuregärung verstoffwechseln die Propionsäurebakterien Milchsäure zu Propionsäure, Essigsäure und Kohlendioxid. Der Metabolismus im Käse ist aber komplexer. Propionsäurebakterien können nämlich die Milchsäure auf verschiedenen Wegen abbauen.

In der **Gegenwart von Asparaginsäure** ist die Fermentation von Milchsäure an diejenige von Asparaginsäure gekoppelt. Dabei entsteht keine Propionsäure, aber Essigsäure, Kohlendioxid und Succinat:

Die wichtigsten Wege des Laktatabbaus durch Propionsäurebakterien

(A) Klassische Laktatfermentation:

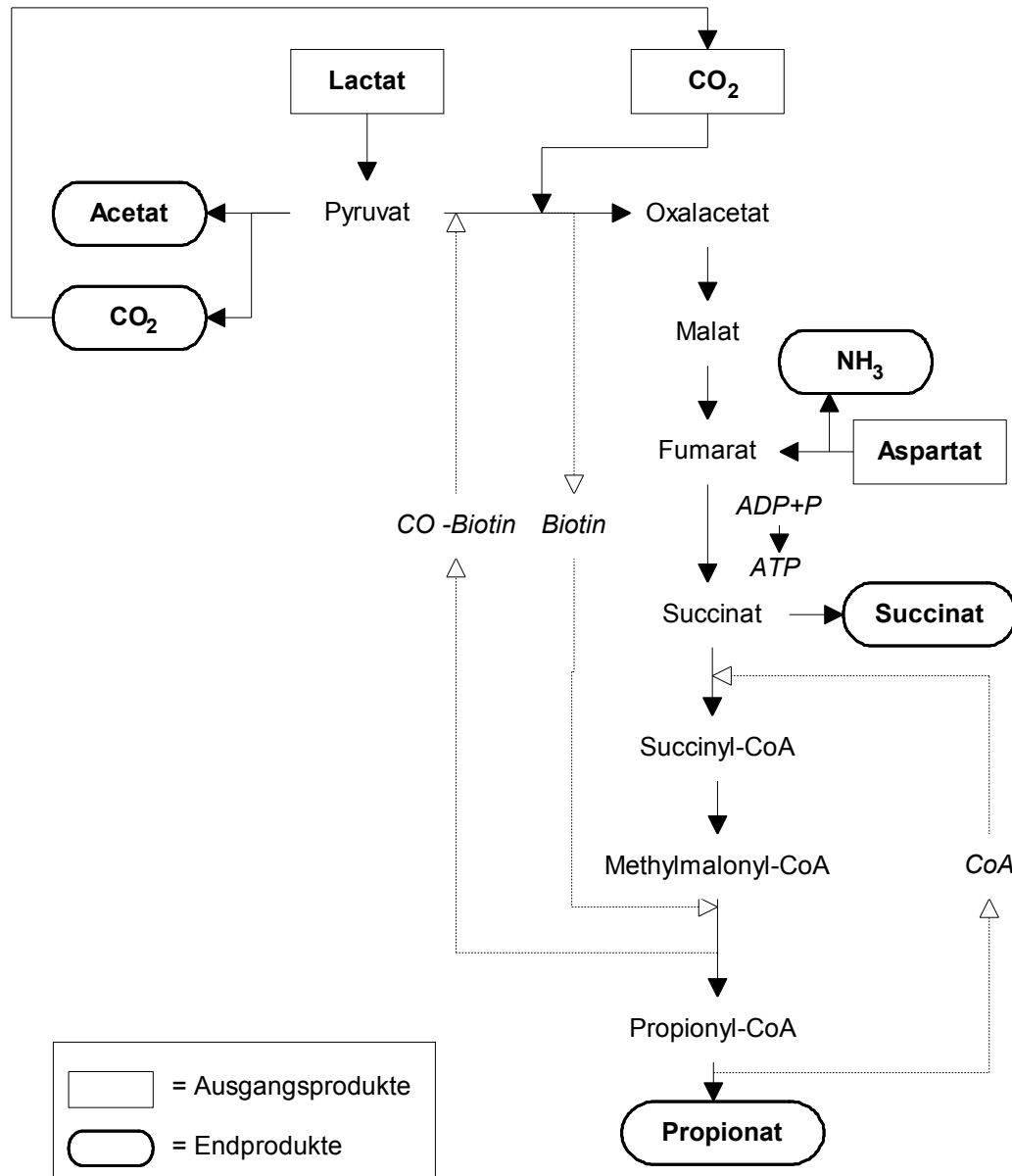


(B) Succinatbildung während der Laktatfermentation über den Aspartat-Metabolismus (Desaminierung von Aspartat):



Aspartat wird dabei zu Ammoniak und Fumarat gespalten, letzteres wird anschliessend zu Succinat (Bernsteinsäure) reduziert (→ Abb. 6).

Abbildung 6: Gärschema von *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*



Beachte: Beim Aspartat-Metabolismus entsteht beim Verbrauch von gleich viel Milchsäure 3 x mehr Kohlendioxid als in der klassischen Propionsäuregärung!!

Propionsäurebakterien können in ihrer Fähigkeit, Asparaginsäure abzubauen, stark variieren (Abb. 7). Im Gegensatz zur Kultur Prop 96 hat die Prop 01 eine hohe Aspartase-Aktivität. Stämme mit einer hohen Aspartase-Aktivität bewirken im Käse ein intensiveres Aroma und stärkere Lochung. Abhängig von der Fähigkeit der eingesetzten P-Kultur, Asparaginsäure zu fermentieren oder nicht, entstehen folglich recht unterschiedliche Produkte.

Stämme mit einer hohen Aspartase-Aktivität bergen allerdings auch ein höheres Nachgärungsrisiko, besonders bei gleichzeitig starker Proteolyse „in die Tiefe“ (Bildung freier Asparaginsäure).

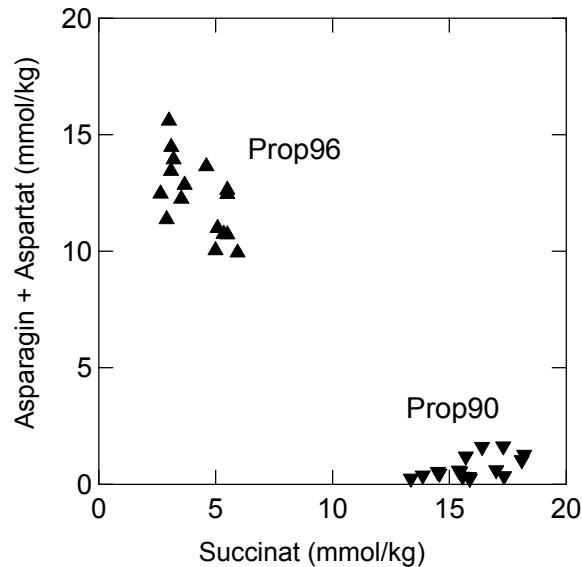


Abbildung: 7: Unterschiedlicher Aspartat-Metabolismus zweier Propionsäurebakterien-Kulturen in Emmentaler von 6 Monaten (Prop96: schwacher Aspartat-abbau; Prop90: starker Aspartatabbau)

Weitere Substrate

Milchsäure und Asparaginsäure sind nicht einzigen Substrate, welche verstoffwechselt werden. Zucker werden im Allgemeinen bevorzugt fermentiert. Die klassische Unterscheidung verschiedener Spezies basiert unter anderem auf der Fähigkeit, bestimmte Zucker vergären zu können. Weitere Substrate der Propionsäurebakterien sind div. (Hydr)oxycarbonsäuren wie Pyruvat, Malat (Äpfelsäure) etc.

4.2 Merkmale der Propionsäurebakterien

Morphologische Eigenschaften und Milieuansprüche

- Kurzstäbchen
- Katalase- und grampositiv
- Ziemlich strikt anaerob

Temperatursanspruch

Minimum 4-10 °C, Optimum 20-**30** °C, Maximum 37-45 °C
(beim Maximum ist Wachstum, nicht nur überleben zu verstehen)

Die optimale Wachstumstemperatur meist um 30 °C. Versuche von ALP haben aber gezeigt, dass sich Propionsäurebakterien im Käse auch bei Temperaturen 14°C relativ gut entwickeln. Dies konnte nicht nur für die beiden Kulturen Prop 01 und Prop 96 nachgewiesen werden, sondern für viele andere Stämme auch. Es scheint sogar sehr wahrscheinlich, dass sämtliche Propionsäurebakterien diese Fähigkeit besitzen.

ALP liess Versuchskäse bei konstanten tiefen Temperaturen (14 bzw. 16 °C) reifen, also ohne Gärraumverweilzeit. Die Käse wiesen alle eine Lochung auf; die Reifedauer

war jedoch länger als üblich. Bei 14 °C dauerte es rund 25 Wochen bis die Lochbildung abgeschlossen war, bei 16°C rund 16 Wochen. Zum Vergleich: Der normaler Gärraum Aufenthalt liegt bei 6-8 Wochen. Auch bei den sensorischen Eigenschaften waren leichte Unterschiede auszumachen, die jedoch nicht negativ waren. Es kann somit auch ohne Gärraum Aufenthalt, mit entsprechender Anpassung der Reifezeit, ein Grosslochkäse guter Qualität hergestellt werden.

Generationszeit

Unter günstigen Bedingungen beträgt sie im Käse 10-35 Stunden. Unter Laborbedingungen geht die Entwicklung schneller, jedoch immer noch langsam. Generationszeiten von 3-8 Stunden sind die Regel.

Das langsame Wachstum ist auch für den Nachweis von Belang. Um sichtbare Kolonien zu erhalten sind 5-7 Tage Inkubation erforderlich (Labornachweis = 10 Tage). Die Bebrütungsdauer für das Züchten der Versandkultur beträgt im Fermenter 4 Tage, in den Flaschen 5 Tage.

pH-Ansprüche	Optimum	6.8-7.2
	Minimum	4.6-5.1
	Maximum	8.0-8.5 (milchwirtschaftlich unbedeutend)

Beim Emmentaler ist man also bestrebt, den pH-Wert nicht unter 5.2 sinken zu lassen.

Temperaturresistenz

Propionsäurebakterien sind ziemlich resistent gegenüber höheren Temperaturen. Für kurze Einwirkungszeiten beginnt die Schädigung etwa bei 58 °C. Die Empfindlichkeit ist stammspezifisch. Wird die Einwirkungszeit verlängert, wirken bereits tiefere Temperaturen dezimierend.

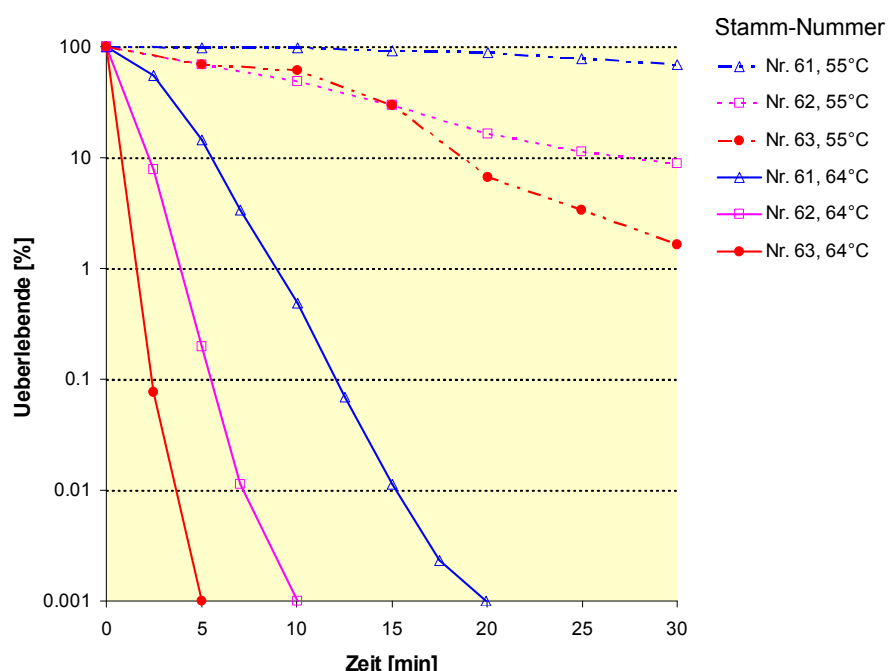


Abbildung 8: Hitzeempfindlichkeit dreier Stämme der früheren Standard-P-Kultur

Kochsalzempfindlichkeit

Eine Kochsalzkonzentration im Wasser von 5 g/Liter bewirkt bereits eine Verzögerung des Wachstums, 50 g verhindern dieses praktisch vollständig. Das bedeutet, dass in Käsen mit einem Wassergehalt von 35 – 40% ein absoluter Salzgehalt von 17-20 g/kg ausreichen würde, um das P-Wachstum zu unterbinden. Allerdings ist im Käse weder das Wasser noch das Kochsalz gleichmässig verteilt, was im Hinblick auf eine Propionsäuregärung entscheidend ist.

Kupferempfindlichkeit

Steigende Kupferkonzentrationen wirken sich auf das Wachstum von Mikroorganismen hemmend aus. So auch auf die Propionsäurebakterien.

Der übliche Kupfergehalt im Käse, hergestellt im Kupferkessi, beträgt etwa 120 - 160 $\mu\text{mol/kg}$ (etwa 10 ppm = 10 mg/kg). Mit der Verarbeitung zunehmend grösserer Milchmengen (grössere Kessi) ist der Kupfergehalt von Emmentaler und Gruyère tendenziell abnehmend.

Farbstoffbildung (Pigmentbildung)

Alle Propionsäurebakterien bilden Pigmente. Die Farben reichen von hellbeige bis deutlich rotbraun. Für die Auswahl der Stämme für P-Kulturen wird nicht zuletzt die Pigmentbildung berücksichtigt. Alle eingesetzten Stämme bilden bei normalem Einsatz cremefarbene, im Käse nicht sichtbare Pigmente. Bei sehr kleinen Impfmengen können im Käse aber trotzdem sichtbare Kolonien entstehen!

4.3 Angaben im Zusammenhang mit der Emmentaler-Herstellung

Die Propionsäuregärung im Käse ist von vielen Faktoren abhängig. Wesentlich sind vor allem der Gehalt an Propionsäurebakterien in der Milch, der P-Kultur-Zusatz, die pH-Verhältnisse, das Angebot an löslichen N-Verbindungen und das Vorhandensein von *Lb casei* oder anderen FH-Laktobazillen.

Normalerweise sind in der Rohmilch Keimzahlen von 0-50, seltener bis 200 Propionsäurebakterien pro ml zu erwarten. Solche Stämme sind natürlich nicht definiert und können zu Problemen Anlass geben, obwohl in der Milch kaum eine Vermehrung stattfindet wegen der langen Generationsdauer und des Fehlens löslicher N-Verbindungen.

Die P-Kulturen

Bis am 1.11.1996 bot ALP nur eine P-Kultur an. Diese sei hier Standard-P-Kultur genannt. Sie bestand aus 6 Stämmen von *Propionibacterium freudenreichii* und wird heute in dieser Form nicht mehr angeboten.

Zur Zeit werden drei P-Kulturen angeboten und der Käser hat die Wahl, wie dies auch bei den Milchsäurebakterien der Fall ist. Die beiden Kulturen **Prop 96** und **Prop 97** gelten als sehr ähnlich. Von der aspartase-positiven **Prop 01** (sie besteht aus 4 Stämmen der Standard-P-Kultur) wird eine etwas intensivere Propionsäuregärung erwartet.

Damit eine P-Kultur für die Praxis in Frage kommt, muss sie folgende Mindestanforderungen erfüllen.

- Keine dunkle Pigmentbildung
- Genügende Temperaturreistenz
- Genügendes Gärvermögen (Menge der flüchtigen Fettsäuren, hoher Propionsäureanteil)

Die Verwendung einer P-Kultur ist bei unserer Emmentalerfabrikation unbedingt erforderlich. Es hat sich gezeigt, dass zu kleine Impfmengen nicht ratsam sind (Tab. 3).

Tabelle 3: Keimzahlen der Propionsäurebakterien in Milch und Emmentaler

Milch ohne P-Kultur	< 50 pro ml
P-Kultur	5-15 Milliarden/ml (ca. 5 Tropfen/1000 l Milch)
Milch mit P-Kultur	1500 – 3500 pro ml
Käsebruch	das 5 -10-fache der Kessimilch
Käse 0 h	± starke Reduktion (Brenntemp.)
Käse 24 h	1'000-10'000 pro ml
Käse 14 Tage (Gärkeller)	ca. alle 20 h eine Verdoppelung
Käse 5 Wochen (Setzen)	100 Millionen pro g
Käse 9 Wochen (Lagerkeller)	einige 100 Millionen pro g

Reife Emmentaler enthalten noch monatelang Propionsäurebakterien in der Höhe von mehreren 100 Millionen.

Beeinflussung der Propionsäuregärung

- Milchqualität (geringe P-Keimzahl, wenig Fremdkeime mit geringer Proteolyse als Folge)
- P-Kultur-Menge (relativ risikoreicher Lenkungsparameter)
- Bruchkorngrosse (passive Anreicherung im Caseingerüst)
- Brenn- und Ausziehtemperatur (speziell im in Bezug auf das Käsegewicht)
- Milchsäuregehalt und pH-Wert (tiefe pH-Werte erschweren den Start)
- Kupfergehalt (nicht beliebig beeinflussbar)
- Salzgehalt (beim Emmentaler von relativ geringer Bedeutung, weil der Salzgehalt in der Regel nur 4-6 g/kg beträgt)
- Kellerklima (Temperatur fördert die Gärung, Feuchte die Gasdiffusion)

Milchsäuregehalt von Emmentaler zonal in verschiedenem Alter

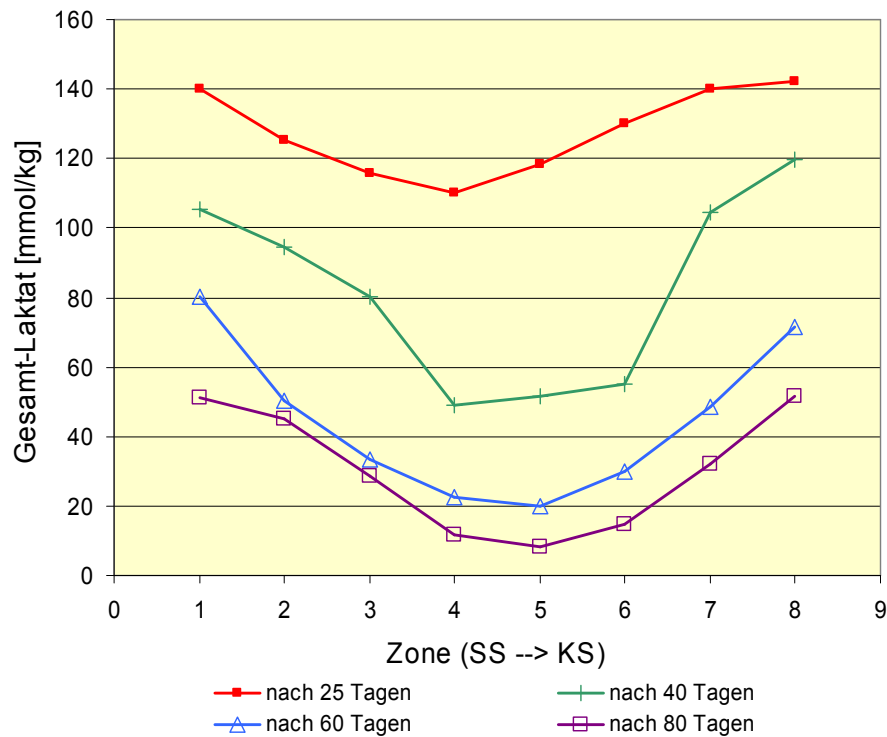


Abbildung 9: **Milchsäureabbau als Folge der Propionsäuregärung im Emmentaler**
SS = Strebelseite (beim Abfüllen oben); KS = Kesselseite (beim Abfüllen unten)

Man beachte, dass in der Randzone und unter dem Narben der Wassergehalt geringer und der Salzgehalt höher ist als in den übrigen Zonen. Weil der Salzgehalt bezogen auf den Wassergehalt für das Gärvermögen der Propionsäurebakterien entscheidend ist, wirkt sich diese Situation doppelt aus. In der Folge bleibt der Milchsäuregehalt in der Aussenzone höher als im Zentrum (Abb. 9).

Bei geschmierten Käsen ist die Situation bezüglich der "Restmilchsäure" anders. Schmiereorganismen zehren Milchsäure und lassen diese vom Käsezentrum nach der Randzone fließen. Die Wassergehaltsunterschiede Rand/Zentrum sind bei diesen Käsen auch viel kleiner als beim Emmentaler.

4.4 Die Bedeutung der Endprodukte der Propionsäuregärung

4.4.1 Flüchtige Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure)

Die Propionsäure mit ihrem süsslichen Geschmack ist für das typische Emmentaler-Aroma eine Hauptkomponente.

Andere (wasserdampflichtige) Fettsäuren tragen zum Geschmack bei, teilweise in positivem oder auch negativem Sinn. Ameisen- und Essigsäure wirken etwas stechend, Buttersäure und Capronsäure sind sehr geschmacksaktiv, aber schon in relativ kleinen Konzentrationen unangenehm (Capronsäure → Ranzigkeit).

4.4.2 Lochbildung durch CO₂ - Löslichkeit von CO₂ in Wasser

Die Löslichkeit eines Gases ist aus der Sicht einer möglichen Lochbildung der zentralste Parameter. H₂ und CO₂ verhalten sich ganz verschieden. H₂ ist absolut unlöslich in Wasser. Schon geringe Mengen verursachen Lochbildung. Die Löslichkeit von CO₂ ist dagegen recht gut und – wie bei jedem Gas - temperaturabhängig (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: **Löslichkeit von CO₂ in der wässrigen Phase des Käseteigs.**

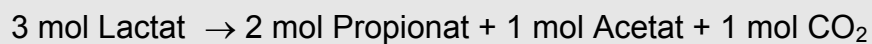
Beispiel: Emmentaler von 100 kg Gewicht und 360 g /kg Wasser

Temperatur	Löslichkeit in Wasser (Sättigungsgrenze) [ml CO ₂ / Liter]	CO ₂ -Menge beim Erreichen der Sättigungsgrenze im Käse von 100 kg [Liter CO ₂ pro Laib à 100kg]
0 °C	1713	61.7
10 °C	1194	43.0
15 °C	1019	36.7
20 °C	878	31.6
25 °C	759	27.3

Bis zur Sättigung eines Käselais von 100 kg braucht es bei 22-23 °C also rund 30 Liter CO₂.

Das CO₂-Potential aus der Propionsäuregärung

Die maximal mögliche Menge an gebildetem CO₂ folgt aus dem Gärschema:



- Der mittlere GMS-Gehalt im Käse liegt bei 129 mmol/kg. Daraus ergeben sich beim kompletten Abbau 43 mmol CO₂ pro kg Käse.
- 1 mol irgendeines Gases weist bei Normalbedingungen (0 °C) ein Volumen von 22.4 Litern auf.
- In einem 100 kg schweren Käse sind 100 x 43 mmol = 4.3 mol vorhanden, diese entsprechen 96.3 Litern (bei 0°C.)
- Bei 22 °C ist das Volumen grösser als bei Normalbedingungen (= 0 °C), nämlich im Verhältnis "295 K dividiert durch 273 K". Dies ergibt 104.1 Liter CO₂.

Wieviel CO₂ tatsächlich aus der Propionsäuregärung gebildet worden ist, lässt sich aus dem Ergebnis des Gaschromatogrammes und dem Propionsäureanteil in analoger Art und Weise berechnen.

Um das Ganze noch etwas komplizierter zu machen, muss festgehalten werden, dass es ausser der klassischen Propionsäuregärung **noch andere CO₂-Quellen** gibt:

- Die heute wichtigste dieser weiteren CO₂-Quellen ist sicher der heterofermentative Abbau des Citrates durch *Lb casei* oder anderer FH-Lb.
- Der Umfang aus Gärungen von Fremdkeimen und die mögliche Decarboxylierung der Aminosäuren ist wenig bekannt; in früheren Erörterungen hat man mit etwa 10-15 Litern CO₂ pro 100 kg Käse als Maximum gerechnet.
- Eine weitere Möglichkeit der CO₂-Produktion besteht im eingangs dieses Kapitels erwähnten Aspartatabbau. Dieser erfolgt zusammen mit Milchsäure und es entsteht dabei mehr CO₂ als beim „reinen“ Milchsäureabbau der Propionsäuregärung.

Aus Vergleichen von Emmentaler und Gruyère schätzt man, dass vom zusätzlichen CO₂ -Potential von etwa 7 mmol (auf 100 kg Käse etwa 15 Liter) tatsächlich nur etwa die Hälfte produziert wird.

Die **Produktion von CO₂ ist deutlich grösser als das Lochvolumen** und die in der wässrigen Phase des Käses lösliche CO₂-Menge. Das heisst, die Diffusion von CO₂ durch die Rinde ist erheblich und kann bei der Herstellung kleinformatiger Grosslochkäse gewisse Schwierigkeiten mit der Lochung bereiten.

Von entscheidender Bedeutung sind natürlich auch die Teigeigenschaften. Der Teig muss elastisch sein, um so viel Gas in Form von Löchern aufnehmen zu können. Beim Emmtaler bedeutet dies: Nicht zu tiefer pH-Wert und wenig Proteolyse.

4.5 Nachweis einer Propionsäuregärung

Die einfachste Möglichkeit bietet die optische und akustische Kontrolle der Käse, speziell natürlich des Emmentalers. Bei einigermaßen normalem Verhalten besteht eine Abhängigkeit von Laibhöhe, Lochgrösse und Gärungsintensität der Propionsäurebakterien.

Unsicher wird diese Art der Kontrolle erst dann, wenn andere Gärungen die Lochbildung massgebend beeinflussen (z.B. Buttersäuregärung).

Analytisch gibt es verschieden geeignete Methoden:

- eine sehr gute Methode, das Chromatogramm
- eine einigermaßen brauchbare, die Restmilchsäure
- eine heute bei ALP nicht mehr angewandte, die Gasanalyse.

Gasanalyse

Die Analyse selber ist im Prinzip einfach und gut. Das Hauptproblem liegt bei der Gasfassung. Ein nicht 100-%ig dichter Gasballon oder eine ungeschickte Handhabung bei der Fassung führte öfters dazu, dass der Ballon bloss mit Luft gefüllt oder mit Luft verfälscht war. Durch welche Gärung dann beispielsweise nachgewiesener Wasserstoff (H₂) oder entstanden war, liess sich oft nicht mehr sicher erklären.

Restmilchsäure

Vorausgesetzt, dass eine praktisch reine Propionsäuregärung vorliegt handelt, ist diese Analyse brauchbar. Der Restlaktatgehalt zeigt aber nur, dass von einer in etwa bekannten Anfangsmenge noch ein Teil vorhanden ist. Der Abbau und auch die Menge gebildeter flüchtiger Fettsäuren können aus der Differenz berechnet werden. Ferner entspricht die Restmilchsäure dem noch vorhandenen Gärungspotential.

Gaschromatogramm

Ein Gaschromatogramm (GC) der flüchtigen Fettsäure ist heute die sinnvollste und zuverlässigste Methode, weil die einzelnen Fettsäuren ziemlich genau bestimmt werden können. Aus der Menge und dem Verhältnis der flüchtigen Fettsäuren lässt sich die Gärung sicherer ableiten als von den Gasen.

Das Verhältnis Propionsäure zu Essigsäure oder auch die Menge der Ameisensäure sind beim Emmentaler ein gutes Mass, die Aktivität (und Wirkung) der FH-Laktobazillen abzuschätzen: Beispielsweise lässt ein tiefer Ameisensäurewert von ≤ 3 mol% bei gleichzeitig hohem Essigsäurewert (Normbereich 3 Monate: 43-48 mol%) im Vergleich zum Propionsäurewert (Normbereich 3 Monate: 47-52 mol%) auf eine ungenügende Aktivität der FH-Lb schliessen.

Wenn eine Buttersäuregärung als Begleitung einer Propionsäuregärung vorliegt, wird dies im Fettsäurespektrum ebenfalls gut ersichtlich (erhöhter Anteil freier n-Buttersäure).

Doch auch die gaschromatografische Analyse ist nicht ganz ohne Mängel: Wenn z.B. Enterobakterien H_2 produzieren oder grössere CO_2 -Mengen ausserhalb der Propionsäuregärung entstehen, wird dies im GC nicht sichtbar. Hier beginnt die Spekulation.

In Käsen mit geringer Gasproduktion und als Folge davon auch geringer Mengen freier Fettsäuren ist die Interpretation nicht immer einfach. Gläsbildung mit minimalen Propion- oder Buttersäuremengen kommen durchaus vor.

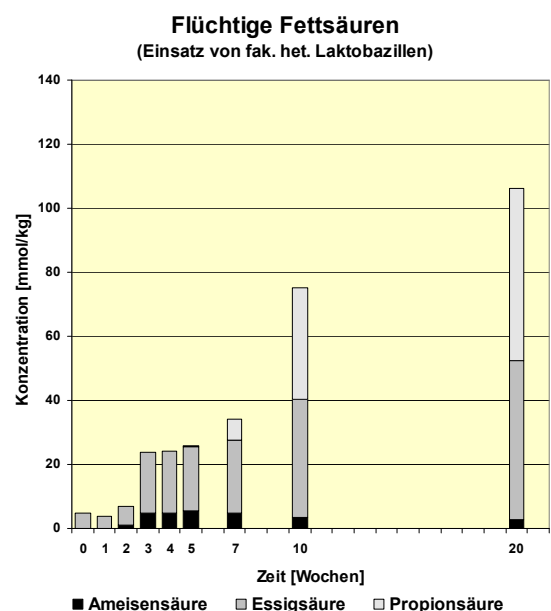
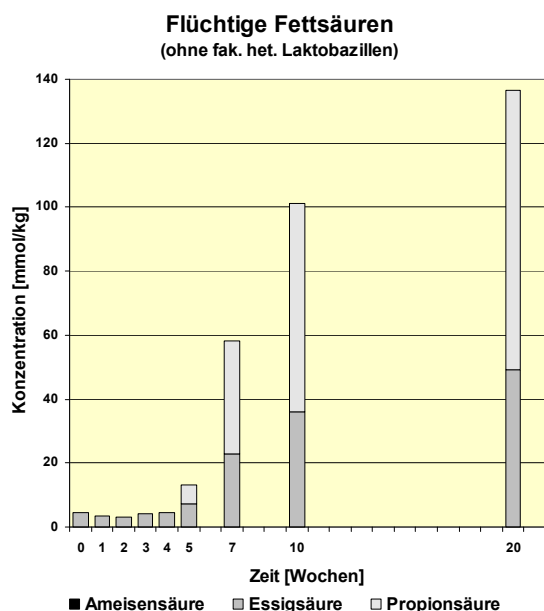


Abbildung 10: **Einfluss der FH-Kulturen auf die Propionsäuregärung im Emmentaler** (Grafik links: ohne FH-Lb, rechts: mit FH-Lb)

Wie die Grafik rechts in Abb. 10 zeigt, werden vor Beginn der Propionsäuregärung bereits 20 - 25 mmol flüchtige Fettsäuren festgestellt. Diese stammen aus dem Citratabbau durch FH-Laktobazillen. Subtrahiert man nun diese Essigsäuremenge von später, d.h. ab dem Beginn der Propionsäuregärung gemessenen Werten, so stimmt das stöchiometrisch zu erwartende Verhältnis von 2 mol Propionsäure auf 1 mol Essigsäure fast perfekt (Abb. 11).

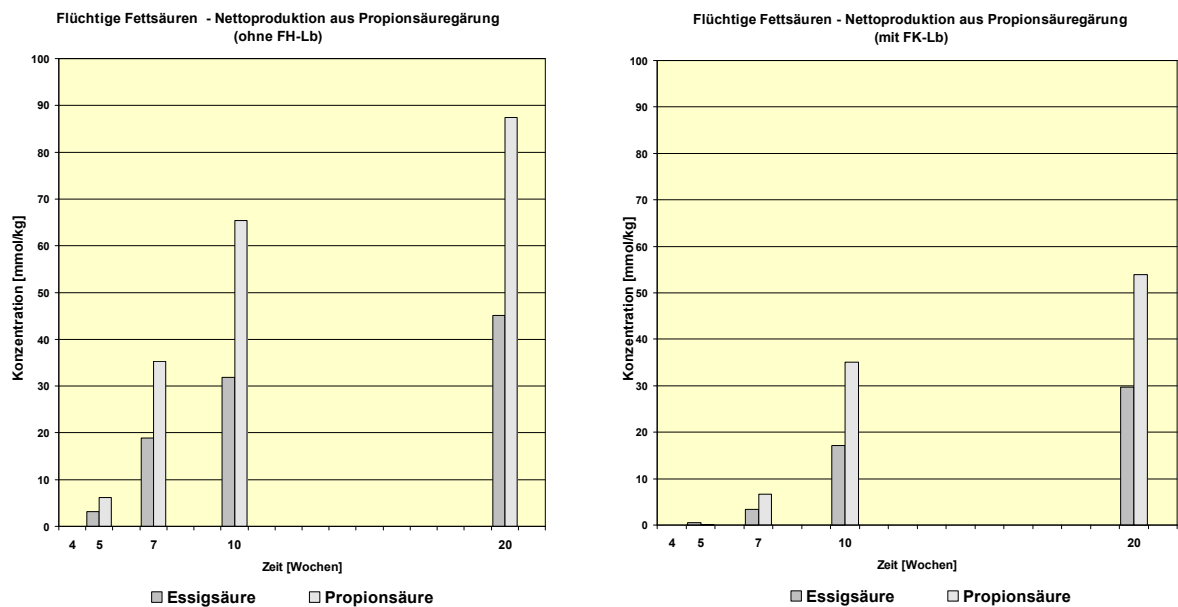
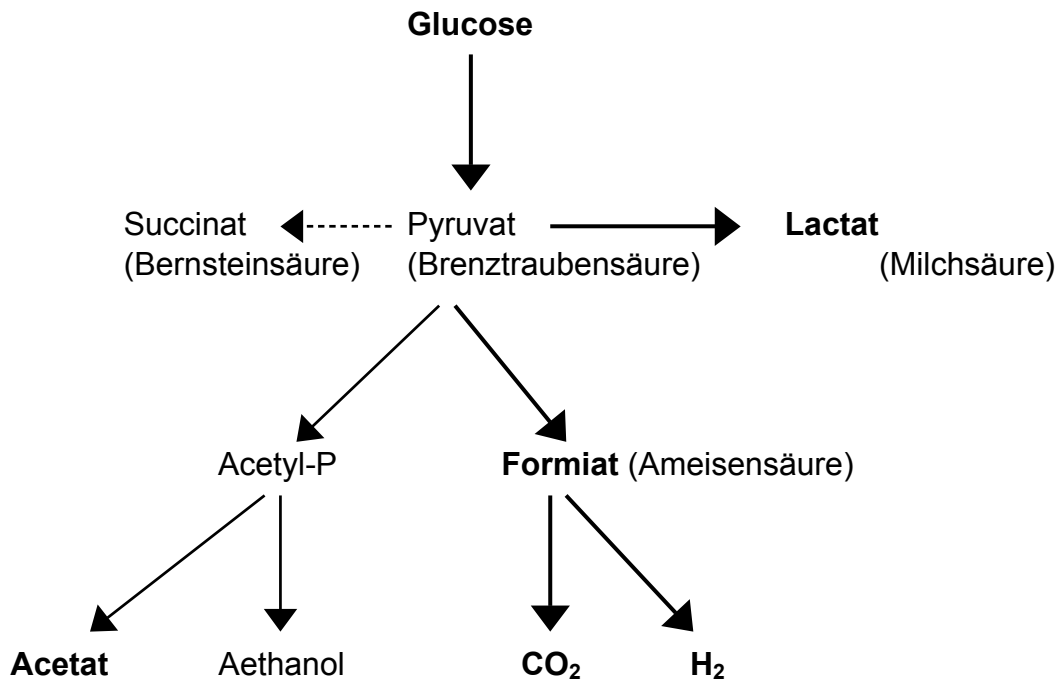


Abbildung 11: **Bildung von Propionsäure und Nettoproduktion an Essigsäure als Folge der Propionsäuregärung mit und ohne FH-Lb** (Die Auswertung basiert auf dem Datenmaterial zu Abb. 10).

5. Gemischtsäuregärung (Ameisensäuregärung)

Dieser Gärungstyp ist vor allem typisch für die Enterobacteriaceen, speziell *Escherichia coli* und andere „Coliforme“. Im Gegensatz zu den oben besprochenen Gärungen fallen mehr Stoffwechselprodukte an. Vor allem wird wie bei der weiter unten besprochenen Buttersäuregärung neben CO_2 auch Wasserstoffgas (H_2) gebildet.

Abbildung 12: Gemischtsäuregärung



Eine mengenmässige Zuordnung der Stoffwechselprodukte ist kaum möglich.

Ameisensäure ist ein typisches Zwischenprodukt (nicht so stabil) und Milchsäure kann je nach Spezies und Rahmenbedingungen 3-85% der abgebauten Glucose betragen! (Allgemein gilt, dass *E. coli* viel - etwa 70% - und *Enterobacter* wenig - etwa 10% - Milchsäure bilden sollen).

5.1 Enterobacteriaceen

Gattungen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceen

Stamm	Gattung	Milchwirtschaftl. bedeutendere Vertreter (* gehört zur Gruppe der „Coliformen“)
Escherichiae	Escherichia [†]	<i>E. coli</i> *
	Shigella	<i>S. flexneri</i> <i>S. sonnei</i>
Edwardsiellae	Edwardsiella	
Salmonellae	Salmonella	<i>S. enterica</i>
	Citrobacter [†]	<i>C. freundii</i> *
Klebsiellae	Klebsiella [†]	<i>K. pneumoniae</i> *
	Enterobacter [†]	<i>E. aerogenes</i> *
	Hafnia	<i>H. alvei</i>
	Serratia ^(†)	<i>S. marcescens</i>
Proteae	Proteus	<i>P. vulgaris</i>
	Providencia	<i>P. rettgeri</i>
	Morganella	<i>M. morganii</i>
Yersinia	Yersinia	<i>Y. enterocolitica</i>
Erwiniae	Erwinia	

† Die meisten Vertreter der Gattung gehören zur Gruppe der Coliformen (Lactose vergärend)

(†) Einige Vertreter der Gattung gehören zur Gruppe der Coliformen

Der Begriff "Coliforme" umfasst die laktosevergärenden Enterobacteriaceen, ist also gleichbedeutend wie "Gasbildung aus Lactose". Er wurde 1893 geprägt, in einer Zeit, da noch keine einfachen Methoden zur Bestimmung von *Escherichia coli*, dem wichtigsten „Coliformen“ zur Verfügung standen. Heute hat der Begriff "Coliforme" in der Schweiz kaum noch von Bedeutung. Anstelle der Toleranzwerte für Coliforme Keime wurden schon vor Jahrzehnten TW für *E. coli* eingeführt. Im Ausland, insbesondere in Nordamerika, sind Limiten für Coliforme noch heute anzutreffen.

5.2 Vorkommen und Eigenschaften

Unter den Enterobacteriaceen findet man viele typische Darmbewohner, wie z.B. *Escherichia coli*. Wegen der Familienbezeichnung wird zuweilen angenommen, Enterobacteriaceen seien generell Fäkalkeime, was nicht zutrifft. Nicht wenige Arten sind in ganz anderen Biotopen zuhause, z.B. auf Pflanzen, gärendem Pflanzenmaterial, im Wasser, im Boden usw., also praktisch überall in der Umwelt. Alle Enterobakterien haben gemein, dass sie bei Pasteurisationsbedingungen sicher abgetötet werden. Deshalb dienen sie als Hygiene-Indikator bei hitzebehandelten Lebensmitteln.

Vorkommen von *Escherichia coli* (Fäkalindikator)

- Darmbewohner. Durch fäkale Kontamination in Lebensmittelrohstoffen tierischer Herkunft, aber auch im Wasser, landw. benutzten Böden, Gemüse zu finden.
- Temperaturoptimum entsprechend der Körpertemperatur der Warmblüter bei etwa 38-40 °C.
- Wachstum bei 15-45 °C
- fakultativ aerob
- pH-Optimum etwa 6.5-7.0 (allgemein ziemlich säureempfindlich)
- in Bezug auf den Nährboden rel. anspruchslos (benötigt aber Zucker)
- relativ resistent gegen Hemmstoffe (Frühblähung im Käse bei Hemmstoff-Kontamination!)

Störungen der Käsefabrikation durch Colibakterien treten meist in einer frühen Phase der Fabrikation auf, d.h. solange noch Zucker vorhanden ist und der pH-Wert noch nicht wesentlich unter pH 5.8 gefallen ist. Die Bildung des wasserunlöslichen Wasserstoffgases führt sofort zu Blähungen, meist schon auf der Presse.

Früher waren diese Keime käseereitechnologisch viel problematischer als heute. Deutlich verbesserte Stallhygiene und wesentlich weniger häufig vorkommende Säuerungsstörungen, lassen "Coliblähungen" nur noch selten in Erscheinung treten. Heute gibt es diese Frühblähungen vor allem noch in Zusammenhang mit der Verarbeitung von hemmstoffhaltiger Milch.

5.3 Nachweis im Käse

Bakteriologischer Nachweis

Enterobacteriaceen überleben im Halbhartkäse und vor allem im Hartkäse nicht gut. Gereifte Käse bei Fehlgärungen auf Enterobacteriaceen zu untersuchen ist darum fast sinnlos: Es kann Gasbildung stattgefunden haben (Nisserkäse oder Vielsatz) obschon keine lebenden Keime mehr nachzuweisen sind. Sollten also möglichst jung untersucht werden.

Eine Analyse der flüchtigen Fettsäuren (Gaschromatogramm) ist kaum geeignet: Wenn im ganz jungen Käse eine Blähung vorliegt, kommen in erster Linie Enterobacteriaceen, Hefen und heterofermentative Milchsäurebakterien in Frage. Diese Keime bilden alle Essigsäure und ev. auch Ameisensäure. Demzufolge sind die flüchtigen Fettsäuren nicht aussagekräftig.

6. Buttersäuregärung

Buttersäurebakterien (*Clostridium tyrobutyricum* und *Cl butyricum*) sind in der Käsefabrikation sehr gefürchtet. Selbst wenn die Käse noch kaum sichtbare Veränderungen aufweisen, sind die von einer Buttersäuregärung betroffenen Käse praktisch unverkäuflich. Eine Ausnahme bildet der Glarner Kräuterkäse, bei welchem eine Buttersäuregärung stattfinden muss.

6.1 Herkunft der Clostridien

- Erde, Mist um Sennhütten
- Silage (etwas abhängig von der Siliertechnik und Silagequalität)
- Wasser, Tränkebecken, Brunnenröge
- Kuhmist (in Abhängigkeit von der Fütterung)

6.2 Wichtige Vertreter der Clostridien

Cl butyricum

Ist theoretisch nur in der Lage Lactose zu vergären und gilt deswegen allgemein als der Verursacher von Frühblähung. Einerseits ist dies sehr zu relativieren, weil zwei Stunden nach dem Käseabfüllen auch für den Lactatvergärer genügend Lactat vorliegt und andererseits namhafte Mikrobiologen davon ausgehen, dass eine Adaptation an das Lactat als durchaus möglich erachtet wird.

Cl tyrobutyricum

Vergärt nur Lactat, kann Lactose nicht vergären. Gilt allgemein als Verursacher einer Spätblähung. Kommt in Silage und Wintermilch häufiger vor als *Cl butyricum* (letzterer eher in Heu und Sommermilch häufiger)

Cl beijerinckii

Forschungsarbeiten der letzten Jahre deuten darauf hin, dass *Cl beijerinckii* eine atypische Form der Buttersäuregärung im Käse (weniger Gasbildung, tiefere Buttersäurewerte) verursacht. Der Keim ist in sporenhaltiger Rohmilch mindestens so häufig zu finden wie *Cl. tyrobutyricum*.

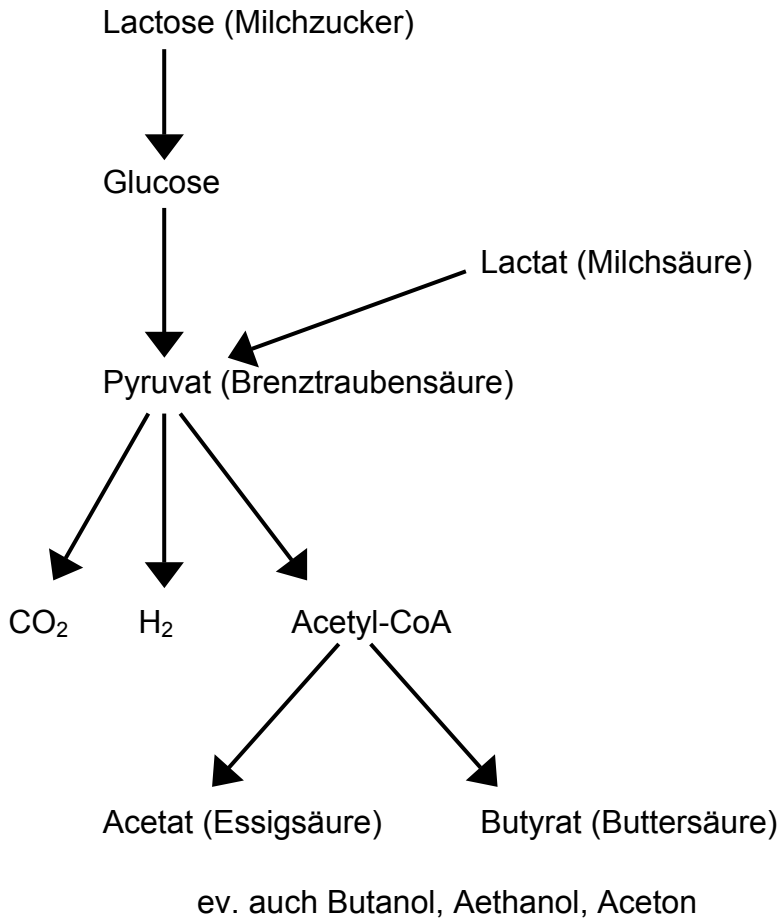
Cl sporogenes

Ist der Verursacher von Stinkerkäsen (Putrificus). Nach Literaturangaben wird er durch nicht-dissoziierte Milchsäure gehemmt. Er wächst unter normalen Bedingungen bei pH-Werten unter 5.5 nicht. Er vergärt, als extremer Proteolyt, Proteine zu Essigsäure, ev. Milchsäure, Ammoniak und H₂.

Cl botulinum

Tritt käsetechnologisch nicht in Erscheinung. Wegen der Toxinbildung und der sehr grossen Hitzeresistenz (>120 °C) ist *Cl botulinum* ein in der Konservenindustrie gefürchteter Lebensmittelvergifter.

Abbildung 13: Gärschema der Buttersäuregärung



6.3 Eigenschaften der Clostridien

Clostridien sind strikt anaerobe, bewegliche Stäbchen. Definitionsgemäss können alle Sporen bilden. Diese stellen bei ungünstigen, äusseren Bedingungen eine resistente Ueberlebensform dar. Sie werden durch übliche Pasteurisationsbedingungen nicht eliminiert.

Fast alle vergären (verschiedene) Substrate zu mehr oder weniger Buttersäure. Die Gärprodukte fallen mengenmässig sehr unterschiedlich an, sogar innerhalb der gleichen Spezies, so dass eine stöchiometrische Angabe nicht sinnvoll ist. Wesentlich ist vor allem die H₂-Bildung: Wasserstoff ist unlöslich in Wasser und führt sofort zu Blähwirkung.

Die Buttersäure ist mit Ausnahme von Blauschimmelkäsen (Buttersäurebildung Fettspaltung) und Glarner Kräuterkäse (gewollte Buttersäuregärung) wegen der Geschmacksbeeinflussung unerwünscht.

Wachstumsbedingungen von Buttersäurebakterien

- pH-Optimum: um pH 6.8 (Minimum pH 4.8)
- Temperatur-Optimum: 30–37 °C (Wachstum zwischen 12°C und 42°C)

6.4 Nachweis der Buttersäurebakterien und der Buttersäuregärung

Bakteriologischer Nachweis von Clostridien

Sogenannt „sichere Methoden“ zum bakteriologischen Nachweis gibt es heute noch nicht. Einerseits ist ungewiss, welcher Anteil der vorhandenen Sporen beim Nachweis wirklich auskeimt und Gas bildet (positives Resultat), respektive ob beim Auftreten von Sporenzahlen über der Toleranzgrenze wirklich eine Blähung der Käse eintritt. Wichtig ist für das Auslösen einer Buttersäuregärung offenbar auch das Milieu, in dem die Clostridien vorher gewachsen waren.

Diese Problematik gilt bei Labor- und Praxismethoden. Trotzdem kann eine solche Analyse zur Abklärung möglicher Infektionsherde oder auch um das Risiko abschätzen zu können, sinnvoll sein. Werden solche Analysen wiederholt durchgeführt, sollte es gelingen, Problemstellen zu finden und insgesamt den Pegel zu senken.

Angebracht sind Analysen von Milch oder Wasser und weniger von Futtermitteln. Es gibt Fachleute, die annehmen, dass in Rohmilch *Cl butyricum* tendenziell eher nachweisbar ist als *Cl tyrobutyricum* (d.h. nicht, dass diese stärker vertreten sind, sondern dass sie besser auskeimen).

Gasanalyse

Mit Einschränkung der weiter vorne gemachten Vorbehalte, wäre eine Gasanalyse zweckdienlich. Abgrenzungsprobleme würden nur zu den, auch H₂ (Wasserstoff) bildenden, Enterobacteriaceen bestehen.

Gaschromatogramm

Im Gaschromatogramm wird die Summe der wasserdampfflüchtigen Fettsäuren als "Tirationswert" angegeben. Die einzelnen Fettsäuren erlauben im Fall der Buttersäuregärung eine zuverlässige Zuordnung.

Buttersäure ist bei keiner anderen Gärung in grösseren Mengen vorhanden, ohne dass gleichzeitig erhöhte Mengen an Capronsäure vorliegen (vgl. dazu Kap. 8, Lipolyse).

Man beachte bitte, dass jede Analysenart ihre Schwachpunkte hat. sei es die Auskeimrate der Sporen im bakteriologischen Nachweis oder die Buttersäurebildung durch Lipolyse oder Organismen der Schmierflora im Gaschromatogramm.

7. Proteolyse

Proteolytische Organismen bilden Enzyme, sogenannte Proteasen, die Proteine in niedermolekulare Verbindungen spalten können.

Der Abbau erlaubt den Mikroorganismen Energie (allerdings relativ wenig) zu gewinnen und Körpersubstanz aufzubauen. Letzteres ist meistens wesentlicher.

starke Proteolyten sind: *Bacillus subtilis*
Clostridium sporogenes
Pseudomonas fluorescens
Sc liquefaciens

Enterobacteriaceen sind zum Teil auch stark proteolytisch, ebenso wie viele Schimmelpilze.

Die technologisch wichtigen Milchsäurebakterien sind im Vergleich zu oben genannten Organismen proteolytisch wenig aktiv, vollziehen aber im Käse die gewollte Proteolyse trotzdem !

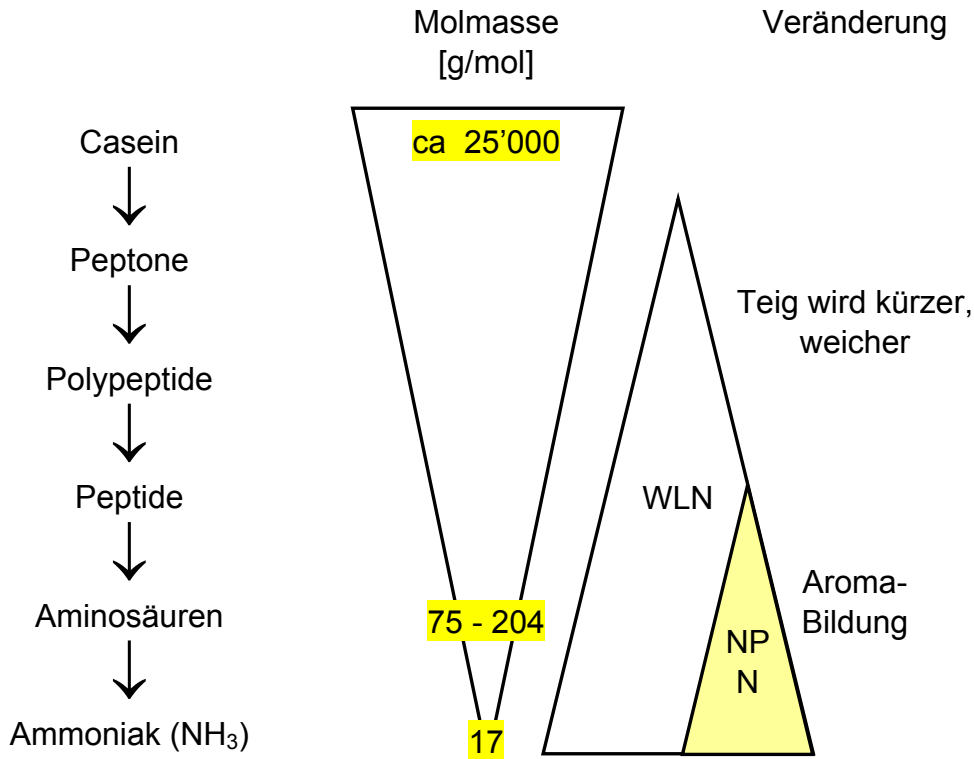
Proteolyse ist im Käse von zentraler Bedeutung. Gründe dafür sind folgende:

- Abbau der Gerüstsubstanz im Käse, des Caseins (Veränderung der Teigeigenschaften)
- Geschmacksbildung durch Abbauprodukte

Man unterscheidet zwischen **primärer** und **sekundärer Proteolyse**.

- Primäre Proteolyse = Abbau „in die Breite“
Abbauprodukte: Peptone, Polypeptide, Oligopeptide
- Sekundäre Proteolyse = Abbau „in die Tiefe“
Abbauprodukte: Di- und Tripeptide, Aminosäuren
- Abbau der Aminosäuren (teritiäre Proteolyse)
Abbauprodukte: Biogene Amine, Ammoniak, Carbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren, Ketosäuren, CO₂, Schwefelwasserstoff

Abbildung 14: Proteolyse des Caseins



7.1 Beeinflussung der Eigenschaften des Käses durch die Proteolyse

- pH-Verlauf (Proteolyse → pH-Anstieg)
- Teigbeschaffenheit
Hartkäse (lang → kurz)
Weichkäse (Erweichung des Teigs)
- Geruch und Geschmack
Abbauprodukte wie Peptide, aromatische Säuren, Aminosäuren, Ammoniak, Aldehyde, Fettsäuren und Mercaptane (Schwefelverbindungen) sind sehr geschmacksaktive Stoffe.
- Nachgärungsverhalten
Stärkere Proteolyse, v.a. in die „Tiefe“, erhöht das Nachgärungsrisiko. Die Gründe dafür liegen einerseits im kürzeren Teig (begünstigt Gläsbildung) und andererseits in der Bildung freier Asparginsäure, welche als Substrat für CO₂-Bildung durch a-positive Propionsäurebakterien dient.

7.2 Nachweisverfahren der Proteolyse im Käse

Chemisch-physikalische Methoden

pH-Wert

- Mit zunehmender Proteolyse geht ein pH-Anstieg vor sich. Innerhalb einer Hartkäsesorte sind die Unterschiede nicht sehr gross. (Bei Emmentaler-Versuchen nach fünf Monaten im Bereich von 5.60 - 5.75).
- Der pH-Wert ist natürlich nicht nur bedingt durch die Proteolyse. Er ist eine Folge der Salzgleichgewichte, der aktiv vorliegenden Säuren, der basischen und sauren Aminosäuren und der Pufferwirkung der Käsemasse.

N-Fraktionen (Stickstoff-Fraktionen)

- Das Prinzip liegt in der Ausnützung unterschiedlicher Löslichkeit von Proteinabbauprodukten in verschiedenen Lösungsmitteln.
- Üblich ist die Bestimmung des wasserlöslichen Stickstoffs (WLN) und des Nicht-Protein-Stickstoffs (NPN).
- Die Differenz zwischen dem Gesamt-Stickstoff (TN) und dem WLN entspricht etwa dem nicht abgebauten (nativen) Casein.

WLN ist ein Mass für den Abbau in "die Breite" oder den Umfang der Proteolyse. Erfasst werden z.T. Polypeptide, Peptide und der gesamte NPN. Die Angabe erfolgt absolut in mmol / kg Käse oder relativ, d.h. in % bezogen auf den Totalstickstoff (TN).

NPN ist ein Mass für den Abbau in "die Tiefe". Mit dieser Analyse werden niedermolekulare Verbindungen, wie kleine Peptide, Aminosäuren und Ammoniak erfasst. Die Angabe erfolgt selten absolut in mol/kg Käse (manchmal auch in g/kg oder mg/kg) und meistens relativ, d.h. in % bezogen auf den WLN.

Andere N-Fraktionen. Ausser WLN und NPN sind mit Ausnahme des wasserlöslichen Stickstoffs bei pH 4.6 in der Analytik für die Praxis nicht üblich. Weil die Löslichkeit stark vom pH-Wert abhängig ist, kann sich letzterer bei Käsen mit hohen pH-Werten besser eignen als der WLN.

Aminosäurenanalyse

Das Resultat wird in mmol/kg Käse angegeben und ist ein Mass für die Proteolyse in "die Tiefe".

- Mit der **Cd-Ninhydrin-Methode** können die freien Aminosäuren im wässrigen Käseextrakt recht selektiv und summarisch erfasst werden. Amine reagieren zwar auch, bilden aber nicht das charakteristische Purpur. Wegen der Giftigkeit des Cadmiums wird die Methode bei ALP nicht mehr angewandt.
- Eine weitere Methode beruht auf der **chromatographischen Trennung** der Aminosäure und deren Detektion mit Hilfe von Ninhydrin. Diese Analyse zeigt zwar das ganze Spektrum der freien Aminosäuren, ist aber methodisch für die Routine-Analytik viel zu aufwendig.
- **para-Benzochinon-Wert**
p-Benzochinon bildet mit freien Aminosäuren intensiv gefärbte Ladungstransfer-Komplexe. Es handelt sich also um einen Nachweis der Gesamtmenge freier Aminosäuren. Wegen der Giftigkeit des para-Benzochinons wird die Methode heute kaum noch eingesetzt.
- **OPA (ortho-Phthaldialdehyd)**
Die Aufarbeitung, das Prinzip und die Aussage sind praktisch gleich wie beim p-Benzochinon. Weil diese Methode für das Laborpersonal gesundheitlich weniger problematisch ist, wird bei ALP heute nur noch diese gemacht.
Der NPN, der p-Benzochinon-Wert und der OPA-Wert korrelieren sehr eng miteinander. Dies bedeutet, dass der Aussagewert ähnlich ist.

Enzymatische Methoden

Von verschiedenen enzymatischen Methoden hat sich bis heute nur eine, der LAP-Nachweis etabliert. Der Enzymnachweis ist prinzipiell verschieden zu den chemischen Methoden. Letztere erlauben einen momentanen Zustand zu erfassen und zu charakterisieren, während ein Enzymnachweis eher das Potential erfasst.

- **LAP** (Leucin-Amino-Peptidase)

Das Enzym LAP ist eine sogenannte Exopeptidase, die einzelne Aminosäure-Bausteine (bevorzugt Leucin) von N-terminalen Ende von Polypeptidketten abspaltet. LAP-Aktivität im Käse führt also Freisetzung von Aminosäuren, d.h. zu einem Proteinabbau „in die Tiefe“.

Mit der Messung des LAP-Wertes im ganz jungen Käse (24 std.) gibt also gewisse Hinweise auf den später stattfindenden Proteinabbau. Mit einem LAP-Wert, der im Vergleich zu den Normwerten einer Käsesorte erhöht ist, lassen sich gewisse „Ungereimtheiten“ erkennen. Die wichtigsten sind:

- *Lb helveticus* an Stelle von *Lb delbrückii*
- Zu geringe Isolation auf der Presse
- Uebermäßige Fremdkeimbelastung der Verarbeitungsmilch

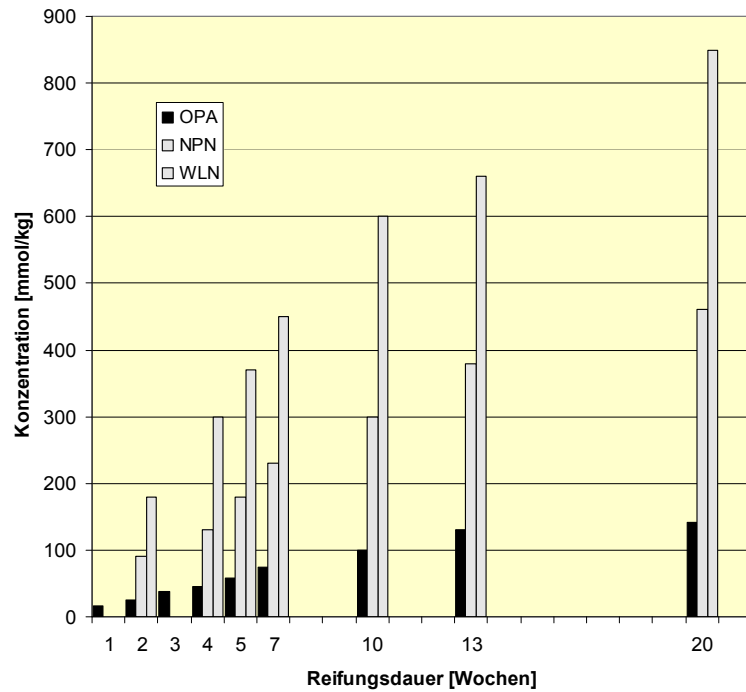


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Proteolyse in Emmentaler von guter Qualität

Die Proteolyse ist ein mehr oder weniger stetig verlaufender Vorgang. Sowohl die N-Fractionen, wie auch der OPA-Wert steigen stetig an. Der Grund, weshalb die Kurven später flacher verlaufen, liegt vor allem in der tieferen Temperatur. OPA-Wert und NPN zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die Werte haben eine vergleichbare Aussage (enge Korrelation).

Enzymatische Prozesse sind immer temperatur- und meistens auch pH-abhängig.

Tabelle 5: Proteinabbau in verschiedenen konsumreifen Käsesorten.

Käsesorte	Alter Monate	TN mol/kg	WLN mmol/kg	NPN mmol/kg	Freie AS g/kg	OPA mmol /kg
Sbrinz	18 – 24	3.28	1050	830	75.7	519
Emmentaler	5 – 9	3.24	860	340	25.6	231
Gruyère	6 – 7	3.00	940	590	38.9	344
Appenzeller	5	2.79	1160	660	39.2	329
Roh-Tilsiter	4 – 5	2.96	1350	630	34.5	303
Past-Tilsiter	3 – 4	2.72	810	290	10.9	96
Roh-Raclette	4	2.71	1160	430	21.6	168
Past-Raclette	3 – 4	2.72	1080	440	17.7	144
Camembert	¾	2.15	1420	240	4.1	54
Brie	¾	2.23	1040	260	5.4	–
Münster	Reif	2.31	2040	250	–	–
Limburger	Reif	2.48	2240	390	15.9	–

8. Lipolyse

Die Lipolyse ist ein enzymatischer Vorgang. Dabei wird das Fett (Triglyceride) in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Die Lipasen katalysieren die Reaktion, die nur in Gegenwart von Wasser abläuft. Man spricht darum auch von der Fetthydrolyse.

Fette bestehen aus dem 3-wertigen Alkohol Glycerin und drei Fettsäuren. Da Fette verschiedene Fettsäuren enthalten, werden diese vereinfacht auch als R-COOH bezeichnet. R steht für die unterschiedlichen Kohlenwasserstoffketten der verschiedenen Fettsäuren.

Bei vollständiger Hydrolyse werden alle Fettsäuren abgetrennt, dies braucht aber nicht der Fall zu sein (Abbildung 16).

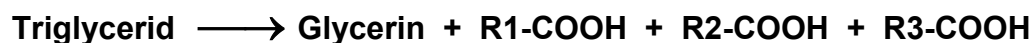
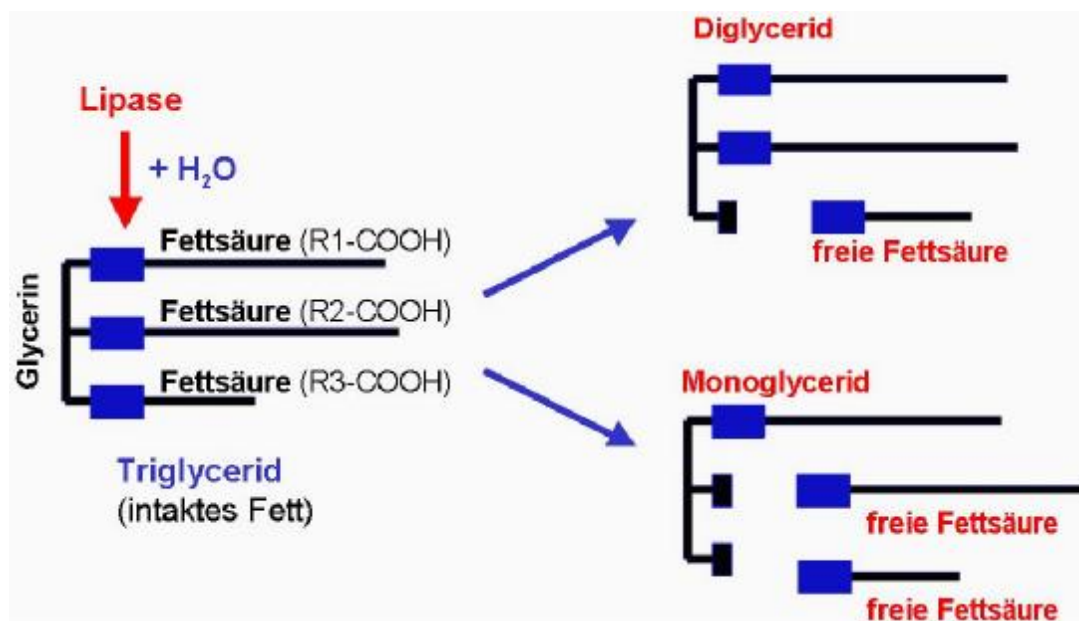


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Fetthydrolyse

Mechanische Belastung der Milch und dadurch Schädigung des Milchfettes ist keine Fettspaltung. Das dabei entstehende freie (ungeschützte) Fett, begünstigt aber die Lipolyse stark.

8.1 Vorkommen von Lipasen

- **Lipasen der Kuh**

Lipasen kommen im Gewebe des Körpers immer in grösseren Mengen vor. In der Milch sind kleine Mengen dieser „originären“ Lipase normal. Im Zusammenhang mit hormonalen Störungen oder Hormonbehandlungen können deutlich grössere Mengen ausgeschüttet werden, die entsprechende Probleme bieten können.

- **Mikrobielle Lipasen**

Es gibt bei den Bakterien, den Hefen und den Schimmelpilzen fettspaltende Vertreter. Folgende gelten als besonders stark fettspaltend:

Schimmelpilze: Besonders Blauschimmel (*Penicillium* ss), deutlich weniger stark *Geotrichum candidum*

Hefen: *Yarrowia*, *Rhodotorula* und viele andere (käsetechnologisch sind Hefen eher selten ein Problem)

Bakterien: *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*

Freie Fettsäuren sind sehr geschmacksaktiv, also aromabildend. Lipasewirkung kann daher erwünscht sein oder einen gravierenden Fehler bedeuten.

In gereiften Blauschimmelkäsen ist die Lipasewirkung des Schimmels unbedingt gewünscht, auf ranzigen Raclettekäse kann jedermann verzichten.

Typisch für sogenannte "Fettfehler" ist ein erhöhter Gehalt an freien Fettsäuren. Bei **Ranzigkeit** ist neben Buttersäure insbesondere auch Capronsäure erhöht.

Talgigkeit oder Seifigkeit ist eine Folge der **Fettoxidation**. Auch dabei handelt es sich um gravierende Fehler. Enzyme spielen bei der Fettoxidation eine ungeordnete Rolle. Die wichtigsten Katalysatoren sind hier Kupfer, andere Schwermetalle und Licht.

Fettsäuren, die in bei Fettoxidation stärker vertreten sind, wären Capryl-, Caprin- und Laurinsäure. (Manchmal ist es aber schwierig, einen Fettfehler eindeutig zuzuordnen).

Freie Fettsäuren und Glycerin können weiter umgesetzt werden zu β -Ketosäuren, Methylketon, Aceton und anderen Produkten, die den Geschmack des Käses beeinflussen können.

8.2 Analytik zum Problem Fettspaltung

- **Bakteriologischer Nachweis von Lipolyten**

Ungewollte Lipolyse im Käse ist viel häufiger eine Folge milcheigener Lipasewirkung als der Lipasen von Mikroorganismen. Aus diesem Grund gehört der Lipolyten-Nachweis nicht zu den häufigen Analysen.

- **Nachweis des Enzymes Lipase**

Die bei ALP angewandte reflektometrische Methode erfasst v.a. die originäre Lipase, welche über die Blutbahn in die Milch abgegeben wird. Mikrobielle Lipasen werden nur teilweise erfasst, da diese Esterasen teilweise eine etwas andere Substratspezifität aufweisen bzw. die Fettspaltung weniger stark katalysieren.

Als semiquantitative Methode kann sie zum Auffinden von Kühen dienen, deren Gemelke zu spontaner Ranzigkeit neigen. Eine Prognose auf "gut" oder „ranzig" aufgrund des Analysenwertes ist aber kaum zulässig, insbesondere nicht bei Milchprodukten und Käse. Die Grössenordnung der zu erwartenden Lipase-mengen seien hier trotzdem genannt:

Probenmaterial	Lipase-Aktivität [IE]	Extremwerte
Tankmilch	85-90	35-155 IE (in normaler Milch)
Emmentaler	< 240	
Raclette pasteurisiert	130	
Raclette aus Rohmilch	230	
Gorgonzola	520	
Camembert	1320	

- **Nachweis flüchtiger Fettsäuren (Gas-Chromatogramm)**

Mit dem Vorhandensein von Capronsäure über der Norm ist der Nachweis der Ranzigkeit erbracht. Indirekt bedeutet dies natürlich auch, dass übermässige Mengen von Lipase vorhanden sein müssen.

Diese Analyse ist die erfolgversprechendste Methode.

Beispiel:

*Ein reifer, tadelloser Gorgonzola weist bei etwa 50 mmol/kg flüchtige Fettsäuren, je etwa 40-45% Essig- und n-Buttersäure, eine ganz geringe Menge Propionsäure und etwa 10-15% Capronsäure auf. Die Buttersäure stammt in diesem Fall aus der Lipolyse! D.h. durch Lipolyse werden **Buttersäure und Capronsäure** freigesetzt und zwar im **Verhältnis von ca. 3:1**.*

8.3 Ursachen und Massnahmen bei Lipolyseproblemen

- Meistens ist originäre Lipase die Ursache für sporadisch auftretende Ranzigkeit. Aus diesem Grund ist auch die Suche nach der schuldigen Kuh angebracht.

Es hat sich gezeigt, dass die Rahmprobe der Lieferantenmilch für diesen Fall zweckmässig ist.

- Eine relativ häufige Ursache liegt in der zu langen Lagerdauer der Milch. Dies ist vor allem ein Problem in Betrieben, die pasteurisierte Milch verarbeiten. Meistens lässt sich das Problem mit einer besseren Milchlagerbewirtschaftung lösen.
- Eine direkte Zuordnung eines Falles zu mikrobiellen Lipolyten als Ursache kommt nur sehr selten vor. Massnahmen sind dieselben wie bei jedem Mangel an Hygiene.
- Mechanische Schädigung des Milchfettes ist nicht die Ursache, aber ein fördernder Faktor der Lipolyse.

9. Zusammenfassung der Fermentationstypen

Nachstehend sind Substrate (Energiequellen) genannt, die für die Milchwirtschaft von Bedeutung sind. Viele Organismen sind jedoch in der Lage, eine ganze Reihe anderer Substrate (vor allem Zucker) zu vergären.

Milchsäuregärung

Substrat	Produkte	Keime
homofermentative MSG		
Lactose Glucose Galactose	Lactat	<i>Sc salivarius</i> <i>Lc lactis ss</i> <i>Lb helveticus</i> <i>Lb delbrückii ss</i> <i>Lb acidophilus</i>
heterofermentative MSG		
Lactose Glucose Galactose	Lactat Acetat, CO ₂ Aethanol Acetoin / Diacetyl	<i>L mesenteroides ss</i> <i>Lc lactis biovar diacethylactis</i> <i>Lb fermentum</i> <i>Lb casei ss (FH-Lb)</i>
fakultativ heterofermentative MSG		
Citrat Ribose	Formiat Acetat CO ₂	<i>Lb casei ss</i> <i>Lb plantarum</i> <i>Lb rhamnosus</i>

Propionsäuregärung

Substrat	Produkte	Keime
Lactose Glucose Lactat Aspartat	Acetat Propionat CO ₂	<i>P freudenreichii ss</i>

Gemischtsäuregärung

Substrat	Produkte	Keime
Lactose Glucose	Lactat Acetat, Formiat CO ₂ , H ₂	Enterobacteriaceen (insbesondere Coliforme)

Buttersäuregärung

Substrat	Produkte	Keime
Glucose Lactose Lactat	Butyrat Acetat CO ₂ , H ₂ Butanol	<i>Cl sporogenes</i> <i>Cl butyricum</i> <i>Cl tyrobutyricum</i> <i>Clostridium ss</i>

Proteolyse (enzymatisch)

Substrat	Produkte	Keime
Casein	Peptone	<i>B.subtilis, Cl sporogenes</i>
Proteine	Peptide	Enterobacteriaceen
Poly-Peptide	Aminosäuren	Psychrotrophe
Aminosäuren	Ammoniak	Blauschimmel
	CO ₂	<i>Lactobacillus</i> ss

Lipolyse (enzymatisch)

Substrat	Produkte	Keime
Fette	Fettsäuren	Psychrotrophe Keime
	Glycerin	<i>Bacillus</i> ss.
	Aromen	Schimmelpilze

Schlussbemerkung

In der Praxis laufen Gärungsvorgänge, speziell bei der Verarbeitung von Rohmilch, selten so schön in gerader Linie ab wie in der Theorie. Die Produkte der gewünschten Gärung weichen dann auch mehr oder weniger von den stöchiometrisch erwarteten Vorgaben ab.

Die mehr oder weniger vorhandene Rohmilchflora übt immer einen gewissen Einfluss auf das Gärgeschehen aus. Daraus muss man ableiten, dass es ratsam ist, diesen Einfluss zu minimieren um möglichst reine (und lenkbare) Gärungen zu erhalten.

Herausgeber Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP), CH-3003 Bern, Tel. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27, www.alp.admin.ch, e-mail: info@alp.admin.ch **Autoren:** Ernst Jakob, Elisabeth Eugster, Marie-Therese Fröhlich-Wyder. **Fotos/Redaktion** Agroscope Liebefeld-Posieux. **Copyright** Nachdruck bei Quellenangabe und Zustellung eines Belegexemplars an die Herausgeberin gestattet.