

## SÄUERUNGSSTÖRUNGEN

Diskussionsgruppen

### Autoren

Ernst Jakob, Ruedi Amrein, Hans Winkler  
Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras,  
CH-3003 Bern





Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für  
Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF  
**Agroscope**

## Impressum

ISSN	1661-0814 (online) /26.03.2013
Herausgeberin	Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Bern Tel. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27 info@agroscope.admin.ch, www.agroscope.ch
Fotos	Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras
Gestaltung	RMG Design, CH-1700 Fribourg
Copyright	© 2013 ALP-Haras Nachdruck bei Quellenangabe und Zustellung eines Belegexemplars an die Herausgeberin gestattet.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Einfluss der Rohmilch auf die Säuerung	4
2.1	Proteingehalt	4
2.2	Antimikrobielle Inhaltsstoffe	4
2.3	Laktoperoxidase-System (LPS)	4
2.4	Immunglobuline (IG)	4
2.5	Leukozyten / Lysozym	4
2.6	Laktoferrin	4
2.7	Freie Fettsäuren	4
2.8	Rückstände von Desinfektionsmitteln	5
2.9	Fazit	5
3	Durch Hemmstoffe verursachte Säuerungsstörungen	6
3.1	Hemmung der Gärungsorganismen durch Antibiotika	6
3.2	Hemmstoffnachweis	6
3.3	Praxismethoden für den Hemmstoffnachweis	8
4	Durch Phagen verursachte Säuerungsstörungen	11
4.1	Bakteriophagen	11
4.2	Milchsäurebakterien-Phagen	11
4.3	Verhalten von Phagen in Milch, Molke und Käse	12
4.4	Hitze- und pH-Resistenz von Phagen	12
4.5	Quellen von Phagen	12
4.6	Phagen in Fettsirtenkulturen	13
4.7	Phagenprobleme bei Verwendung von Betriebskulturen und Direktstartern	14
4.8	Massnahmen gegen phagenbedingte Säuerungsstörungen	15
5	Die Herstellung aktiver Betriebskulturen	16
5.1	Umfeld für die Kulturenherstellung	16
5.2	Erhitzen der Magermilch	16
5.3	Impfen der Betriebskultur	16
5.4	Bebrütung	17
5.5	Herstellung von Fettsirtenkulturen	17
5.6	Kontrolle der Kultur	17
5.7	Kulturenrotation	17
6	Einfluss der Jahreszeit und der Betriebsauslastung	17
7	Kritische Fabrikationsparameter	18
7.1	Vorbereitung der Kessmilch	18
7.2	Temperaturführung	18
8	Zusammenfassung	19

# 1. Einleitung

Ein normaler Säuerungsverlauf ist eine Grundvoraussetzung für die Herstellung von qualitativ einwandfreiem Käse. Eine verlangsamte oder ungenügende Säuerung wirkt sich auf den Wasserhalt, die Mikroflora, die Teigeigenschaften und das Reifungsverhalten des Käses aus. Der vorliegende Diskussionsgruppenstoff geht den möglichen Ursachen von Säuerungsstörungen nach und zeigt auf, wie diese erkannt und vermieden werden können.

## 2. Einfluss der Rohmilch auf die Säuerung

### 2.1 Proteingehalt

Der Proteingehalt der Milch wirkt sich auf die Säuerung aus, vor allem wenn man Milchen mit sehr unterschiedlichem Eiweissgehalt vergleicht, z.B. Kuhmilch mit Ziegenmilch. In einer eiweissreichen Milch fällt der pH-Wert als Folge der stärkeren Pufferung langsamer. In einer thermophilen Mischkultur verlängert sich dadurch die Wachstumsphase der Streptokokken.

### 2.2 Antimikrobielle Inhaltsstoffe

Obwohl Milch ein optimaler Nährboden für Bakterien ist, enthält sie doch Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen hemmen können. Zu diesen natürlichen „Hemmstoffen“ zählen unter anderem folgende Faktoren:

- Laktoperoxidase-System
- Immunglobuline
- Leukozyten
- Lysozym
- Laktoferrin
- freie Fettsäuren

Die Hemmwirkung dieser Milchbestandteile bezeichnet man auch als die natürliche Bakterizidie der Rohmilch. Einige dieser antimikrobiellen Inhaltsstoffe sind hitzelabil, so dass ihre Wirkung mit der Pasteurisation der Milch verloren geht oder zumindest reduziert wird. Bei anderen (z.B. Lysozym, Peroxidase, Laktoferrin und freie Fettsäuren) ist dies aber nicht der Fall.

Neben den natürlichen „Hemmstoffen“ kann Milch auch Rückstände von Desinfektionsmitteln und antimikrobiellen Tierarzneimitteln enthalten, die sich auf die Säuerung auswirken können.

### 2.3 Laktoperoxidase-System (LPS)

Das antimikrobiell wirkende LPS besteht aus der in der Milch reichlich vorhandenen Laktoperoxidase, Thiocyanat und Wasserstoffperoxid. Die Aktivität des LPS hängt ab vom fütterungsabhängigen Thiocyanatgehalt der Milch und vom Angebot an Wasserstoffperoxid, dass von den Milchsäurebakterien (MSB) oder gewissen Bakterien der Rohmilchflora produziert wird.

### 2.4 Immunglobuline (IG)

Die Milch enthält natürlicherweise Antikörper (Immunglobuline), die sich an die Oberfläche von Bakterien, darunter MSB, binden können. Sehr hohe Konzentration findet man in Kolostralmilch.

Das Anhaften der IG an die Bakterienoberflächen hat zur Folge, dass die Bakterien an Fettkügelchen binden oder zusammenklumpen und sedimentieren. Letzteres kann z.B. dazu führen, dass die Säuerung bei der Herstellung von Frischkäse ungleichmässig verläuft (stärkere Säuerung am Boden des Fertigers). Bei der Herstellung von Labkäse ist dies aber kein Problem.

### 2.5 Leukozyten / Lysozym

Weisse Blutkörperchen (Leukozyten) besitzen ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften, indem sie Stoffe wie z.B. das hitzestabile Lysozym und andere antimikrobiell wirkende Stoffe freisetzen können. Besonders viele Leukozyten findet man in Mastitismilch.

### 2.6 Laktoferrin

Das Milchprotein Laktoferrin bindet Eisen, ein für Mikroorganismen unentbehrliches Element, besitzt aber eine weitere, davon unabhängige antimikrobielle Wirkung. Kolostralmilch enthält fünfmal mehr Laktoferrin als normale Milch. Deutlich erhöhte Gehalte findet man auch bei erhöhter Zellzahl und in Milch der letzten Laktationswoche.

### 2.7 Freie Fettsäuren

Freie Fettsäuren haben ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften, und zwar umso ausgeprägter, je tiefer der pH-Wert ist. Die Konzentration der freien Fettsäuren ist in einer einwandfreien Milch deutlich unter 1 mmol/kg und damit rund zehnmal zu tief, um einen Einfluss auf die Säuerung zu haben.

## 2.8 Rückstände von Desinfektionsmitteln

Reinigungs- und Entkeimungsmittel dienen dazu, die mit Milch und Milchprodukten in Berührung kommenden Oberflächen in einen hygienisch einwandfreien Zustand zu versetzen. Reste dieser Mittel müssen mit Trinkwasser vollständig entfernt werden, damit sie keinen negativen Einfluss auf die Gärungsorganismen ausüben. Ein wichtiger Faktor ist die Abspülbarkeit der verschiedenen Chemikalien. Oberflächenaktive Verbindungen wie z.B. die quaternären Ammoniumverbindungen (QAV) haften aber auf diversen Werkstoffen sehr gut und sind nicht gut abspülbar.

Meldungen aus der Praxis, dass vermehrt Flüssigmittel zum Vordippen für die Desinfektion der Zitzen verwendet werden, veranlassten ALP, diese in Bezug auf das Wachstum der MSB zu testen. In einem ersten Tastversuch zeigte sich, dass eines von sechs Vordippmitteln die MSB stark hemmte. Eine Anfrage beim Hersteller ergab, dass das Produkt 5-10% der QAV namens Didecylmethylammoniumchlorid enthält. Die Zitzen werden mit einer 1%igen Lösung gedippt und mit einem Einwegtuch abgetrocknet.

Die Untersuchung des Einflusses des Vordippmittels auf die Säuerung der RMK 101 ergab, dass die Kultur nach einer Bebrütung von 8 Stunden bei einer Dosierung von 0.1% 6.8°SH und bei 0.01% 2.8°SH weniger säuerte (siehe Abb. 1). Auch in der 16-stündigen Kultur wurde eine Säuerungsabnahme um 4.8 bzw. 1.4°SH gemessen. Im mikroskopischen Bild wurde in der Variante mit 0.05 mL/100 mL Milch (0.5%) kein Wachstum festgestellt, bei 0.1 % zeigten die Streptokokken eine untypische Form.

Je nach Sorgfalt bei der Anwendung können Reste von QAV-haltigen Vordippmitteln an den Zitzen zurückbleiben und beim Melken mit der Milch weggespült werden. Wie oben erwähnt, haften QAV wegen deren oberflächenaktiven Eigenschaften gut auf der Haut und anderen Oberflächen.

Nach Intervention durch ALP bei der Herstellerfirma wurde das QAV-haltige Zitzentauchmittel vom Markt genommen. Weitere solche Produkte sind womöglich noch auf dem Markt.

Auch in Fussbädern und als Desinfektionsmittel für Böden und Wände kommen QAV-haltige Produkte zum Einsatz. Wegen deren schlechter Abspülbarkeit empfehlen wir, keine QAV-haltigen Produkte für die Reinigung und Desinfektion von Oberflächen zu verwenden, die mit Milch oder dem Käsebruch in Kontakt kommen.

## 2.9 Fazit

Verschiedene Milchbestandteile können das Wachstum von Bakterien hemmen. Der Gehalt der Milch an solchen Stoffen ist abhängig von der Fütterung, dem Laktationsstadium, der Eutergesundheit und der hygienischen Qualität der Milch. Rohmilch verschiedener Lieferanten wird sich darum auch in Bezug auf das Säuerungsverhalten unterscheiden. Besonders gross ist der Effekt von Kolostralmilch, von altmelker Milch und von Mastitismilch. Unbedingt zu vermeiden sind Kontaminationen der Milch mit QAV-haltigen Desinfektionsmitteln.

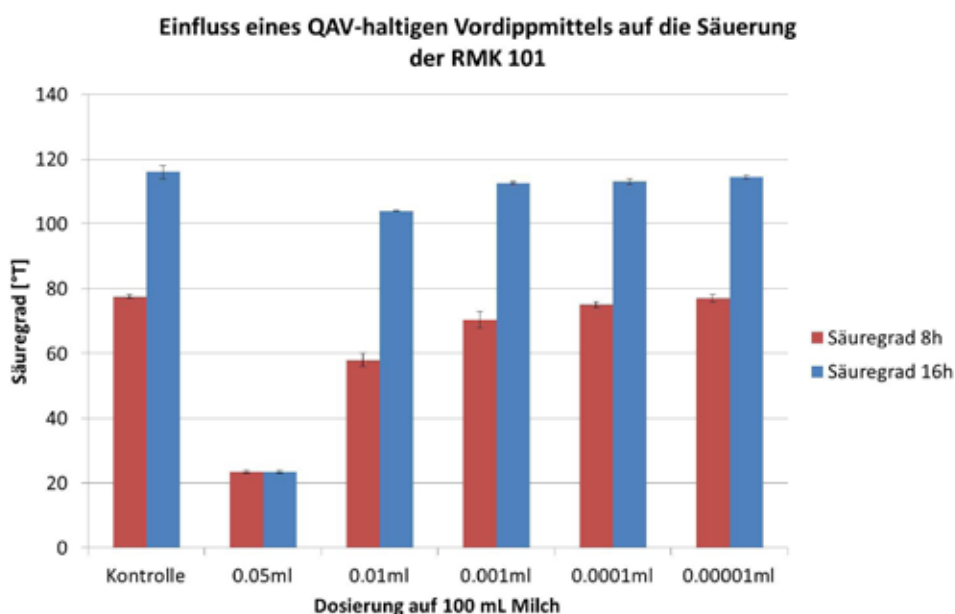


Abb. 1 : Einfluss eines QAV-haltigen Vordippmittels auf die Säuerung der RMK 101 (Doppelansatz, 8 bzw. 16h bebrütet bei 38°C)

## 3 Durch Hemmstoffe verursachte Säuerungsstörungen

### 3.1 Hemmung der Gärungsorganismen durch Antibiotika

Die Ergebnisse der öffentlich-rechtlichen Milchprüfung zeigen, dass rund 0.04% der Milchlieferungen hemmstoffpositiv sind (TSM Treuhandstelle GmbH, 2010: Jahrestatistik Milchmarkt 2009). Das bedeutet, dass eine Käserei, die von durchschnittlich 25 Milchproduzenten 2 x täglich mit Milch beliefert wird, im Durchschnitt rund 7 x pro Jahr hemmstoffhaltige Milch geliefert bekommt. Dadurch können je nach Konzentration und nachfolgender Verdünnung in der Kessmilch mehr oder weniger starke Säuerungsstörungen auftreten.

Zur Behandlung von Euterentzündungen werden vor allem Penicilline eingesetzt, deren Mengenanteil rund 82% ausmachen (siehe Tab. 2).

Wie Tabelle 1 zeigt, gehören die MSB zu den hemmstoffempfindlichsten Bakterien überhaupt. Zur Behandlung einer Kuh werden 1 bis 8 Millionen Einheiten (1 IE = 1µg) Penicillin ins Euter appliziert. Gelangt das erste Gemelk nach der Behandlung irrtümlicherweise in den Milchtank, reicht die Hemmstoffmenge in diesem einen Gemelk aus, um 200'000 Liter Milch verarbeitungsuntauglich zu machen. Ein Deziliter eines solchen Gemelks auf 1'000 Liter Kessmilch führt bereits zu einer Störung der Säuerung im Käse!

Besonders empfindlich gegenüber Penicillinen ist *Streptococcus thermophilus*, während Laktobazillen erst

Tab. 1: Penicillinempfindlichkeit (Penicillin G) verschiedener Mikroorganismen

Mikroorganismus	Minimale Hemmstoffkonzentration [µg /L]
<i>Delvotest SP-NT (Geobacillus stearothermophilus)</i> <sup>1</sup>	2.5
<i>Streptococcus thermophilus</i> <sup>2</sup>	10 – 50
<i>Lactococcus lactis</i> <sup>2</sup>	100 – 250
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <sup>2</sup>	250 – 500
<i>Lactobacillus helveticus</i> <sup>2</sup>	250 – 500
<i>Propionibacterium shermanii</i> <sup>2</sup>	50 – 100
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	30
<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>3</sup>	2'000
<i>Escherichia coli</i> <sup>3</sup>	60'000

Quellen:

<sup>1</sup> Delvotest SP, Technical Bulletin. DSM Food Specialties B.V., Delft NL;

<sup>2</sup> R. Scott, Cheesemaking Practice, 3. Ausgabe, 1998;

<sup>3</sup> R.P. R Emmel, The Penicillins, University of Minnesota, 2013.

bei etwa 20-mal höheren Konzentrationen gehemmt werden. Liegt die Hemmstoffkonzentration der Kessmilch im Grenzbereich, ist es also möglich, dass nur die Anfangssäuerung im Käse gestört ist, der pH-Wert nach 24 h aber nicht ausserhalb der Norm liegt. Da die eingesetzten Penicilline meist säureempfindlich sind, verlieren sie bei sinkendem pH-Wert zunehmend ihre antimikrobielle Wirkung.

Gramnegative Bakterien wie *E. coli* sind relativ unempfindlich gegenüber Penicillinen, was erklärt, weshalb aus hemmstoffhaltiger Milch hergestellte Rohmilchkäse in der Regel eine Frühblähung (Coligärung) entwickeln.

Säuerungsstörungen, die der Käser bemerkt, sind nach unserer Einschätzung deutlich seltener, als dies aufgrund des Anteils positiver Proben bei der Milchprüfung zu erwarten wäre. Die möglichen Gründe dafür sind:

- Verdünnung der hemmstoffhaltigen Milch in der Kessmilch,
- Verdünnung durch den Wasserzusatz zur Milch und/oder zum Käsebruch,
- etwas geringere Antibiotikaempfindlichkeit der MSB im Vergleich zum Hemmstofftest im Labor (siehe Tab. 1 und 2).

### 3.2 Hemmstoffnachweis

Viele Käsereibetriebe führen keine speziellen Hemmstofftests durch. In der Branchenleitlinie QM Fromarte sind solche Tests nicht vorgeschrieben, da die Kontrolle der Säuerung im Käse und/oder in der Ausrührsirte als indirekter Hemmstofftest gilt. Spezielle Hemmstofftests müssen nur Betriebe durchführen, die Konsummilch oder Rahm in den Verkehr bringen.

Allerdings reagieren die MSB-Kulturen nicht ganz so empfindlich auf Hemmstoffe wie sie es müssten, um bei guter Säuerung die gänzliche Abwesenheit von Hemmstoffen zu gewährleisten. Wie Tab. 2 zeigt, ist der Joghurt-Test bezüglich des Penicillins deutlich weniger empfindlich als der Delvotest SP. Die Nachweisgrenze des Joghurt-Tests ist rund viermal höher als der Grenzwert. Eine thermophile Startkultur (RMK) dürfte sich ähnlich verhalten.

Bei Kontaminationen mit Gentamicin, Neomycin und Kanamycin sprechen sowohl der Joghurt-Test als auch der Delvotest zu spät an. Es ist also möglich, dass Milch mit zu hoher Hemmstoffkonzentration verarbeitet wird, die Säuerungswerte, insbesondere die Endsäurewerte (pH 24h), aber noch im Normbereich liegen. Tatsächlich liegt ALP ein Analysenbericht eines kantonalen Labors vor, gemäss dem in zwei Käsen Rückstände von Gentamicin nachgewiesen wurden. Die untersuchten Käse wurden als nicht verkehrsfähig beurteilt, da die verarbeitete Milch nicht den Anforderungen der Verordnung über die

Hygiene in der Milchproduktion entsprochen habe.

Die Autoren des QM FROMARTE waren sich der angesprochenen Problematik bewusst, sie kamen aber zur Einschätzung, dass eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit durch den Konsum eines schwach mit Hemmstoff kontaminierten, aber normal gesäuerten Käses ausgeschlossen werden kann, da selbst in einem solchen Fall die akzeptable tägliche Aufnahmemenge (ADI-Werte) der eutertherapeutisch genutzten Antibiotika kaum überschritten würde.

In einigen Exportländern wie z.B. den USA ist gesetzlich vorgeschrieben, dass die Verarbeitungsmilch lückenlos auf die Anwesenheit von Antibiotika überprüft werden muss. Die Inspektoren der amerikanischen Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde FDA haben im Herbst 2012 beanstan-

det, dass gewerbliche Käsereien in der täglichen Routine zum Teil keine offiziell anerkannten Hemmstofftests anwenden. Auch Käseexporteure müssen immer häufiger ihren Kunden darlegen, wie in der Schweiz die Absenz von Antibiotikarückständen durch Hemmstoffkontrollen gewährleistet wird.

Daher ALP empfiehlt den gewerblichen Käsereien, die Verarbeitungsmilch (Kessmilch oder Tankmilch) täglich mit einem international anerkannten Hemmstofftest zu überprüfen, wie dies in der Milchindustrie seit über 30 Jahren üblich ist. Damit wird nicht nur ein immer wiederkehrender Diskussionspunkt hinfällig. Die Käserei kann daraus auch den Nutzen ziehen, dass sie im Falle einer Hemmstoffkontamination viel schneller reagieren und sofort Laboranalysen der Rückstellproben der Lieferantenmilch veranlassen kann.

Tab. 2: Empfindlichkeit von kultureller Hemmstofftests gegenüber eutertherapeutisch genutzten Antibiotika

Antibiotika-Klasse Antibiotikum	Verbrauch für die Euterbehandlung CH 2008 <sup>1)</sup>	Grenzwert Milch (MRL) <sup>2)</sup>	Nachweisgrenzen		
			Delvotest® SP – NT <sup>3)</sup>	Joghurt Test 2.5 h <sup>4)</sup>	Joghurt Test 4h <sup>4)</sup>
	% der Gesamtmenge	[µg /L]	[µg /L]	[µg /L]	[µg /L]
beta-Laktame	82.2%				
Amoxicillin		4	3-5	>3	7.5
Ampicillin		4	3-5	4	5
Cefalexin		100	60-100	100	2000
Cloxacillin		30	15-25	k.A.	k.A.
Penicillin G		4	2.5	15	37.5
Aminoglykoside	14.6%				
DH-Streptomycin		200	≥1500	k.A.	k.A.
Gentamicin		100	200-500	500	1000
Kanamycin		150	≥7500	k.A.	k.A.
Neomycin		1500	2000	k.A.	k.A.
Macrolide	2.2%				
Erythromycin		40	250	400	500
Spiramycin		200	≥350	k.A.	k.A.
Polypeptide	<0.3%				
Colistin		50	k.A.	k.A.	k.A.
Tetracycline	<0.1%				
Chlortetracyclin		100	200-600	500	1000
Oxytetracyclin		100	200-500	100	200
Sulfonamide	<0.1%	100	50-100	k.A.	k.A.

<sup>1)</sup> Flechtner O, Müntener C. 2009. Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin. Berichtsperiode 2005-2008. [www.swissmedic.ch/marktueberwachung](http://www.swissmedic.ch/marktueberwachung)

<sup>2)</sup> Council Regulation (EEC) No 2377/90. (<http://eur-lex.europa.eu>)

<sup>3)</sup> Delvotest SP, Technical Bulletin. DSM Food Specialties B.V., Delft NL ([www.delvotest.com](http://www.delvotest.com)) und Le Breton et al. 2007. *Analytica Chimica Acta* 586, 280-283

<sup>4)</sup> Mohsenzadeh M, Bahrainipour A. 2008. *Pak J Biol Sci* 11 (18) 2282-2285.

k.A. Keine Angaben verfügbar

### 3.3 Praxismethoden für den Hemmstoffnachweis

Für den Nachweis von Hemmstoffen existieren drei grundsätzlich verschiedene Testverfahren: enzymatische, immunologische und mikrobiologische (Abb. 2). Sie funktionieren wie folgt:

enzymatischer Test	Die Milchprobe wird mit Enzym (Carboxypeptidase) und Farbstoff vermischt. Antibiotika aus der Gruppe der beta-Laktame binden an das Enzym und verhindern so die Umwandlung des Farbstoffes. Andere Hemmstoffe reagieren in diesem Test nicht.
immunologischer Test	Die Milchprobe wird mit markierten Antikörpern gegen beta-Laktam-Hemmstoffe (AK) vermischt. Die Hemmstoffmoleküle (AG) bilden Komplexe (AG-AK) mit diesen AK. Die Probeflüssigkeit lässt man anschliessend durch einen Papierstreifen wandern, der an zwei Stellen immobilisierte Antikörper enthält, von denen der erste nur die nicht komplexierten AK, der andere nur die AG-AK-Komplexe binden kann. An jener Stelle auf dem Teststreifen, wo Substanz gebunden wird, tritt eine Färbung ein (siehe Abb. 2, Bild unten, Mitte).
mikrobiologischer Test	Das Prinzip ist gleich wie beim Joghurt-Test. Die Milchprobe wird mit einem sehr hemmstoffempfindlichen Testbakterium ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ) und einem Farbindikator vermischt und bei 64°C inkubiert. Wächst der Keim, erfolgt innert 2-2.5h ein Farbumschlag, der die Abwesenheit von Hemmstoffen anzeigt.

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionsweisen weisen die in der Praxis angewendeten Hemmstofftests grosse Unterschiede auf bezüglich Analysendauer und Spezifität (Tab. 3).



Abb. 2: Beispiele für enzymatische (Penzyme Milk Test), immunologische (Twinsensor BT/betasensor) und mikrobiologische (Delvotest SP mini NT) Hemmstofftests



Tab. 3: Vor- und Nachteile verschiedener Typen von Hemmstoff-Tests

Testprinzip	Vorteile	Nachteile
enzymatisch	Schnelltest	selektiv (nur beta-Lactame) nicht generell anerkannt
immunlogisch	Schnelltest teilweise sehr tiefe Nachweisgrenze (deutlich < MRL)	selektiv (nur bestimmte Gruppe(n))
mikrobiologisch	Breitband-Test, der alle Gruppen von Hemmstoffen erfasst; hohe Akzeptanz bei Behörden	Zeitbedarf >2h Bei einigen Hemmstoffen zu wenig empfindlich

**Schnelltests reagieren immer wirkstoffgruppenspezifisch,  
mikrobielle Tests decken ein breites Spektrum ab, benötigen aber Zeit.**

Leider kann keiner der kommerziell erhältlichen Hemmstofftests alle therapeutisch genutzten Antibiotika mit genügender Empfindlichkeit nachweisen (Tab 4). Allerdings ist es so, dass die Lücken bzw. Schwächen der verschiedenen Tests Wirkstoffe betreffen, die in der Schweiz nicht oder nur in wenigen Euterpräparaten zur Anwendung gelangen (siehe Abb. 3).

Wer Schnelltests verwenden möchte, muss einen beta-Laktam-Schnelltest in Kombination mit dem Aminoglycosid-Schnelltest (4Aminosensor) oder einem mikrobiologischen Test einsetzen, um genügend Sicherheit bezüglich Abwesenheit von Hemmstoffen zu haben.

Die am häufigsten verwendeten Antibiotika Neomycin, Cloxacillin und Benzylpenicillin (Penicillin G) werden von allen mikrobiologischen Tests zuverlässig erfasst. Diese Tests haben auch den Vorteil, dass sie in allen Ländern offiziell anerkannt sind.

#### Kosten

Grundausrüstung: Für die meisten Tests benötigt man einen temperatur- und zeitgesteuerten Heizblock oder Inkubator, der ca. 300 - 500 Franken kostet.

Die Verbrauchsmaterialkosten (Testkit) belaufen sich auf 2 bis 6 Franken pro Test, je nach Test und Bestellmenge. Es lohnt sich, nach den Konditionen zu fragen.

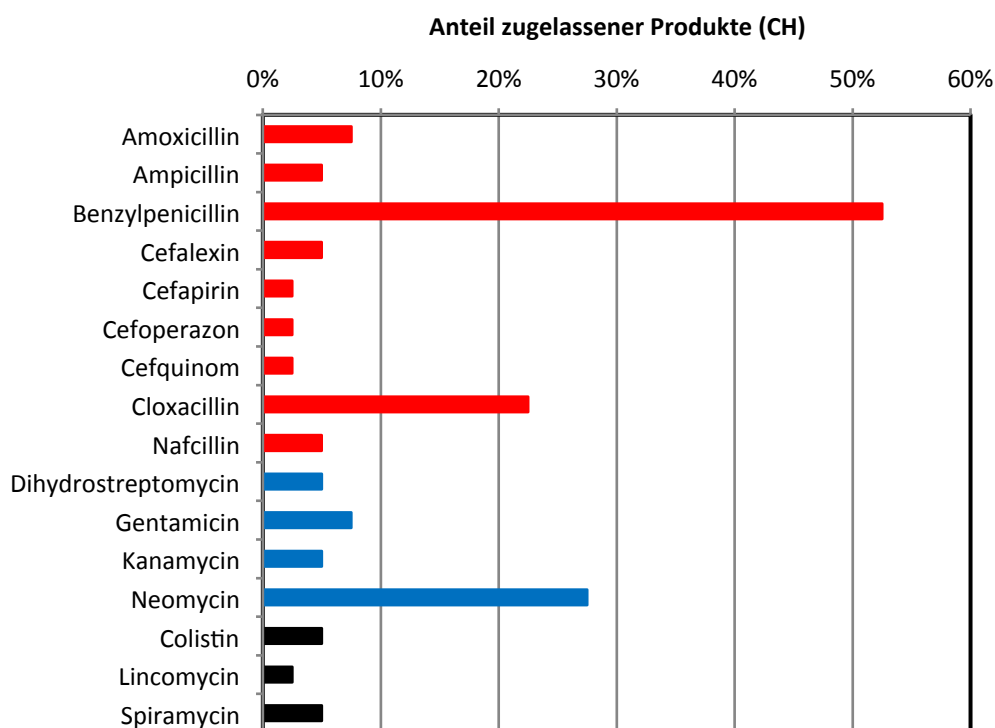






Abb. 3: Antibiotika in zugelassenen Euterbehandlungspräparaten (CH, Stand 2012). Rote Balken = beta-Laktam-Antibiotika, blaue Balken = Aminoglykoside, schwarze Balken = andere Wirkstoffgruppen

Tab. 4: In der Schweiz erhältliche Hemmstofftest-Systeme

Test	Penzyme S100	New Snap beta-Lactam	Delvotest® BLF	Beta s.t.a.r	ROSA MRLBL3 beta-lactam	betasensor	4Aminosensor	AIM BRT Suchtest	Delvotest SP NT (3 h)	Blue_Yellow II Test
<b>Hersteller</b>	Neogen (US)	IDEXX Lab. (US)	DSM (NL)	Neogen (US)	Charm Sciences (US)	Unisenor (B)	Unisenor (B)	AIM GmbH (D)	DSM (NL)	Charm Sciences (US)
<b>Testprinzip</b>	enzymatisch	immunologisch	immunologisch	immunologisch	immunologisch	immunologisch	immunologisch	mikrobiologisch	mikrobiologisch	mikrobiologisch
<b>Zeitbedarf</b>	15-22 min.	8-10 min.	5 min.	5 min.	3 min.	6 min.	6 min.	2.5 - 3 h	2.5 - 3 h	2.5 - 3 h
<b>beta-Laktame</b>										
Amoxicillin	gut bis sehr gut	knapp ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Ampicillin	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Benzylpenicillin	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Cefalexin	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	unbrauchbar	unbrauchbar	knapp ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Cefoperazon	knapp ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Cefapirin	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	knapp ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
Cefquinom	klar ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	klar ungenügend
Cloxacillin	knapp ungenügend	knapp ungenügend	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
<b>Aminoglykoside</b>										
DH-Streptomycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	gut bis sehr gut	klar ungenügend	klar ungenügend	klar ungenügend
Gentamycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	gut bis sehr gut	klar ungenügend	klar ungenügend	gut bis sehr gut
Kanamycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	klar ungenügend
Neomycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut	gut bis sehr gut
<b>Sonstige</b>										
Spiramycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	klar ungenügend	klar ungenügend	klar ungenügend
Colistin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	knapp ungenügend	knapp ungenügend	unbrauchbar
Lincomycin	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	knapp ungenügend	knapp ungenügend	gut bis sehr gut
Tetrazykline	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	unbrauchbar	klar ungenügend	knapp ungenügend	gut bis sehr gut
<b>benötigte Geräte</b>	Inkubator 47°, Mischer, Pip.	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette	Pipette	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette	Inkubator; Pipette
<b>Importeur CH</b>	Winkler AG, Konolfingen	provet AG, Lyssach	prochem AG, Zürich	Winkler AG, Konolfingen	Instrumenten-Gesellschaft AG, Zürich	Chemie Brunschwig AG, Basel	Chemie Brunschwig AG, Basel	Winkler AG, Konolfingen	prochem AG, Zürich	Instrumenten-Gesellschaft AG, Zürich

**Empfindlichkeit des Tests**

gut bis sehr gut	
knapp ungenügend	
klar ungenügend	
unbrauchbar	

## 4. Durch Phagen verursachte Säuerungsstörungen

Durch Phagen bedingte Säuerungsstörungen stehen in Bezug auf Häufigkeit und wirtschaftlicher Bedeutung ohne Zweifel erster Stelle, weil gerade grosse Mehrchargenbetriebe besonders betroffen sind. In der Milchverarbeitung werden darum verschiedene Massnahmen getroffen, die direkt auf die Vermeidung von Phageninfektion abzielen oder die Phagenabwehr zumindest unterstützten (siehe Abschnitt 4.8).

Bei Säuerungsstörungen durch Phagen kann Käse einen zu hohen End-pH-Wert und zu viel Restzucker aufweisen, so dass Fehlgärungen wie z.B. Putrifikus eintreten. Neben Säuerungsstörungen können Phagen auch andere negative Auswirkungen haben. Vernichten Phagen beispielsweise einen aromabildenden Stamm, so hat dies auch Auswirkungen auf das Aromaentwicklung. Oder eine probiotische Sauer Milch enthält kaum probiotische Keime, wenn der zugesetzte Stamm von Phagen befallen wurde.

### 4.1 Bakteriophagen

Bakteriophagen sind auf den Befehl von Bakterienzellen spezialisierte Viren, deren Grösse etwa der von Caseinmicellen entspricht (20 – 200 nm). Wie alle Viren, besitzen auch Bakteriophagen keinen eigenen Stoffwechsel, können sich nicht aktiv fortbewegen und sind für die Vermehrung zwingend auf eine stoffwechselaktive Wirtszelle angewiesen. Es gibt circa. 15 Familien von Bakteriophagen, die sich bezüglich Form, Wirtspektrum und anderer Merkmale unterscheiden. Bakteriophagen sind allgegenwärtig: Man schätzt, dass es auf der Erde zehnmal mehr Bakteriophagen als Bakterienzellen gibt.

### 4.2 Milchsäurebakterien-Phagen

Die meisten MSB-Phagen bestehen aus einem Kopf und einem langen Schwanz, die beide aus Proteinen bestehen. Im Kopf befindet sich die Erbsubstanz des Phagen. Am Schwanzende finden sich Eiweissmoleküle, die besondere Oberflächenmerkmale der Wirtszellen erkennen und an diese binden können (Abb. 4). Hat ein Phage an die Oberfläche angedockt, perforiert er die Zellwand der Bakterienzelle und injiziert seine Erbsubstanz.

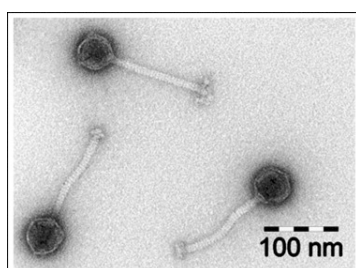


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Lactococcus lactis* Phagen (Bild Max Rubner Institut, Kiel)

Bakteriophagen können ihre Vermehrung grundsätzlich auf zwei Wegen erreichen (Abb. 5).

- Beim lytischen Vermehrungszyklus übernimmt die Phagenerbsubstanz das Kommando über die Bakterienzellen, welche nun neue Phagen produziert, bis zu 200 an der Zahl! Sind die neu gebildeten Phagen „reif“, werden Enzyme produziert, die die Zellwand auflösen und die Phagen freisetzen.
- Beim lysogenen Vermehrungszyklus fügt sich die Erbsubstanz des Phagen ins Chromosom der Bakterienzelle ein und wird damit inaktiv. Man spricht dann von einem Prophagen. Bei jeder Teilung der Bakterienzelle wird der Prophage mitvermehrt.

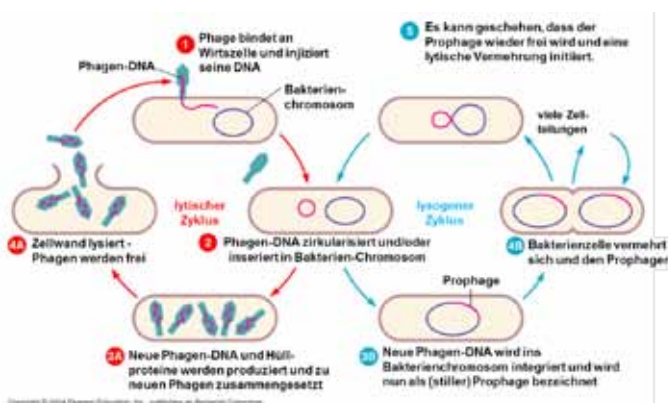


Abb. 5: Lytische und lysogene Vermehrung von Phagen mit Hilfe der Bakterienzellen.

Durch die Analyse der Erbsubstanz von MSB-Stämmen hat man festgestellt, dass Laktobazillen in der Regel Prophagen in ihrem Erbgut enthalten. Bei *Streptococcus thermophilus* scheint dies dagegen eher selten vorzukommen. Rohmischkulturen beherbergen immer Stämme, die einen Prophagen im Erbgut tragen!

Ein Prophage im Erbgut der Bakterienzelle kann Vorteile bringen, z.B. den Schutz vor Infektionen durch virulente Phagen. Unter bestimmten Umständen kann aber ein Prophage wieder aktiv werden und eine lytische Vermehrung auslösen (siehe Abb. 5, Punkt 5). Auslösende Umstände können sein:

- Hitzestress (z.B. hohe Brenntemperatur)
- Nährstoffmangel
- erhöhte Salzkonzentration
- pH-Stress
- antimikrobielle Wirkstoffe
- UV-Strahlung ...

### 4.3 Verhalten von Phagen in Milch, Molke und Käse

Da die Oberfläche von Phagen aus Eiweissen besteht, ist sie je nach pH-Wert des Milieus mehr oder weniger stark elektrisch geladen. Dadurch neigen Phagen dazu, an Oberflächen mit entgegengesetzter Ladung zu adsorbieren, z.B. an die Oberfläche von Caseinmicellen. Abb. 6 zeigt, wie in Magermilch der Anteil freier Phagen von rund 60% auf rund 10% zurückgeht, wenn der pH-Wert der Milch von 6.5 auf 4.7 absinkt. Sinkt der pH-Wert unter 4.7 werden die Phagen vom Casein abgestossen und liegen in freier Form vor. In Molke zeigt sich diese pH-Abhängigkeit der freien Phagen nicht, da kein Casein vorhanden ist.

Entscheidend für die Infektion der MSB ist aber nicht nur die Anzahl freier Phagen pro Milliliter, sondern auch, wie gut die Phagen an die Oberfläche der MSB adsorbieren können. Gemäss Literatur (Watanabe, 1972) zeigen Phagen im schwachsauren bis schwach alkalischen Bereich die höchste Infektiosität. Ein pH-Wert der Kultur zwischen 4.7 bis 5.0 scheint für den Schutz der MSB vor Phagen optimal zu sein. Die in Käsereien häufig praktizierte Kühllagerung von beimpfter Magermilch bis zur Bebrütung sollte trotzdem kein Problem darstellen, da die Infektionsrate bei Temperaturen unter 6°C ebenfalls reduziert ist und keine nennenswerte Vermehrung der Bakterien stattfindet.

Im Käse sind Phagen nur noch beschränkt infektiös, da sie zusammen mit den Wirtszellen in der Käsematrix weitgehend immobilisiert sind und wegen des pH-Wertes hauptsächlich an das Casein adsorbieren. Für den

Säuerungsverlauf im Käse ist nur der Anteil der zum Zeitpunkt der Milchgerinnung bereits befallenen MSB relevant. In der Ausrührsirte können die Phagen die Wirtszellen dagegen ungehindert attackieren, weshalb nicht selten der Fall eintritt, dass die Säuerung der Ausrührsirte unbefriedigend ist, die Säuerung im Käse (Sonde oder pH) dagegen normal verläuft.

### 4.4 Hitze- und pH-Resistenz von Phagen

Früher galten MSB-Phagen als eher wenig hitzeresistent (Inaktivierung bei Pasteurisation). Dies scheint aus heutiger Sicht nicht mehr zutreffend zu sein. So wird von Phagen berichtet, die selbst nach einer Hitzebehandlung während 15 min bei 95°C nicht vollkommen inaktiviert wurden. Es scheint, dass insbesondere in Industriebetrieben hitzeresistente Phagen geradezu selektioniert wurden.

Phagen sind im Allgemeinen gegen Alkalien resistent aber gegen Säure empfindlich. MSB-Phagen können teilweise 30 min bei pH 11 ohne Schaden überleben! Bei pH-Werten  $\leq 2.5$  werden sie dagegen rasch inaktiviert (Nakai et al. 1999). Gemäss Feststellungen in der Praxis, können Phagen in CIP-Lauge von 75°C tagelang überleben, insbesondere wenn diese nicht regelmässig entschlammt wird.

### 4.5 Quellen von Phagen

Neben der Kultur selbst, die Prophagen enthalten kann, gibt es im Umfeld der Käseherstellung zahlreiche Quellen von Phageninfektionen:

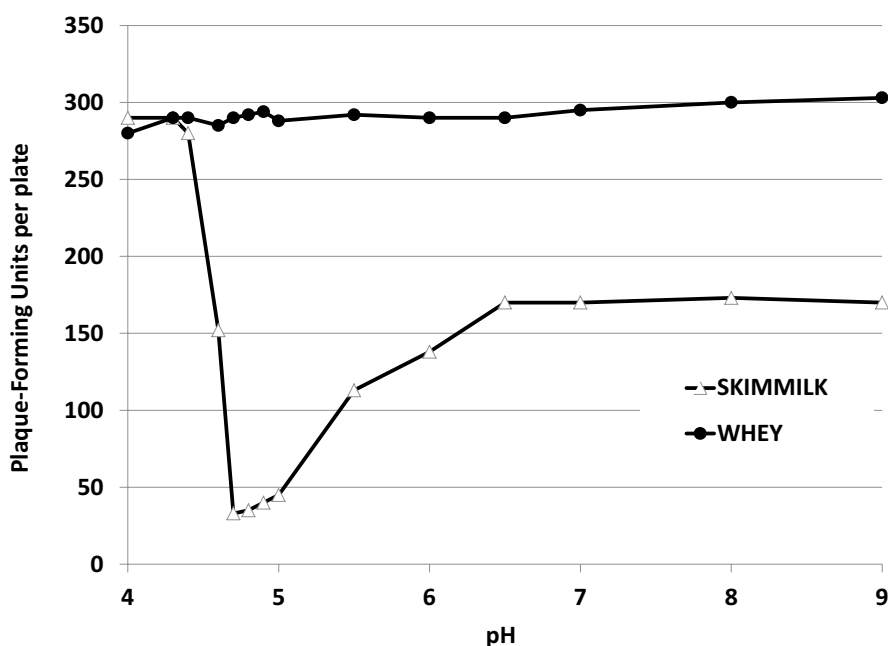


Abb. 6: Anzahl freier Phagen (Plaque-Forming Units) in Magermilch (Skimmilch) und Molke (Whey) nach Beimpfung mit Phagen bei verschiedenen pH-Werten (Quelle: Erskine J.M., 1970).

### Rohmilch

Auf dem Milchproduktionsbetrieb sind MSB, insbesondere Laktobazillen, allgegenwärtig: im Grünfutter, in feuchten Futtermischungen, auf der Zitzenhaut, in Melkanlagen usw.. Entsprechend präsent sind dort auch die Phagen. Eine hohe Milchlagertemperatur führt zu einer schnellen Vermehrung der MSB-Flora der Rohmilch und begünstigt damit auch die Vermehrung der Phagen.

### Fabrikationsumgebung

Selbst wenn eine phagenfreie Kultur und pasteurisierte Milch eingesetzt wird, ist damit zu rechnen, dass es im Kessi bereits zu ersten Phageninfektionen und zur Vermehrung von Phagen kommt, sobald die Lag-Phase der MSB verstrichen ist. In der Käseerei finden sich daher immer und überall MSB-Phagen, und zwar umso mehr, je mehr säuernde Molke im Betrieb verschleppt wird.

### Rezyklierte Milchbestandteile

- Molke, die zum Vorspülen von Fabrikationsanlagen verwendet wird.
- Molkenziger, der zur Verfeinerung des Käseteigs eingesetzt wird.
- Sirtenrahm

### Transportbehälter

- Für den Transport von Molke verwendete Behälter (Kannen, Tank), die vom Bauernbetrieb wieder zur Anlieferung von Milch verwendet werden.

### 4.6 Phagen in Fettsirtenkulturen

Betriebe, die Fettsirtenkulturen (FSK) verwenden, erleben nach einem Neustart mit auf Sterilmilch gezüchteter Kultur sehr häufig, dass die Säuerungsaktivität der Kultur nach zwei bis drei Tagen einbricht. In einem Versuch von ALP mit der Kultur MK410 Lyo (definierte Mehrstammkultur, gefriergetrocknet), in welchem die Bedingungen der Fabrikation von Berner Alpkäse AOC simuliert wurden, zeigte sich, dass in der Regel bereits in der zweiten FSK nach dem Start fast keine Laktobazillen mehr zu finden waren und die Säuerungsaktivität deutlich verschlechtert war (siehe Abb. 7). In den folgenden Tagen nahm der Anteil der Laktobazillen in der Kultur wieder zu und die Säuerung verbesserte sich wieder, da sich phagenresistente Laktobazillen durchsetzen konnten. Allerdings waren in den folgenden Tagen teilweise erneute Einbrüche zu verzeichnen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Kultur MK-410 Lyo verbessert, indem phagensensitive Stämme aus der Kultur durch Stämme aus der Stammsammlung ausgetauscht wurden, die gegenüber den Phagen in der Molke aus einem Praxisbetrieb, der die Kultur MK-410 Lyo einsetzt, resistent waren. Nach dieser Massnahme wurde die angepasste Kultur mit Erfolg in der Käsefabrikation getestet.

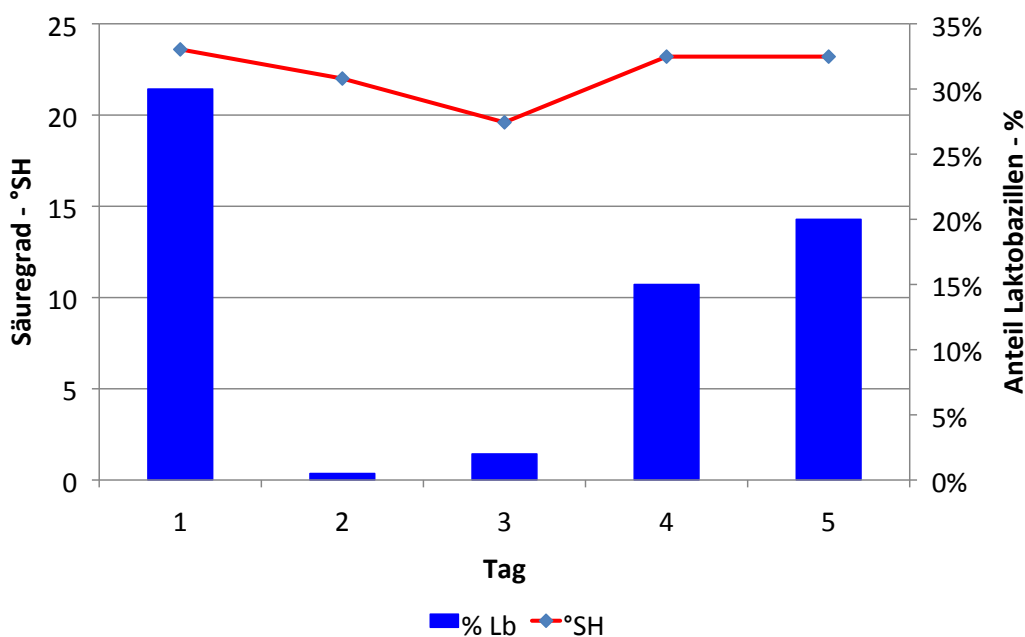


Abb. 7: Säuerungsaktivität und Laktobazillenanteil in einer Fettsirtenkultur nach einem Neustart mit der auf Sterilmilch angezüchteten Kultur MK410 Lyo von ALP. Tag 1 = 1. Fettsirtenkultur usw.

In einer gemeinsamen Arbeit von ALP und der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften in Wädenswil (ZAHW) wurden Molkenproben aus 29 Gruyère-Käsereien auf die Präsenz von Phagen untersucht. Als Teststämme wurden drei MSB-Stämme mit besonders breitem Phagenspektrum verwendet. Zum Nachweis von Phagen wurde jeweils 1 Promille des 1:100 verdünnten Molkenfiltrates zu den Kulturen der Teststämme zugesetzt. Die Untersuchung ergab folgende Ergebnisse:

- Alle Molken inaktivierten den Teststamm für Laktobazillen-Phagen (*Lb. delbrückii ssp. bulgaricus*)
- Nur 2 von 29 Molkenfiltraten konnten einen der beiden Teststämme von *Str. thermophilus* inaktivieren.

In einem zweiten Schritt wurden aus der Gruyère-Kultur AOC-G1 isolierte Einzelstämme von *Str. thermophilus* und *Lb. delbrückii ssp. lactis* auf deren Empfindlichkeit gegenüber den isolierten Phagen geprüft. Bei den Laktobazillen zeigte sich folgendes Bild (Tab. 5):

- Jede Molke enthielt einen Phagen, der einen oder gar mehrere Stämme aus der Kultur AOC-G1 befallen konnten
- 2 der 5 Laktobazillus-Stämme erwiesen sich als recht widerstandsfähig, einer als sehr widerstandsfähig.

Unter Verwendung der Kultur AOC-G1 erstellte Säuerungskurven zeigten, dass ein einzelner, der isolierten Phagen, das Säuerungsverhalten der Kultur in der Regel nicht signifikant verändern kann.

Die Versuche bestätigen insgesamt, dass eine „eingefahrenere“ FSK trotz der Präsenz von Phagen ein relativ robustes System ist, d.h. dass sich ein Gleichgewicht zwischen Phagen und Wirtsbakterien einstellt. Die Tatsache, dass eine FSK trotz der Anwesenheit von aktiven Phagen trotzdem säuert, erklärt sich dadurch, dass ...

- die verschiedenen MSB-Stämme ein unterschiedliches Phagenspektrum haben und dieses infolge von Mutationen immer wieder ändern, ev. sogar resistent werden;

- die Phagen unterschiedlich virulent sind, z.B. einen bestimmten MSB-Stamm zwar befallen können, dessen Wachstum aber nur verlangsamen können.

Gleichwohl sind spontane, phagenbedingte Säuerungsstörungen bei FSK jederzeit möglich, da sich auch die Phagen an die die potentiellen Wirtszellen anpassen!

#### 4.7 Phagenprobleme bei Verwendung von Betriebskulturen und Direktstartern

Definierte Kulturen sind aus folgenden Gründen auf Phagen besonders anfällig:

- Die meist geringe Anzahl Stämme (meist nur 2 oder 3) erhöht die Gefahr eines totalen Ausfalls der Kultur
- Durch den Einsatz von Kulturen in unveränderter Zusammensetzung wird die Anreicherung von Phagen gegen die verwendeten Stämme in der Umgebung der Käsefabrikation gefördert.

Besonders phagengefährdet sind Mehrchargenbetriebe und Industrielle Käsefabrikationsbetriebe. Dass wissen die grossen Kulturenhersteller, welche die industriellen Milchverarbeiter beliefern, und selektieren regelmässig bakteriophagen-insensitive Mutanten (BIM), indem sie ihre Stämme aktuellen Phagen aus der Praxis aussetzen und die resistenten Mutanten des Stammes weiterzüchten. Ist eine solche Mutante über mehrere Passagen stabil, tauscht man damit einen alten Stamm in der Kultur aus. Das hat allerdings auch seine Tücken: Wenn die selektierten Stämme veränderte Proteolyse-Eigenschaften oder ein anderes Säuerungsverhalten aufweisen, kann sich der Austausch eines Stammes auf die Eigenschaften der Kultur auswirken, da die Direktstarter-Kulturen nur aus wenigen Stämmen bestehen.

Tab. 5: Sensitivität der Einzelstämme von *Lb. delbrückii ssp. lactis* aus der Kultur AOC-G1 gegenüber den Laktobazillen-Phagen aus Molkenproben verschiedener Gruyère-Käsereien. (Wachstumsreduktion: ++ > 40%; + = 10 – 39%; - keine Hemmung)

Phagen aus Molke Nr.	4218	4402	4397	4122	4217	4223	4345	4384
Teststamm								
FAM 19109 (AOC-G1)	++	+	++	+	+	-	+	++
FAM 19112 (AOC-G1)	+	+	+	+	+	+	-	-
FAM 19108 (AOC-G1)	+	-	-	-	-	-	-	-
FAM 19110 (AOC-G1)	-	+	-	-	-	-	-	-
FAM 19113 (AOC-G1)	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.8 Massnahmen gegen phagenbedingte Säuerungsstörungen

Ein erfolgreicher Kampf gegen Phageninfektionen erfordert präventive Massnahmen auf mehreren Ebenen. Die wichtigsten Massnahmen sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Massnahmen zur Vorbeugung gegen Phageninfektionen in der Käsefabrikation (nach Briggiler Marcó, Moineau und Quiberoni, 2012).

Phagen-Quelle	Strategie	Massnahmen
Betrieb	Planung und Einrichtung	Trennen von Fabrikationsbereichen Geschlossene Anlagen (z.B. geschlossene Fertiger) Luftfiltration Überdruck im Bereich der Fertiger Verhinderung von Aerosolen
	Prozessdesign	Prozessoptimierung Zeitl. Staffelung Kulturenrotation
	Reinigung / Desinfektion	Reinigung/Erneuerung CIP-Lauge Saure Zwischenreinigung Desinfektion (Peressigsäure), UV Vermeidung von Aerosolen
Rohmilch	Mikrobiologie	Kühlagerung verhindert Vermehrung
	Milchbehandlung	Hitzebehandlung
Kulturen	phagenfreie Kulturen	Einsatz resistenter Kulturen Sterile Arbeitsweise Abgetrennter Raum (Überdruck) Kleiderwechsel, Händedesinfektion
	Kreisläufe unterbrechen	Kulturenrotation
	Kulturmedium	Steriles Medium phagenhemmende Spezialmedien (z.B. calciumbindende Zusätze wie Citrat, Polyphosphate etc.)
Rezyklierte Milchhaltsstoffe	Molke	Verhinderung von Aerosolbildung (bei Abfüllen, Reinigung etc.)
	Sirtenrahm	Hochpasteurisation Wöchentlich ein Unterbruch
Sonstige	Molkenrücknahme	Keine Transportbehälter in den Betrieb lassen
	Unterhalt	Regelmässige Kontrolle von Dichtungen Kontrolle von Tanks/Fertiger auf Risse



## 5. Die Herstellung aktiver Betriebskulturen

Eine wichtige Voraussetzung um phagenbedingte Säuerungsstörungen zu verhindern, sind aktive, in ihren Eigenschaften von Produktion zu Produktion ausgeglichene Betriebskulturen. Die Kontrolle des Säuregrades in jeder Fabrikation gehört zur guten Herstellungspraxis!

Die Herstellung der Betriebskulturen wirkt sich entscheidend auf deren Qualität aus. Es empfiehlt sich, die einzelnen Arbeitsschritte periodisch zu hinterfragen und wenn nötig, Anpassungen vorzunehmen.

- Sind meine räumlichen Voraussetzungen in Ordnung?
- Arbeite ich in sauberen, trockenen und gut durchlüfteten Räumen?
- Wann führe ich welche Arbeiten durch?

### 5.1 Umfeld für die Kulturenherstellung

Folgende Punkte sind speziell zu beachten:

#### Kulturenflaschen

- einwandfreie Glasflaschen und Deckel verwenden
- nur Flaschenbürsten einsetzen, welche das Glas nicht zerkratzen

#### Reinigung

- sofort nach Gebrauch gut spülen – in Lauge legen – reinigen – spülen – in Säure legen (nicht in Wickelbad oder Presswanne) – gut spülen
- ausschliesslich Reinigungs- und Desinfektionsmittel verwenden, die sich gut abspülen lassen und die keine quaternären Ammoniumverbindungen (QAV) enthalten
- Konzentration der Reinigungsmittel-Lösungen einhalten
- gereinigte Flaschen entweder sofort wieder verwenden oder mit der Öffnung nach unten an einem geeigneten Standort aufbewahren



Abb. 8: Arbeitsplatz zur Kulturenherstellung

#### Nährmedium, Füllen der Flaschen:

- frisch zentrifugierte Magermilch oder Pulvermagermilch (9 Liter Wasser und 1 kg Instant-Magermilchpulver)
- Füllhöhe: Das Normvolumen der Flasche möglichst ausnutzen, aber ausreichend Kopfraum für die Wärmeausdehnung des Mediums lassen.

=> Magermilch immer frisch sterilisieren

### 5.2 Erhitzen der Magermilch

Für die Sterilisation hat sich die Erhitzung im Dampfkochtopf oder im Autoklav sehr gut bewährt. Als Massstab für die Erhitzungstemperatur und die –zeit gilt die Bräunung der Milch nach der Sterilisation. Die sterilisierte Milch sollte nur eine schwache Bräunung aufweisen. Idealerweise wird die erhitzte Magermilch bis zum Gebrauch im Kühlraum gelagert!

Wird als Nährmedium UHT-Magermilch verwendet, ist darauf zu achten, dass diese an einem hygienisch einwandfreien, trockenen Ort gelagert wird.

Wird anstelle einer Sterilisation die Milch nur während 90 – 120 Minuten bei 95 – 98 °C erhitzt (Bert-schinger Kochtopf), ist besonders darauf zu achten, dass:

- Magermilch bzw. Milchpulver eingesetzt wird, das speziell für die Kulturenproduktion geeignet ist
- das Medium nach der „Sterilisation“ gut gekühlt und rasch verwendet wird (Gefahr auskeimender, ev. psychrotropher Sporen)

### 5.3 Impfen der Betriebskultur

- Trockener, hygienisch einwandfreier Standort im Freien oder in einem geeigneten, von der Produktion unabhängigen Raum
- das Impfen des Nährmediums sollte entweder am Morgen als erste Arbeit oder geduscht und umgezogen nach der Käseproduktion erfolgen
- Ein Luft eintrag ins Kulturenfläschli beim Impfen ist zu vermeiden (Rückführung der Pipette ins Fläschli in gepresster Haltung)
- Werden die Kulturen im Wasserbad bebrütet, soll das Nährmedium kalt geimpft werden (geringeres mikrobiologische Kontaminationsrisiko). Wird die Sterilmilch vor dem Beimpfen auf die Bebrütungstemperatur eingestellt, muss diese mindestens während 12 Stunden im Wärmeschrank zur Temperatureinstellung gelagert werden.
- Desinfektion der Hände und des „Impfumfeldes“. Geeignet sind Alkohol 80 Vol-% oder Isopropanol 70 Vol-% bei einer Einwirkungszeit von mindestens 1 Minute während derer die Fläche gut befeuchtet sein muss.



## 6. Einfluss der Jahreszeit und der Betriebsauslastung

### 5.4 Bebrütung

Während der Lagerung von Betriebskulturen nimmt deren Aktivität ab (Säure). Daher bewährt sich das Kaltlagern der beimpften Sterilmagermilch und das Bebrüten unmittelbar vor dem Gebrauch.

#### Vorteile:

- Das Fläschli mit der Stammkultur muss idealerweise nur einmal geöffnet werden
- Die Aktivität der MSB bleibt beim pH-Wert der Sterilmilch besser erhalten als in der Stammkultur mit tiefem pH-Wert.

### 5.5 Herstellung von Fettsirtenkulturen

In der Herstellung von Fettsirtenkulturen (FSK) gibt es je nach Ziel und Zweck viele Variationen. Um eine ausgeglichene Aktivität zu erreichen, gelten folgende allgemeine Regeln:

- peinlich sauberes Arbeiten
- Kulturentöpfe und Utensilien vor Gebrauch brühen
- Kein Kontakt von Sirte und Utensilien mit den Händen
- tägliche frische Herstellung der FSK
- Einsatz vor Gebrauch: Oberste Schicht dekantieren, Bodensatz mit abgebrühtem Löffel aufrühren

### 5.6 Kontrolle der Kultur

Von jeder Charge sind zu kontrollieren:

- Aussehen (Farbe, Geruch und Geschmack)
- Säuregrad

Massnahmen bei Säurestörungen: Wenn bei fachgerechter Herstellung der gewünschte Säuregrad nicht innerhalb der gewünschten Zeit erreicht wird, lohnt sich langes Pröbeln nicht. In einer solchen Situation ist es empfehlenswert, mit einer Sirte oder FSK aus einer anderen gut fabrizierenden Käserei neu zu starten. Unter Umständen muss diese Massnahme während mehreren Tagen in Folge ergriffen werden.

### 5.7 Kulturenrotation

Die ALP Starterkulturen weisen im Allgemeinen eine gute Säuerungsaktivität und eine gewisse Robustheit in Bezug auf Säuerungsstörungen auf. Als besonders robust gelten die RMK 105, 124 und 302. Die Wahl der Kulturen sollte in erster Linie betriebsspezifisch erfolgen. Um Säuerungseinbrüche möglichst völlig auszuschliessen, werden die Kulturen in einem Teil der Käsereien rotiert. Der Nutzen dieser Massnahme ist am höchsten, wenn jeweils sämtliche Starterkulturen ausgewechselt werden.

Eine Häufung von Säuerungsstörungen geht nicht selten einher mit der kälteren Jahreszeit und/oder einer starken Betriebsauslastung (Chargenfabrikation, Spezialitäten). Eine Ausdehnung der Produktionszeiten geht zu Lasten der Standzeiten und dadurch nimmt die Luftbelastung (Luftfeuchtigkeit / Luftpartikel / Luftkontamination) zu. Die kältere Jahreszeit führt nicht selten dazu, dass die Fabrikationsräume nur noch ungenügend austrocknen können. Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nimmt die Belastung an Phagen und Keimen in der Luft zu. Trifft dies ein, erhöht sich die Gefahr von Säuerungsstörungen in der Produktion. Zur Einschränkung des Risikos sind im Besonderen zu beachten:

- genügend Frischluft auch im Winter (evtl. Fabrikationsraum heizen, Zugluft vermeiden)
- gründliche Reinigung / Desinfektion zwischen den Fabrikationen
- Aerosole möglichst vermeiden
- Gerätschaften vor Gebrauch desinfizieren (wenn möglich mit Hitze)
- häufige Raumreinigung

Bei Mehrchargenproduktion stellt sich zwangsläufig die Frage der Notwendigkeit der Reinigung zwischen den Produktionschargen. Treten Säurestörungen auf, muss auch dieser Bereich kritisch hinterfragt werden.

## 7. Kritische Fabrikationsparameter

### 7.1 Vorbereitung der Kessmilch

Die Vorreifung der Kessmilch beeinflusst die spätere Säuerung und Entsirtung im jungen Käse. Wird eine zu kurze Vorreifungszeit gewählt, verringert sich die Griffentwicklung und es säuert langsam im Käse. Mit dem Pressen verdichtet sich die Käsemasse; eine später einsetzende Milchsäuregärung führt zu einem Sirtenstau in der Randzone. Teigverfärbungen entstehen. Säuert der Käse zu schnell, verliert er mehr Wasser und in der Regel auch mehr Calcium. Der Käseteig wird fester und kürzer.

Das Schütten der Betriebskulturen erfolgt üblicherweise zu Beginn des Milchwärmens. Eine schonende und langsame Erwärmung der Kessmilch verbessert die Säuerungsfähigkeit der MSB. Ein Warmhalten der gesamten Kessmilch während 5-20 Minuten stärkt die Säuerungsbereitschaft und Verkäsbarkeit.

Wird die Milch über 12 bis max. 18 Stunden gelagert, wird eine Lagertemperatur zwischen 8 und 13°C empfohlen. Je kälter die Milch gelagert wurde, umso länger muss die Vorreifungszeit sein.

Die Vorreifung ist sortenspezifisch. In der Regel gelten die in Tab. 7 zusammengestellten Parameter für das Vorreifen der Kessmilch.

Wird mit lyophilisierten Kulturen gekäst, sind die Vorgaben des Herstellers strikte zu beachten. Bei Halbhartkäse wird mehrheitlich während mindestens einer Stunde auf Labungstemperatur vorgereift.

### 7.2 Temperaturführung

Die Temperaturführung während der Käsefabrikation ist abhängig von der Käsesorte und lässt trotz Pflichtenheft und Sortenreglemente einen variablen Prozessbereich zu. Die thermophilen Milchsäurebakterienkulturen von ALP sind ziemlich wärmetolerant.

Bei mesophilen Einzelstamm- bzw. Mehrstammkulturen sind Nachwärmtemperaturen über 40°C für eine optimale Milchsäuregärung ungeeignet. Zur Verbesserung der Verkäsungsbereitschaft der Kessmilch eignen sich beim Emmentaler die Kulturen MK 401, MK 2020, MMK 501 und Lc 17 in einer Menge von 0.2-0.5‰.

Ein schonendes Wärmen des Bruches erlaubt den MSB eine gewisse Anpassung an hohe Temperaturen. Bei Temperaturen >52°C beginnen auch thermophile MSB abzusterben und die Milchsäuregärung verzögert sich. Besonders stark wird dieser Effekt bei Brenntemperaturen >57°C. In diesem Temperaturbereich macht bereits ein Grad mehr einen grossen Unterschied!

Tab. 7: Säuerungsspezifische Parameter für die Käseherstellung

Käsesorte	Schüttmenge	Vorreifungszeit	Säuerungskontrollen	Reduktase
Emmentaler AOC	1.5-2.5 ‰	20-75 Minuten	2h: 9.5-11.5°SH	3 ¾ -5 ¼ h
Gruyère AOC	0.8-1.2 ‰	10-40 Minuten	pH 2h: 6.30 ± 0.05 pH 4h: 6.00± 0.05	3 ½ - 4 ½ h
Sbrinz AOC	1.8-2.2 ‰	20-45 Minuten	2h: 9-11°SH	3 ¾ -4 ¾ h
Tilsiter	0.8-1.5 ‰	30-50 Minuten	pH 2h: 6.05± 0.05	3 ½ -4 ½ h
Appenzeller	0.8-1.5 ‰	30-50 Minuten	pH 2h: 5.95± 0.05	3 ½ -4 ½ h

## 8. Zusammenfassung

Abweichungen vom erwarteten Säuerungsverhalten der Kultur oder des Käses haben vielfältige Ursachen. Besonders bei der Herstellung von Rohmilchkäse können natürliche antimikrobielle Inhaltsstoffe der Milch eine Rolle spielen, wobei deren Konzentration fütterungsabhängig oder physiologisch bedingt schwankt. Bedeutender sind aber Kontaminationen der Milch mit Antibiotika. Mit zunehmender Anzahl Lieferanten erhöht sich das Risiko einer Käseerei, eine hemmstoffhaltige Milch geliefert zu bekommen. Da die in der Schweiz gebräuchliche Säuerungskontrolle in der Käsefabrikation in einigen Käseexportländern nicht als Hemmstofftest anerkannt wird, empfehlen wir den Käseereien, die Kessmilch stets einem international anerkannten Hemmstofftest zu unterziehen. Neben Antibiotika können auch Kontaminationen der Milch mit QAV-haltigen Reinigungs- und Desinfektionsmittel oder Zitzentauchmittel (Vordippmittel) die Milchsäurebakterien hemmen. Solche Mittel sollten darum nicht auf milch- oder produktberührenden Oberflächen angewandt werden.

Ein weitere wichtige Ursache von Säuerungsstörungen sind Bakteriophagen, wobei Mehrchargenbetriebe besonders stark betroffen sein können. Vorbeugende Massnahmen gegen Phagen umfassen Massnahmen im Bereich der Raumausstattung, die räumliche Trennung bestimmter Prozessschritte, optimierte Reinigungsprozesse (ohne Aerosolbildung, nicht nur alkalische Reinigung) und eine einwandfreie Hygiene bei der Herstellung der Kulturen. Auch Sirtenrahm kann eine bedeutende Phagenquelle sein, weshalb eine wöchentliche Unterbrechungen des Zyklus zu empfehlen ist. Wichtig für eine gute Säuerung ist letztlich auch eine optimale Prozessführung. Das gilt insbesondere für die Temperaturführung im Kessi und auf der Presse.

