

Die mikrobielle Biodiversität in Rohmilchkäse

Cornelia Bär¹, Elisabeth Eugster¹, Stefan Irmeler¹, Aline Moser¹ und Cosima Pelludat²

¹Agroscope, Institut für Lebensmittelwissenschaften ILM, Bern, Schweiz

²Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, Wädenswil, Schweiz

Auskünfte: Elisabeth Eugster, elisabeth.eugster@agroscope.admin.ch



Mikroorganismen ermöglichen die Produktion von Schweizer Rohmilchkäse und garantieren dessen Qualität und Sicherheit. (Quelle: Swiss Cheese Marketing)

Von allen Lebewesen weisen Mikroorganismen die grösste Diversität auf, spielen in allen Ökosystemen eine fundamentale Rolle – und sind doch kaum erforscht. Nicht zuletzt wegen ihrer «Unsichtbarkeit» für das menschliche Auge und der Schwierigkeit, sie im Labor zu kultivieren. Dabei sind Mikroorganismen allgegenwärtig, existieren seit Milliarden von Jahren und kommen in unvorstellbar grosser Zahl vor. In einem Gramm Boden gibt es ca. 10 Milliarden, die man schätzungsweise 10000 verschiedenen Arten zuordnen kann (Torsvik *et al.* 1996). Auf den Blättern dieser Welt sind es gar 10^{26} (Vorholt 2012). Diese allgegenwärtigen Organismen gezielt und zu unserem Nutzen in der Land- und Ernährungswirtschaft einzusetzen, ist ein vielversprechendes Zukunftsprojekt.

Um dieses Ziel zu erreichen, muss man jedoch zuerst das Schlüsselproblem lösen: Wie findet man in dem unvorstellbar grossen Angebot die geeigneten Kandidaten? Welcher Mikroorganismus oder welche Gemeinschaft aus Mikroorganismen besitzt die Funktion, Wirkung und Eigenschaft, die unsere Wunschvorstellung erfüllen? In den letzten Jahren ist die Lösung dieses Problems durch eine Explosion in der Entwicklung neuer genetischer Analysemethoden (Next Generation Sequencing (NGS)) näher gerückt (Mayo *et al.* 2014). Durch die DNA-Sequenzierung kann die Gesamtheit der Mikroorganismen in einem System – das Mikrobiom – erfasst und die Genomsequenz einzelner mikrobieller Stämme bestimmt werden, was erste Hinweise auf ihre Funktion

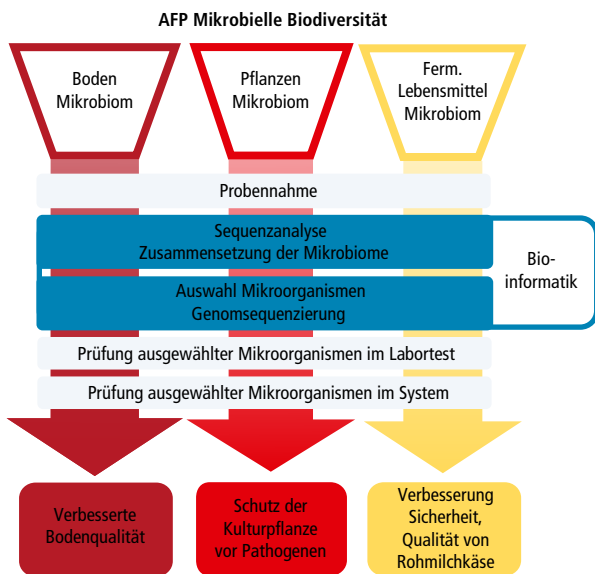


Abb. 1 | Organisation des Agroscope Forschungsprogrammes mikrobielle Biodiversität.

zulässt. Der Nachweis dieser Funktion und der Leistung, die ausgewählte Mikroorganismen in einem System zeigen, sowie der Wirkung, die erzielt wird, erfolgt anschliessend durch etablierte Tests im Labor.

Einzelne Beispiele, bei denen Mikroorganismen zu unserem Nutzen in der Landwirtschaft eingesetzt werden, gibt es bereits: Pflanzenassoziierte Mikroorganismen können Krankheiten unterdrücken (De Vrieze *et al.* 2015) und das Ausbringen von bestimmten Bodenpilzen wird dazu verwendet, gewisse Schadinsekten gezielt und langfristig im Feld zu kontrollieren (Enkerli *et al.*, 2004). Die mikrobielle Biodiversität landwirtschaftlich relevanter Ökosysteme ist jedoch grösstenteils unbekannt, und daher für uns auch nicht nutzbar.

Das Agroscope Forschungsprogramm Mikrobielle Biodiversität

Das Agroscope-Forschungsprogramm «Mikrobielle Biodiversität» (AFP MikBioDiv) hat das Ziel, die Mikrobiome und die Funktionen von Mikroorganismen in drei für die Land- und Ernährungswirtschaft relevanten Systemen Boden, Pflanze und fermentierte Lebensmittel zu untersuchen. In den Arbeitspaketen «Mikrobiom des Bodens» und «Mikrobiom der Pflanze» (Abb. 1) wird die mikrobielle Biodiversität in repräsentativen Böden der Schweiz beziehungsweise auf der Pflanzenoberfläche von Raigras, Kartoffel und Apfel analysiert. Langfristige Ziele sind die Verbesserung der Bodenqualität durch Kenntnis des Zusammenspiels von Bodennutzung

Zusammenfassung Mikroorganismen können gezielt und zu unserem Nutzen in der Land- und Ernährungswirtschaft eingesetzt werden: Sie können beispielsweise Pflanzenkrankheiten unterdrücken (De Vrieze *et al.* 2015) oder eingesetzt werden, um Schadinsekten zu kontrollieren (Enkerli *et al.* 2004). Die mikrobielle Biodiversität relevanter Ökosysteme ist jedoch grösstenteils unbekannt. Wissen in diesem Bereich zu generieren ist das Ziel des Agroscope Forschungsprogrammes «Mikrobielle Biodiversität» (AFP MikBioDiv), und zwar in drei für die Land- und Ernährungswirtschaft relevanten Systemen: Boden, Pflanze und fermentierte Lebensmittel. Die Untersuchung der mikrobiellen Biodiversität in Rohmilchkäse hat eine Reihe «unerwarteter», aber taxonomisch bekannter Bakteriengattungen zu Tage gebracht. Darüber hinaus konnten zahlreiche Gensequenzen keiner Bakterien-Gattung zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass auch im Käse bislang unerforschte Bakterien vorkommen.

und Bodenmikrobiom beziehungsweise der Schutz der Pflanze vor Pathogenen durch einzelne Mikroorganismen oder synthetische Gemeinschaften. Im Arbeitspaket «Mikrobiom fermentierter Lebensmittel» (Abb. 1) steht die Erforschung der mikrobiellen Biodiversität der Agroscope Stammsammlung (Liebefeld) sowie der Ökosysteme Fettsirte (Molke) und Rohmilchkäse im Mittelpunkt. Es ist das Ziel, die mikrobielle Vielfalt erst einmal zu identifizieren, zu erhalten und auf Basis von Genomdaten und Stoffwechsel-Aktivitäten zu erforschen, um sie dann gezielt für die Herstellung von hochwertigen und sicheren, fermentierten Milchprodukten einzusetzen. Das vierte Arbeitspaket «Agroscope-Netzwerk für Genomik und Bioinformatik (ANET-GB)» umfasst den Aufbau eines Expertennetzwerkes für Genomik und Bioinformatik mit Infrastruktur und bietet Expertise für Datenanalyse und -Integration für genomische und bioinformatische Forschung an.

Die mikrobielle Biodiversität in Rohmilchkäse

Die Herstellung von Käse gehört zu den ältesten biotechnologischen Verfahren. Hierbei werden Mikroorganismen eingesetzt, um Milch zu einem lagerbaren Produkt umzuwandeln und sie mit einer Vielfalt von Stoffwechselprodukten (beispielsweise Aromastoffen)

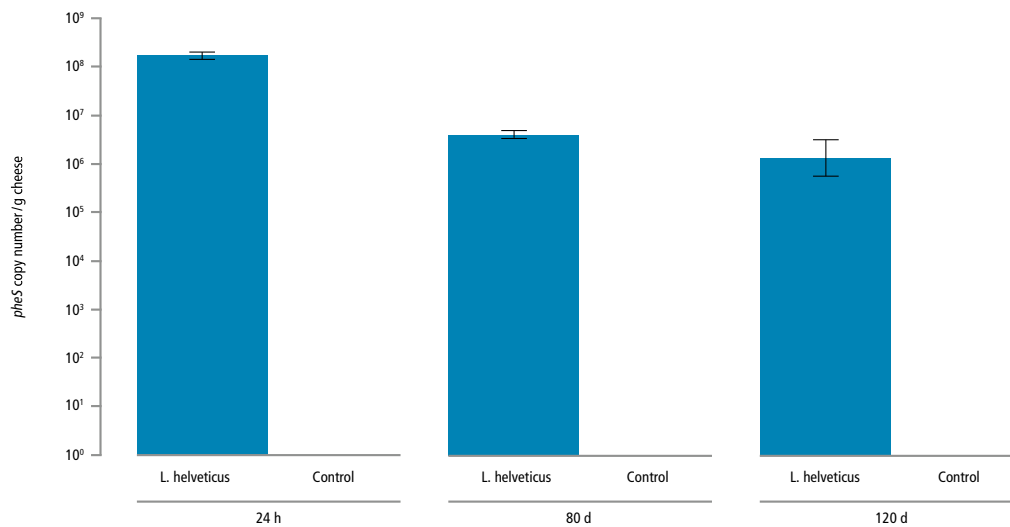


Abb. 2 | Quantitativer Nachweis *L. helveticus* in Käse, hergestellt mit und ohne (Control) *L. helveticus* als Zusatzkultur nach 24 Stunden, 80 und 120 Tagen. Lag die Konzentration an *L. helveticus* im Käse zu Beginn bei 108 Kopien g⁻¹ Käse (24 h), war sie nach 80–120 Tagen noch bei 106–107 Kopien g⁻¹ Käse (Moser *et al.* 2016).

anzureichern, wodurch Käse ihre typischen Eigenschaften erhalten.

Im Rahmen einer Doktorarbeit wird im Arbeitspaket «Mikrobiom fermentierter Lebensmittel» die mikrobielle Biodiversität von *Lactobacillus helveticus* innerhalb der Spezies und in Fettsirtekulturen untersucht. Fettsirtekulturen entstehen durch Fermentation von Molke, welche nach der Käsefabrikation zurückgehalten wird. Sie werden für die Herstellung verschiedener traditioneller Käsesorten eingesetzt und sind ein von *L. helveticus* bevorzugtes Habitat. *L. helveticus* ist ein Milchsäurebakterium und wird auch für die Herstellung von fermentierten Getränken und als Probiotikum eingesetzt. Bei der Herstellung von Käse spielt *L. helveticus* eine besondere Rolle: das Bakterium trägt massgeblich zum bakteriellen Proteinabbau sowie Peptid- und Aminosäurekatabolismus bei, der zur Bildung des typischen Aromas führt (Hannon *et al.* 2007). Um die Diversität der in der Agroscope Stammsammlung vorhandenen *L. helveticus* Stämme zu untersuchen, wurden die Genome von 80 Stämmen sequenziert. Die Sequenzdaten werden für verschiedene Fragestellungen verwendet. So wurde bereits eine spezifische, quantitative Nachweismethode für *L. helveticus* entwickelt. Weiterhin werden Korrelationsstudien durchgeführt, um die Gene, die primär für den Proteinabbau und den Peptid- und Aminosäurekatabolismus und somit massgeblich für die Entstehung des Aromas im Käse verantwortlich sind, zu identifizieren.

Ein erster Erfolg wurde mit der Entwicklung einer quantitativen, spezifischen Nachweismethode erzielt.

Die bioinformatische Auswertung der Sequenzrohdaten zeigte, dass die Sequenz des *pheS* Gens unterschiedlich genug ist, um *L. helveticus* von nahe verwandten Spezies unterscheiden zu können (Moser *et al.* 2016). Die entwickelte Methode ist sehr sensitiv (10 Kopien des *pheS* Gens pro ml oder g Probe können detektiert werden) und wird bereits in weiteren Forschungsprojekten eingesetzt, um die Spezies in verschiedenen Habitaten wie z. B. Rohmilch, Fettsirte, Käse oder fermentiertem Gemüse nachzuweisen, zu quantifizieren und während der Reifung zu verfolgen (Abb. 2).

Im Rahmen einer postdoktoralen Forschungsarbeit wird die mikrobielle Biodiversität in Rohmilchkäse, welche die biochemischen Veränderungen, die während der Reifung stattfinden, sowie die Entstehung von Käsefehlern massgeblich beeinflusst, untersucht. Um das komplexe Konsortium an Mikroorganismen in Rohmilchkäse zu analysieren, werden NGS-Technologien eingesetzt, die auch nicht-kultivierbare Mikroorganismen erfassen. Ein Blick in die vorhandene Literatur zeigt, dass in Rohmilch mehr als 400 verschiedene Bakterienarten identifiziert werden (Montel *et al.* 2014). Die neuen Techniken ermöglichen nicht nur, die Genome im Rohmilchkäse zu sequenzieren, sondern auch ihre aktiven Gene zu identifizieren (Metagenom- und Metatranskriptomanalyse), dadurch kann das Mikrobiom eines Rohmilchkäses erforscht und in Bezug auf seine funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden. So werden Mikroorganismen, die aus der Rohmilch, aus der Käsereiumgebung und aus den Starterkulturen stammen, identifiziert und

ihre Entwicklung während der Käsereifung lässt sich verfolgen. Weiterhin kann der Einfluss von technologischen Parametern auf die mikrobielle Biodiversität untersucht werden. Interessant ist auch der Vergleich von Mikrobiomen aus Käsen mit guter und Käsen mit verminderter Qualität, um den Einfluss der Mikroorganismen auf die Käsequalität besser zu verstehen.

Ein erster Meilenstein wurde mit der Etablierung eines Arbeitsablaufs (Workflows) erreicht, der es ermöglicht, die Mikroorganismen in Käse zu identifizieren. Hierzu wurde die DNA einer Käseprobe (Rohmilchkäse, 90 Tage) extrahiert und die 16S rRNA Gene, auf denen die verwandtschaftlichen Beziehungen von Bakterien basieren, mittels Amplicon-Sequenzierung auf einer Ion Torrent Plattform sequenziert. Die bioinformatische Auswertung und taxonomische Zuordnung der erhaltenen Sequenzen erfolgte über MG-RAST (Meyer *et al.* 2008). In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Metagenomanalyse dieser Rohmilchkäseprobe dargestellt (Bär *et al.* 2016). Neben den bekannten Gattungen wie beispielsweise *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium* die aus der Rohmilch oder der Käseumgebung stammen oder als Starter- oder Zusatzkultur zugegeben wurden, wurde eine Reihe unerwarteter, aber taxonomisch bekannter Bakteriengattungen (z.B. *Weissella*, *Rhodococcus*) gefunden. Darüber hinaus konnten zahlreiche Gensequenzen keiner Bakterien-Gattung zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass auch im Käse-Habitat bislang unerforschte Bakterien vorkommen.

Weitere Analysen werden folgen, um das Mikrobiom eines Rohmilchkäses zu beschreiben und die Zusammen-

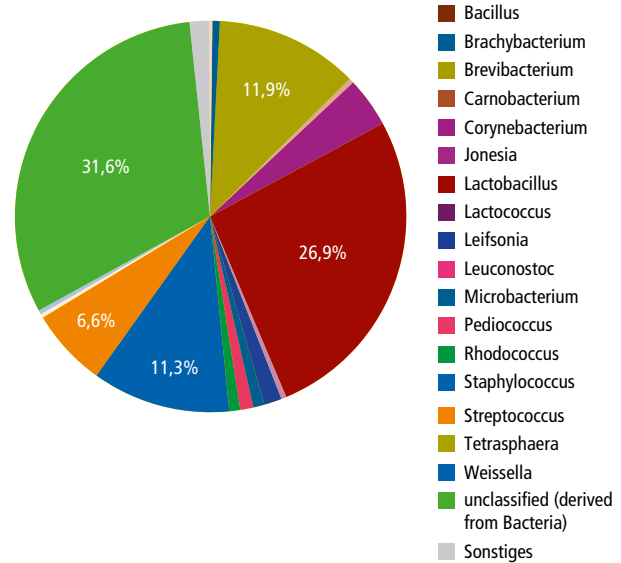


Abb. 3 | Mikrobiom eines 90 Tage gereiften Rohmilchkäses, basierend auf einer 16S Metagenomanalyse. Die phylogenetische Zuordnung erfolgte über MG-RAST (Bär *et al.* 2016).

setzung, Eigenschaften und Dynamik der Subpopulationen auf die Käsequalität zu charakterisieren. Sie werden die Grundlage dafür sein, dass wir den Einfluss der Mikroorganismen auf die Biochemie der Käsereifung besser verstehen und somit die Reifung besser kontrollieren und gegebenenfalls sogar beschleunigen können. Ursachen von Käsefehlern, die zu einer Wertminderung führen, werden besser verstanden und Massnahmen zur Qualitätsverbesserung können ergriffen werden. ■

Literatur

- Bär C., Moser A., Wechsler D. & Irmeler S., 2016. Insights into the microbial biodiversity of cheese. *25th International ICFMH Conference* 2016.
- De Vrieze M., Pandey P., Bucheli T. D., Varadarajan A. R., Ahrens C. H., Weisskopf L. & Bailly A., 2015. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential antimycete agents. *Frontiers Microbiology* **6**, 1295.
- Enkerli J., Widmer F. & Keller S., 2004. Longterm persistence of *Beauveria brogniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biological Control* **29**, 115–123.
- Hannon J.A., Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Delahunty C.M. & Beresford T.P. 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* **17**, 316–327.
- Mayo B., Rachid C.T.C.C., Alegria Á., Leite A.M.O., Peoxoto R.S., Delgado S., 2014. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. *Current Genomics* **15**, 293–309.
- Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E. M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J. & Edwards R. A., 2008. The Metagenomics RAST server – A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **2008**, **9**, 386.
- Montel MC, Bchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, Berthier F. 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* **177**, 136–154.
- Moser A., Berthoud H., Eugster E., Meile L. & Irmeler S., 2016. Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* by real-time PCR (submitted).
- Torsvik V., Sorheim R. & Goksoyr J., 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – A review. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 170–178.
- Vorholt J. A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews Microbiology* **12**, 828–840.