

## Interaktionen zwischen Propionsäurebakterien und Starter/ Nicht-Starter-Milchsäurebakterien in Emmentaler

Juni 2002, Nr. 440

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	3
Material und Methoden	3
Resultate und Diskussion	4
Schlussfolgerungen	7
Literatur	8

Titelbild:  
Röntgenbilder von Emmentaler

Original erschienen in:  
dmz (2002) (noch nicht erschienen)

Impressum:

Herausgeber:  
FAM  
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft  
Liebefeld  
CH-3003 Bern  
Telefon +41 (0)31 323 84 18  
Fax +41 (0)31 323 82 27  
<http://www.admin.ch/sar/fam>  
e-mail [info@fam.admin.ch](mailto:info@fam.admin.ch)

Autoren:  
Marie-Therese Fröhlich-Wyder

Kontaktadresse für Rückfragen:  
M.-T. Fröhlich-Wyder  
e-mail [marie-therese.froehlich@fam.admin.ch](mailto:marie-therese.froehlich@fam.admin.ch)  
Telefon +41 (0)31 323 82 23  
Fax +41 (0)31 323 82 27

Erscheinungsweise:  
In unregelmässiger Folge mehrmals jährlich.

Ausgabe:  
Juni 2002, Nr. 440

# Interaktionen zwischen Propionsäurebakterien und Starter/Nicht-Starter-Milchsäurebakterien in Emmentaler

Marie-Therese Fröhlich-Wyder  
Eidgenössische Forschungsanstalt  
für Milchwirtschaft (FAM),  
Liebefeld, CH-3003 Bern

## 1. Einleitung

Propionsäurebakterien (PSB) werden in der Schweiz für die Herstellung von Emmentaler Käse eingesetzt, um die charakteristische Lochung und das typische nussige Aroma zu erzielen. Die Vielfalt der natürlich vorkommenden Stämme ist gross und wurde glücklicherweise nicht beeinflusst durch den Einsatz von kommerziellen Kulturen [9].

PSB sind salzempfindlich und wachsen optimal bei einem pH zwischen 6 und 7. Sie entwickeln sich gut im Käse, jedoch weniger gut in Milch [14]. Ihr Metabolismus im Käse ist sehr komplex und noch nicht bis ins Detail geklärt [7]. Zwei wichtige, unterschiedliche Stoffwechselwege zur Verwertung der Energiequelle Laktat wurden beschrieben: In der klassischen Propionsäuregärung entstehen aus drei Molekülen Laktat ein Molekül  $\text{CO}_2$ . Im anderen Fall wird Aspartat zusammen mit Laktat fermentiert unter Freisetzung von Succinat und zusätzlichem  $\text{CO}_2$  [3, 5, 6]. Sowohl Laktat als auch Aspartat sind im Käse in grosser Menge verfügbar.

Fakultativ heterofermentative Nicht-Starter Laktobazillen (FH) werden in der Emmentaler Fabrikation zur Hemmung der Propionsäuregärung eingesetzt [15]. Jimeno et al. [10] konnten nachweisen, dass im Vergleich zu einer Kontrolle das Wachstum der Propionsäurebakterien um bis zu 80 % reduziert wurde, wenn FH Laktobazillen (*Lactobacillus casei* und *Lb. rhamnosus*) zum Einsatz kamen.

Während der Käsureifung spielt die Proteolyse eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Textur und des Flavours. Verstärkter Eiweissabbau führt zu einer

beschleunigten Reifung. Dies ist allgemein erwünscht, wenn nicht nachteilige Nebeneffekte auftauchen wie eine verminderte Reifungstauglichkeit. Beim Emmentaler kann eine beschleunigte Reifung zusammen mit einer verstärkten Propionsäuregärung zu einer Nachgärung führen [1]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass thermophile Laktobazillen die PSB stimulieren können [4, 11, 12, 13]. Im Speziellen bei *Lb. helveticus* konnte diese Stimulation auf eine Freisetzung von Peptiden und freien Aminosäuren oder auf eine Beseitigung einer Inhibitor-Substanz zurückgeführt werden [11].

Die erwähnten Mikroorganismen werden häufig in Emmentaler gefunden oder aber sogar zu deren Herstellung eingesetzt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktionen untereinander und deren Einfluss auf die Qualität der Käse zu untersuchen und besser zu verstehen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Die verwendeten Kulturen

Zwei verschiedene Kulturen von *Propionibacterium freudenreichii* sp. *shermanii* wurden verwendet, eine mit schwacher (Prop96) und die andere mit starker Aspartase Aktivität (Prop90). Die *Lb. helveticus* Kultur ist eine Mischung aus 3 Stämmen von *Streptococcus thermophilus* und aus 4 Stämmen von *Lb. helveticus*. Die FH Kultur besteht aus 3 *Lactobacillus casei* Stämmen, isoliert aus einem reifen Emmentaler guter Qualität. Sie ist Bestandteil des Kulturenangebotes der

FAM und wird an Käseereien verkauft, um die Gefahr der Nachgärung bei Emmentaler einzudämmen.

## 2.2. Der Versuch

Die Käse wurden im Pilotplant der FAM gemäss dem Standardprotokoll für Modell-Emmentaler hergestellt. Pro Tag wurden 8 Käse hergestellt. Die Analysen wurden wie in [2] beschrieben durchgeführt.

Beim gewählten Design handelt es sich um einen wiederholten Versuch mit 4 Faktoren auf 2 Stufen. Dies ergibt somit 4 Blöcke zu 8 Käse. Mit solch einem Design können mehrere Faktoren und Stufen gleichzeitig getestet werden. Die PSB-Kulturen (Prop96/Prop90), *Lb. helveticus* (mit/ohne) und die FH Laktobazillen (mit/ohne), wie auch die Saison der Milchproduktion (Gras- oder Dürrfütterung) standen für je einen Faktor auf 2 Stufen.

## 3. Resultate und Diskussion

### 3.1. Die Fütterung

Wintermilch (Dürrfütterung) ist erfahrungsgemäss weniger ‚reif‘ und, wenn diese zu Emmentaler verarbeitet wird, anfälliger als Sommermilch (Grünfütterung) auf eine Nachgärung. Käseproduzenten beobachten bei der Verarbeitung von Wintermilch i.a. einen leicht verlangsamten Säuerungsverlauf mit resultierendem tieferen pH und somit einem höheren Wasser- und Laktatgehalt im 1tägigen Käse. Dasselbe beobachteten auch wir in unserem Versuch: Im Winter war der Säuerungsverlauf langsamer (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Wasser- und Laktatgehalte waren somit nach einem Tag höher; der pH war nicht nur nach 1 Tag, sondern auch am Ende der Reifezeit tiefer (Tabelle 1). Diese Faktoren könnten die Ursache für mehr PSB sein, die dann mehr Laktat verbrauchen und somit mehr Propionsäure und CO<sub>2</sub> freisetzen (Tabellen 2-3). Der höhere Wassergehalt konnte auch andere enzymatische Reaktionen, nämlich die Proteolyse ankurbeln, wie dies Tabelle 1 zeigt.

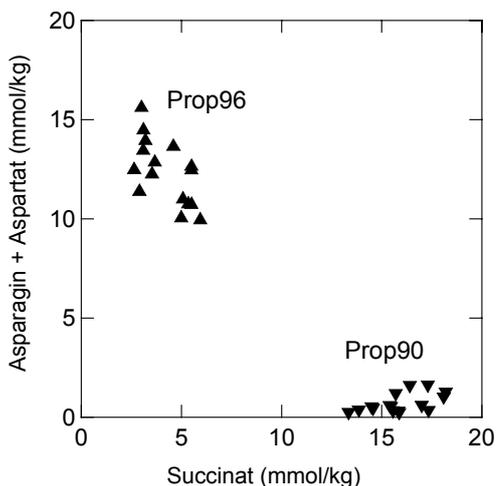
**Tabelle 1:**  
**Wasser, Laktat, pH und Proteolyseparameter (180 Tage) im Emmentaler**

Faktor	N	Wasser (g/kg)		Laktat (mmol/kg)		pH 180d	TN (g/kg) 180d	WLN (% TN) 180d	NPN (% WLN) 180d	Freie AS (mmol/kg) 180d
		1d	180d	1d	180d					
Fütterung										
Gras	16	372.5	326.2	125.6	26.9	5.83	46.5	23.2	61.9	175.5
Heu	16	373.9	331.4	131.3	25.5	5.72	44.7	25.0	64.6	199.1
PSB										
Prop96	16	372.9	328.2	128.3	34.5	5.77	45.5	24.6	63.1	196.8
Prop90	16	373.5	329.4	128.6	17.9	5.78	45.6	23.6	63.2	177.8
<i>Lb. casei</i>										
mit	16	372.9	328.9	128.9	51.2	5.76	45.6	24.5	63.3	191.9
ohne	16	373.5	328.7	127.9	1.2	5.79	45.6	23.7	63.0	182.7
<i>Lb. helveticus</i>										
mit	16	372.8	328.5	127.9	25.4	5.78	45.6	24.0	64.5	196.0
ohne	16	373.6	329.1	129.0	26.9	5.77	45.6	24.2	61.8	178.5
ANOVA										
Fütterung		*	***	***	–	***	***	***	***	**
PSB		–	–	–	***	–	–	**	–	**
<i>Lb. casei</i>		–	–	–	***	***	–	*	–	–
<i>Lb. helveticus</i>		–	–	–	–	**	–	–	***	*

– nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; PSB Propionsäurebakterien; TN = totaler Stickstoffgehalt; WLN = wasserlöslicher Stickstoff; NPN = Nichtprotein Stickstoff; AS = Aminosäuren

### 3.2. Die Aspartase Aktivität der PSB

Die Abbildung 1 verdeutlicht anhand des Gehaltes an Succinat und der Summe von Asparagin und Aspartat, dass sich die beiden Kulturen Prop96 und Prop90 in ihrem Aspartat Metabolismus unterscheiden. Es wird häufig beobachtet, dass die Fähigkeit Aspartat zu metabolisieren auch mit einem stärkeren Wachstum der PSB gekoppelt ist. Dies führt zwangsläufig zu höheren Konzentrationen an Propionsäure, Essigsäure und CO<sub>2</sub> (Tabellen 2 und 3). Derselbe Sachverhalt wurde schon in einer vorhergehenden Arbeit beschrieben [16].



**Abbildung 1:**  
**Unterschiedlicher Aspartat-Metabolismus zweier Propionsäurebakterien-Kulturen in Emmentaler von 6 Monaten (Prop96: schwach Aspartase-positiv; Prop90: stark Aspartase-positiv)**

Die Kultur Prop90 in Abwesenheit von FH Laktobazillen führte zu mehr und zu grösseren Löchern im Käse (Abbildung 2), und somit zu höheren Laiben als Folge der starken CO<sub>2</sub> Produktion (Tabelle 3). Dies sind alle Zeichen, die auf eine mögliche Nachgärung hinweisen [1]. Die Kultur hat jedoch nicht nur diese nachteilige, sondern auch eine erwünschte Wirkung: Das Aroma ist viel intensiver (unveröffentlichtes Ergebnis), was wir in der Arbeit von Wyder et al. [16] gleichermassen beschreiben

konnten. Die Ursache dafür ist im stärkeren Aminosäurenkatabolismus zu suchen, der zu mehr flüchtigen Aromakomponenten führt.

### 3.3. Die fakultativ heterofermentativen Laktobazillen

Während der Reifezeit ist die Zahl an FH Laktobazillen deutlich angestiegen, auch in den Käse ohne Zusatz der Kultur. Diese stammen mit Sicherheit aus der Rohmilch, machen jedoch nicht mehr als 10 % der FH Laktobazillen in den Käse mit Zusatz der *Lb. casei* Kultur aus (Tabelle 2).

Citrat wird mehrheitlich von FH Laktobazillen konsumiert. Wie Tabelle 2 zeigt, führt die Citrat-Vergärung zu zusätzlicher Ameisen- und Essigsäure. Propionsäure und CO<sub>2</sub> wurden weniger freigesetzt, da die FH Laktobazillen die Propionsäuregärung hemmen. Der Aufenthalt der Käse im Gärraum verlängert sich somit (Tabelle 3). Diese Wirkung wird in der Schweiz seit 1989 gezielt ausgenutzt, um die Propionsäuregärung zu kontrollieren. Die Nachgärungsfälle erfuhren dadurch einen starken Rückgang. Man kennt bis heute den Mechanismus dieser Hemmwirkung nicht genau. Gemäss Jimeno et al. [10] könnten die vermehrte Ameisen- und Essigsäureproduktion zu einer Hemmung der PSB führen.

In unserem Versuch konnten wir eine spezifische Interaktion zwischen den FH Laktobazillen und PSB bestätigen, die die Emmentaler-Fabrikanten schon aus Erfahrung kennen: Die Prop96 wird von den FH Laktobazillen stärker gehemmt als die Prop90. Dies ist mit ein Grund, wieso Prop90 (starke Aspartase-Aktivität) ein grösseres Risiko für Nachgärung bildet.

### 3.4. *Lb. helveticus*

*Lb. helveticus* setzt theoretisch DL-Laktat im Verhältnis 1:2 frei. Deshalb findet man mehr D-Laktat in den 1tägigen Käsen, die mit *Lb. helveticus* hergestellt wurden (55.5 im Gegensatz zu 50.4 mmol/kg).

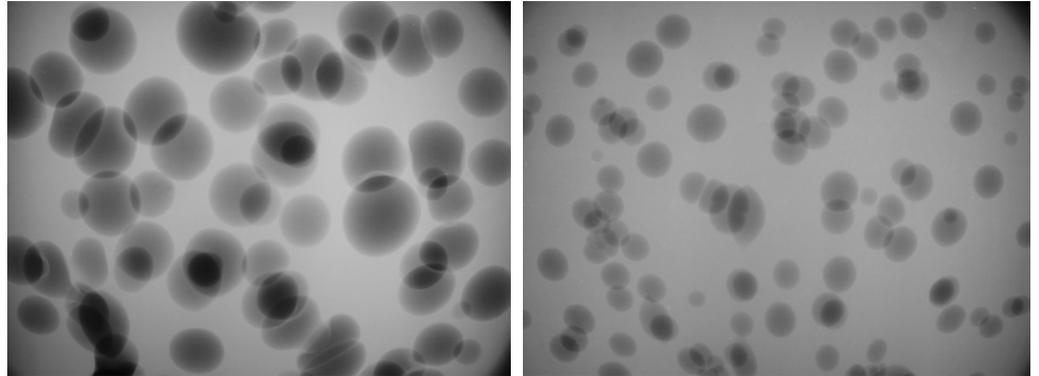


Abb. 2: Röntgenbilder von Emmentaler im Alter von 6 Monaten (links: hergestellt mit Prop90 und *Lb. helveticus*; rechts: hergestellt mit Prop96 und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen)

Tabelle 2: Flüchtige Fettsäuren (FIFS), Succinat und Citrat in mmol/kg, sowie Propionsäurebakterien und FH Laktobazillen (log KBE/g) in Emmentaler (6 Monate)

Faktor	N	C1	C2	C3	C4	C6	FIFS	Succinat	Citrat	FHL	PSB
Fütterung											
Gras	16	1.7	41.5	75.8	0.87	0.32	120.4	9.8	4.2	7.24	8.12
Heu	16	2.4	51.6	88.7	1.17	0.36	144.4	10.4	3.3	7.23	8.03
PSB											
Prop96	16	2.3	43.3	76.6	1.03	0.32	123.8	4.2	3.8	7.30	7.56
Prop90	16	1.8	49.8	87.9	1.02	0.36	141.0	15.9	3.7	7.17	8.59
<i>Lb. casei</i>											
mit	16	3.5	47.3	68.6	1.05	0.33	121.1	9.3	0.2	7.53	7.95
ohne	16	0.6	45.8	95.9	0.99	0.35	143.7	10.8	7.4	6.94	8.20
<i>Lb. helveticus</i>											
mit	16	2.2	47.3	82.0	1.02	0.34	133.0	10.2	3.6	7.30	7.97
ohne	16	1.9	45.9	82.5	1.02	0.34	131.8	9.9	3.9	7.17	8.18
ANOVA											
Fütterung		*	***	***	***	**	***	–	***	–	–
PSB		*	***	***	–	**	***	***	–	–	***
<i>Lb. casei</i>		***	–	***	–	–	***	***	***	***	–
<i>Lb. helveticus</i>		–	–	–	–	–	–	–	*	–	–

– nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; PSB Propionsäurebakterien; C1 = Ameisensäure; C2 = Essigsäure; C3 = Propionsäure; C4 = Buttersäure; C6 = Capronsäure; FHL = FH Laktobazillen

Die meisten *Lb. helveticus* Stämme besitzen normalerweise auch eine Peptidase- und Proteinase-Aktivität, die höher ist als bei anderen Laktobazillen [8]. Dies zeigt sich in einer höheren Leucin-aminopeptidase Aktivität (4.3 IE im Vergleich zu 1.3 IE) und in den höheren Anteilen an kleineren Peptiden (NPN in Tabelle 1) und an Aminosäuren.

Schliesslich kann man *Lb. helveticus* für eine kürzere Aufenthaltsdauer der Emmentaler im Gärraum verantwortlich machen (Tabelle 3). Eine mögliche Erklärung ist die verstärkte Proteolyse, die zu einem höherem pH und somit besseren Wachstumsbedingungen für die PSB führt. Zusätzlich werden durch die Proteolyse mehr Asparagin und Aspartat freigesetzt, die von den PSB in Abhängigkeit ihrer Aspartase-Aktivität metabolisiert werden können. Auch wird der Käseteig durch die Proteolyse kürzer und brüchi-

ger, bzw. weniger elastisch und kann das zusätzlich gebildete CO<sub>2</sub> nicht mehr auffangen. Es entstehen Risse im Teig. So kann *Lb. helveticus* das Risiko einer Nachgärung erhöhen.

#### 4. Schlussfolgerungen

Über die Interaktionen zwischen Propionsäurebakterien, fakultativ heterofermentativen Laktobazillen und *Lb. helveticus* ist bereits viel bekannt. Trotzdem bleiben viele Fragen unbeantwortet. In dieser Arbeit konnten wir zwar zeigen, dass der Aspartat-Metabolismus mit einem stärkeren Wachstum der PSB und einer intensiveren Propionsäuregärung gekoppelt ist. Und doch konnten wir nicht aufzeigen, ob die Aspartase-Aktivität die Ursache oder nur ein Indikator ist.

Die FH Laktobazillen hemmen offensichtlich die PSB mit einer kleineren Aspar-

Tabelle 3: Lochbildung in Emmentaler Käse

Faktor	N	Tage im Gärraum	Lochanzahl		Lochgrösse (mm)		Laibhöhe (cm)	CO <sub>2</sub> (mmol/kg)
			40 d	180 d	40 d	180 d	180 d	40 d
Fütterung								
Gras	16	59.50	56.4	153.8	11.0	7.3	21.0	18.2
Heu	16	63.69	55.9	88.3	10.8	9.4	26.0	24.8
PSB								
Prop96	16	65.75	59.8	101.7	10.6	8.3	22.2	19.1
Prop90	16	57.44	52.5	140.4	11.3	8.4	24.8	24.0
<i>Lb. casei</i>								
mit	16	64.69	82.1	101.1	10.7	9.8	22.6	17.8
ohne	16	58.50	30.1	141.1	11.2	6.9	24.4	25.2
<i>Lb. helveticus</i>								
mit	16	60.44	67.4	128.6	11.0	8.5	23.3	21.8
ohne	16	62.75	44.9	113.6	10.9	8.2	23.7	21.3
<b>ANOVA</b>								
Fütterung		***	—	***	*	***	***	*
PSB		***	—	*	***	—	—	—
<i>Lb. casei</i>		***	**	*	***	***	—	*
<i>Lb. helveticus</i>		**	—	—	—	—	—	—

— nicht signifikant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; PSB Propionsäurebakterien

tase-Aktivität stärker als diejenigen mit einer grösseren Aktivität. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten konnten wir nicht finden.

Obwohl *Lb. helveticus* in den Emmentaler unseres Versuches nicht dominierte, konnten wir aufzeigen, dass die Spezies wegen ihrer proteolytischen Aktivität das Risiko einer Nachgärung vergrössert. Heutzutage ist es möglich, die Propionsäuregärung während der Reifung zu kontrollieren. Seit der Einführung von Starter Milchsäurebakterien in den 70er Jahren, den FH Laktobazillen im Jahre 1989 und 1996 einer PSB-Kultur mit schwacher Aspartase-Aktivität (Prop96),

ist der Fehler der Nachgärung in der Schweiz praktisch eliminiert. Es ist möglich, Emmentaler mit einer massgeschneiderten Lochung herzustellen (Abbildung 2): Grosse Löcher kann man mit dem kombinierten Einsatz von *Lb. helveticus* und einer stark Aspartase-positiven PSB Kultur erzielen. Kleine Löcher erhalten wir mit dem kombinierten Einsatz von FH Laktobazillen und einer schwach Aspartase-positiven PSB Kultur.

## 5. Literatur

Die Literaturliste kann bei der Autorin bezogen werden

