

Rohmischkulturen sind sehr vielfältig

Seit 35 Jahren erweisen sich ALP-Rohmischkulturen in der Käsefabrikation als sehr stabil und robust. Eine Erklärung dafür kann die genetische Vielfalt der in den Rohmischkulturen enthaltenen Laktobazillen-Stämme sein.

Dino Isolini, Alexandra Roetschi, Elisabeth Eugster.* In der Stammsammlung der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) befinden sich 1400 Isolate von *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Die meisten wurden aus Schweizer Käse und aus den ALP-Rohmischkulturen isoliert.

Rohmischkulturen (RMK) sind rohe Gemische von *L. delbrueckii* subsp. *lactis* und *S. thermophilus*; die Anzahl der enthaltenen Stämme ist nicht bekannt. Sie wurden zwischen 1975 und 1986 aus Fettfirtekulturen, die aus gut fabrizierenden Betrieben in der ganzen Schweiz stammten, gewonnen. Zwölf solcher RMK-Kulturen befinden sich im Versandsortiment ALP und werden wöchentlich produziert und vertrieben. Diese werden als Starter in der Herstellung der typischen, harten und halbharten Schweizer Käsesorten eingesetzt.

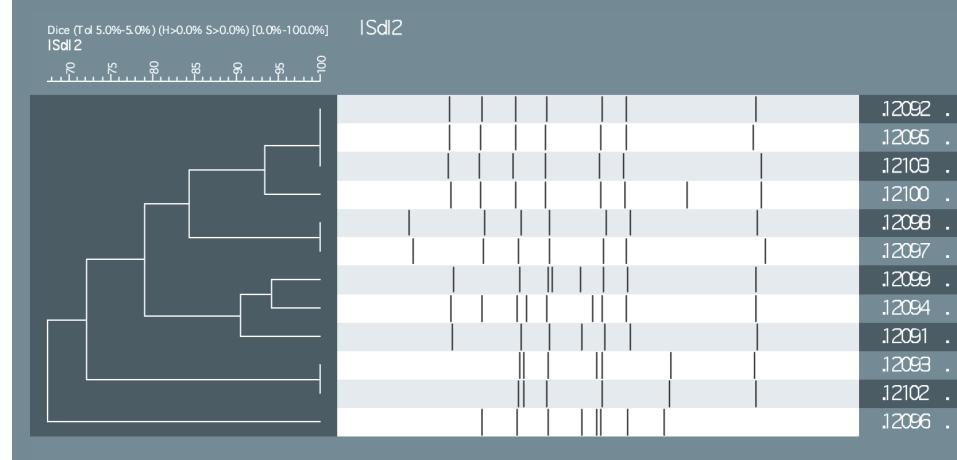
In der ALP-Stammsammlung sind aber noch immer etwa 200 verschiedene RMK aus den siebziger Jahren konserviert. Aus diesen Mischungen wurden Stämme isoliert und auf verschiedene käsereitechnologisch relevante sowie physiologische und molekularbiologische Eigenschaften untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Isolate je nach Eigenschaft sehr unterschiedlich sein können.

In diesem Artikel ist die genetische Charakterisierung von insgesamt 491 (davon 381 aus den RMK) Isolaten aus der ALP-Stammsammlung zusammengefasst. Die Untersuchung brachte eine erstaunlich hohe Biodiversität der ALP-Rohmischkulturen hervor.

Untersuchte Stämme

Die Isolierung von *Lactobacillus*-Stämmen aus dreizehn verschiedenen RMK erfolgte in der Zeit von 1977 bis 1980. Es wurden Kulturen ausgewählt, die damals im Versand-

**Der phylogenetische Baum zeigt die Diversität der in der Rohmischkultur 325 enthaltenen Stämme
L'arbre phylogénétique montre la diversité des souches présentes dans la culture mixte brute 325.**



**Von zwölf untersuchten Isolaten aus der Rohmischkultur 325 wurden 8 verschiedene Genotypen gefunden.
Parmi douze isolats analysés provenant de la culture mixte brute 325, 8 génotypes différents ont été trouvés.**

sortiment ALP waren. Die Identifikation der Isolate erfolgte mit Hilfe von API 50CHL unter Berücksichtigung der gebildeten Milchsäure-Isomere. Es handelt sich bei allen untersuchten Isolaten um *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.

Genotypisierung mit DNA-Fragmenten

Um Bakterien genetisch zu typisieren, stehen an der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine davon verwendet die Transposone. Transposone sind DNA-Fragmente, welche von einem Ort zu einem anderen im Bakteriengenom springen können. Transposone kommen in variabler Kopienanzahl im Genom von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* vor und erlauben eine gute Differenzierung der verschiedenen Stämme.

Aus allen untersuchten Isolaten wurde die DNA extrahiert. Die DNA wurde mit einem Restriktionsenzym abgebaut und anschliessend durch eine Agar-Gel Elektrophorese getrennt. Dadurch bekommt man DNA-Fragmente verschiedener Grösse; innerhalb dieser DNA-Stücke kann dann das transponierbare Element (Transposon) gesucht werden. Dafür musste die DNA auf eine Nylon-Membran übertragen werden. Anschliessend wurde eine spezifische Sonde, die das Transposon erkennen kann, auf diese Membran verteilt. Die Stellen, an denen die Sonde das transponierbare Element erkannt hat, wurden mittels einer kolorimetrischen Reaktion sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der Typisierung aller Isolate konnten mit Hilfe eines Computer-Programms zu einem phylogenetischen Baum verarbeitet werden. Dieser

Anzahl gefundene Genotypen pro RMK Nombre de génotypes trouvés par CMB					
RMK	Herkunft der Sirte	Anzahl analyisierte Isolate	Anzahl Genotypen	%	
CMB	Provenance du petit lait	Nombre d'isolats analysés	Nombre de génotypes	%	
101 ¹⁾	Fischbach LU	30	11	37	
104 ¹⁾	Hämikon LU	23	7	30	
105 ¹⁾	Huttwil (Rätschen) BE	29	4	14	
115 ¹⁾	diverse Strep-tokokken und Laktobazillen aus RMK 105	48	3	6	
119 ¹⁾	Stettfurt TG	27	19	70	
124 ¹⁾	Strohwilen TG	26	6	23	
150 ¹⁾	Egg SG + 6 Laktobazillen aus RMK 101	22	5	23	
153 ¹⁾	Pfaffnau LU	34	13	38	
157 ¹⁾	Altbüron LU	30	8	27	
164 ¹⁾	Illighausen TG	51	3	6	
202 ²⁾	La Sionge FR	5	2	40	
302 ³⁾	Hildisrieden LU	44	19	43	
325 ³⁾	unbekannt	12	8	67	

¹⁾ aus Emmentaler-Sirte, ²⁾ aus Gruyère-Sirte,

³⁾ aus Sbrinz-Sirte

zeigt den Verwandtschaftsgrad zwischen den verschiedenen Stämmen.

Erstaunlich hohe Biodiversität

Die Anzahl der untersuchten Isolate pro Rohmilchkultur ist nicht repräsentativ und lässt keinen statistischen Vergleich zwischen den Kulturen zu. Die Anzahl der gefundenen Genotypen ist nicht unbedingt von der Anzahl der untersuchten Isolate abhängig, wie dies an den Beispielen der RMK164 und RMK325 gezeigt werden konnte (siehe Tabelle).

Insgesamt wurden innerhalb der 381 untersuchten Isolate 108 verschiedene Genotypen von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* gefunden. Es wurden insgesamt acht Genotypen gefunden, die in mehr als einer Kultur vorkommen. Dies ist in zwei Fällen einfach zu

erklären: RMK115 setzt sich aus einer Auswahl von Laktobazillen aus der RMK105 zusammen; RMK150 besteht aus 6 Laktobazillen der RMK101.

Nachvollziehbar ist auch die «Verwandtschaft» zwischen Kulturen aus der gleichen Region im Falle der RMK164 und RMK119 sowie der RMK157 und RMK104: es ist bekannt, dass früher, zur Zeit der kessiabürgigen Sirte-Kulturen, die Käser bei Säuerungsproblemen die Kulturen beim Nachbarkäser holten. Das könnte auch bei der RMK325 und RMK302 der Fall gewesen sein, da beides Sbrinz-Kulturen sind. In den anderen Fällen ist es schwierig, eine Erklärung zu finden, insbesondere im Falle der Verwandtschaft der RMK202 mit der RMK150, 157 und 104, da die RMK202 die einzige untersuchte Gruyère-Kultur ist.

Trotz der relativ kleinen Anzahl untersuchter Isolate ist die Biodiversität innerhalb und zwischen den Kulturen beeindruckend. Die Phagenempfindlichkeit der Stämme wurde bis jetzt noch nicht systematisch untersucht. Aufgrund der genetischen Vielfalt der Stämme ist anzunehmen, dass auch diesbezüglich Unterschiede vorhanden sind und dies vermutlich die Erklärung ist für die Robustheit (Säuerung, Phagenresistenz) der RMK bezüglich des RMK-Systems, das sich in der Schweizer Käsereiwirtschaft seit mehreren Jahrzehnten bewährt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass aus den vorhandenen 200 alten Sirten (RMK) noch eine grosse Anzahl verschiedener Stämme (Genotypen) isoliert werden kann, ist hoch.

Bereits vorhandene sowie künftige Stämme aus dem alten Material stellen ein grosses Potenzial für die weitere Entwicklung neuer Kulturen, wie z.B. sortenspezifischer AOC-Kulturen, dar.

Das Alter der Stämme ist dabei kein Nachteil, kann doch einerseits damit die GVO-Freiheit nachgewiesen werden und andererseits haben die Stämme noch keine übertragbaren Antibiotika-Resistenzen erworben, was die Kulturen von ALP von vielen kommerziellen Kulturen unterscheidet.

*Die Autorinnen und der Autor arbeiten an der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP in Bern-Liebefeld.

Fabrication fromagère

La biodiversité des cultures mixtes brutes

Dans la collection de souches d'Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) on trouve 1400 isolats de *L. Delbrueckii* subsp. *lactis*. La plupart provient des fromages suisses et ont été isolés dans les cultures mixtes brutes de l'ALP. Ces cultures mixtes brutes ont été récoltées dans toute la Suisse entre 1975 et 1986 auprès de fromageries fabriquant du bon fromage. Douze d'entre elles sont fabriquées chaque semaine et commercialisées et servent de starter pour la fabrication de fromage.

200 autres cultures mixtes brutes datant des années septante représentent une source d'isolats ayant des propriétés différentes. Cet article présente la caractérisation génétique de 491 isolats de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* dont 381 proviennent de cultures mixtes brutes.

Les différentes souches seront ici identifiées grâce aux transposons (ou éléments transposables) qui sont des fragments d'ADN.

Parmi les 381 isolats étudiés, on retrouve 108 génotypes différents. Parmi eux, huit génotypes sont présents dans plus d'une culture. On constate aussi la parenté entre les petits-lait provenant d'une même région; il est connu qu'en cas de problème, les fromagers allaient chercher du petit lait chez un voisin. On relèvera aussi la biodiversité à l'intérieur des cultures et entre les cultures. La probable différence de sensibilité aux phages est certainement une raison de la robustesse de la résistance du système des cultures mixtes brutes.

Il est très vraisemblable que l'on pourra isoler encore un grand nombre de souches dans ces 200 petits laits, ce qui représente un grand potentiel pour le développement de nouvelles cultures spécifiques aux sortes, par ex. aux AOC. L'âge des souches ne représente aucunement un problème, il montre d'une part l'absence d'OGM et d'autre part les souches n'ont pas encore de résistance aux antibiotiques transmissible. Ces points diffèrent les cultures ALP de nombre de leurs concurrentes. alp