

Langer Weg zur perfekten Starterkultur

Für die Entwicklung von Starterkulturen mit definierter Zusammensetzung ist die Liste der erwünschten Stammeigenschaften lang. Um das Ziel zu erreichen, müssen viel Zeit und Ressourcen eingeplant werden.

PETRA LÜDIN, UELI VON AH, NOAM SHANI*

Die Entwicklung von Starterkulturen verlangt eine sorgfältige Prüfung der Milchsäurebakterien bezüglich ihrer technologischen und organoleptischen Eigenschaften. Agroscope nutzt dazu gerne die Bakterienvielfalt der internen Stammsammlung, welche mehr als 10 000 Isolate, die im Laufe des 20. Jahrhunderts gesammelt und konserviert wurden, umfasst. Mesophile Starterkulturen, wie sie etwa für die Herstellung von Halbhartkäsen, Quark, Frischkäse oder Butter eingesetzt werden, bestehen zu einem bedeutenden Anteil aus Laktokokken. Die Subspezies *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ist aufgrund ihrer guten Säuerungsfähigkeit und proteolytischen Aktivität ein wichtiger Bestandteil von mesophilen Startern. Durch den Abbau von Peptiden und die Verwertung von Aminosäuren entsteht eine Vielzahl von aromaaktiven Molekülen die massgeblich zum typischen Käsearoma beitragen. Beim Abbau der Aminosäure Leucin kann jedoch auch

3-Methylbutanal entstehen, welches im Käse ab einem Schwellenwert von 0,5 mg/kg als malziges oder verbranntes Aroma wahrgenommen wird. Die Bildung dieses Aromas ist für viele klassische Halbhartkäse unerwünscht. Bei der Entwicklung von Starterkulturen muss darauf geachtet werden, dass die ausgewählten Stämme 3-Methylbutanal nicht oder nur in geringem Masse bilden.

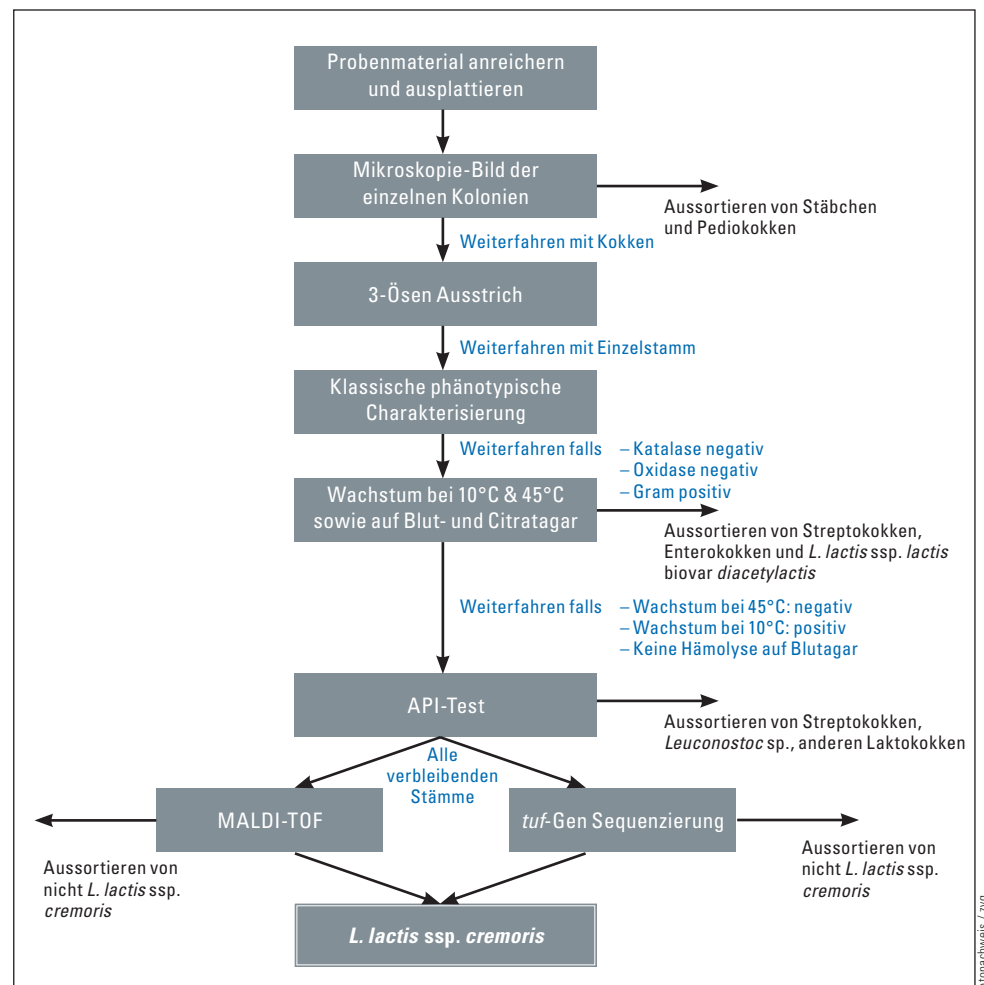
Neue Isolate für die Stammsammlung

Für die Entwicklung einer Starterkultur für Halbhartkäse vom Typ Raclette musste beim Screening von *L. lactis* ssp. *cremoris* aus der Agroscope-Stammsammlung festgestellt werden, dass ein grosser Anteil der 68 konservierten Isolate das malzige Aroma bildeten und sich deshalb nicht für den Einsatz in einer definierten Starterkultur eigneten. Die Stamm-

Herkunft des Probenmaterials	Anzahl Proben
Milchproben von Kühen, Ziegen, Stuten, Lama und Alpaka	101
Zitzenabstriche von Ziegen und Schafen	21
Abstriche von Melkutensilien oder der Melkumgebung»	5
Muttermilch	2
Silage	3
Weidegras, frisches Getreide	8
Früchte (Trauben, Erdbeeren, Pflaumen, Aprikosen, Himbeeren, Sauerkirschen)	17
Gemüse (Spitzkohl, Kohlrüben)	4
Total	161

Herkunft des Probenmaterials, welches für die Isolation von *L. lactis* ssp. *cremoris* gesammelt wurde.

Origine des échantillons collectés pour isoler *L. lactis* ssp. *cremoris*.



Schematisch dargestellte Vorgehensweise für die phänotypische und genotypische Charakterisierung der Isolate für die Identifizierung von *L. lactis* ssp. *cremoris*.

Représentation schématique de la procédure de caractérisation phénotypique et génotypique des isolats pour l'identification de *L. lactis* ssp. *cremoris*.

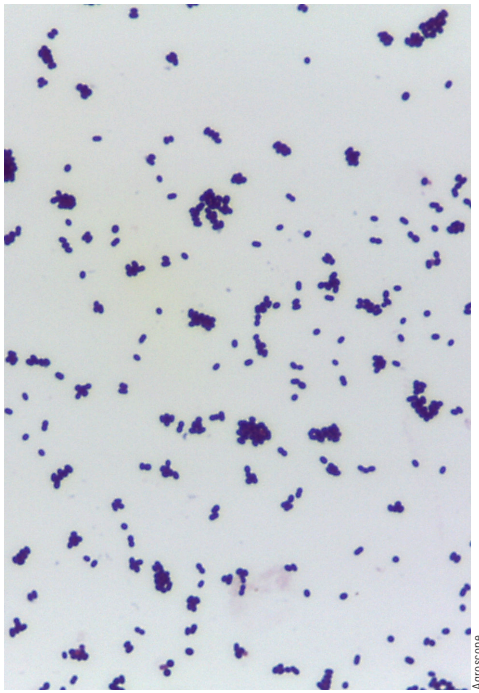


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme von *L. lactis* ssp. *cremoris* 51.1 nach Gram-Färbung; 100-fach vergrössert.

Ill. 2: Vue au microscope de *L. lactis* ssp. *cremoris* 51.1 après coloration de Gram; agrandissement 100 x.

sammlung wurde deshalb mit neuen Isolaten aus dem Ursprungsgebiet ergänzt, um eine vernünftige Anzahl Stämme für die Entwicklung der Kultur zur Verfügung zu haben.

Dazu wurden zwischen Mai und Juli 2014 schweizweit insgesamt 161 unterschiedliche Proben erhoben. Ausgewählt wurden Rohstoffe, in welchen generell Laktokokken vermutet wurden, was hauptsächlich Milch und die Melkumgebung sowie pflanzliches Material betrifft (Tabelle 1). Weiter wurde darauf geachtet, dass der Probenahmeort möglichst frei von Antibiotikaeinsatz ist, um keine antibiotikaresistenten Keime zu isolieren. Ausserdem wurden Probenahmeorte definiert, an denen keine kommerziellen Starterkulturen zum Einsatz kommen.

In aufwändiger Laborarbeit wurde das Probenmaterial aufgearbeitet, in optimalem Medium und Bedingungen für *Lactococcus* sp. angereichert, Reinheitsausstriche gemacht und total 192 Isolate mittels klassischen, phänotypischen Charakterisierungsmethoden genauer untersucht (vgl. Abbildung 1). So konnten Isolate wie *Leuconostoc* sp., *Aerococcus* sp., *Enterococcus* sp. oder *Streptococcus* sp. eliminiert werden und die Suche nach *L. lactis* ssp. *cremoris* weiter eingeschränkt werden.

Da für die eindeutige Identifikation eines unbekanntes Isolates rein phänotypische Methoden nicht ausreichen, wurde in einem weiteren Schritt die Subspezies mittels MALDI-TOF und durch die Sequenzierung des für Milchsäurebakterien diskriminierenden *tuf*-Gens bestimmt. Beide Methoden ergeben ein stammspezifisches Muster, vergleichbar mit einem Fingerabdruck, welches durch den Abgleich mit einer Datenbank die Identifikation des Stammes ermöglicht.

8 Isolate für die Stammsammlung

Nach diesen letzten Schritten konnten schliesslich 8 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* identifiziert und in die Stammsammlung aufgenommen werden (Abbildung 2). Davon stammen 7 Isolate ursprünglich aus Kuh- oder Ziegenmilchproben und 1 Isolat wurde aus Weizen isoliert. Ein erster Vortest mit der menschlichen Nase deutete darauf hin, dass mindestens 3 Stämme das malzige Aroma nicht bilden.

Die Ausbeute von 8 Stämmen, oder anders ausgedrückt 4.1%, scheint gering, wenn man sich die grosse Zahl der untersuchten Proben vor Augen führt. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* nicht einfach zu finden und sein Habitat nicht eindeutig bestimmbar ist. In den meisten kommerziellen Starterkulturen werden deshalb immer wieder die gleichen *L. lactis* ssp. *cremoris* Stämme eingesetzt und intensiv genutzt.

Bis die neuen Isolate bereit sind für den Einsatz in einer Agroscope-Starterkultur, ist die Entwicklungsarbeit jedoch noch lange nicht abgeschlossen. Es werden weitere Tests wie etwa das Wachstum und Säuerungsvermögen in Kombination mit anderen Stämmen, das Vorhandensein von Antibiotikaresistenzgenen oder die Bildung von biogenen Aminen folgen. Weiter muss ein Prozess für die standardmässige Züchtung und Konservierung entwickelt werden. Mit den ersten Mustern kann dann in der Käsematrix ausgetestet werden, wie sie sich in Co-Kultur mit anderen Stämmen verhält und ob die Kultur auch unter Praxisbedingungen als Starterkultur funktioniert.

Der Weg zu einer perfekten Starterkultur, in der die neu isolierten Stämme einen wichtigen Beitrag zur Herstellung von qualitativ hochwertigem Schweizer Halbhartkäse leisten, ist also noch lang.

*Die Autoren arbeiten bei Agroscope.

redaktion@alimentaonline.ch

Trouver la culture parfaite

Développer une culture lactique requiert une évaluation attentive des bactéries lactiques pour ce qui est de leurs caractéristiques technologiques et organoleptiques. Agroscope se sert volontiers à cet effet dans sa collection interne de plus de 10'000 isolats, rassemblée au cours du siècle passé. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* est un élément important des cultures mésophiles, utilisées pour la fabrication de fromage à pâte molle, de fromage frais ou de beurre, en raison de ses bonnes facultés acidifiantes et de son activité protéolytique produisant un grand nombre de molécules actives au niveau sensoriel. Toutefois, la dégradation de la leucine produit du 3-méthylbutanal, lequel donne un arôme indésirable de malt ou de brûlé au fromage. On recherche donc des cultures comportant des souches produisant peu ou pas de cette substance.

Ainsi, pour la production de cultures pour les fromages à pâte mi-dure de type raclette, Agroscope s'est mis à la recherche de nouveaux isolats dans la région d'origine de ce fromage. *L. lactis* est soupçonné. Un total de 161 échantillons ont été prélevés de matières premières typiques telles que lait, environnement laitier ou matériel végétal. Ensuite, le matériel a été préparé et enrichi au laboratoire, afin de le caractériser plus avant selon des méthodes phénotypiques. L'identification définitive s'est faite quant à elle selon les méthodes MALDI-TOF ou par séquençage d'un gène spécifique.

Il en a résulté 8 souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, qui ont été reprises dans la collection de souches d'Agroscope. Un premier test avec un nez humain a montré qu'au moins 3 d'entre elles ne formaient pas l'arôme malté indésirable. La découverte de ces nouveaux isolats ne signifie toutefois pas la fin du travail de développement pour Agroscope. Une procédure de culture et de conservation standardisée devra notamment être développée. Ensuite, les premiers échantillons seront testés dans une matrice de fromage, notamment afin de déterminer leur comportement en co-culture avec d'autres souches.