



## Propionsäurebakterien in der Rohmilch und deren Bedeutung für die Qualität von Hart- und Halbhartkäse

### Autoren

Ernst Jakob, Ruedi Amrein, Meral Turgay, Hans Winkler



## Impressum

Herausgeber:	Agroscope, <a href="http://www.agroscope.ch">www.agroscope.ch</a>
Auskünfte:	Ernst Jakob E-Mail: <a href="mailto:ernst.jakob@agroscope.admin.ch">ernst.jakob@agroscope.admin.ch</a>
Abbildungen	Agroscope
Gestaltung	Glasson Imprimeurs Editeurs SA Bulle, Suisse
Download	<a href="http://www.agroscope.ch/transfer">www.agroscope.ch/transfer</a>
Copyright	© Agroscope 2016
ISSN	2296-7206 (Print), 2296-7214 (Online)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2. Propionsäurebakterien</b>	<b>5</b>
2.1 Vorkommen der Propionsäurebakterien	5
2.2 Physiologische Eigenschaften der Propionsäurebakterien	6
2.3 Technologisch wichtige Eigenschaften der Propionsäurebakterien	7
<b>3. Durch Propionsäurebakterien verursachte Käsefehler</b>	<b>9</b>
3.1 Emmentaler	9
3.2 Halbhartkäse	10
3.3 Gruyère	10
3.4 Sbrinz	10
<b>4. Einwandfreie Lieferantenmilch</b>	<b>12</b>
<b>5. Kontaminationen mit Propionsäurebakterien in der Käserei</b>	<b>13</b>
<b>6. Analytischer Nachweis von Propionsäurebakterien</b>	<b>14</b>
6.1 Keimzählung auf Agarmedium	14
6.2 Quantifizierung mit PCR	14
6.3 Untersuchung von Rückstellproben	14
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>15</b>
<b>8. Quellen</b>	<b>15</b>

# 1. Einleitung

Propionsäurebakterien (PSB) sind gefürchtete Verursacher von Käsefehlern bei sehr vielen Halbhart- und Hartkäsen, die nicht aus pasteurisierter Milch hergestellt werden. Dafür verantwortlich sind die recht grosse Widerstands- und Anpassungsfähigkeit der Keime und die Tatsache, dass sie im reifenden Käse wachsen können. Deshalb können bereits schwache Kontaminationen in der Milch zu Schäden führen. Die von Propionsäurebakterien verursachten Käsefehler umfassen unschöne braunen Tupfen im Käseteig, atypische Löcher, Risse (Gläs) und Aromafehler. Selbst beim Emmentaler Käse, wo die Milch mit Propionsäurebakterienkulturen beimpft wird, können „wilde“ PSB aus der Rohmilch Schaden anrichten, indem sie zu Nachgärung führen können. Im vorliegenden Diskussionsgruppenstoff werden die physiologischen und technologischen Eigenschaften der PSB behandelt. Ausserdem werden die durch PSB verursachten Käsefehler sortenspezifisch erörtert. Schliesslich werden auch aktuelle Methoden zum Nachweis von PSB vorgestellt und Massnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen von PSB aufgezeigt.

## 2. Propionsäurebakterien

Heute sind 13 Arten von PSB bekannt, wovon 6 als „milchwirtschaftliche“ oder auch als „klassische“ PSB bezeichnet werden, die übrigen 7 als „haut-assoziierte“ PSB, wie z.B. *Propionibacterium acnes* (Erreger der Akne).

Die „milchwirtschaftlichen“ PSB umfassen die folgenden Arten (Thierry et al. 2011): *P. acidipropionici*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. thoenii*

Bei *P. freudenreichii* werden teilweise noch zwei Unterarten (Subspezies) unterschieden, nämlich *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* (vergärt keine Laktose oder nur langsam) und *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (vergärt Laktose). Doch diese Unterscheidung ist heute sehr umstritten.

### 2.1 Vorkommen der Propionsäurebakterien

Propionsäurebakterien wurden in der Pansenflora von Wiederkäuern, in Fäkalien von Kälbern, Kühen und Schweinen nachgewiesen, aber auch in Silage. Es scheint aber so, dass die Keimzahlen in Rinderkot und Silage bescheiden sind (< 100 Keime/g). So konnten italienische Forscher (Rossi et al., 2000) in 11 Silageproben und 12 Kotproben keine PSB nachweisen. Hingegen waren 60% der Milchproben und 90% der Käseproben und alle 6 untersuchten Proben von gesäuerter Molke positiv. Wie Tabelle 1 zeigt, sind die beiden Arten *P. freudenreichii* und *P. jensenii* am meisten verbreitet.

Cacanno und Mitarbeiter (Cacanno et al. 1995) untersuchten 306 Lieferantenmilchproben aus Betrieben, die Grana Padano herstellen, und fanden zwischen wenigen PSB pro Milliliter bis 27'000 KbE/mL. Nicht weniger als 21% der Proben enthielt mehr als 500 KbE/mL. Von 60 untersuchten PSB-Isolaten waren 65% als *P. freudenreichii* identifiziert, 25% als *P. jensenii*. Von Fessler (1997) untersuchte Isolate aus Milchproben von Tal- und Alpkäsereien ergab ähnliche Anteile der verschiedenen Spezies.

Agroscope untersuchte Kessmilch aus Emmentaler-, Sbrinz- von Gruyère-Käsereien. In 82% der Proben konnten PSB nachgewiesen werden. In den positiven Proben war immer *P. freudenreichii* nachweisbar (dominant), 26% enthielten zusätzlich *P. jensenii*, 5 der Proben zusätzlich *P. thoenii*, oder *P. acidipropionici*. Bei der Untersuchung von 151 PSB-Isolaten aus Kessmilch von Gruyère-Betrieben konnten 77% der Isolate als *P. freudenreichii* identifiziert werden.

Die Analyse der PSB-Flora in 34 Proben von Sbrinzkäse zeigte ebenfalls eine Dominanz von *P. freudenreichii*. Die Spezies wurde in allen diesen Käsen nachgewiesen, typischerweise mit Keimzahlen von etwa einer Million KbE/g und mehr. Nur in 2 Käsen (6%) wurden auch noch andere Spezies von PSB nachgewiesen, wobei deren Keimzahl stets vergleichsweise klein war.

In Halbhartkäse aus Rohmilch scheint die PSB-Flora grundsätzlich etwas vielfältiger zu sein. In zwei solcher Proben konnten wir ähnlich hohe Keimmengen von anderen PSB messen wie wir *P. freudenreichii* fanden.

Tabelle 1: Vorkommen verschiedener Propionsäurebakterien in Milch und Käse.

	Milch (Cacano et al. 1995)	Milch (Fessler, 1997)*	Milch (Rossi et al. 2000)	Käse (Rossi et al. 2000)
	N=306 (100% pos.)	N= 94 / 28 Isolate	N=52 (60% pos.)	N=20 (90% pos.)
<i>P. freudenreichii</i>	65 %	62 % / 55 %	39 %	69 %
<i>P. jensenii</i>	25 %	21 % / 15%	54 %	27 %
<i>P. thoenii</i>	5 %	2 % / 30 %	3 %	4 %
<i>P. acidipropionici</i>	5 %	15 % / 0%	5 %	-

\* Isolate aus Milch von Talgebiet FR / Sömmerungsgebiet FR

## 2.2 Physiologische Eigenschaften der Propionsäurebakterien

Propionsäurebakterien haben im Allgemeinen bescheidene Nährstoffansprüche. Damit sind die Voraussetzungen für ein breites Vorkommen von PSB in der Umwelt gegeben. Mit einer minimalen Generationszeit von 5-6 Stunden wachsen PSB auch unter idealen Bedingungen vergleichsweise langsam. Sauerstoff bremst das Wachstum von PSB erheblich. Direkt der Luft ausgesetzt wachsen sie nicht mehr, können aber aerobe Bedingungen gut überleben.

Die meisten „milchwirtschaftlichen“ PSB bilden Pigmente, weshalb Kolonien cremefarben oder orange bis braunrot gefärbt sind (Abb. 1). Diese Pigmentierung ist auch der Grund dafür, dass PSB in Käse unansehnliche braune Tupfen bilden können. Bei den kräftig gefärbten Kolonien auf Laktatagar handelt es sich nach unserer Erfahrung meist um *P. jensenii*.

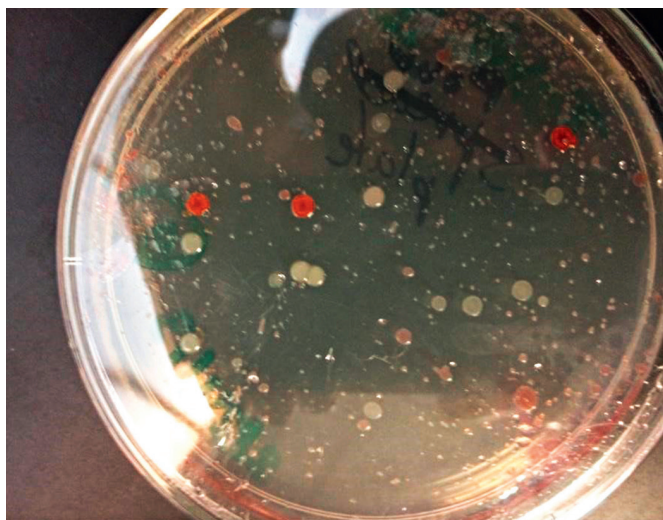
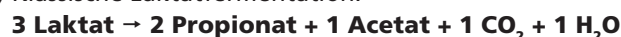


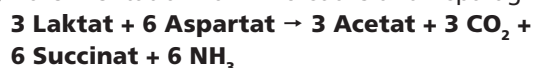
Abbildung 1: Petrischale mit Kolonien von Propionsäurebakterien und Begleitflora auf Laktatagar.

Die Propionsäurebakterien verdanken ihre Fähigkeit, sich während der Reifung im Käse zu vermehren, der Tatsache, dass sie Milchsäure vergären können. Dabei gibt es drei Stoffwechselwege die sie dafür nutzen können:

(A) Klassische Laktatfermentation:



(B) Kofermentation von Milchsäure und Asparaginsäure



(C) CO<sub>2</sub>-Fixation



Wie die drei Stoffwechselwege genutzt werden, ist milieu- und stammabhängig. Der Stoffwechselweg der Kofermentation von Milchsäure und Asparaginsäure (B) spielt bei jenen Stämmen eine grosse Rolle, die eine hohe Aspartase-Aktivität aufweisen. Das Enzym spaltet die Asparaginsäure in Ammoniak und Fumarsäure, die dann weiter zu Bernsteinsäure umgesetzt wird. PSB mit hoher Aspartase-Aktivität profitieren von der Proteolyse. Der freigesetzte Ammoniak lässt den pH-Wert der Käse ansteigen, was wiederum die Proteolyse im Käse fördert. Dieser Vorgang ist beim Emmentaler eine bedeutende Nachgärungsursache. Wie Abb. 2 zeigt, sind die Unterschiede bezüglich der Aspartase-Aktivität verschiedener Stämme von *P. freudenreichii* sehr gross.

Tabelle 2: Eigenschaften von Propionsäurebakterien (Thierry et al., 2011; ergänzt durch weitere Quellen)

Pigmentierung	creme - rotbraun	kräftigere Pigmentierung v.a. bei <i>P. jensenii</i> und <i>P. thoenii</i>
Wachstumstemperatur	Optimum: 30 - 32 °C	Minimum: 4-6 °C Maximum: 37-45 °C
pH-Wert	Optimum: pH 6 - 7	Minimum: pH 4.6-5.1
Minimale Generationszeit	5 - 6 h (anaerob)	
Sauerstoffbedarf	anaerob bis mässig aerotolerant	aber kein Absterben durch Luftkontakt
Substrate	Milchsäure (Laktat), Galactose, Glycerin, Asparaginsäure (Aspartat)	
Stoffwechselprodukte	Propionsäure (Propionat), Essigsäure (Acetat), Bernsteinsäure (Succinat), CO <sub>2</sub>	

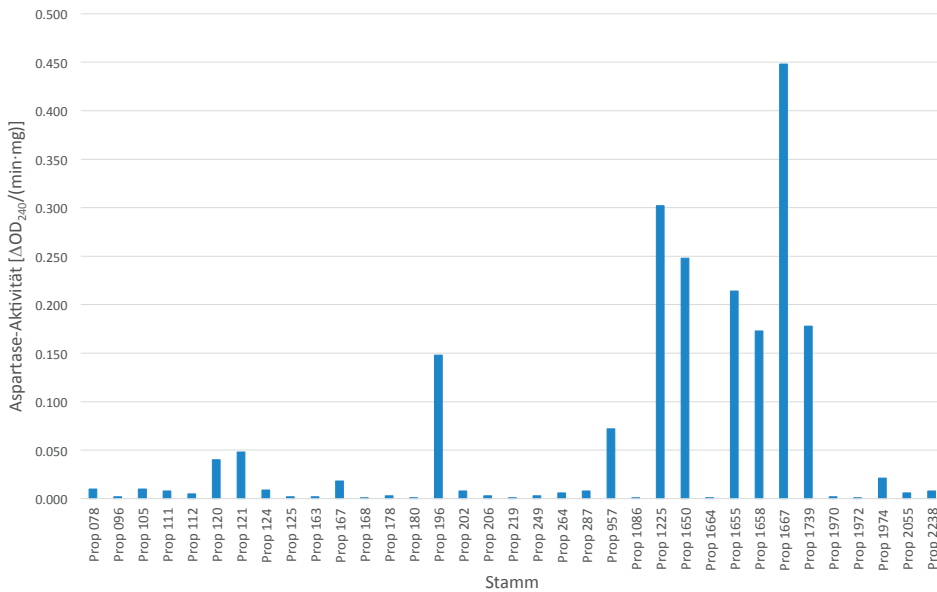


Abbildung 2: Aspartase-Aktivität von verschiedenen Stämmen von *P. freudenreichii* aus der Stammsammlung von Agroscope

Die Bedeutung des Stoffwechselwegs der CO<sub>2</sub>-Fixation (C) ist unklar, wird aber allgemein als untergeordnet eingestuft.

## 2.3 Technologisch wichtige Eigenschaften der Propionsäurebakterien

### Wachstumstemperatur

Versuche von Agroscope haben gezeigt, dass sich PSB im Käse auch bei Temperaturen von 14°C relativ gut entwickeln (Fröhlich & Eugster, 2005). Ohne Gärraumaufenthalt bei 14°C gereifte Modellemmentaler entwickelten die typischen Löcher; die Lochbildung benötigte aber rund 25 Wochen statt der üblichen 6 – 8 Wochen. Die meisten PSB stellen ihr Wachstum erst bei Temperaturen zwischen 5 und 10 C ein.

### Wachstumsgeschwindigkeit

Unter günstigen Bedingungen beträgt die Generationszeit der PSB im Käse 10 – 35 Stunden. Unter Laborbedingungen geht die Entwicklung schneller, jedoch immer noch langsam. Das langsame Wachstum ist auch für den Nachweis von Belang. Um sichtbare Kolonien zu erhalten sind mindestens 5–7 Tage Inkubation erforderlich.

### Temperaturresistenz

Propionsäurebakterien sind ziemlich resistent gegenüber höheren Temperaturen. Das gilt besonders für *P. freudenreichii*. Für kurze Einwirkungszeiten beginnt die Schädigung etwa bei 58°C. Die Empfindlichkeit ist stammspezifisch. Wie Abb. 3 zeigt, sind bei besonders hitzeresistenten Stämmen bei 64°C Heisshaltezeiten von bis zu 7 min erforderlich, um 90% der Keime zu inaktivieren.

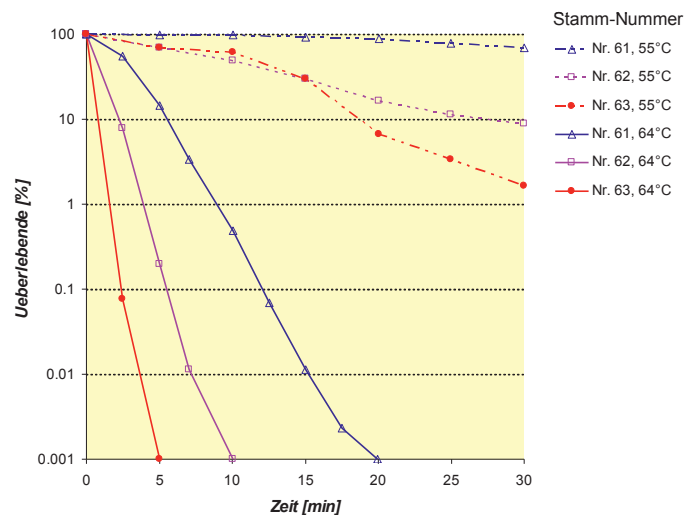


Abbildung 3: Hitzeempfindlichkeit dreier Stämme von Propionsäurebakterien bei 55 °C und 64 °C.

Die Arbeit von Rossi und Mitarbeitern (Rossi et al. 2000) zeigt, dass *P. jensenii*, *P. thoenii* und vor allem *P. acidipropionici* deutlich weniger hitzeresistent sind als *P. freudenreichii*. Das könnte der Grund dafür sein, dass in Hartkäse praktisch immer nur *P. freudenreichii* nachgewiesen werden können.

### Salzempfindlichkeit

Propionsäurebakterien sind recht salzempfindlich. Dies zeigt auch ein Versuch mit Modell-Emmentaler, die nicht bzw. unterschiedlich lange im Salzbad behandelt wurden (Abb. 4). Im Reagenzglas bewirkt eine Salzkonzentration von 5 g/Liter bereits eine Verzögerung des Wachstums, 50g verhindern dieses praktisch vollständig. Das bedeutet, dass in Käsen mit einem Wassergehalt von 35–40% ein absoluter Salzgehalt von 17 - 20 g/kg ausreichen würde, um das Wachstum von PSB zu unterbinden. Allerdings ist gerade im jungen Käse das Kochsalz nicht gleichmässig

verteilt. Und durch PSB verursachte braune Tupfen, die wir nicht selten auch in der Randzone von Käsen finden, zeigen, dass es auch PSB-Stämme gibt, die eine recht hohe Salztoleranz aufweisen.

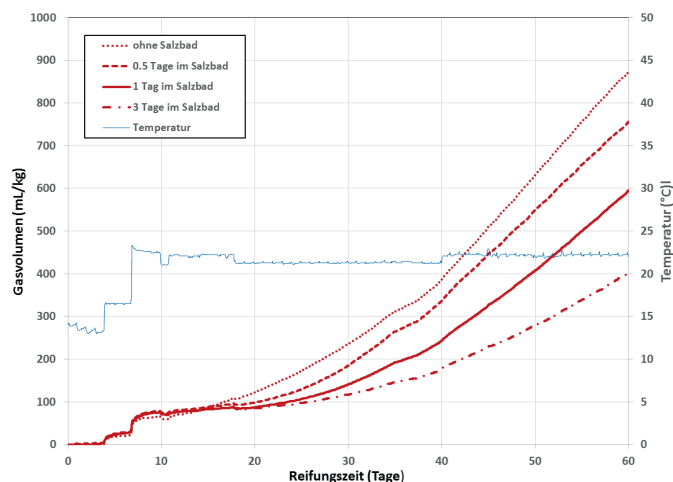


Abb. 4. Gasbildung in Modell-Emmentaler mit unterschiedlicher Salzbadbehandlung

Tatsächlich gibt es sogar Kulturen von PSB mit hoher Salztoleranz. Sie werden bei der Herstellung des norwegischen Jarlsberg Käses eingesetzt.

### Empfindlichkeit gegen Kupfer

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Kupfer sind altbekannt. Sie beruhen vermutlich darauf, dass Kupfer an gewisse Enzyme bindet und diese inaktivieren kann, so dass der Zellstoffwechsel gestört wird. Kupfer katalysiert auch die Bildung von sehr reaktiven Sauerstoffverbindungen, die zellschädigend wirken. In Kupferfertigern hergestellte Käse weisen heute typischerweise Kupfergehalte von 3 bis 12 mg/kg auf. Bei Kupfergehalten ab 25 – 30 mg/kg besteht die Gefahr von grünlichen Teigverfärbungen, die besonders gut in der Randzone sichtbar sind. In einer Praxiserhebung in Emmentalerbetrieben konnte Agroscope 2006 keine qualitativen Unterschiede zwischen Chargen mit tiefem Kupfergehalt (Mittelwert 2.6 mg/kg) und normalem Kupfergehalt (Mittelwert 6.9 mg/kg) feststellen. In einer Untersuchung von Sbrinzkäse zeigten erst Käse mit Kupfergehalte über 9 mg/kg eine Tendenz zu geringerem PSB-Wachstum.



## 3. Durch Propionsäurebakterien verursachte Käsefehler

### 3.1 Emmentaler

Nachdem die Nachgärung beim Emmentaler mit der Einführung der so genannten Fakheth-Kulturen (*Lb. casei* und *Lb. rhamnosus*) und verbesserter PSB-Kulturen vor gut 20 Jahren massiv eingedämmt werden konnte, ist die Problematik in den letzten Jahren wieder etwas mehr in den Fokus gerückt. Zwar lässt die Taxationsstatistik (Abb. 5) nicht erkennen, dass sich Nachgärung wieder häufiger einstellt. Allerdings sind Partien, die erst im Handelskeller eine deutliche Nachgärungstendenz aufweisen statistisch nicht erfasst.

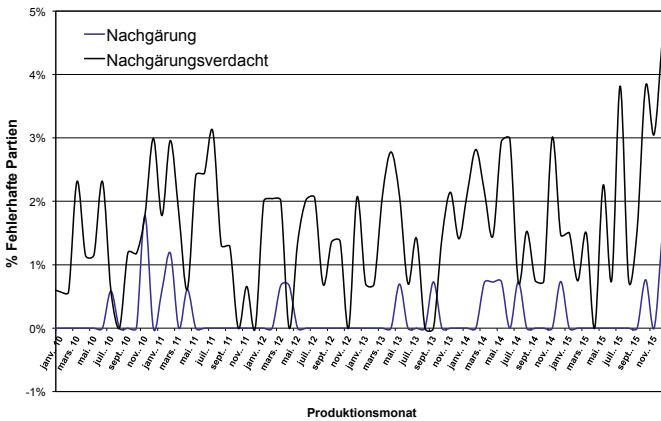


Abb. 5. Mit dem Verdacht auf Nachgärung taxierte Partien von Emmentaler AOP im Zeitraum von Januar 2010 bis Dezember 2015

#### Wilde PSB können auch im Emmentaler Probleme verursachen.

Eine 2008 durchgeführte molekularbiologische Analyse der PSB-Flora von Emmentaler aus der Käserei Uettligen brachte erstaunliche Ergebnisse (Turgay et al., 2011). Nach 6 Monaten Reifezeit, dominierten nicht mehr die bekannten PSB-Stämme aus der Kultur Prop 96, sondern fremde Stämme, die offensichtlich über die Rohmilch in den Käse fanden. Auch im Käse, der mit der Kultur Prop 01 hergestellt wurde, kam es zu Veränderungen. Aber hier begannen die zwei PSB-Stämme aus der Kultur, die hohe Aspartaseaktivität aufweisen, zu dominieren. Die Schlussfolgerung: PSB-Wildstämme mit hoher Aspartaseaktivität können die geringe Nachgärungstendenz der Prop 96 zunichtemachen. Das heißt, auch in der Fabrikation von Emmentaler AOP ist darauf zu achten, dass die Rohmilch nicht mit PSB kontaminiert ist.

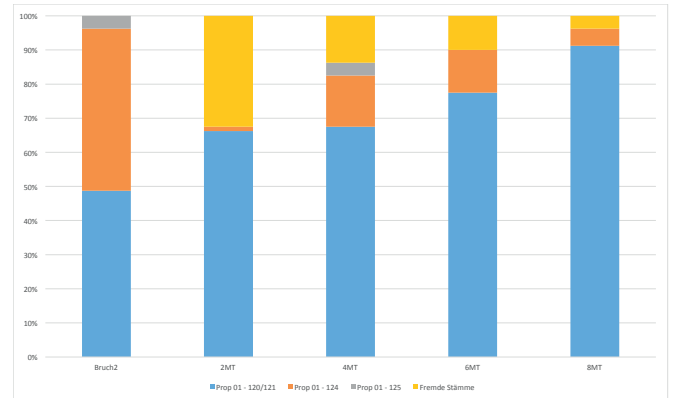
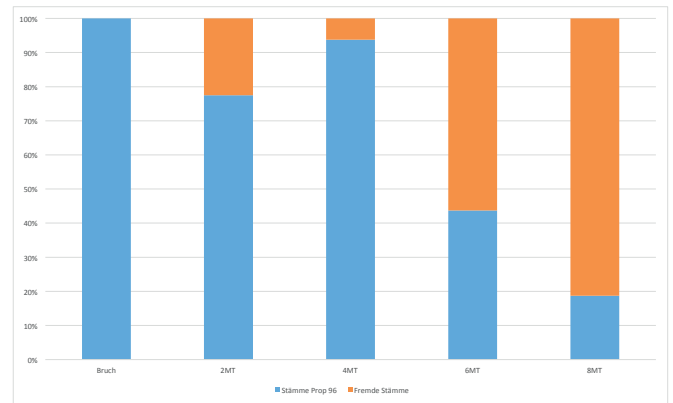


Abb. 6. Veränderung der Zusammensetzung der PSB-Flora in Emmentaler während der Reifung. Grafik links: Käse mit Prop 96, Grafik rechts: Käse mit Prop 01

#### Auch die Proteolyse unter Kontrolle haben

Wie oben bereits ausgeführt begünstigt eine starke Proteolyse das Wachstum von PSB mit hoher

Aspartaseaktivität. Daher ist auch wichtig, dass die Rohmilch nicht mit stark proteolytischen Laktobazillen kontaminiert ist. Dies gilt insbesondere für Kontaminationen mit *Lb. helveticus*, z.B. in Fällen, wo solche Kulturen für die Herstellung von Spezialitäten verwendet werden.

Seit einigen Jahren empfehlen wir bei Indizien für eine zu starke Proteolyse (Nachgärung, weisser Teig in der Randzone), eine Probe aus der Randzone (3–12 mm) der 20 Tage alten Käse auf den Gehalt an freien Aminosäuren (OPA-Wert) zu untersuchen. Der Wert sollte 45 mmol/kg nicht überschreiten.



Abb. 7. Emmentaler mit Anzeichen einer Nachgärung wie gezogene Löcher, Gläs in der Randzone.

## 3.2 Halbhartkäse

Schmiergereifte Halbhartkäse bieten Propionsäurebakterien auf Grund des Wassergehaltes und der relativ raschen Entsäuerung des Teiges gute Wachstumsbedingungen. Hemmend wirken dagegen der Salz- und Kupfergehalt des Käses, sowie die Reifungstemperatur unter 15°C.

Mit einer exakten Thermisation der Fabrikationsmilch kann in Abhängigkeit der gewählten Temperatur und Zeit eine Reduktion von Propionsäurebakterien unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/ml erreicht werden. Da *P. freudenreichii* relativ hitzeresistent ist, spielt die Thermisationstemperatur eine grosse Rolle. Eine Thermisation bei 65°C während 15 Sekunden hat etwa den gleichen Abtötungseffekt auf vegetative Keime, wie eine Thermisation bei 60°C und einer Heisshaltezeit von 5 Minuten! Wenn eine Propionsäuregärung bei Käse aus pasteurisierter Milch auftritt, handelt es sich um eine nachträgliche Kontamination mit Propionsäurebakterien während der Fabrikation. Nach dem Pressen können PSB nicht mehr in den Käse eindringen.

Beim Halbhartkäse kann das Wachsen von Propionsäurebakterien grundsätzlich zwei typische Fehlerbilder hervorrufen. Der Käse kann erstens atypisch grosse Löcher und/oder Pick und Gläs (siehe Abbildung) aufweisen. Charakteristisch ist in diesen Fällen auch ein süssliches Aroma.



Abb. 8: Appenzeller Käse 3 Monate, grosse Loch, Pick und Gläs

Das zweite typische Fehlerbild ist die Tupfenbildung im Käseteig, die sich ausschliesslich oder verstärkt in der Randzone zeigt (siehe Abbildung 9). Die Ursachen für die sichtbare Tupfenbildung sind nicht restlos geklärt. In der Randzone profitieren die PSB einerseits von der schnelleren Entsäuerung durch die Käseschmiere. Andererseits werden sie durch den höheren Salzgehalt stärker gehemmt. Es ist denkbar, dass gewisse Stressfaktoren sie dazu bringen, stärker pigmentierte Kolonien zu bilden.



Abb. 9: Halbhartkäse 3 Monate, braune Tupfen in Randzone

## 3.3 Gruyère

Beim Gruyère sind Propionsäuregärungen während der Reifung weniger häufig als bei anderen Käsesorten. Gleichwohl wurde sie in den 90er-Jahren als wichtigste Ursache ungenügender Lagerfähigkeit identifiziert, dies häufig im Zusammenhang mit Salzgehalten von weniger als 12 g/kg. Im Vergleich zu damals ist die Lagerfähigkeit des Gruyère heute deutlich besser.

Der Hauptgrund für die heute eher geringe Bedeutung von Propionsäuregärungen beim Gruyère ist zweifellos die hohe Brenntemperatur. Aber auch wegen der Milchlagerung im Kupferkessi und der relativ schnellen Salzdifffusion ins Käseinnere vermehren sich die Propionsäurebakterien in der Regel langsam, so dass wahrnehmbare Käsefehler ausbleiben. Hinzu kommt, dass die meisten Gruyèrekäsereien monatlich Milchproben der einzelnen Lieferanten auf Propionsäurebakterien untersuchen lassen (Anforderung: <20 KbE/mL). Trotzdem kommen durch Propionsäurebakterien verursachte Käsefehler immer noch vor. Sie äussern sich meist in Glässtellen (siehe Abbildung 10) und/oder braunen Tupfen in der Randzone.



Abb. 10: Gruyère mit Gläs (Alter: 6 Monate; Gehalt an Propionsäure: 7.2 mmol/kg)

## 3.4 Sbrinz

Propionsäurebakterien sind jene Fremdkeime, die beim Sbrinzkäse die häufigsten Schäden und hohe finanzielle Verluste verursachen. Sensorisch wahrgenommen werden die Keime in der Regel im Alter von 5 bis 11 Monaten aufgrund kleiner, brauner Tupfen im Teig (siehe Abbildung 11) und eines süßlichen Geschmacks. Im Unterschied zu den geschmierten Halbhart- und Hartkäse finden sich

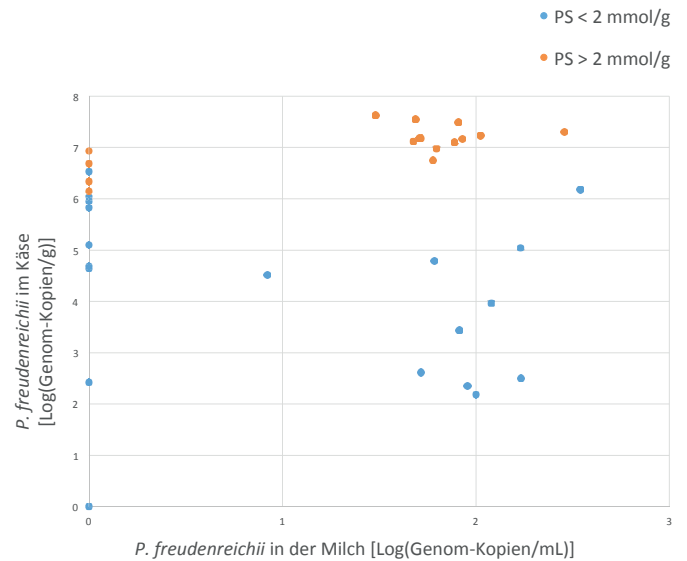
braune Tupfen beim Sbrinz weniger in der Randzone, sondern zur Laibmitte hin. Eine Erklärung dafür bietet der lange Salzbadauftenthalt der Sbrinzkäse von 15 bis 20 Tagen. Eher selten ist die Propionsäuregärung im Sbrinz so stark, dass Picks oder Stotzgläs entstehen. Sbrinzkäse, welche bei der Qualitätsüberprüfung am Lager oder anlässlich der Taxation im Alter von 11 Monaten sensorische Fehler aufweisen, werden stets beprobt und auf Propionsäure untersucht. Käse mit über 2 mmol/kg lassen sich nicht mehr zu Tafelkäse ausreifen und finden nur noch als Industriekäse Verwendung.



Abb. 11: Sbrinzkäse mit braunen Tupfen

### Propionsäurebakterienflora von Milch und Käse in Sbrinzbetrieben

In einer jüngst bei Agroscope durchgeführten Studie zum Vorkommen von PSB in Sbrinzkäse sind 40 reife Sbrinzkäse im Alter von 11 Monaten bezüglich PSB, pH-Wert, Kupfer- und Salzgehalt untersucht worden (noch unveröffentlicht). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 zusammengefasst. Käse mit Keimzahlen unter 1 Million PSB/g wiesen in der Regel weniger als 2 mmol/kg Propionsäure auf und waren von guter Qualität. Allerdings wurden in vier Käseleiben PSB in hoher Zahl und auch erhöhte Gehalte Propionsäure nachgewiesen, obwohl in der Kessmilch keine PSB nachweisbar waren. Die Untersuchung zeigte auch, dass die Zahl der PSB im gereiften Sbrinzkäse keinen klaren Zusammenhang zur Zahl der PSB in der Kessmilch hat. Dies ist auch kaum zu erwarten, denn die PSB in der Milch variieren bezüglich Hitzeresistenz und Wachstumsfähigkeit im Käse, so dass die Biodiversität von *P. freudenreichii* in der Milch einen wesentlichen Einfluss darauf hat, ob sich die Keime im Käse entwickeln.



## 4. Einwandfreie Lieferantenmilch

Die Quellen von Milchkontaminationen mit PSB sind vielfältig. PSB gelangen immer beim Melken in die Milch, wobei die Melkanlage und –hygiene die Hauptverursacher sind. Dennoch spielt das Umfeld der Melchkühe eine wichtige Rolle. Eine mit PSB belastete Umgebung bietet viele indirekte Kontaminationsmöglichkeiten.

### Besonders kritische Bereiche der Umgebung

PSB vermehren sich gerne im Milieu, wo organisches Material unter Luftabschluss gärt. Speziell zu erwähnen sind:

**Stall:** verschmutzte Liegeflächen, defekte Gummimatten, Nassbereiche bei Tränkebecken, usw.

**Futterbereich:** Futtermischwagen, Futterreste, Futterstationen, usw.

### Melkanlagen als häufigste Infektionsherde

Melkanlagen frei von Propionsäurebakterien und anderen Mikroorganismen zu halten, bedingt die strikte Beachtung folgender Punkte:

- Einwandfreie Montage der Anlage
- Fachmännisch ausgeführte Unterhalts- und Wartungsarbeiten
  - Diese Teile müssen bei den jährlichen Servicearbeiten kontrolliert und ggf. gereinigt oder ersetzt werden:
    - Vakuumleitung, -tank, -hahne
    - Vakuum-Regelventil
    - Verschraubungen, Dichtungen Melkleitung
    - sämtliche Verschleissteile sind auszuwechseln
    - Milchmengenmessgerät
    - Temperatur der Reinigungsmittellösung
    - Menge der Reinigungsmittellösung (genügt der Volumenstrom?)
    - Kontrolle auf Sauberkeit der kritischen Stellen, wie z.B. Verschraubungen, Dichtungen usw.
    - Milchproduzenten informieren, was und wie oft gewisse Teile wie z.B. Sammelstück, Milchhahne, Dichtungen in Endeinheiten, usw. gereinigt werden muss
- Reinigung der Melkanlage
  - Nach jedem Melken sofort vorspülen, reinigen und nachspülen
  - Lauge- und Säurereinigung alternierend anwenden
  - Reinigungsmitteldosierung nach Vorgaben des Herstellers (Dosierung überprüfen)
  - Temperatur der Reinigungslösung sollte während der Reinigung mind. 60°C erreichen. Hinweise zur Anhebung der Temperatur: mit Warmwasser vorspülen, Boilertemperatur und/oder Menge der Reinigungslösung erhöhen, Durchlauferhitzer einrichten oder richtig einstellen. Es sei daran erinnert, dass eine um 5°C tiefere Temperatur, die für die Abtötung von Bakterien nötige Zeit um das Zwanzigfache verlängert!

- Diese Teile müssen regelmässig von Hand gereinigt werden
  - › Deckel und Dichtung Endeinheit
  - › Dreiweghahn
  - › Milchhahne
  - › Sammelstück
  - › Tankauslauf
  - › Dichtung Rührwerk, Tank



Abb. 13: Bei Stallvisiten entdeckte hygienische Schwachstellen in Melkanlagen. Bild links: Sammelstück mit Ablagerungen. Bild rechts: Dreiweghahn mit Milchrückständen.

### Weitere Punkte betreffend die Melkanlage

- Leitungen mit einem Schwamm ausstossen birgt mikrobiologische Gefahren. Daher „Schwamm Milch“ nicht abliefern, sondern für das Tränken der Kälber verwenden.
- Die Melkanlage muss so konzipiert sein, dass nach der Reinigung kein Schwamm zum Ausstossen von Restwasser eingesetzt werden muss.
- Die Erfahrungen der Beratung gehen dahin, dass bei erhöhten PSB-Werten in der Lieferantenmilch immer Infektionsherde in der Melkanlage oder Milchtank gefunden werden. Das Erhitzen der Melkanlage mit Dampf bewährt sich gut, und die PSB-Werte in der Milch bleiben danach erfahrungsgemäss über mehrere Monate tief, sofern Schwachstellen vorher behoben wurden.

## 5. Kontaminationen mit Propionsäurebakterien in der Käserei

Über die Herkunft von PSB in Käsereien ist durch langjährige Untersuchungen in der Praxis und bei Agroscope bekannt, dass diese in der Regel durch belastete Rohmilch in die Käserei gelangen und sich bei schlechter Wartung und unsachgemässer Reinigung und Desinfektion in den Verarbeitungsanlagen ansiedeln können. Erste Priorität bei der Sanierung von Käsereien mit Nachgärungskäsen liegt somit bei der Eliminierung der PSB aus der Verarbeitungsmilch und der Vermeidung einer Kontamination im Abfüll- und Pressbereich.

Stufenkontrollen können wertvolle Hinweise über den Eintrag von PSB geben. Das Problem dabei ist, dass die Schadschwelle bei diesen Keimen sehr tief ist, wie dies bei anderen käseschädlichen Bakterien, die in Käse wachstumsfähig sind, auch der Fall ist. Das heisst, es gilt auch schwache Kontaminationen zu entdecken, wobei die Nachweismethoden an ihre Grenzen stossen.

Ein optischer Hygienecheck ist sehr zu empfehlen. Dies zeigen aktuelle Untersuchungen, welche in Käsereien mit ungenügender Ausreifbarkeit der Käse durchgeführt werden (siehe Tabelle 3, oben). Dabei sollen alle Rohrverschraubungen gelöst und Ventile zerlegt werden.

Potentielle PSB-Infektionsherde sind:

- der Auslaufhahn des Überstellmilchtanks
- der Bruchabfüllstutzen
- lose Verschraubungen
- das Restwasser im Bruchleitungsverteiler
- der Bereich Pressstempel und Presswanne

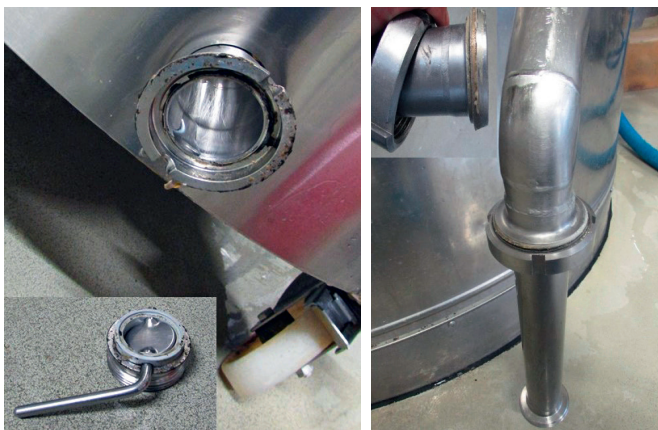


Abb. 14: Bei einer Käsereivisite entdeckte hygienische Schwachstellen. Bild links: Auslaufhahn des Überstell-Milchtanks. Bild rechts: Bruchabfüllstutzen.

### Wie beugen wir Kontaminationsquellen vor?

- Tägliche Kontrolle auf Sauberkeit der Anlagen.
- Tägliche Überwachung der CIP-Parameter (Temperatur, Konzentration etc.).
- Regelmässiges Auswechseln der Verschleissteile, wie Dichtungen, Schläuche, Gummi-Impeller.
- Sofortige Reparatur von Leckagen.
- tägliche Reinigung und Desinfektion des Abfüllsystems.
- Eine fachgerechte, jährliche Wartung
- Bei Verdacht auf Infektionen: Spülwasserproben vor Inbetriebnahme einer Anlage oder eines Anlageteils fassen und mikrobiologisch untersuchen. Sofortige Ergebnisse liefern z.B. ATP-Messungen (Regionalberatung kontaktieren).

## 6. Analytischer Nachweis von Propionsäurebakterien

### 6.1 Keimzählung auf Agarmedium

Die milchwirtschaftlichen Labors in der Schweiz verwenden für Untersuchung von Rohmilch den Laktat-Agar bestehend aus je 30 g Caseinpepton und Hefepepton, 15 g Natriumlactat und 12g Agar pro Liter Medium. Die Beimp werden anaerob bei 30°C während 9-10 Tagen bebrütet. Typische Kolonien (erhaben, beige bis rötlich) werden dann gezählt. Die Koloniefarbe erlaubt keine sichere Differenzierung verschiedener PSB-Spezies.

Die Begleitflora kann das Zählergebnis verfälschen, indem die Identifikation der PSB-Kolonien erschwert ist oder dass Kolonien wachsen, die mit PSB-Kolonien verwechselt werden können. In einem 2014 durchgeführten Laborvergleich mit 5 verschiedenen Rohmilchproben hat sich denn auch gezeigt, dass die Streuung der Ergebnisse von der Probe abhängig ist. Für eine Probe mit einer mittleren Keimzahl von 100 KbE/mL umfasste die typische Streubreite 50 – 200 KbE/g.

### 6.2 Quantifizierung mit PCR

Aufgrund der langen Dauer der herkömmlichen Keimzählmethoden und der manchmal widersprüchlichen Ergebnisse hat die Käsereibranche schon vor Jahren den Wunsch einer verbesserten Methode für die PSB-Analytik in Milch geäußert. Agroscope hat darum PCR-Methoden entwickelt, die einen hochspezifischen Nachweis der wichtigsten PSB-Arten ermöglichen und eine Quantifizierung mit tiefer Nachweisgrenze ermöglicht. Sie sind verfügbar für

- *P. freudenreichii*
- *P. thoenii*
- *P. jensenii*
- *P. acidipropionici*

Eine qPCR-Methode zu entwickeln, die alle vier relevanten Spezies gleichzeitig erfasst, war bisher nicht möglich, da es zu wenig Gemeinsamkeiten zwischen den Spezies gibt, die nicht auch für gewisse andere Bakterien zutreffen, die nicht zu den PSB gehören.

Wie die Abbildung **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** zeigt, ist die Übereinstimmung der qPCR-Methode für *P. freudenreichii* mit der Koloniezählmethode ab einer Keimzahl von 10 - 50 KbE/mL relativ gut, obwohl sich die beiden Methoden bezüglich der Selektivität unterscheiden. Die untere Bestimmungsgrenze der qPCR-Methode liegt bei 50 Genomeinheiten (entspricht theoretisch der Anzahl lebender und toter Zellen) pro Milliliter Milch. Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze sind unzuverlässig. Bei tieferen Koloniezahlen waren gehäuft höhere qPCR-Ergebnisse zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Begleitflora bei der Koloniezählmethode stört und somit die Erfassung der PSB erschweren kann. Ausserdem werden bei der qPCR Methode nicht vermehrungsfähige PSB erfasst, bei der Koloniezählmethode hingegen nicht.

Mit der qPCR-Methode steht nach unserer Überzeugung ein Werkzeug zur Verfügung, das es erlaubt, die für Käsefehler meistverantwortliche PSB-Art (*P. freudenreichii*) in Rohmilchproben selektiv und zuverlässig zu erfassen.

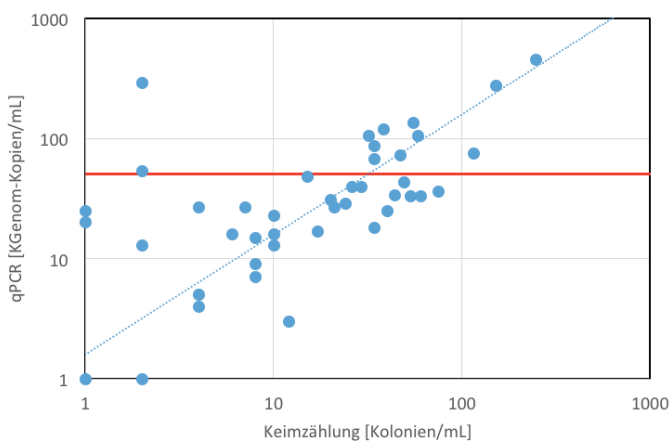


Abb. 15. Vergleich der Koloniezählmethode und der qPCR-Methode für PSB anhand von Kessmilchproben aus Hartkäsebetrieben. Die rote Linie markiert die untere Bestimmungsgrenze der qPCR-Methode (BG = 50 Genom-Kopien/mL). Für die Koloniezählung wurden 0.5 mL Milch auf 5 Platten verteilt. Drei Ergebnisse mit <2 KbE/mL wurden als 1 KbE/mL berücksichtigt.

### 6.3 Untersuchung von Rückstellproben

Versuche mit Liebefelder PSB-Flüssigkulturen hatten gezeigt, dass beim Einfrieren und Wiederauftauen in einem normalen Tiefkühler bis zu 90% der Keime ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren. In Milch scheinen dagegen Propionsäurebakterien den Gefrierprozess recht gut zu überstehen. Beim bakteriologischen Ringversuch 2014 mit der klassischen Keimzählmethode konnte keine Abnahme der Koloniezahl beobachtet werden, selbst wenn die tiefgekühlten Proben über mehr als 6 Monate gelagert wurden.

## 7. Zusammenfassung

Propionsäurebakterien können grundsätzlich bei allen Halbhart- und Hartkäsen Käsefehler verursachen, sogar beim Emmentaler. Durch PSB verursachte Käsefehler umfassen atypische Lochung, Nachgärung und Gläsbildung, Off-Flavour (süsslicher Geschmack) und unschöne braune Tupfen im Käseteig. Unter den verschiedenen PSB ist *P. freudenreichii* der mit Abstand wichtigste Verursacher. Er ist vergleichsweise Hitzeresistenz und überlebt somit auch die hohe Brenntemperatur beim Sbrinz oder eine Thermisation bei 65°C ohne Heisshaltezeit. Aufgrund der Fähigkeit sich während der Reifung im Käse zu vermehren, ist die Schadensschwelle im Bereich der Nachweisgrenze der Analysenmethoden. Umso wichtiger ist es, die Lieferantenmilch regelmässig auf PSB zu untersuchen und ggf. zu intervenieren. Nur so kann die Belastung in Kessilmilch niedrig gehalten und Schaden verhindert werden, besonders wenn Rohmilch verarbeitet wird.

## 8. Quellen

Cacano M., Todesco R., Lodi R. & Brasca M. 1995. Propionibacteria in Italian hard cheeses. *Le Lait*, 75 (4-5), 415-426

De Freitas R. und Mitarbeiter. 2015. New insights about phenotypic heterogeneity within *Propionibacterium freudenreichii* argue against its division into subspecies. *Dairy Science & Technology*, 95, 465–477

Fessler D., 1997. Characterisation of propionibacteria in Swiss raw milk by biochemical and molecular-biological methods. Dissertation ETH Zürich Nr. 12328

Fröhlich-Wyder M.T. & Bachmann H.P. 2004. Cheeses with Propionic Acid Fermentation. In: Fox F.P., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. & Guinee T.P. (Hrsg.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 2: Major Cheese Groups. Elsevier, ISBN 0-1226-3653-8

Fröhlich-Wyder, M.-T., Eugster-Meier, E. (2005). Kann Grosslochkäse ohne Gärraumaufenthalt hergestellt werden? *Agrarforschung*, 12 (9), 410-415.

Hofherr L.A. Hammond E.G., Glatz B.A., Ross P.F. 1983. Relation of Growth Temperature to Fatty Acid Composition of Propionibacterium Strains. *Journal of Dairy Science*, 66 (8), 1622–1629

Rossi F., Dellaglio F., Peluso M. & Torriani S. 2000. Propionibatteri caseari: diffusione, resistenza agli stress tecnologici e proprietà antagonistiche. *Industrie Alimentari*, XXXIX, 553-557.

Piveteau P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Le Lait*, 79, 23-41

Thierry A., Falentin H., Deutsch S. M. & Jan G. 2011. Propionibacterium spp. In: Fuquay J.W., Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Hrsg.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edition. Academic Press, ISBN-9780123744074

Turgay M., Irmeler S., Isolini D., Amrein R., Fröhlich-Wyder M.-T. Berthoud H., Wagner E., Wechsler D., 2011. Biodiversity, dynamics, and characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss Emmentaler PDO cheese *Dairy Science & Technology*, 91 (4), 471-489

Turgay M., Schaeren W., Wechsler D., Bütikofer U., Graber H.U. 2016. Fast detection and quantification of propionibacteria in milk samples using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *International Dairy Journal*, 61, 37-43

