

# Aufklärung von nicht alltäglichen Käsefehlern mit modernster Analytik

Oktober 2020



*Deklassierter Emmentaler im Alter von 1.5 Monaten mit stark fehlerhafter Lochung.*

## Autoren:

Daniel Wechsler  
Stefan Irmeler  
Thomas Aeschlimann  
Marco Meola  
Hélène Berthoud

**In fermentierten Lebensmitteln wie Käse wird die Produktqualität massgebend durch die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflusst. Der vorliegende Artikel zeigt an einem Praxisbeispiel die analytischen Möglichkeiten von Agroscope bei der Aufklärung von mikrobiell bedingten Käsefehlern auf.**

### Einleitung

Im Rahmen des Agroscope Forschungsprojektes Käsemikrobiom werden sowohl erwünschte wie auch unerwünschte Einflüsse des Käsemikrobioms auf die Käsequalität untersucht. Ziel des Projektes ist es, das Wissen über den Einfluss des Käsemikrobioms auf die Produktqualität zu erweitern. Der Fokus des Projektes richtet sich insbesondere auf Rohmilchkäse, da in deren Mikrobiom eine grössere Biodiversität erwartet wird. Im Rahmen des Projektes werden auch neue Analysemethoden entwickelt, mit denen die Käsereibereitung von Agroscope bei der Aufklärung von komplexen Praxisfällen unterstützt werden kann. Besonders hervorzuheben ist in diesem

Zusammenhang die Entwicklung molekularbiologischer Methoden, die immer leistungsfähiger und kostengünstiger werden und somit vertiefte Einblicke in das Käsemikrobiom ermöglichen.

Das Titelbild zeigt einen deklassierten Emmentaler, der eine stark fehlerhafte Lochung aufweist. Derart gravierende Fehlerbilder sind auch für erfahrene Käsereiberater nicht alltäglich. Aufgrund der sehr unsauberen Ausschaffung der Löcher wurde ein mikrobiell bedingter Käsefehler vermutet, der durch eine gasbildende Kontaminationsflora hervorgerufen wird. Da gewerbliche Betriebe und regionale Beratungsplattformen nur über beschränkte analytische Möglichkeiten verfügen, wurde Agroscope zur Klärung der Ursachen beigezogen.

Die Aufklärung solcher Praxisfälle ist auch eine wichtige Grundlage für den Wissenstransfer von Agroscope in die Praxis in Form von Ausbildungs- und Weiterbildungsveranstaltungen.



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für  
Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF  
**Agroscope**

### Käsereiberatung von Agroscope

Die in der Schweiz hergestellten Sortenkäse werden von den Konsumentinnen und Konsumenten aufgrund ihrer hervorragenden und konstanten Qualität sehr geschätzt. Mittels unabhängigen Qualitätsbeurteilungen (Taxationen) stellen die Sortenorganisationen sicher, dass nur qualitativ einwandfreie Käse in die Vermarktung gelangen. Fehlerhafte Käse werden deklassiert, was für die betroffenen Käsereien grosse ökonomische Verluste mit sich bringt, insbesondere dann, wenn die gesamte Produktion einer Käserei über einen längeren Zeitraum von einem Käsefehler betroffen ist. In solchen Situationen ist eine möglichst schnelle Aufklärung der Ursachen entscheidend, damit korrektive Massnahmen eingeleitet und die Fehlerursachen beseitigt werden können. Die Aufklärung von seltenen Käsefehlern verlangt viel Erfahrungswissen. Bei Agroscope arbeiten insgesamt vier Käsereiberater, die in enger Zusammenarbeit mit den regionalen Beratungsplattformen Käsereien in der ganzen Schweiz beraten und unterstützen. Dank der Mitarbeit der Berater in der Käseforschung und Kulturentwicklung von Agroscope ist sichergestellt, dass die vielseitigen Kompetenzen von Agroscope der Praxis für die Aufklärung von komplexen Käsefehlern zur Verfügung stehen.

### Analytische Ansätze zur Aufklärung von mikrobiologisch bedingten Käsefehlern

In den letzten Jahren wurden im Bereich der Käseanalytik bedeutende Fortschritte erzielt. Abbildung 1 enthält eine Übersicht der verschiedenen Ansätze, die bei Agroscope zur Aufklärung von Käsefehlern zum Einsatz gelangen. Insbesondere neue molekularbiologische Methoden liefern zunehmend diagnostische Hinweise, um die mikrobiologischen und molekularen Ursachen von nicht alltäglichen Käsefehlern aufzuklären. Neben klassischen mikrobiologischen Analysen werden deshalb in der Käsereiberatung von Agroscope zunehmend auch molekularbiologische Analysen eingesetzt. Die begrenzten Möglichkeiten, mit mikrobiologischen Methoden fehlerhafte Entwicklungen während der Reifung von Käse aufzuzeigen, waren auch Anlass dafür, dass in den letzten Jahrzehnten viele chromatographische, enzymatische und biochemische Analysemethoden entwickelt wurden, mit denen das Gärsgeschehen in Käse im Verlauf der Reifung anhand von ausgewählten Metaboliten verfolgt werden kann. Im Folgenden sollen die heute verfügbaren Lösungsansätze zur Aufklärung von nicht alltäglichen, mikrobiell bedingten Käsefehlern vorgestellt werden.

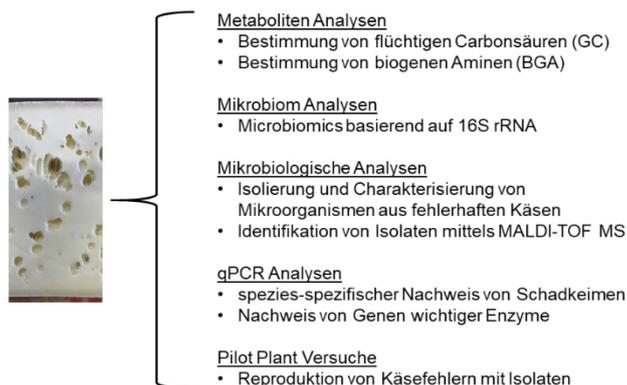


Abbildung 1: Lösungsansätze zur Aufklärung der Ursache von mikrobiell bedingten Käsefehlern.

### Metaboliten-Analysen

Metaboliten-Analysen sind auch heute noch der erste Schritt bei der Untersuchung von fehlerhaften Käseproben und liefern in der Mehrzahl der Fälle bereits entscheidende Hinweise zur Klärung der Ursachen von Qualitätsfehlern. Flüchtige Carbonsäuren und biogene Amine zählen zu den aussagekräftigsten Metaboliten in Käse. Die Untersuchung von Praxisproben auf den Gehalt an flüchtigen Carbonsäuren erlaubt einen Einblick in das Gärsgeschehen der reifenden Käse und ermöglicht die Erkennung verschiedener Fehlgärungen (z. B. Buttersäuregärung), die sich meist auch durch eine übermässige Gasbildung bemerkbar machen.

Auch die Bildung von biogenen Aminen ist eine häufig vorkommende Ursache für die unerwünschte Gasbildung in Käsen. Biogene Amine werden in Käse unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> aus Aminosäuren gebildet, weshalb die Bildung dieser Metaboliten stets auch im Zusammenhang mit der Bildung von Rissen (Gläs, Pick) oder einer fehlerhaften Lochung betrachtet werden muss. Die Bildung von biogenen Aminen führt zu einem schnellen Anstieg des pH-Wertes während der Käsereifung, was den Reifungsprozess beschleunigt und die Lagerstabilität der Käse reduziert. Unter den biogenen Aminen ist die Bildung von Histamin und Tyramin besonders unerwünscht. Tyramin ist problematisch für Personen, die mit Monoaminoxidase (MAO) hemmenden Medikamenten behandelt werden, da dadurch auch der Abbau von Tyramin verlangsamt wird. Typische Symptome einer Tyramin-Intoxikation sind erhöhter Blutdruck in Verbindung mit Kopfschmerzen, Schwindel, Sehstörungen, Übelkeit. Histamin erzeugt einen unangenehm brennenden Sinneseindruck im Mund, die Einnahme von > 50 mg Histamin pro Mahlzeit kann auch bei gesunden Personen gesundheitliche Beschwerden wie z. B. Hautrötungen oder Durchfall verursachen.

Im vorliegenden Praxisfall wurde der fehlerhafte Käse wie üblich in einem ersten Schritt auf die Gehalte an flüchtigen Carbonsäuren und biogenen Aminen untersucht. Die wichtigsten Analysenbefunde sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Analysenbefunde im deklassierten Emmentaler.

Ameisensäure	5.5 mmol kg <sup>-1</sup>
Essigsäure	30.5 mmol kg <sup>-1</sup>
Propionsäure	8.9 mmol kg <sup>-1</sup>
Flüchtige Carbonsäuren total	45.7 mmol kg <sup>-1</sup>
Cadaverin	853 mg kg <sup>-1</sup>
Histamin	42 mg kg <sup>-1</sup>
Tyramin	61 mg kg <sup>-1</sup>
Summe biogene Amine	956 mg kg <sup>-1</sup>
Freie Aminosäuren (OPA)	186 mmol kg <sup>-1</sup>

Der tiefe Propionsäuregehalt zeigte, dass die in diesem jungen Reifungsstadium noch schwach ausgeprägte Propionsäuregärung nur einen Bruchteil der Gasbildung erklärt. Ameisensäure und Essigsäure entstehen beim Abbau von Citrat durch fakultativ heterofermentative Laktobazillen, die als Zusatzkultur bei der Herstellung von Emmentaler zugesetzt werden. Diese flüchtigen Carbonsäuren können aber auch bei der gemischten Säuregärung des Milchzuckers durch Enterobakterien entstehen. Bei einer solchen Gemischtsäuregärung werden neben einer Reihe von organischen Verbindungen auch CO<sub>2</sub> und Wasserstoff freigesetzt, was in kontaminierten Käsen bereits

während des Pressvorgangs oder in den ersten Tagen der Reifung zu einer fehlerhaften Lochbildung führen kann und im Extremfall zu einer Frühblähung führt. Die Bestimmung des Gehalts an flüchtigen Carbonsäuren in gleichaltrigen Emmentaler Käsen mit normaler Lochung ergab ähnliche Gehalte an flüchtigen Carbonsäuren, so dass keine Hinweise für eine gemischte Säuregärung durch Enterobakterien vorlagen. Hingegen führte die Bestimmung der biogenen Amine zu einem sehr auffälligen Befund. Der Käse wies mit 853 mg kg<sup>-1</sup> einen aussergewöhnlich hohen Gehalt an Cadaverin auf, was nur durch die Präsenz einer Kontaminationsflora erklärt werden kann. Die Bildung von Cadaverin in Käse wird hauptsächlich mit dem Wachstum von Enterobakterien in Verbindung gebracht, sie kann aber auch mit Laktobazillen (z. B. *Lactobacillus saerimneri*) assoziiert sein. Die Herstellung von Emmentaler bei Brenntemperaturen im Bereich von 52–54 °C und die nur langsame Abkühlung der grossformatigen Laibe führt normalerweise zu einer starken Dezimierung von Enterobakterien, weshalb eine derart hohe Konzentration an Cadaverin für diese Käsesorte atypisch ist. Ziel der weiteren Untersuchungen war es deshalb, die mikrobiologische Ursache für die starke Bildung von Cadaverin aufzuklären.

**Käsemikrobiomanalysen**

Das Mikrobiom beschreibt die Gesamtheit aller Mikroorganismen in einem Ökosystem. Bei Käsemikrobiomanalysen wird genetisches Material direkt aus der Käseprobe extrahiert und sequenziert. Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal zu einer klassischen mikrobiologischen Analyse ist, dass Mikroorganismen nicht mehr kultiviert werden und sich auf diese Weise auch nicht-kultivierbare Mikroorganismen nachweisen lassen. Bei der Sequenzierung werden PCR-abhängige Verfahren (*amplicon-based sequencing*) und PCR-freie Verfahren (*shotgun metagenomic sequencing*) unterschieden. Bei Agroscope kommt bei Mikrobiom-Analysen ein Verfahren zur Anwendung, das auf der Sequenzierung des 16S rRNA Gens basiert. Hierbei werden im extrahierten, genetischen Material Teile des bakteriellen 16S-rRNA-Gens mittels PCR

amplifiziert und anschliessend sequenziert. Die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens ist besonders aufschlussreich, da dieses Gen universal in allen Bakterien vorkommt, sich jedoch von Bakterienspezies zu Bakterienspezies unterscheidet. Folglich kann durch die Bestimmung der Basenabfolge dieses Gens und dem anschliessenden Vergleich mit bekannten Sequenzen, die Bakterienspezies bestimmt werden. Dieses Verfahren wird seit 1994 als Standardverfahren für die Identifikation von Bakterien eingesetzt. Leider enthalten die für Vergleiche notwendigen 16S-rRNA-Gensequenzdatenbanken auch fehlerhafte Einträge, da sie nicht kuriiert sind. So kann es vorkommen, dass Sequenzdaten einer falschen Bakterienspezies zugeordnet wurden. Im Rahmen des Agroscope Forschungsprojektes «Mikrobielle Biodiversität» wurde in den letzten Jahren in Zusammenarbeit mit INRAE in Frankreich eine kuriierte Datenbank für milchwirtschaftlich relevante Mikroorganismen erstellt (Meola et al., 2019). Die Einträge dieser DAIRYdb genannten Datenbank liefern verlässlichere Zuordnungen. Eine Käsemikrobiom-Analyse liefert Millionen von Sequenzdaten. Um die Ergebnisse einer solchen Studie zu interpretieren, ist ein molekularbiologisches und informatisches Fachwissen notwendig. Abbildung 2 zeigt den Ablauf einer Käsemikrobiom-Studie bei Agroscope.

Im vorliegenden Praxisfall wurden 10 qualitativ gute Käse aus verschiedenen Chargen und 10 Käseproben aus einer Charge mit stark fehlerhaften Käsen mit dem oben beschriebene Verfahren untersucht. Die Spezies der Starterkultur und Zusatzkulturen (*Lactobacillus delbrueckii* und *Streptococcus thermophilus*, sowie *Propionibacterium freudenreichii* und *Lactobacillus paracasei*) dominierten die Zusammensetzung des Mikrobioms aller untersuchten Käse und stellten zusammen jeweils über 99 % des Mikrobioms im Käseteig dar (Abb. 3). In der Gruppe der fehlerhaften Käse war die relative Abundanz von *Lactobacillus delbrueckii* tiefer bzw. jene von *Lactobacillus paracasei* höher als in den Vergleichskäsen mit guter Qualität. Die Grundproblematik bei der Anwendung von Microbiomics in fermentierten Lebensmittel besteht darin, dass einzelne Spezies derart dominant sein können, dass der Nachweis kleinerer

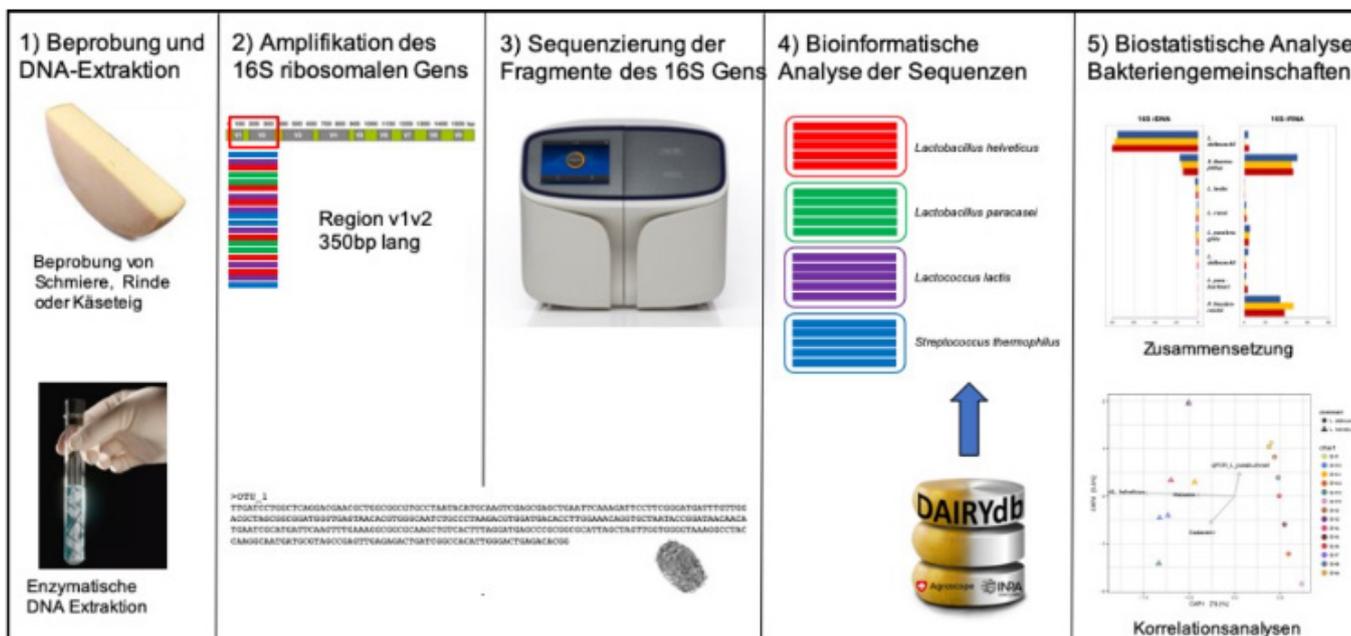


Abbildung 2: Ablauf einer auf 16S basierten Käsemikrobiomanalyse bei Agroscope.

Bakterienpopulationen sehr schwierig wird. Die in Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die zugesetzten Kulturen das Mikrobiom der in Käse dominieren und dass autochthon vorkommenden Bakterien einen sehr geringen Anteil am Mikrobiom ausmachen. Es ist jedoch so, dass auch marginale Bakterienpopulationen im Mikrobiom von Käse einen sehr wichtigen Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften und die Produktqualität ausüben können. Dies gilt insbesondere für käseschädliche Bakterienpopulationen, die trotz sehr tiefen relativen Abundanzen von < 0.1 % gravierende Auswirkungen auf die Käsequalität haben können.

Abbildung 4 zeigt die relative Abundanz der Minorbestandteile im Käsemikrobiom der untersuchten Käse die jeweils zusammen weniger als 1 % ausmachten. In den fehlerhaften Käsen wurden *Lactobacillus parabuchneri* und andere Laktobazillen wie *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus coryniformis* gefunden (Abb. 4). Als weitere Minorbestandteile wurden auch Spezies aus der Familie der Entero-

kokken und der Enterobacteriaceen nachgewiesen. Es kann angenommen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Bildung der biogenen Amine Cadaverin (Enterobacteriaceen), Tyramin (Enterokokken) und Histamin (*Lactobacillus parabuchneri*) sowie der Kontaminationsflora besteht. Aufgrund der sehr hohen Ähnlichkeit der 16S-rRNA-Gensequenzen von eng verwandten Spezies wäre es mehr spekulativ als gesichert, spezies-spezifische Aussagen über die Ursache der fehlerhaften Käsequalität zu machen. Das Wachstum von käseschädlichen Bakterien in den fehlerhaften Käsen war auf einen Fehler bei der Wahl der Fabrikationsrezeptur zurückzuführen, der eine zu tiefe Brenntemperatur (50 °C statt 52–54 °C) und eine zu tiefe Abfülltemperatur (44 °C statt 52 °C) zur Folge hatte. Vermutlich führte die viel zu tiefe Abfülltemperatur zu einer unvollständigen Milchsäuregärung, so dass in Käsen nach 24 Stunden noch Restzucker verfügbar war, der das Wachstum von unerwünschten und käseschädlichen Bakterien begünstigte.

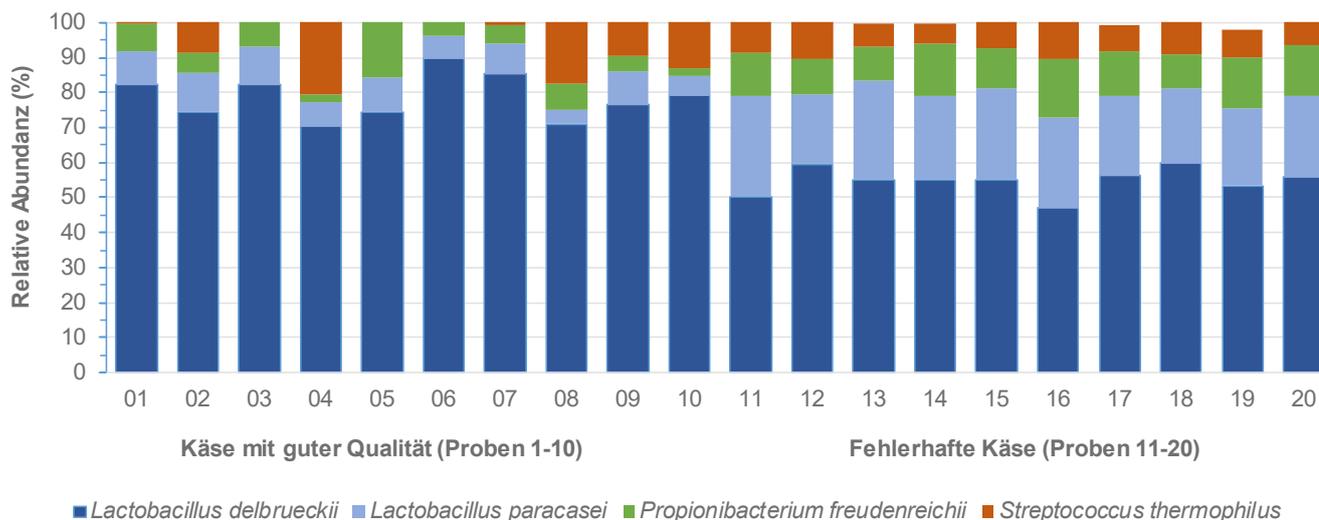


Abbildung 3: Relative Abundanz der dominanten Spezies *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Propionibacterium freudenreichii* und *Lactobacillus paracasei* in den untersuchten Käseproben.

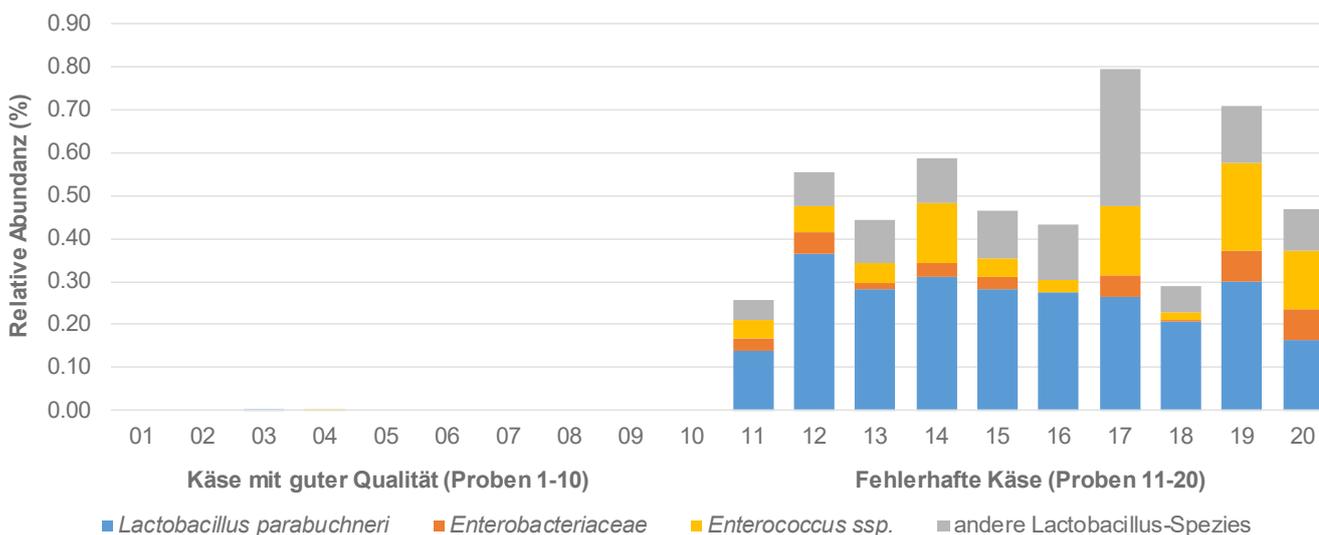


Abbildung 4: Relative Abundanz von Minorbestandteilen im Käsemikrobiom.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Mikrobiomanalysen interessante Hinweise zur Präsenz von unerwünschten Keimen in Käsen lieferten. Aussagen über die genauen Spezies käseschädlichen Bakterien in der fehlerhaften in den deklassierten Emmentaler Käsen waren basierend auf den Ergebnissen der Mikrobiomanalysen nicht möglich, weshalb in einem weiteren Schritt ergänzend auch mikrobiologische Analysen durchgeführt wurden.

### Mikrobiologische Analysen

Biogene Amine sind organische, basisch reagierende Verbindungen und entstehen hauptsächlich durch mikrobiell verursachte Decarboxylierung von Aminosäuren. So wird z. B. Histamin aus Histidin, Tyramin aus Tyrosin und Cadaverin aus Lysin gebildet. In der Mikrobiologie werden verschiedene Medien verwendet, um Bakterien, die biogene Amine bilden, zu isolieren. Diesen Decarboxylase-Medien ist gemeinsam, dass sie einen leicht sauren pH-Wert aufweisen und dass ihnen eine für die Aminbildung notwendige Vorläufer-Aminosäure sowie ein pH-Indikator zugesetzt wird. Wenn ein Bakterium in der Lage ist, die Vorläufer-Aminosäure zu decarboxylieren, entsteht ein Amin, welches den pH um die Bakterienkolonie erhöht. Der pH-Anstieg wird durch den Farbumschlag des pH-Indikators sichtbar.

Im vorliegenden Praxisfall wurden auf Grund des hohen Cadaverin-Gehalts Agarplatten mit der Vorläufer-Aminosäure Lysin verwendet. Der Ausstrich eines Homogenates des fehlerhaften Emmentalers auf diesen Agarplatten und deren anschließende Bebrütung bei 30 °C während 20 h führte zu einem Wachstum von rötlichen Kolonien (Abb. 5). Da die rötliche Farbe nur eine pH-Veränderung anzeigt, jedoch nicht direkt die Bildung einesamins nachweist, wurde in einem zweiten Schritt eine Kolonie in ein Flüssigmedium mit der entsprechenden Vorläufer-Aminosäure überimpft. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C für etwa 20 Stunden wurde der Medienüberstand mittels Dünnschichtchromatographie auf die Anwesenheit von biogenen Aminen untersucht (Abb. 6, rechts). Dieser Nachweis ist qualitativ und erlaubt es, bis zu 16 Proben parallel in wenigen Stunden auf die Bildung von Histamin, Tyramin, Cadaverin und Putrescin zu prüfen. Mit dieser Methode wurde bestätigt, dass die rötlichen Kolonien Cadaverin bilden. Für die rasche Identifikation von Bakterien und Hefen wird bei Agroscope das MALDI-TOF-MS (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) Verfahren verwendet (Abb. 7). Hierbei werden Kolonien von Agarplatten auf eine metallene Targetplatte transferiert und mit einer Matrix-Lösung (meist ein Benzoesäurederivat) versetzt. Eine solche Targetplatte hat 96 bis 160 Probenfelder. Die Zieltafel wird dann in das MALDI-TOF-MS-Gerät eingeführt. Im Hochvakuum wird mit einem Laser auf die mit Matrix-Lösung versetzten Bakterien geschossen. Dadurch werden Proteine aus den Bakterien freigesetzt, ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Anhand der Flugzeit, die die Moleküle in einem Flugrohr benötigen, kann die Masse der freigesetzten Proteine bestimmt werden.

Das Gesamtspektrum der Massen ist für einzelne Bakterien-spezies charakteristisch, quasi ein molekularer Fingerabdruck. Durch den Vergleich der gemessenen Spektren mit Referenzspektren kann die Bakterien-spezies ermittelt werden. Dank diesem sehr schnellen Verfahren zur Identifikation von Bakte-

rienkolonien konnten die rötlichen Bakterienkolonien in weniger als einem halben Tag als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert werden.

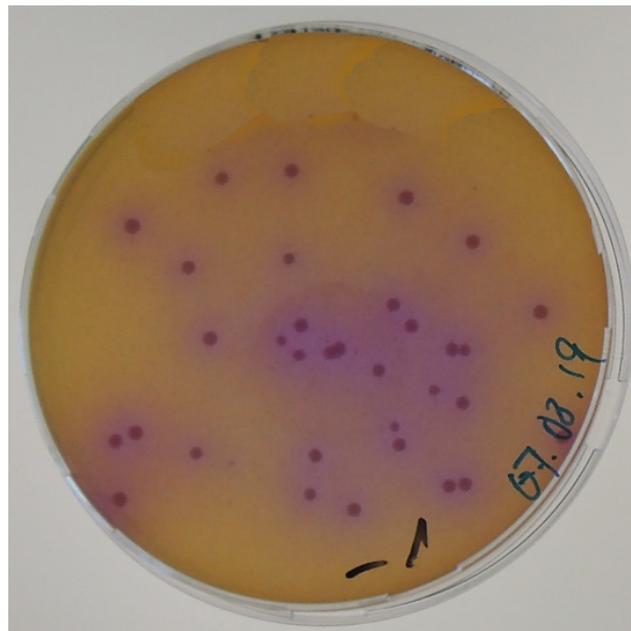


Abbildung 5: Agarplatte mit Cadaverin bildenden Bakterien, die auf dem spezifischen Medium als rötlich gefärbt Kolonien erkennbar sind.

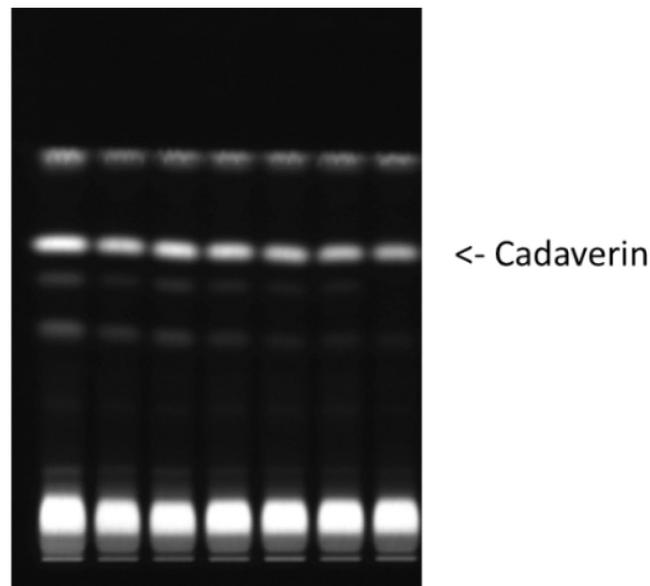


Abbildung 6: Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Bildung von Cadaverin durch die isolierten Bakterienkolonien.

### Vorkommen von *Klebsiella pneumoniae* in Käse

Über das Vorkommen von *Klebsiella pneumoniae* in Käse ist wenig bekannt. In einer italienischen Studie wurde die Spezies als Verderbererreger in kommerziell hergestelltem Mozzarella identifiziert (Massa et al., 1992). Mit *Klebsiella pneumoniae* kontaminierte Chargen zeigten eine starke Gasbildung, was einerseits zur Bildung von Löchern im Käse führte und andererseits eine Blähung der Plastikbeutel verursachte. Die Käse wurden aus pasteurisierter Milch hergestellt, weshalb angenommen wurde, dass die Kontamination nach der Vorbehandlung der Milch erfolgte. Für die Erzielung der sortentypischen

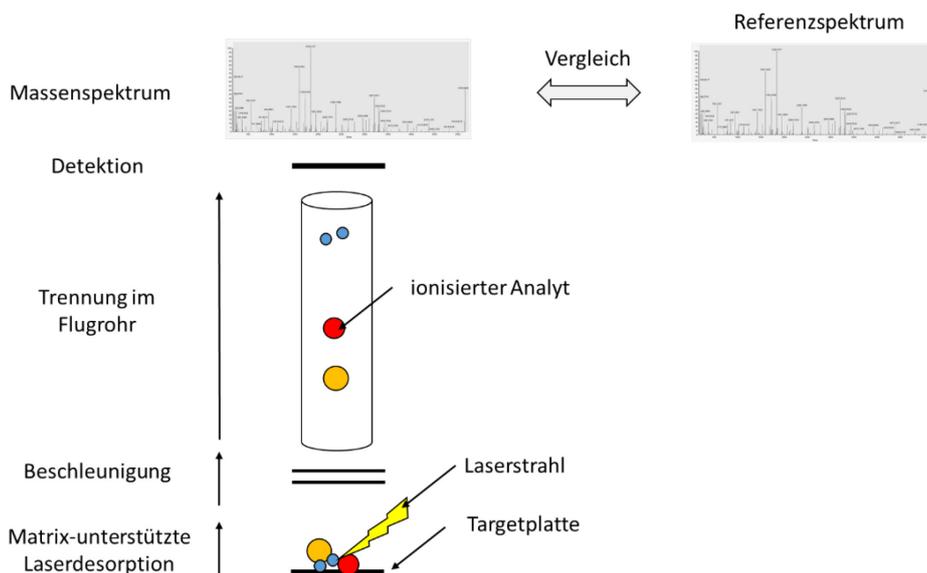


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer MALDI-TOF-MS-Analyse.

Textur wird Mozzarella im Anschluss an die Käseherstellung in einem Wasserbad bei Temperaturen bis 57 °C geknetet. Die in den fehlerhaften Mozzarella festgestellte Gasbildung zeigt, dass *Klebsiella pneumoniae* eine solche Wärmebehandlung überstehen kann. Die in der Studie durchgeführten Abklärungen zur Thermoresistenz von *Klebsiella pneumoniae* ergaben, dass Kulturen von *Klebsiella pneumoniae* mit einer Ausgangskeimzahl  $10^7$  KBE ml<sup>-1</sup> erst durch eine Wärmebehandlung von 15 min bei 63 °C vollständig inaktiviert wurden.

Im vorliegenden Praxisfall konnte nicht geklärt werden, ob die verarbeitete Rohmilch mit *Klebsiella pneumoniae* kontaminiert war. Denkbar ist auch, dass die Kontamination mit diesem Schadkeim erst beim Abfüllen des Käsebruches erfolgte. Das Schnittbild zeigt, dass die fehlerhafte Lochung im Zentrum des Käses weniger stark ausgeprägt war. Dieser zonale Unterschied lässt vermuten, dass *Klebsiella pneumoniae* im Zentrum des Emmentalers aufgrund der langsameren Abkühlung zumindest teilweise inaktiviert wurde.

### qPCR-Analysen

Die Verfügbarkeit von Genomsequenzen verschiedenster Bakterienarten in öffentlich zugänglichen Datenbanken ermöglicht zunehmend die Entwicklung spezies-spezifischer Nachweissysteme. Dank der Entwicklung einer bioinformatischen Pipeline (Dreier et al., 2020) konnte die Anzahl spezies-spezifischer Nachweissysteme in den letzten drei Jahren kontinuierlich erhöht werden. Agroscope kann derzeit über 30 milchwirtschaftlich relevante Bakterienarten mit Hilfe von qPCR Analysen quantitativ nachweisen (Tab. 2). Dies eröffnet auch neue Perspektiven für die Untersuchung von Praxisproben auf käseschädliche Bakterienarten. In der vorliegenden Studie wurden auch die Populationsdichten der mit den Kulturen zugeetzten Spezies bestimmt (Abb. 8). Dabei zeigte sich, dass die Populationsdichte von *Lactobacillus delbrueckii* in den fehlerhaften Käsen signifikant tiefer war ( $p$ -Wert = 0.001). Die Ergebnisse der qPCR-Analysen lassen vermuten, dass in den fehlerhaften Käsen das Wachstum von *Lactobacillus delbrueckii* als Folge der tiefen Abfülltemperatur von 44 °C gebremst wurde.

Tabelle 2: Übersicht milchwirtschaftlich relevanter Spezies, für die Agroscope über spezies-spezifische qPCR-Nachweissysteme verfügt.

Spezies	EvaGreen qPCR	TaqMan-qPCR
<i>Clostridium butyricum</i>	x	
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	x	x
<i>Enterococcus durans</i>	x	
<i>Enterococcus faecalis</i>	x	
<i>Enterococcus faecium</i>	x	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	x	x
<i>Lactobacillus brevis</i>	x	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	x	
<i>Lactobacillus casei</i>	x	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	x	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	x	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	x	x
<i>Lactobacillus fermentum</i>	x	x
<i>Lactobacillus gasseri</i>	x	
<i>Lactobacillus helveticus</i>		x
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	x	x
<i>Lactobacillus paracasei</i>	x	x
<i>Lactobacillus pentosus</i>	x	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	x	x
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	x	
<i>Lactobacillus sakei</i>	x	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	x	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	x	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	x	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	x	
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		x
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>		x
<i>Propionibacterium jensenii</i>		x
<i>Propionibacterium thoenii</i>		x
<i>Streptococcus salivarius</i>	x	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	x	x

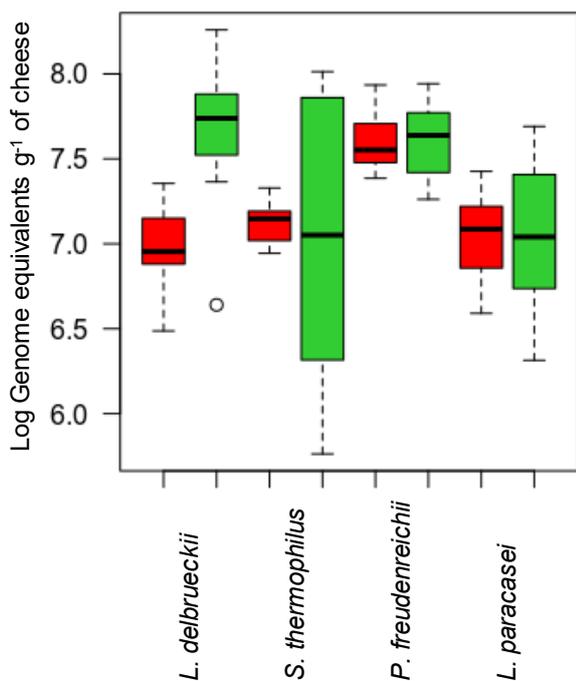


Abbildung 8: Nachweis von Spezies aus Starter- und Zusatzkulturen mittels qPCR in fehlerhaften Käsen (rot; n = 10) und qualitativ guten Käsen (grün; n = 10).

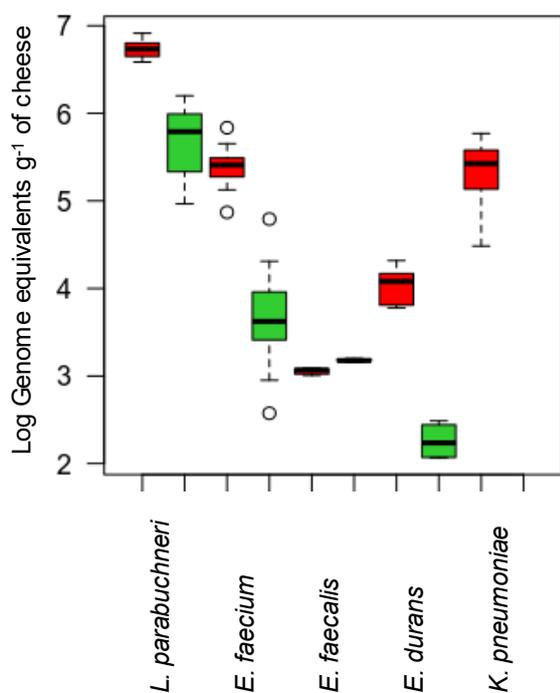


Abbildung 9: Spezies-spezifischer Nachweis von *L. parabuchneri*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* und *K. pneumoniae* mittels qPCR in fehlerhaften Käsen (rot; n = 10) und qualitativ guten Käsen (grün; n = 10).

Die Mikrobiomanalyse ergab klare Hinweise auf die Präsenz einer Kontaminationsflora in den fehlerhaften Käsen (*Lactobacillus parabuchneri*, *Enterococcus* und *Enterobacteriaceae*;

Abb. 4), die relative Abundanz der Kontaminationsflora war jedoch sehr gering (< 1 %). Die Ergebnisse des spezies-spezifischen Nachweises von *Lactobacillus parabuchneri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus durans* und *Klebsiella pneumoniae* mittels qPCR sind in Abbildung 9 dargestellt. Die qPCR-Ergebnisse untermauern den Verdacht, dass eine unvollständige Milchsäuregärung bzw. Restzucker in den Käsen zu einem Wachstum von käseschädlichen Keimen in den fehlerhaften Käsen führte. In den 10 fehlerhaften Käsen war die Populationsdichte der drei Spezies *Lactobacillus parabuchneri*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus durans* signifikant höher als in den Käsen mit guter Qualität (p-Wert = 0,0002). Kontaminationen mit *Klebsiella pneumoniae* konnten ausschliesslich in den fehlerhaften Käsen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese Spezies bei den üblichen Brenn- und Abfülltemperaturen zur Herstellung von Emmentaler AOP inaktiviert wird. Der Nachweis von käseschädlichen Bakterien mittels qPCR ist sehr aufschlussreich, da anhand der ermittelten Populationsdichten abgeschätzt werden kann, ob zwischen dem Fehlerbild und der Kontaminationsflora ein kausaler Zusammenhang besteht. In den fehlerhaften Käseproben wurde neben sehr hohen Konzentrationen von Cadaverin auch Histamin und Tyramin nachgewiesen. Die Bildung dieser drei biogenen Amine ist aufgrund der qPCR-Ergebnisse gut nachvollziehbar. Die Populationsdichte von *Klebsiella pneumoniae* erklärt die hohe Konzentration an Cadaverin in den fehlerhaften Käsen. Die Bildung von Tyramin kann aufgrund der vorgefundenen Populationsdichten hauptsächlich mit *Enterococcus faecium* assoziiert werden. Die Populationsdichte von *Lactobacillus parabuchneri* war in fehlerhaften Käsen durchschnittlich eine Zehnerpotenz höher als in den guten Käsen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese Spezies sehr oft in stark mit Histamin belasteten Käsen enthalten ist.

Das hier vorgestellte Praxisbeispiel zeigt die Konsistenz der Ergebnisse, die mittels 16S-Metagenomik und qPCR erhalten wurde und verdeutlicht die Komplementarität dieser beiden molekulargenetischen Verfahren. Limitierend für den Einsatz von qPCR-Nachweisen ist der Umstand, dass nur nach käseschädlichen Spezies gesucht werden kann, für die ein spezies-spezifisches Nachweissystem verfügbar ist. Auch der analytische Aufwand ist beträchtlich, da die zahlreichen Spezies in einem Käsemikrobiom derzeit noch mit seriellen qPCR-Analysen erfasst werden müssen. Beeindruckende Fortschritte in der Mikrofluidtechnologie haben zur Entwicklung eines High Throughput qPCR Systems geführt (Fluidigm®), dessen Einsatz auch für die Käse Diagnostik interessante neue Perspektiven eröffnet. Mit diesem System können aktuell bis zu 96 verschiedene qPCR-Nachweissysteme parallel durchgeführt werden, wodurch die Analysenkosten im Vergleich zu herkömmlichen qPCR-Analysen etwa um den Faktor 100 reduziert werden können. Die Weiterentwicklung der Käse Diagnostik durch den Einsatz der Fluidigm®-Technologie ist Gegenstand laufender Forschungsarbeiten von Agroscope.

**Pilot-Plant-Versuche**

Die Aufklärung von nicht alltäglichen Käsefehlern ist ein wichtiges Element in der Käseerberatung. Ein Käsefehler ist erst dann aufgeklärt, wenn er gezielt reproduziert werden kann. Pilot-Plant-Versuche sind ein wichtiges Instrument, wenn es da-

rum geht, das Wissen über käseschädliche Bakterien zu erweitern. In Rahmen der durchgeführten Abklärungen gelang es, mehrere Isolate von Cadaverin bildenden *Klebsiella pneumoniae* aus dem im Titelbild gezeigten Emmentaler zu isolieren. Der Einsatz solcher Isolate in *Pilot-Plant*-Versuchen kann wertvolle Hinweise Thermoresistenz und Schadensschwelle dieser Spezies liefern, was insbesondere für die Herstellung von Rohmilchkäsen von Bedeutung ist. Anhand solcher Versuche kann beispielsweise geklärt werden, bei welchen Sorten die Präsenz dieses Keimes in der Rohmilch Auswirkungen auf die Käsequalität hat und ab welchen Keimzahlen in der Verarbeitungsmilch Käsefehler zu erwarten sind. Gemäss der vom Bundesamt für Umwelt (BAFU) veröffentlichten Liste zur Einstufung von Organismen handelt es sich bei *Klebsiella pneumoniae* um einen Klasse 2 Organismus. Aus Gründen der Biosicherheit war es nicht möglich, im *Pilot Plant* von Agroscope Liebefeld entsprechende Versuche mit den gewonnenen Isolaten durchzuführen. Dies verdeutlicht, dass die Infrastruktur der Käseforschung von Agroscope an die geltenden Sicherheitsanforderungen angepasst werden muss, damit Käseversuche mit Isolaten von Klasse 2 Organismen wieder durchgeführt werden können.

**Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden Studie wurde versucht, anhand eines Praxisfalls die Ursachen für das Auftreten einer äusserst fehlerhaften Lochung in deklassiertem Emmentaler aufzuklären. Die Analysenergebnisse der Bestimmung der biogenen Amine zeigten, dass alle fehlerhaften Käse eine Kontaminationsflora enthielten, die sehr hohe Mengen an Cadaverin bildet. Es wurde vermutet, dass diese Kontaminationsflora auch Auslöser für die stark fehlerhafte Lochung sein könnte. In der Folge wurde deshalb versucht, mit molekularbiologischen und mikrobiologischen Analysen zu klären, um was für eine Kontaminationsflora es sich handelt. In den fehlerhaften Käsen wurden mittels Mikrobiomanalysen Kontaminationen mit Enterokokken und *Lactobacillus parabuchneri* detektiert, deren Präsenz die schwache Bildung von Tyramin und Histamin erklärt. Weiter wurden auch Enterobacteriaceen detektiert, die aufgrund ihres gasbildenden Potenzials und ihrer Fähigkeit zur Bildung von Cadaverin das Fehlerbild erklären könnte. Aufgrund der extremen Dominanz von Spezies der zugesetzten Kulturen, lag die relative Abundanz der detektierten Kontaminationen weit unter einem Prozent. Eine abschliessende Klärung der Fehlerursache war anhand der Befunde der Mikrobiomanalysen nicht möglich. Aus den deklassierten Emmentaler konnten Cadaverin bildende Isolate gewonnen werden, die mittels MALDI-TOF MS als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert werden konnte. Mittels qPCR-Analysen wurden relevante Kontaminationen mit *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus parabuchneri* und *Klebsiella pneumoniae* in den fehlerhaften Käse nachgewiesen und damit plausible Ursachen zur Erklärung des vorgefundenen Fehlerbildes gefunden. Derzeit laufen bei Agroscope Forschungsarbeiten, um mittels High Throughput qPCR erwünschte und unerwünschte Spezies in Käse quantitativ nachzuweisen. Erste Versuchsergebnisse mit diesem komplementären Lösungsansatz sind vielversprechend, der Einsatz dieser kostensparenden Methodik in der Praxis wäre ein grosser Fortschritt in der Käseanalytik und Käsereiberatung.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Aufklärung von nicht alltäglichen, mikrobiologisch verursachten Qualitätsproblemen in Käse trotz der Verfügbarkeit neuer Analysemethoden eine komplexe und zeitaufwändige Aufgabe bleibt, die nur durch den Einsatz von verschiedenen, komplementären Analysen lösbar ist. Mikrobiomanalysen können wertvolle Hinweise zur schnellen Aufklärung von Praxisfällen liefern, die Ergebnisse solcher Analysen müssen aber in jedem Fall mit Vorsicht interpretiert werden, da es sich um eine Forschungsmethode handelt, die nicht für diagnostische Zwecke entwickelt wurde.

**Literaturverzeichnis**

- Dreier M., Berthoud H., Shani N., Wechsler D., Junier P. (2020). SpeciesPrimer: a bioinformatics pipeline dedicated to the design of qPCR primers for the quantification of bacterial species. *PeerJ* 8:e8544 <http://doi.org/10.7717/peerj.8544>
- Massa S., Gardini F., Sinigaglia M., Guerzoni M.E. (1992). *Klebsiella pneumoniae* as a spoilage organism in mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 75(6):1411–1414. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77894-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77894-1)
- Meola, M., Rifa, E., Shani, N., Delbès C., Berthoud H., Chassard C. (2019). DAIRYdb: a manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. *BMC Genomics* 20, 560. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5914-8>

**Impressum**

Herausgeber	Agroscope Liebefeld
Auskünfte	Daniel Wechsler
Gestaltung	Daniel Wechsler
Fotos	Agroscope
Titelbild	Deklassierter Emmentaler AOP
Download	<a href="http://www.agroscope.ch/transfer">www.agroscope.ch/transfer</a>
Copy right	© Agroscope 2020
ISSN	2296-7214
DOI	<a href="https://doi.org/10.34776/at358g">https://doi.org/10.34776/at358g</a>