

# Mikrobielle Kulturen für den Nachweis der Herkunft von lange ausgereiften Extrahartkäsen

Petra Lüdin, Hans-Peter Bachmann und Alexandra Baumeyer Brahier

Agroscope, 3003 Bern, Schweiz

Auskünfte: Hans-Peter Bachmann, E-Mail: hans-peter.bachmann@agroscope.admin.ch

<https://doi.org/10.34776/afs11-9>

Publikationsdatum: 21. Januar 2020



**Abb. 1** | Mikroskopisches Bild einer Herkunftsnachweiskultur mit *Lactobacillus rhamnosus*.



**Abb.2** | Herkunftsnachweiskulturen in flüssiger und gefriergetrockneter Form.

## Zusammenfassung

Agroscope hat eine Methode entwickelt um über den Einsatz von Milchsäurebakterien Schweizer Käsesorten vor Fälschungen zu schützen. Diese Milchsäurebakterien werden aus der Käseumgebung isoliert, tragen eine einzigartige Sequenz in ihrem natürlichen Erbgut und lassen sich dadurch mittels qPCR von allen anderen Mikroorganismen eindeutig unterscheiden. Es werden bewusst Milchsäurebakterien ausgewählt, die im Käse gut überleben, damit sie selbst nach einer ausgedehnten Reifung noch nachweisbar sind. Trotzdem haben diese keinen wahrnehmbaren Einfluss auf das Aroma, die Textur oder die Lochbildung. Dieser Schutz hat sich in den letzten Jahren bei Hart- und

Halbhartkäse stark bewährt und geholfen Betrugsfälle aufzudecken oder sie gar nicht erst entstehen zu lassen. Bisher wurden Herkunftsnachweiskulturen (HNK) für Käse mit Reifung von vier Monaten (Appenzeller® Käse), sechs Monaten (Tête de Moine AOP) und zwölf Monaten (Emmentaler AOP) entwickelt. Nun ist es gelungen HNK zu entwickeln, die sich auch für bis zu 26 Monate lange ausgereifte Extrahartkäse bestens eignen.

**Key words:** Cultures, Lactic Acid Bacteria, Marker, Authentication, Proof of Origin, Identification of Copycats, Cheese.

## Einleitung

Agroscope hat eine Methode entwickelt, um über den Einsatz von Milchsäurebakterien Schweizer Käsesorten vor Fälschungen zu schützen (Casey *et al.* 2008). Dieser Schutz hat sich in den letzten Jahren stark bewährt und geholfen Betrugsfälle aufzudecken oder sie gar nicht erst entstehen zu lassen. Manch ein Fälscher wird abgeschreckt, da es keine ganzen Käseleibe mehr braucht, um den Echten von der Fälschung zu unterscheiden, sondern ein Nachweis nun auch in Scheiben, Reibkäse oder Rosetten zweifelsfrei möglich ist.

Vor bald zehn Jahren wurde die erste sogenannte Herkunftsnachweiskultur (HNK) erfolgreich in Emmentaler AOP implementiert. Seit 2013 und 2015 gibt es sie auch im Tête de Moine AOP und in Appenzeller® Käse und weitere stehen kurz vor der Einführung. Diese ein paar Mikrometer kleine Marker (Abb.1) sind aus der Käseumgebung isolierte Milchsäurebakterien, die eine einzigartige Sequenz in ihrem natürlichen Erbgut tragen und sich dadurch von allen anderen Mikroorganismen eindeutig unterscheiden lassen. Es werden bewusst Milchsäurebakterien gewählt, die im Käse gut überleben und damit selbst nach einer ausgedehnten Reifung noch nachweisbar sind. Die gewählten Bakterien vermehren sich in der frühen Phase der Käsereifung nur gering, wodurch eine Störung der üblicherweise verwendeten Starterkultur vermieden werden kann. Andererseits dürfen die HNK keinen wahrnehmbaren Einfluss auf das Aroma, die Textur oder die Lochbildung haben. Um die HNK selbst fälschungssicher zu machen, besteht sie in der Regel aus zwei Markerbakterien. Die beiden Stämme werden separat gezüchtet, anschliessend gemischt, gegebenenfalls gefriergetrocknet und portioniert, an die Käseerei verschickt und dort während der Käseherstellung zusammen mit der Starterkultur der Kessimilch beigegeben. Die Markerbakterien in der HNK können rotiert werden, da für jede HNK auch Reserve-Stämme entwickelt wurden. Nachgewiesen werden können sie jederzeit in wenig Käsematerial mittels quantitativer Polymerasenkettenreaktion (qPCR), welche die einzigartige Sequenz der HNK eindeutig findet.

Die erste HNK für den Emmentaler AOP wird in flüssiger Form angeboten und nach einer umfassenden Qualitätskontrolle den Käsern alle zwei Wochen zugestellt. Die flüssige Form hat den Vorteil, dass sie weniger aufwändig in der Herstellung ist und in der Käseerei genauer dosiert werden kann. Der Nachteil dieser Angebotsform ist die beschränkte Haltbarkeit. Aus diesem Grund wurden und werden alle weiteren Herkunftsnachweiskulturen in gefriergetrockneter (= lyophilisierter) Form als Pulver

angeboten (Abb. 2). Der Herstellungsprozess und die damit verbundene Entwicklung werden damit zwar deutlich aufwändiger, doch wird dies durch die Vorteile der wesentlich verlängerten Haltbarkeit sowie einer kleineren Anzahl an Qualitätskontrollen, da pro Jahr weniger Chargen produziert werden, ausgeglichen. Weil die Bakterien im Pulver sehr hoch konzentriert sind, muss in der Käseerei der Kessimilch nur eine ganz kleine Menge vom Pulver zugesetzt werden. Der Versand an die Käseereien erfolgt in der Regel nur noch alle drei Monate, was auch den Einsatz in Alpkäsereien ermöglicht.

Nach der erfolgreichen Einführung des Nachweissystems für Halbhart- und Hartkäse, stand das Forschungsteam von Agroscope bei der Entwicklung einer HNK für lange ausgereifte Extrahartkäse vor neuen Herausforderungen. Erstens wird beim Extrahartkäse der Käsebruch bis auf 57°C erwärmt, was einigen Bakterien bereits zu heiss ist und sie eliminiert. Zweitens ist eine Reifungsdauer von zwei oder mehr Jahren keine Seltenheit. Drittens sind Löcher bei Extrahartkäsen meist unerwünscht, was den Einsatz von zur Gasproduktion neigenden Mikroorganismen schwierig macht. Nach den ersten Erfah-



Abb. 3 | Bioreaktor für die experimentelle Züchtung der Herkunftsnachweiskulturen.

rungen mit Pediokokken als HNK, wurde deshalb ein neuer Weg mit fakultativ heterofermentativen Laktobazillen eingeschlagen, da diese Milchsäurebakterien erfahrungsgemäss in sehr reifen Extrahartkäsen natürlicherweise vorkommen. Diese Laktobazillen fermentieren nicht nur Hexosen zu Milchsäure, sondern sind auch in der Lage Pentosen zu verwerten und daraus nebst Milchsäure auch Essigsäure zu produzieren (Broadbent *et al.* 2011). Hexosen sind Monosaccharide, deren Kohlenstoffgrundgerüst sechs Kohlenstoff-Atome enthält, wie z.B. die Glukose und die Galaktose, aus denen der Milchzucker besteht. Pentosen enthalten hingegen nur fünf Kohlenstoffatome, wie z.B. die Ribose, die während der Käsereifung frei wird.

Entscheidend für das Forschungsteam von Agroscope war nun, Stämme von fakultativ heterofermentativen Laktobazillen zu finden, die kein Citrat abbauen können. Die meisten Stämme dieser Gruppe von Laktobazillen sind in der Lage, das in der Milch vorhandene Citrat zu verwerten, was sie zu Beginn der Reifung konkurrenzfähiger im Käse macht, da sie auch nach dem Abbau der Laktose noch eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung haben. Der Abbau von Citrat führt aber auch zur Abspaltung von CO<sub>2</sub> und damit zur Gasbildung im Käse mit dem Risiko von Löchern, Gläs oder Rissen (Weinrichter *et al.* 2001, Gemelas *et al.* 2014).

Die Hypothese war, dass Stämme von fakultativ heterofermentativen Laktobazillen, die kein Citrat abbauen können, bei der Vermehrung im Käse Pentosen oder andere Kohlenstoffquellen verwerten, damit einen Überlebensvorteil haben und trotzdem kein Gas bilden.

## Material und Methoden

2055 Stämme von fakultativ heterofermentativen Laktobazillen (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus rhamnosus*) wurden auf Agarplatten mit Citrat und Glukose als Kohlenstoffquellen gezüchtet, um ihre Fähigkeit Citrat abzubauen zu untersuchen; die Citrat-positiven Stämme bilden dabei einen transparenten Hof um die Kolonie. 23 Citrat-negative Keime wurden anhand ihrer Genomsequenzen auf ihre einzigartigen Stellen im Genom untersucht. Nach dem Auffinden von geeigneten DNA-Sequenzen zur Entwicklung eines PCR-Systems, wurden insgesamt neun *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* in einem Kurventhermostaten dem Temperaturprofil bei der Herstellung von Extrahartkäse ausgesetzt. Anschliessend wurde die Überlebensrate der Bakterien ermittelt.

Für die vier Stämme mit der besten Überlebensrate wurden anschliessend in einem Bioreaktor (Abb. 3) die idealen Bedingungen für die Vermehrung (z.B. Temperatur, pH, Dauer) und die Gefrierdrying (z.B. Cryoschutz, Dauer, Temperatur, Druck) ermittelt. Die so hergestellten Herkunftsnachweiskulturen wurden in einem nächsten Schritt in der Modellkäserei mit einer Rezeptur für Extrahartkäse getestet.

Die Käse wurden im Käsekeller bei für Extrahartkäse üblichen Bedingungen ausgereift und nach 24 Stunden, 4, 11 und 26 Monaten beprobt. Anhand der Bestimmung einer Reihe von biochemischen Parametern (z.B. Citratgehalt, freie Aminosäuren und Milchsäure) und Inhaltsstoffen (z.B. Wasser-, Fett- und Salzgehalt und flüchtige Carbonsäuren) sowie einer sensorischen



**Abb. 4** | Schnittbild der 26 Monate gereiften Extrahartkäse zur unterstützenden Beurteilung der Lochbildung. Die Käse Nummer 1 und 6 sind Kontrollkäse ohne die Zugabe von HNK; Käse Nummer 2 bis 5 enthalten HNK.

Beurteilung, wurde die Qualität der Käse untersucht. Die Aufnahme von Röntgenbildern und die Beurteilung des Schnittbildes am Ende der Reifung dienten der Beurteilung des Lochbildes (Abb. 4).

Der regelmässige qPCR-Nachweis während der Reifung erlaubte die Beurteilung der Stabilität der HNK über die lange Reifungsdauer. Dazu wird 10 g Probenmaterial homogenisiert und daraus die DNA extrahiert. Spezifische Primer binden an die einzigartige DNA-Sequenz der Markerbakterien und bestimmen so, welche Region der DNA in der eigentlichen PCR vervielfältigt wird. Diese amplifizierten DNA-Stücke werden dann in Echtzeit quantifiziert.

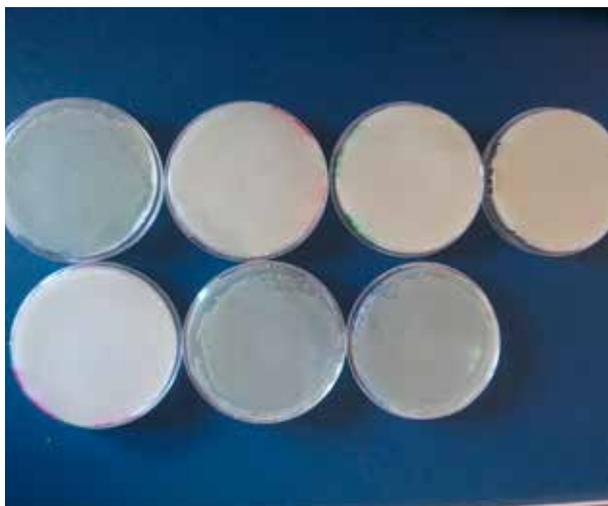
Drei Stämme wurden anschliessend in einem Praxisversuch in gut produzierenden Betrieben getestet. Die Qualitätsbeurteilung erfolgte analog dem Versuch in der Modellkäserei. Im letzten Praxisversuch wurde ein ausführlicher Duo-Trio-Sensorik-Test durchgeführt. Dazu bekamen die Probandinnen und Probanden eine Referenz und zwei unterschiedliche Käsestücke mit und ohne HNK zur Verkostung. Die Referenz war zufallsverteilt ein Käsestück mit oder ohne HNK. Nun musste herausgefunden werden, welches Käsestück sich von der Referenz unterscheidet und auch die Frage beantwortet werden, wieso es sich unterscheidet. Für die zweite Frage stand eine Liste mit vorgegebenen Attributen zur Verfügung.

## Resultate und Diskussion

Aufgrund der Untersuchungen im Labor wurden vier Stämme ausgewählt und in der Modellkäserei sowie in Praxisversuchen in gewerblichen Käsereien getestet. Drei Stämme erfüllten dabei alle gestellten Anforderungen (Tab. 1).

### Citrat-negative Laktobazillen

Der erste Praxisversuch brachte ein erstaunliches Resultat. Obwohl alle im Käse eingesetzten Stämme im Labor auf den Citrat-Agarplatten nicht in der Lage waren Citrat zu verstoffwechseln, ist in der Praxis ebendies in einer Versuchsvariante geschehen. Nebst dem Abbau von Citrat, hatten einige Käse einen höheren Gehalt an den typischen Abbauprodukten Essig- und Ameisensäure sowie eine deutlich sichtbare Lochbildung durch das ebenfalls gebildete CO<sub>2</sub>. Nach genauerer Betrachtung wurde festgestellt, dass nur ein Stamm, ein *L. paracasei*, Citrat abbaut. Im Labor wurde später ermittelt, dass dieser Stamm nur in Kombination mit gewissen anderen Laktobazillen in der Lage ist, Citrat zu verstoffwechseln (Abb. 5). Dies können Laktobazillen aus der Rohmilch sein oder in einzelnen Fällen auch der



**Abb. 5** | Citrat-Agarplatten mit den unverdünnten Versuchskulturen. Oben von links nach rechts: Stamm 0 als Positivkontrolle, Versuchsstämme A, B und C einzeln ausplattiert. Unten von links nach rechts: B, C und D in Kombination mit *L. paracasei* Stamm A. Der transparentere Agar (Hofbildung) weist auf Citratabbau hin.

zweite Markerstamm der HNK. Es wird vermutet, dass gewisse Teilschritte des Citratmetabolismus durch andere Mikroorganismen übernommen werden können. Da während der Käseherstellung immer auch andere Keime mit Citratstoffwechsel vorhanden sein können, kam der erwähnte *L. paracasei* nicht weiter als Bestandteil der HNK in Frage. Ausserdem müssen die Stämme in Zukunft auf den Citrat-Platten nicht nur einzeln, sondern auch in Kombination getestet werden um das Screening auf Laborstufe zu verbessern.

**Tab. 1** | Screening-Kriterien bei der Entwicklung einer Herkunftsnachweiskultur (HNK) für Extrahartkäse.

Kriterien für die Entwicklung einer HNK	Anzahl Stämme welche die Kriterien erfüllen
Fakultativ heterofermentative Laktobazillen aus Extrahartkäse isoliert	2055
Kein Abbau von Citrat auf Citrat-Platten	23
Kein vollständiges Gen für Citratabbau im Genom gefunden	9
Überleben der hohen Brenntemperaturen des Extrahartkäses	6
Geeignetes qPCR System für den Nachweis der einzigartigen DNA Sequenz	4
Gute Ausbeuten bei der Biomassenherstellung sowie gute Überlebensrate bei der Gefriertrocknung	4
Sicher nach heutigem Stand der Wissenschaft in Bezug auf die Anwendung	4
Guter Nachweis im Käse, kein Einfluss auf die Qualität	3

### Abklärungen zur Sicherheit

Bei den HNK wird mit Milchsäurebakterien gearbeitet, welche als sehr sicher gelten. Trotzdem wurden die Stämme eingehend untersucht, ob sie übertragbare Antibiotika-Resistenz-Gene aufweisen, kritische Virulenzfaktoren besitzen oder biogene Amine bilden können. Das Vorgehen für die Sicherheitsabklärungen wurde von Bachmann *et al.* (2019) beschrieben. Alle vier geprüften Stämme erfüllten ausnahmslos die definierten Anforderungen.

### Molekularbiologischer Nachweis über 26 Monate

Bei einer Herkunftsnachweiskultur mit zwei Stämmen wird angestrebt, dass das qPCR Signal bei einem Stamm bei mindestens  $1.0E+04$  und beim anderen Stamm bei mindestens  $1.0E+03$  Kopien/Reaktion liegt. Der *L. rhamnosus*, Stamm E, blieb im Käse über die gesamte Reifungsdauer von 26 Monaten stabil und war mit einem sehr starken qPCR Signal von rund  $1.0E+06$  Kopien/Reaktion nachweisbar (Abb. 6). *L. paracasei*, Stamm B, war in drei Käsereien trotz einem leichten Rückgang des

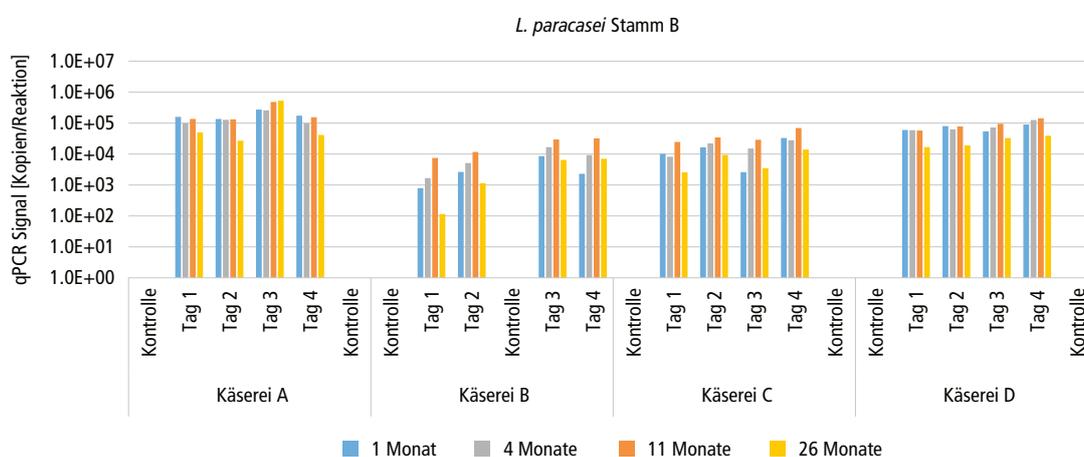


Abb. 6 | qPCR-Nachweis des Markerstammes *L. rhamnosus* Stamm E in vier Käsereien an vier Fabrikationstagen und zwei Kontrollkäsen über die 26-monatige Reifung im Extrahartkäse.

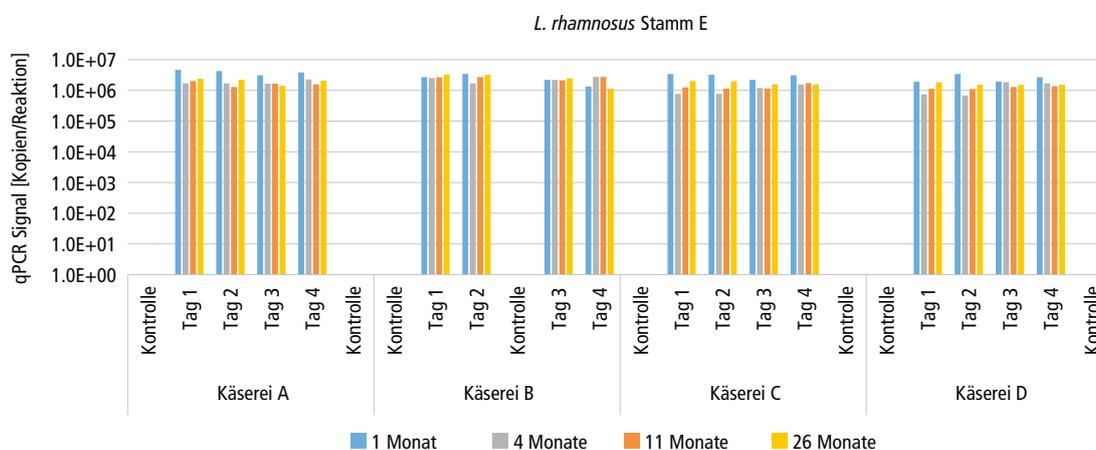


Abb. 7 | qPCR-Nachweis des Markerstammes *L. paracasei* Stamm B in vier Käsereien an vier Fabrikationstagen und zwei Kontrollkäsen über die 26-monatige Reifung im Extrahartkäse.

qPCR Signals zwischen dem 11. und 26. Monat problemlos nachweisbar. In der Käserei B war das qPCR Signal etwas schwächer und im Käse des zweiten Versuchstages sogar unter der kritischen Grenze von  $1.0E+03$  Kopien/Reaktion (Abb. 7). Dies deutet darauf hin, dass die Anwendung dieses Stammes in dieser einen Käserei etwas optimiert werden muss, der Nachweis aber grundsätzlich möglich ist.

Generell waren die beiden Stämme bereits nach einem Monat mit hoher Anzahl nachweisbar und sind während der Reifung nur teilweise leicht weitergewachsen. Der Nachweis der aktiven HNK gelingt demnach auch in sehr lange ausgereiften Käsen.

### Beurteilung der Käsequalität

Der Milchzuckerabbau in den ersten 24 Stunden, der Wasser- sowie Fettgehalt waren für alle Käse vergleichbar und in einem sehr engen Bereich. Feststellbare Schwankungen gab es im Gehalt an freien Aminosäuren, Citrat, Salzgehalt und pH. Diese Schwankungen waren jedoch zwischen den Käsereien grösser als innerhalb der Versuchsvarianten und es gab keinen Zusammenhang mit der Zugabe der HNK.

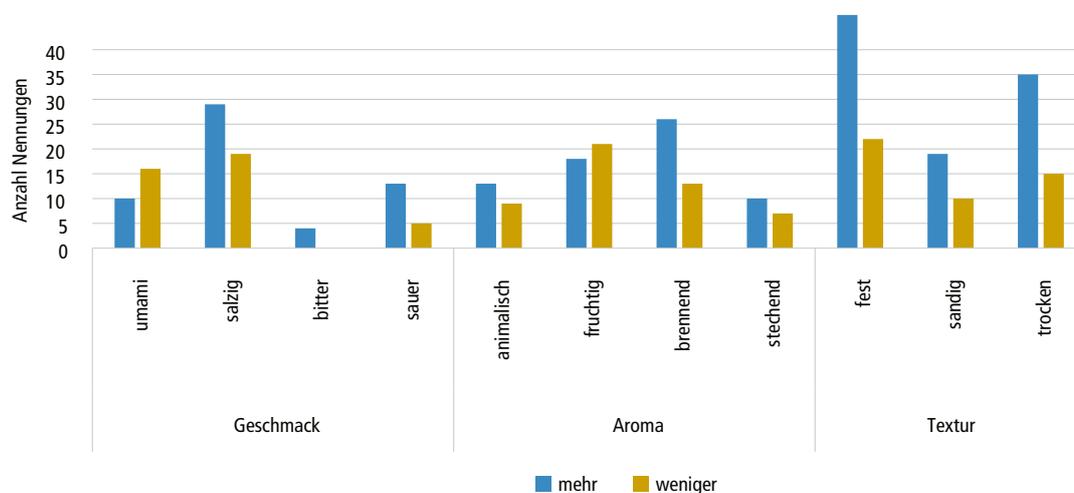
Statistisch signifikant höher war in den Käsen mit HNK der Gehalt an Ameisen- und Essigsäure. Der absolute Gehalt lag jedoch immer noch in einem normalen Bereich. Diese Stoffwechselprodukte sind offenbar nicht durch den Abbau von Citrat entstanden und es scheint kein Gas gebildet worden zu sein. Die Lochbildung war in allen Käsen normal.

### Sensorische Beurteilung im Duo-Trio-Test

An der Degustation der 26 Monate alten Käse nahmen 19 geschulte Panellisten des Agroscope Liebefeld internen Sensorikpanels sowie sieben Fachpersonen aus der Branche teil. Bei 75 % der getesteten Paare erkannten nur gerade knapp mehr als die Hälfte der Panellisten den abweichenden Käse beim Duo-Trio-Sensorik-Test. Statistisch ausgewertet waren die richtigen Antworten jedoch (auf dem 5%-Niveau) nicht signifikant, was bedeutet, dass die Käse mit HNK nicht von den Kontrollkäsen unterschieden werden konnten. Dies ist insbesondere interessant, als dass die Käse mit HNK auch immer an einem anderen Tag fabriziert wurden als die Kontrollkäse ohne HNK. Dadurch spielte auch die unterschiedliche Milch und kleine Schwankungen zwischen den Fabrikationstagen eine Rolle bei der sensorischen Beurteilung.

Zusätzlich interessierte, aufgrund von welchen Attributen die Panellisten mit den richtigen Antworten die unterschiedlichen Käse erkannt hatten. Die detaillierte Auswertung ergab, dass von den 361 genannten Attributen die meisten abweichenden Käseproben aufgrund unterschiedlicher Festigkeit oder Trockenheit erkannt wurden (Abb. 8). Also überwiegend Unterschiede in der Textur, die nicht primär alleine durch Mikroorganismen beeinflusst werden, weshalb hier nicht von einem Einfluss der HNK ausgegangen wird.

Die Attribute salzig und brennend wurden am zweithäufigsten genannt um den Unterschied der Käse zu beschreiben. Man kann hier jedoch keinen eindeu-



**Abb. 8** | Auswertung der Anzahl Nennungen von Attributen im Duo-Trio-Test der Probanden, welche den unterschiedlichen Käse erkannt haben. Die Balken sind blau dargestellt für Attribute, welche die Käse mit HNK mehr haben. Die gelben Balken stehen für die Anzahl Nennungen der Attribute welche die Käse mit HNK weniger haben. Als Beispiel: alle Probanden zusammen genommen haben die Käse mit HNK insgesamt 18-mal als fruchtiger und 21-mal als weniger fruchtig beurteilt.

tigen Trend erkennen. So wurden die Käse mit HNK in 5 % (18 Nennungen) als fruchtiger aber auch in 5,8 % (21 Nennungen) als weniger fruchtig beurteilt. Die Käse mit HNK wurden weiter mit 8 % aller genannten Attribute (29 Nennungen) als salziger jedoch auch mit 5,3 % (19 Nennungen) als weniger salzig empfunden. Der analytisch gemessene Salzgehalt zwischen den Käsen zeigte keinen relevanten Unterschied. Er kann aber auch innerhalb des Käses schwanken und deshalb auch trotz der sorgfältigen Auswahl der Käsestücke bei der Beurteilung eine Rolle spielen. Ähnlich sind die Ergebnisse für das Attribut brennend. Von den erkannten Unterschieden wurden die Käse mit HNK in 7,2 % der Nennungen als brennender, in 3,6 % als weniger brennend bezeichnet.

## Schlussfolgerungen

Das bewährte System der Herkunftsnachweiskulturen zur Verhinderung von Fälschungen beim Käse funktio-

niert auch bei lange ausgereiften Extrahartkäsen sehr zuverlässig.

Weitere Schweizer Käsesorten werden das System ebenfalls einführen und damit ein effektives Instrument für die Bekämpfung von Fälschungen schaffen. Agroscope hat das Ziel, die Herstellung und den Nachweis der Herkunftsnachweiskulturen weiter zu optimieren und das System stetig zu verbessern. Auch der validierte Nachweis in speziellen Käseerzeugnissen (wie z. B. Schmelzkäse, Fonduemischungen oder Reibkäsemischungen) oder ein portabler Schnelltest für Analysen direkt vor Ort (Lüdin *et al.* 2018) wurden evaluiert und sind vielversprechend.

Es ist gut denkbar, das System auch bei weiteren (fermentierten) Lebensmitteln zu etablieren, wie z. B. bei Fleischprodukten oder Pflanzenölen. Auch Anwendungen ausserhalb des Lebensmittelsektors (z. B. in der Kosmetik) sind grundsätzlich möglich um Fälschungen aufzudecken und zu verhindern. ■

## Literatur

- Bachmann H.P., Kohn C., von Ah U. & Shani N., 2019. Sicherheitsabklärungen für die Liebefelder Kulturen. *Agrarforschung Schweiz* **10** (7–8) 290–297.
- Broadbent J. R., Budinich M. F. & Steele J. L. , 2011. Non-Starter Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of dairy sciences, 2<sup>nd</sup> edition*. **1**: 639–644.
- Casey M.G., Isolini D., Amrein R., Wechsler D. & Berthoud H., 2008. Naturally occurring genetic markers in lactobacilli and their use to verify the authenticity of Swiss Emmental PDO cheese. *Dairy Sci. Technol.* **88**, 457–466. <https://doi.org/10.1051/dst:2008014>.
- Gemelas L., Degraeve P. & Demarigny Y., 2014. The Citrate Metabolism in Homo- and Heterofermentative LAB: A Selective Means of Becoming Dominant over Other Microorganisms in Complex Ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*. **5**, 953–969. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.510106>.
- Lüdin P., von Ah U., Rollier D., Roetschi A. & Eugster E., 2016. Lactic Acid Bacteria as Markers for the Authentication of Swiss Cheeses. *Chimia*, **70** (5) 349–353. <https://doi.org/10.2533/chimia.2016.349>.
- Lüdin P., Rando G. & Sahi B., 2018. Käse-Fälschungen sofort aufgedeckt. *Alimenta* Nr. **10**, 20–21.
- Weinrichter B., Luginbühl W., Rohm H. & Jimeno J., 2001. Differentiation of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli from Plants, Milk, and Hard Type Cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, Energy Source Utilization and Autolysis Type. *LWT Food Sci. & Technol.* **34** (8) 556–566. <https://doi.org/10.1006/ftsl.2001.0799>.