

Dr. Stefan IRMLER, Tharmatha BAVAN, Dr. Barbara GUGGENBÜHL, Bern, Schweiz

# Aminosäurestoffwechsel von Pediokokken aus Käse

**In fermentierten Lebensmitteln wie Käse, Wurstwaren und Wein sind oftmals Pediokokken nachzuweisen. So sind z. B. *Pediococcus acidilactici* und *Pediococcus pentosaceus* regelmäßig in der Nicht-Starter Milchsäureflora von Schweizer Rohmilchkäsen anzutreffen. An der schweizerischen Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras wird der Aminosäurestoffwechsel dieser Bakterien untersucht, um ihren Einfluss auf das Käsearoma und die Käsequalität zu verstehen.**

Bei der Verarbeitung von Milch zu Joghurt, Quark und Käse spielen Milchsäurebakterien eine wichtige Rolle. Sie verstoffwechseln den Milchzucker zu Milchsäure, wodurch der pH-Wert im Produkt sinkt und dieses vor dem Verderb durch andere Bakterien geschützt wird. Um eine gute Säuerung zu gewährleisten, werden heutzutage ausgewählte Milchsäurebakterien als Starterkulturen bei der Käseherstellung willentlich zugesetzt. In Käsen aus Roh- und pasteurisierter Milch findet man am Ende der Reifung aber nicht nur die Milchsäurebakterien der Starterkultur, sondern auch sogenannte Nicht-Starter Milchsäurebakterien, die von der Rohmilchflora bzw. von der Käsereiumgebung stammen. So werden beispielsweise Pediokokken regelmäßig in der Nicht-Starter Milchsäureflora von Schweizer Rohmilchkäsen wie z. B. Emmentaler, Gruyère, Appenzeller und Tilsiter nachgewiesen. Sie können in Käse innerhalb von 40 bis 50 Tagen bis zu  $1 \times 10^6$  Koloniebildenden Einheiten pro Gramm Käse erreichen. Bei diesen Bakterien handelt es sich um Grampositive und Katalase- sowie Oxidase-negative Milchsäurebakterien, die eine homofermentative Milchsäuregärung aufweisen. Letzteres bedeutet, dass sie Zucker zu Milchsäure ohne Kohlendioxidbildung verstoffwechseln. Allerdings ist wenig über ihre Stoffwechsellätigkeiten und ihren Einfluss auf die Käsereifung bekannt.

Unter dem Mikroskop erscheinen Pediokokken kugelförmig, und sie kommen paarweise und

als Tetraden (zu viert) vor (Abbildung 1). Taxonomisch sind bislang sechs Pediokokken-Spezies beschrieben worden. Um die Spezies korrekt zu bestimmen, kommen sowohl molekularbiologische Techniken wie z. B. die Sequenzierung der 16S rDNA als auch phänotypische Tests zum Einsatz. So verstoffwechselt z. B. *P. pentosaceus* im Vergleich zu *P. acidilactici* Maltose; Letzterer kann die Zuckerquelle Maltose nicht nutzen.

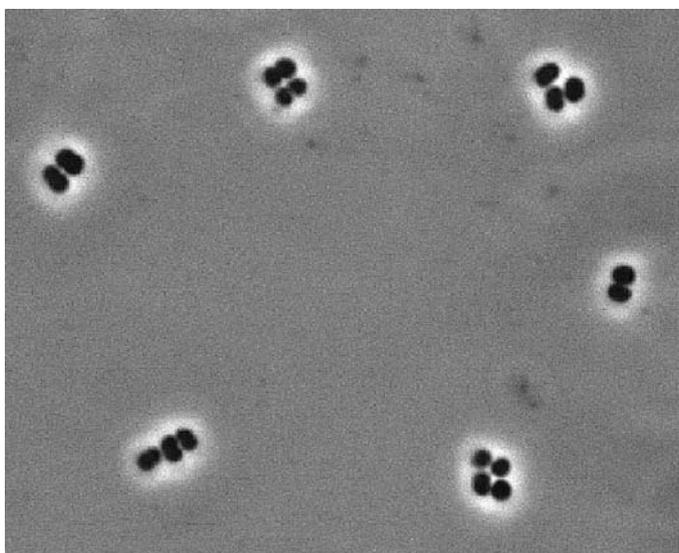
Die Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras verfügt über eine große Anzahl von Pediokokken-Isolaten aus Schweizer Käsen. An ALP-Haras wurde die Sequenzierung der 16S rDNA angewendet, um die Spezies eindeutig zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei den Isolaten überwiegend um die beiden Spezies *Pediococ-*

*cus acidilactici* und *Pediococcus pentosaceus* handelt.

Während der Käsereifung werden durch den Abbau der Kaseine (Proteolyse) Peptide und Aminosäuren freigesetzt. Mit verschiedenen Enzymen wie Decarboxylasen, Dehydratase, Lyasen oder Aminotransferasen können Milchsäurebakterien die Aminosäuren dann zu einer Reihe von weiteren Verbindungen verstoffwechseln. An ALP-Haras wurde der Aminosäurestoffwechsel von einer Auswahl an verschiedenen *P. acidilactici* und *P. pentosaceus*-Stämmen näher untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Stoffwechselaktivitäten von Pediokokken und deren Einfluss auf die Käsequalität und die Aromabildung im Käse besser zu verstehen.

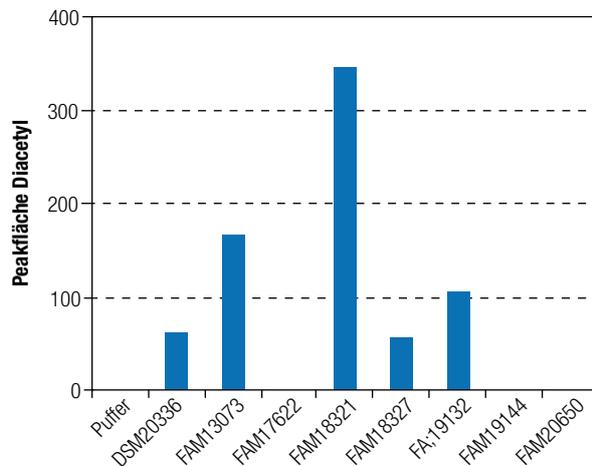
## ■ Bildung von Diacetyl aus Serin

Diacetyl hat einen ausgeprägten Buttergeruch und ist eine wichtige Aromakomponente in Butter. Diesem Aromastoff wird auch eine bedeutende Rolle für das Aroma von verschiedenen Käsesorten wie z. B. Camembert, Cheddar und Emmentaler zugewiesen. Diacetyl kann von Laktokokken und Laktobazillen aus Citronensäure gebildet werden. Dabei wird die



**Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) von *Pediococcus pentosaceus* FAM19132**

**Abbildung 2:** Gaschromatographischer Nachweis der Diacetylbildung von verschiedenen *P. pentosaceus* Stämmen. Die Stämme wurden in einem Puffer mit Serin inkubiert. Dargestellt sind die Peakflächen von Diacetyl.



Citronensäure in mehreren Schritten über das Zwischenprodukt Pyruvat und die Freisetzung von Kohlendioxid in Diacetyl umgewandelt. Untersuchungen an der ALP zeigten, dass sowohl die *P. acidilactici* als auch die *P. pentosaceus* Stämme Citronensäure nicht verstoffwechselten. Allerdings bildeten sie Diacetyl, wenn ihnen Pyruvat als Substrat angeboten wurde. Pyruvat wird nicht nur aus dem Abbau von Zucker und Citronensäure gebildet, sondern kann auch durch die Desaminierung der Aminosäure Serin hergestellt werden. Daher wurden die Pediokokken-Stämme in einem Serin-haltigen Puffer inkubiert. Die Analyse der flüchtigen Verbindungen im Kopfraum der Probe zeigte dann, dass mehrere Stämme von *P. pentosaceus* Diacetyl produzierten (Abbildung 2). Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass diese Stämme in der Lage sind, Serin zu Pyruvat umzuwandeln, welches dann zu Diacetyl umgesetzt wird.

Das Enzym, welches den ersten Schritt katalysiert, wird Serin Dehydratase genannt. Das Genom von *P. pentosaceus* ATCC 25745 ist sequenziert, und die Daten sind öffentlich zugänglich. Eine Analyse dieser Genomdaten ergab, dass *P. pentosaceus* ein Gen besitzt, welches möglicherweise eine Serin Dehydratase codiert. Interessanterweise ist dieses Gen nicht in den öffentlich zugänglichen Genomdaten von *P. acidilactici* zu finden. Die Nukleinsäuresequenz dieses Gens wurde in den *P. pentosaceus*-Stämmen der ALP Sammlung bestimmt. Es zeigte sich, dass die Stämme FAM17622, FAM19144 und FAM20650 Mutationen in diesem Gen aufweisen, die dazu führen, dass diese Stämme keine aktive Serin Dehydratase

herstellen. Da die erwähnten Stämme auch kein Diacetyl aus Serin bildeten, liegt die Vermutung nahe, dass das Gen an der Bildung von Diacetyl aus Aminosäuren beteiligt ist.

### ■ Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren

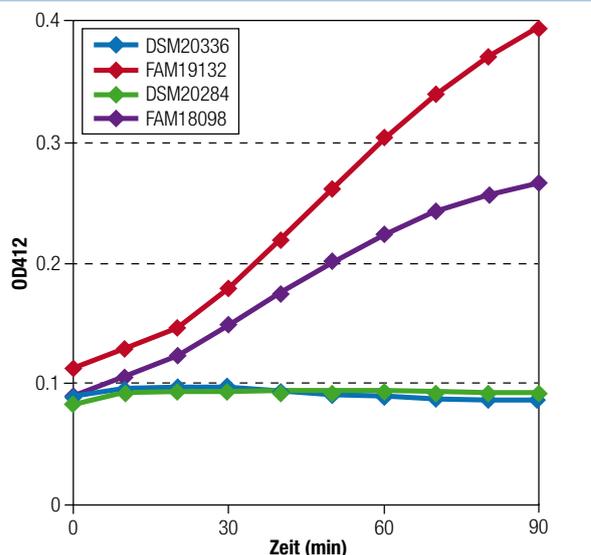
Schwefelhaltige flüchtige Verbindungen sind als zentrale Aromakomponenten in zahlreichen Käsesorten wie z. B. Gruyère beschrieben. Diese geruchsaktiven Stoffe werden bereits in sehr niedrigen Konzentrationen wahrgenommen und werden oftmals als kartoffel- oder kohlarartig beschrieben. Sie entstehen im Käse durch den Abbau der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Bei der Bildung dieser Aromakomponenten spielen C-S Lyasen eine Rolle, eine Gruppe von Enzymen, welche in der Lage ist Kohlenstoff-Schwefel-Verbindungen zu spalten.

Um die C-S Lyaseaktivität zu ermitteln, wurde den Proteinextrakten Cystathionin, eine schwefelhaltige Aminosäure, die als Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Methionin aus Cystein gebildet wird, und Ellman-Reagenz zugesetzt. In der Gegenwart von C-S Lyasen wird Cystathionin zu Cystein oder Homocystein gespalten. Beide Substanzen haben eine zugängliche Thiolgruppe und reagieren mit dem Ellman-Reagenz. Dabei entsteht eine intensiv gelbe Farbe, welche photometrisch erfasst werden kann (Abbildung 3).

Die Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass nicht alle Pediokokken-Stämme Cystathionin-spaltende Eigenschaften aufwiesen. Um die Zusammensetzung der C-S Lyasen in den untersuchten Stämmen näher zu charakterisieren, wurden die Proteine unter nativen Bedingungen in Polyacrylamidgelen getrennt. Die Gele wurden anschließend in einem Puffer mit Cystein und Bleiacetat inkubiert (Abbildung 4). Sofern C-S Lyasen anwesend sind, setzen diese Schwefelwasserstoff aus Cystein frei, welches dann mit den Bleiionen zu schwarzem Bleisulfid reagiert.

Da Bleisulfid unlöslich ist, fällt es auf dem Gel aus und lässt dadurch die C-S Lyasen sichtbar werden. Es zeigte sich, dass nicht alle Stämme C-S Lyaseaktivität aufweisen und bestätigte die Resultate der Cystathionin-Untersuchungen. Zudem wurde beobachtet, dass nicht alle Stämme das gleiche Bandenmuster zeigen, was darauf hindeutet, dass die Zusammensetzung der C-S Lyasen in den Stämmen unterschiedlich ist. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Pediokokken stammspezifische Enzyme besitzen, die Schwefelwasserstoff und Thiole aus

**Abbildung 3:** Bestimmung der C-S Lyase Aktivität von Pediokokken mit der schwefelhaltigen Aminosäure Cystathionin in Gegenwart von Ellman-Reagenz. Das Reagenz reagiert mit freierwerdenden Thiol-Gruppen zu einem gelben Farbstoff, der photometrisch bei 412 nm gemessen wurde. Während *P. pentosaceus* FAM19132 und *P. acidilactici* FAM18098 C-S Lyase Aktivität aufweisen, zeigen die beiden anderen Stämme *P. pentosaceus* DSM 20336 und *P. acidilactici* DSM 20284 keine Aktivität



schwefelhaltigen Aminosäuren freisetzen, und somit bei der Bildung schwefelhaltiger Aromastoffe im Käse ein Rolle spielen können.

### ■ Abbau von Arginin

Die zugänglichen Genomdaten von *P. acidilactici* DSM 20284 und *P. pentosaceus* ATCC 25745 weisen darauf hin, dass beide Spezies die Gene für das Arginin Deiminase System besitzen.

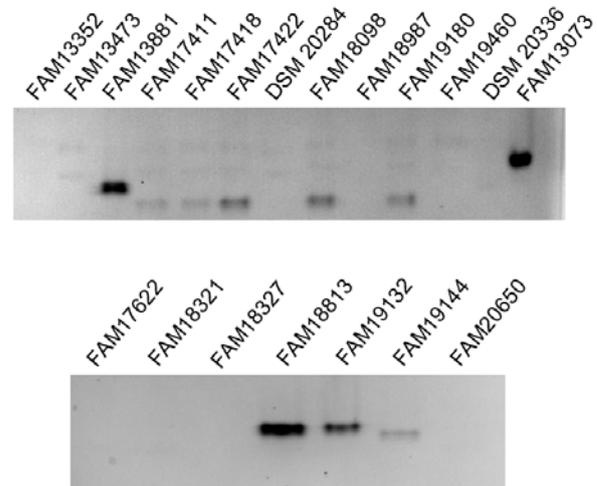
Dieser Stoffwechselweg umfasst die drei Enzyme Arginin Deiminase, Ornithin-Carbamoyltransferase und Carbamat-Kinase. Diese Enzyme sind verantwortlich für die Verstoffwechslung von Arginin zu Ornithin, wobei ebenfalls Ammoniak, Kohlendioxid und der zelluläre Energieträger ATP gebildet werden. Um die Aktivität dieses Stoffwechsels in Pediokokken nachzuweisen, wurden die Bakterien in einem Arginin-haltigen Medium angezogen.

Die Aminosäurezusammensetzung des Mediums wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (Abbildung 5). Es zeigte sich, dass die Bande für Arginin verschwand und dafür eine Bande für Ornithin sichtbar wurde. Dieses Experiment zeigte, dass das Arginin Deiminase System in beiden Pediokokken-Spezies aktiv ist. Die Freisetzung von Ammoniak bei diesem Stoffwechsel konnte mit einem enzymatischen Nachweistest ebenfalls bestätigt werden.

### ■ Ausblick für die Käsepraxis

Einer der wichtigsten biochemischen Prozesse während der Käsereifung ist der Abbau der Kaseine zu kurzkettigen Peptiden und Aminosäuren. Während der Abbau einzelner Amino-

**Abbildung 4: Nachweis von C-S Lyase Aktivität in verschiedenen Stämmen von *P. acidilactici* und *P. pentosaceus*. Die schwarzen Banden zeigen C-S Lyasen an. Die Banden entstehen dadurch, dass die Enzyme Schwefelwasserstoff freisetzen, welches dann in Gegenwart von Bleiionen als unlösliches, schwarzes Bleisulfid ausfällt**



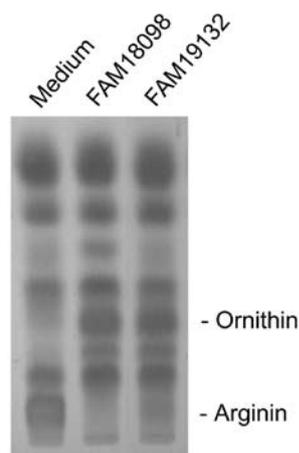
säuren durch Laktokokken und Laktobazillen in Käse zum Teil gut untersucht und dokumentiert ist, gibt es kaum wissenschaftliche Berichte zu Stoffwechselaktivitäten von Pediokokken. Die Untersuchungen an der Forschungsanstalt ALP zeigten deutlich, dass Pediokokken ebenfalls in der Lage, sind Aminosäuren zu verstoffwechseln. Näher untersucht wurden Serin und schwefelhaltige Aminosäuren, da sie Vorläufer für Aromastoffe wie Diacetyl und schwefelhaltige flüchtige Verbindungen darstellen.

Beim Abbau von Serin zu Diacetyl als auch von Arginin zu Ornithin entsteht zudem Ammoniak und Kohlendioxid, das einen Einfluss auf den pH und die Gasentwicklung hat. Die Bildung von Ammoniak aus dem Aminosäureabbau bringt für die Pediokokken den Vorteil, in einer sauren Umgebung, wie sie im Käse vorherrscht, den pH anzuheben. Da die Proteolyse bei höherem pH im Käse bekanntlich schneller abläuft, ist es denkbar, dass die Präsenz von Pediokokken

im Käse zu einer schnelleren Käsereifung führt. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist, dass aus dem Aminosäureabbau auch Kohlendioxid freigesetzt wird, sodass damit zu rechnen ist, dass Pediokokken auch die Lochbildung beeinflussen können.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Berichte publiziert, die aufzeigen, dass *P. pentosaceus* und *P. acidilactici* Bestandteile der Nicht-Starter Flora von zahlreichen Käsesorten sind. Die Untersuchungen von ALP-Haras tragen dazu bei, die metabolischen Aktivitäten und Interaktionen von Pediokokken mit anderen Nicht-Starter Milchsäurebakterien im Käse besser zu verstehen. Diese Kenntnisse dienen nicht nur dazu, die biochemischen Vorgänge während der Käsereifung zu verstehen, sondern sind auch wertvoll in Hinblick darauf, Pediokokken als Zusatzkulturen mit aromabilddenden und reifungsbeschleunigenden Eigenschaften einzusetzen. □

**Abb. 5: Chromatogramm von Aminosäuren getrennt auf Cellulose-Dünnschichtplatten. Es wurden gleiche Mengen von nicht-inokuliertem Medium und Medium, in welchem *P. acidilactici* FAM18098 bzw. *P. pentosaceus* FAM19132 gewachsen war, aufgetrennt. Die Aminosäuren wurden mit Ninhydrin sichtbar gemacht**



Extrem robust, dichtungsfrei und diffusionsdicht!  
**Druckmessumformer DMU 02 Vario**



- ➕ Druck- und Füllstandmessgeräte für die Prozesstechnik
- ➕ Ideal für öl- und fettfreie Anwendungen
- ➕ Messbereiche von -1/0 bar bis 0/4.000 bar
- ➕ In unterschiedlichsten Varianten

[www.afriso.de](http://www.afriso.de)

**AFRISO**  
EURO-INDEX

TechnoPharm • Halle 5 • Stand 447 • BrauBeviale • Halle 5 • Stand 105