



Phagen in der Käseerei



**Noam Shani, Helena Stoffers, Ernst Jakob, Carlotta Sartori,
John Haldemann, Thomas Aeschlimann, Nicolas Fehér**

DG, Rütli den 26. November 2024



Was sind Bakteriophagen?

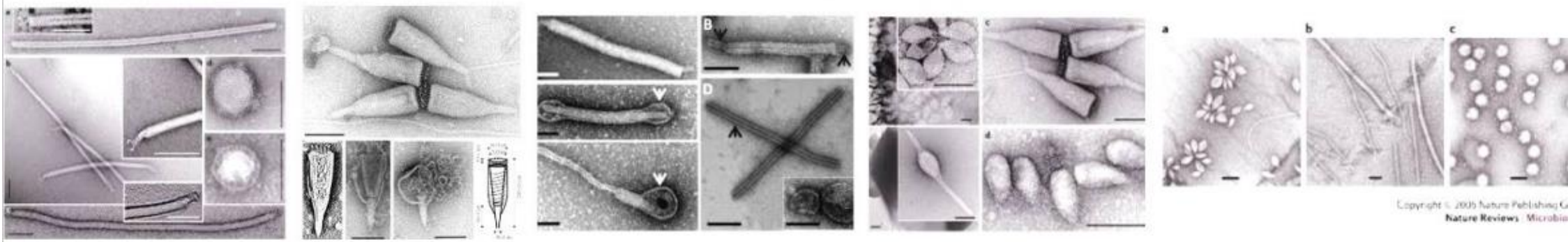
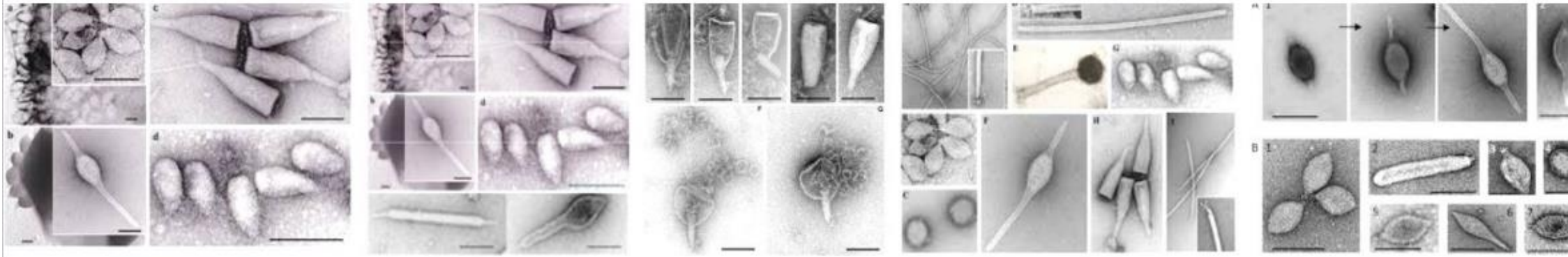
THE RELATIVE SIZE OF PARTICLES

From the COVID-19 pandemic to the U.S. West Coast wildfires, some of the biggest threats now are also the most microscopic.

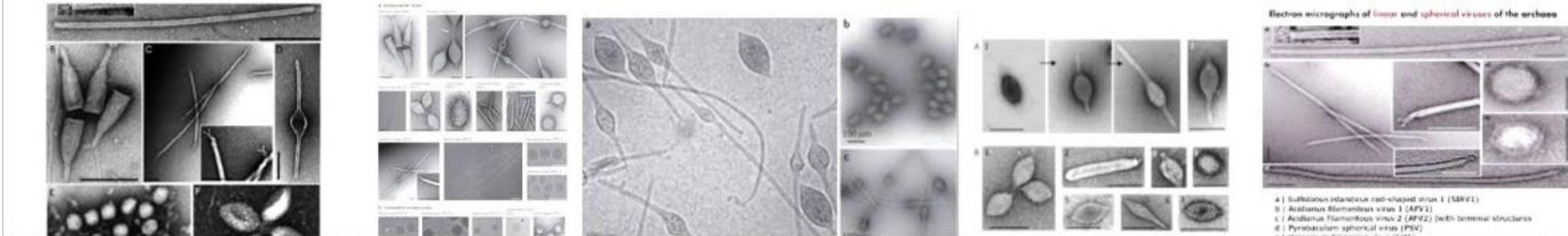
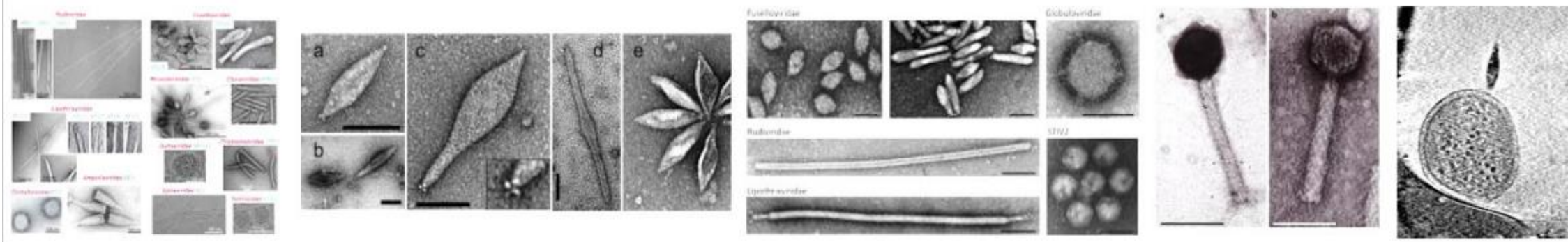
A particle needs to be 10 microns (μm) or less before it can be inhaled into your respiratory tract. But just how small are these specks?

Here's a look at the relative sizes of some familiar particles »





Copyright © 2005 Nature Publishing G
Nature Reviews - Microbio



Electron micrographs of linear and spherical viruses of the archaea

a | Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 1 (SIRV1)
b | Acidilobus filamentosus virus 1 (AFV1)
c | Acidilobus filamentosus virus 2 (AFV2) [with terminal structures]
d | Pyrobaculum sphaerical virus (PSV)

PD Dr.
Wolfgang
Beyer
Universität
Hohenheim
homepage:
uniho-beyer.de



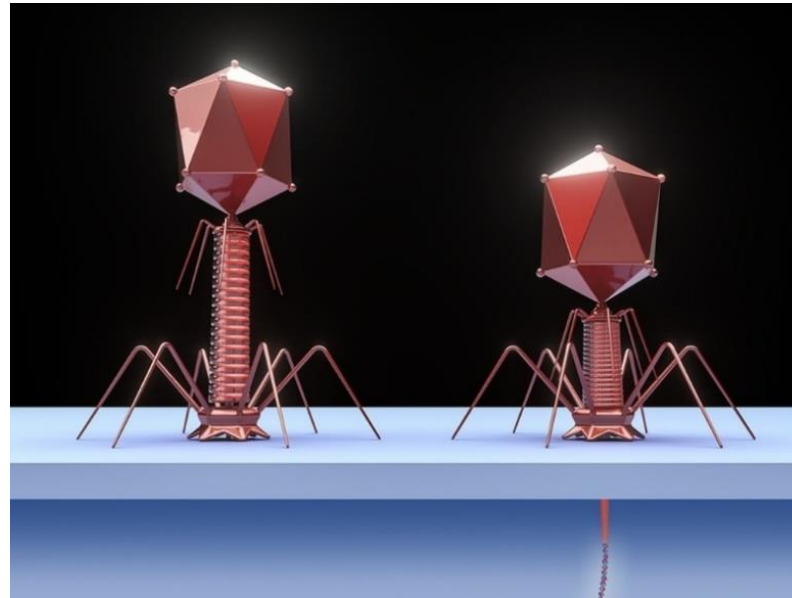
Was sind Bakteriophagen?

- Mikroskopische Organismen, die **überall** dort vorkommen, wo es Bakterien gibt.
- Brauchen einen **passenden bakteriellen Wirt**, um sich zu vermehren.
- Sehr wichtige Rolle in **Ökosystemen** (fördern Biodiversität, regulieren Bakterien-Populationen, etc.)
- Ein Kessi voller Milch mit Kulturen ist das **Phagen-Paradies**
- Studie in Käsereien in Irland: **>60%** der gesammelten Molken enthalten Phagen.



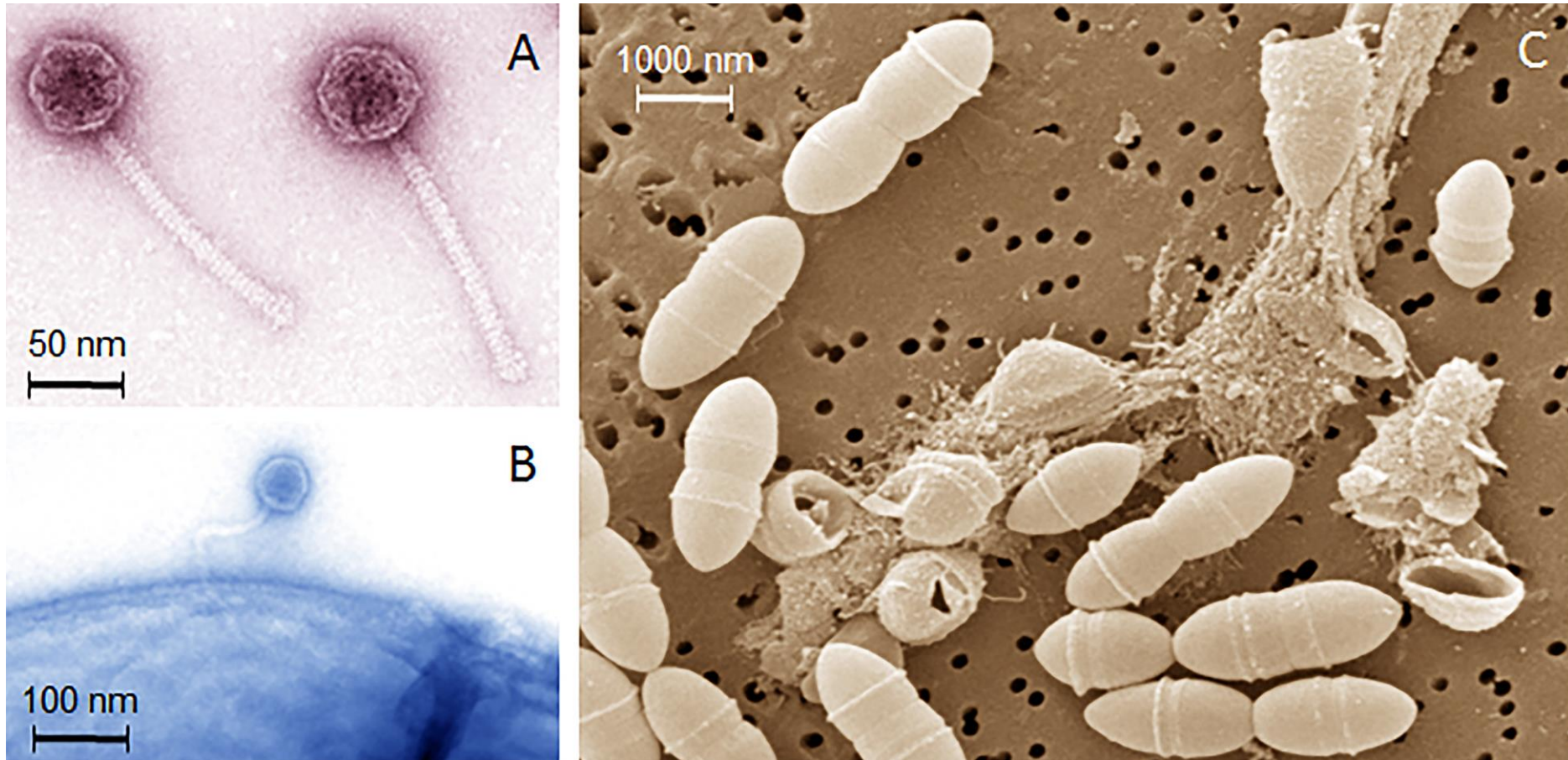
Was sind Bakteriophagen?

- **Einfache Organismen:** DNA in einer Protein-Hülle
- Verursachen **langsame oder gescheiterte Säuerungen**
- Können die **Produkteigenschaften** beeinträchtigen
- Gleiche Phagen können **jahrelang** in einer Käserei bleiben





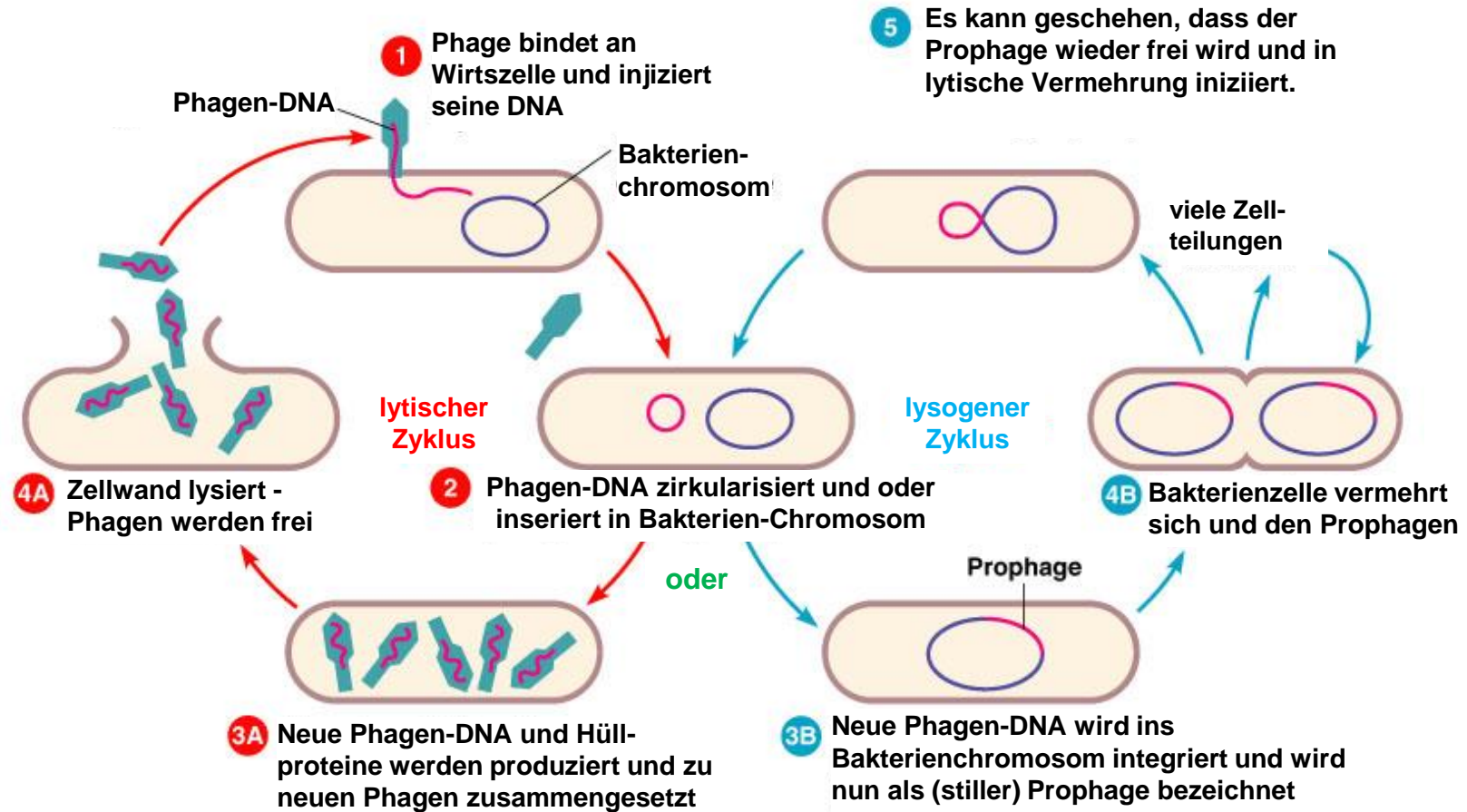
Phagen befallen und zerstören Milchsäurebakterien



Elektronenmikroskopische Aufnahmen (A) von Bakteriophagen der Milchsäurebakterien, (B) eines einzelnen Phagen nach der Anheftung (Adsorption) an die Zelloberfläche eines Milchsäurebakteriums und (C) von der beginnenden Zerstörung der Bakterienzellen durch die Phagen. Abbildung: Dr. Horst Neve, Max Rubner-Institut



Direkte und indirekte Vermehrung von Phagen (lytischer & lysogener Zyklus)

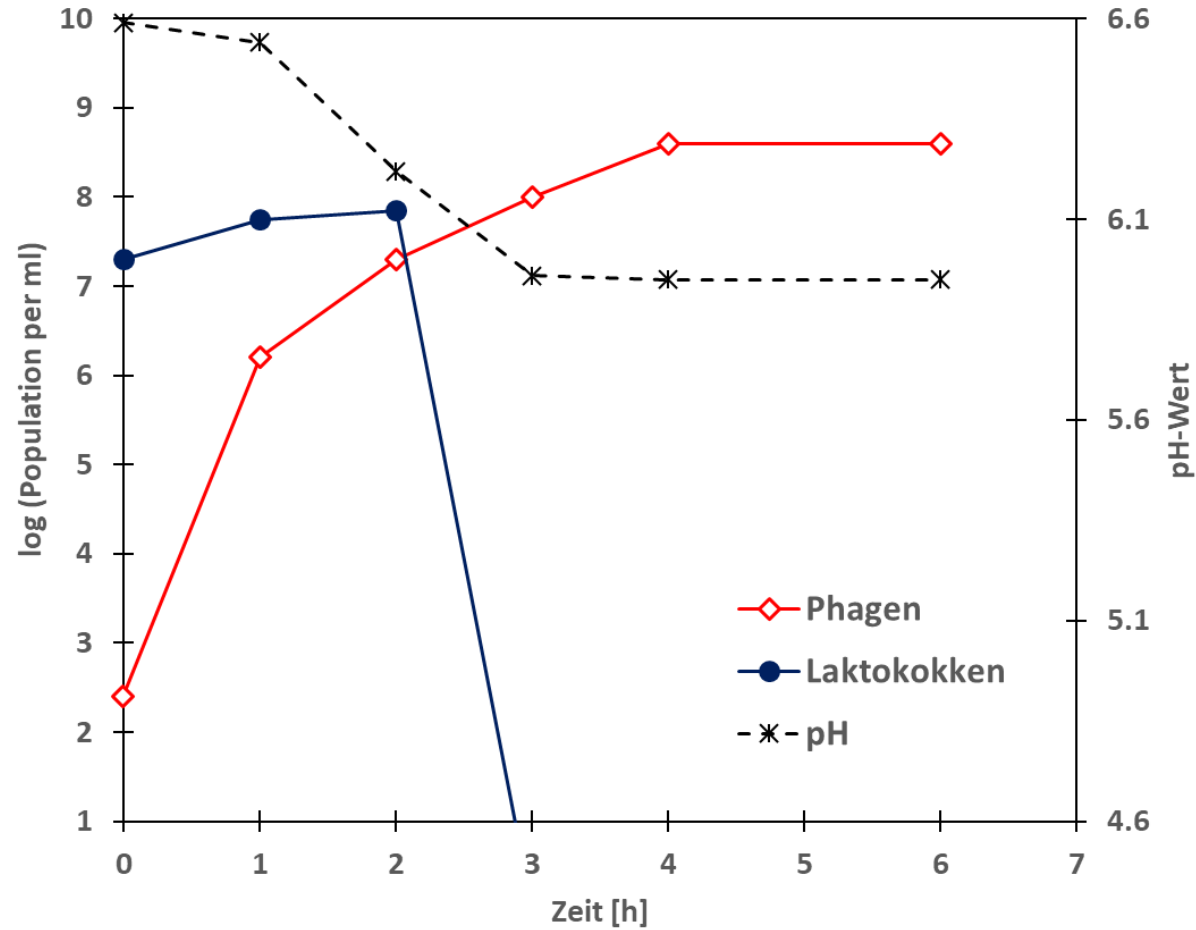


Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

4A: 1 Zelle kann mehrere hundert Phagen freisetzen. Aus einem Phagen können so 100 Milliarden Phagen entstehen, in weniger als 1h!



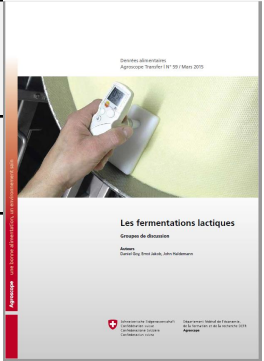
Vermehrung eines Lactococcus-Stamms und seines Phagen in Milchpermeat



nach Atamer et al.,
2009. Deutsche
Milchwirtschaft, 60
(3) 84-88)

Negative Auswirkungen von Phagen auf die Qualität von Gruyère

Thermophile Milchsäurebakterien		
	Fehler	Kontrolle
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Verspätete Anfangssäuerung • Allgemein langsamere Säuerung • Stören auch die Lb. 	Konsistenz der Käse pH 2h, 4h, 24h Milchsäure L+ und D- °SH und Mikroskopie Kulturen
<i>Lactobacillus delbruecki ssp. lactis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Schlechtere Säuredeckung = abweichendes Aroma, schlechte Haltbarkeit • Weniger Proteolyse = fader Geschmack, sandiger Teig • Mangelnder Wettbewerb gegenüber anderen Lb. = Loch durch heterofermentativen LB. • Aromafehler 	Konsistenz der Käse pH 2h, 4h, 8h, 24h LAP Wert Milchsäure L+ et D- °SH und Mikroskopie Kulturen Galaktose, Bräunung
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger Proteolyse → weniger Aroma 	LAP Wert Milchsäure L+ et D- °SH und Mikroskopie Kulturen





Resistenz von *Lb. delbrückii* ssp. *lactis* gegenüber Phagen

	Phagen, isolierte aus Molke verschiedener Gruyère-Käsereien							
	4218	4402	4397	4122	4217	4223	4345	4384
Stämme AOP-G1	A	B	C	D	E	F	G	H
FAM 19109	+++	+	+++	+	+	-	+	+++
FAM 19112	+	+	+	+	+	+	-	-
FAM 19108	+	-	-	-	-	-	-	-
FAM 19110	-	+	-	-	-	-	-	-
FAM 19113	-	-	-	-	-	-	-	-

Reduziertes Wachstum : ++ > 40%; + = 10-39%; - keine Hemmung



Vorteil der Rohmischkulturen (RMK)



Die Stämme der RMK:

- Wurden aus Fettsirtenkulturen isoliert, einem Ökosystem, das weitgehend an Phagen angepasst ist.
- Sind von Natur aus robust gegenüber Phagen und verfügen über Schutzmechanismen.
- Enthalten eine Vielzahl von Stämmen mit unterschiedlichen Spektren.

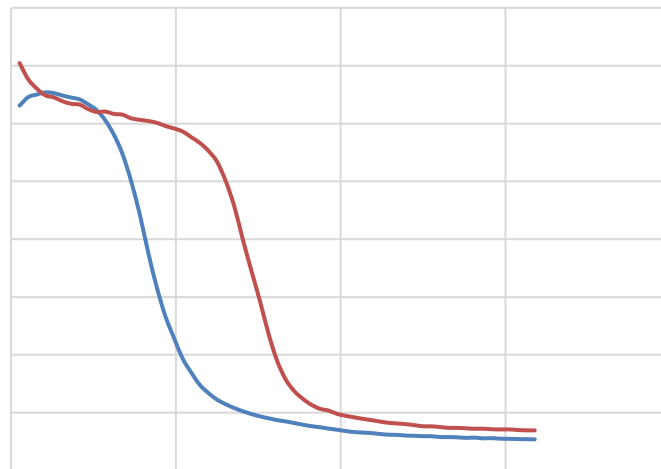
Die RMK ermöglichen im Allgemeinen eine vollständige Säuerung der Käse, auch bei sehr starken Störungen durch Phagen.



Praxisbeispiel Phagenproblem mit RMK pH während der Säuerung

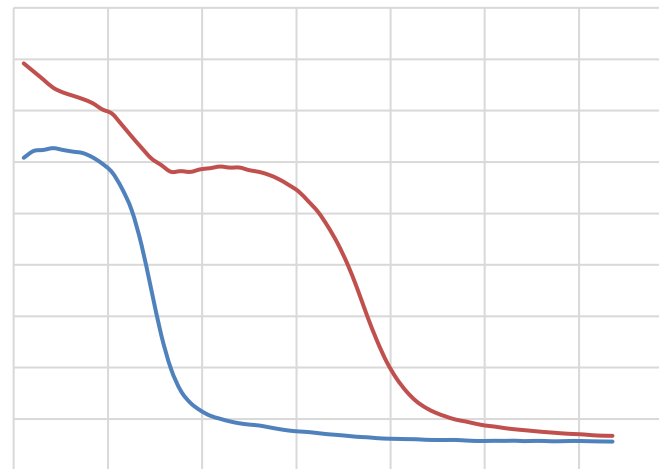
➤ Fettsirte aus dem Kessi mit Kulturen inkubiert

280, 1%, 37°C



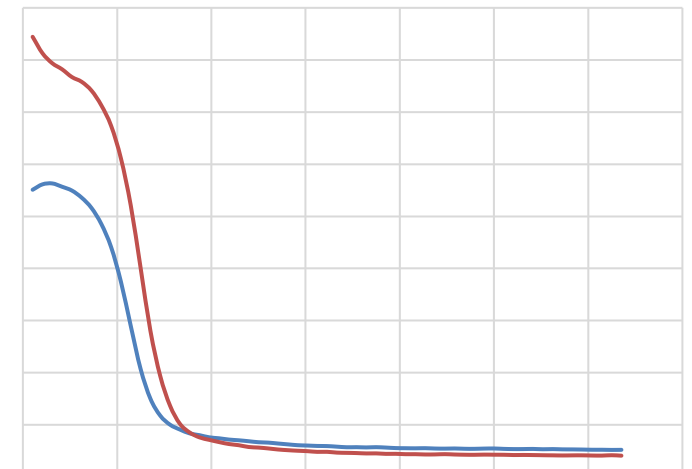
— 280 1% — 280 1% und Fettsirte

291, 1%, 37°C



— 291 1% — 291 1% und Fettsirte

BAMOS 1% 37°C



— BAMOS 1% — BAMOS 1% und Fettsirte

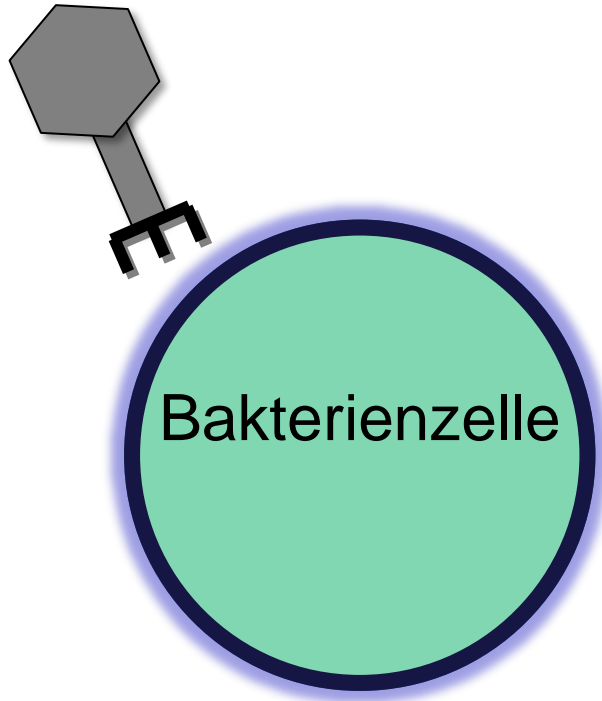


Negative Auswirkungen von Phagen auf die Qualität von Vacherins fribourgeois

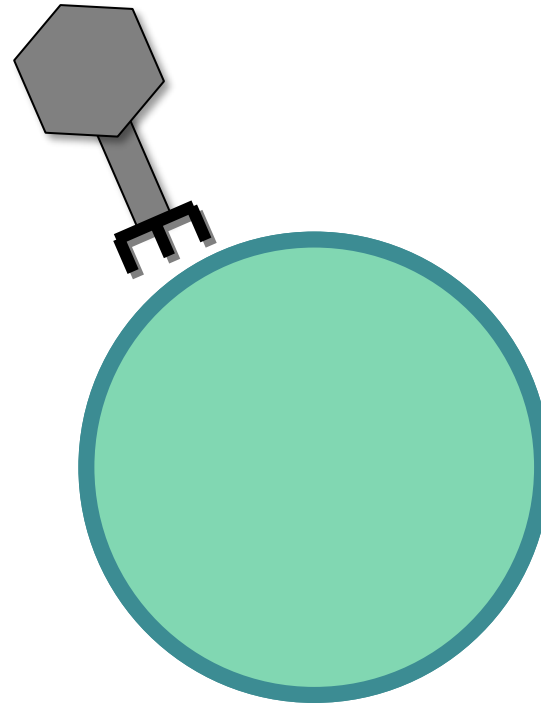
Mesophile Milchsäurebakterien		
	Fehler	Kontrolle & Zielwerte
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Verspätete Anfangssäuerung• Allgemein langsamere Säuerung• Säuerungs Unterbruch	pH 2h, 4h, 6h, 24h °SH Kulturen Galaktose < 5 mmol/kg
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<ul style="list-style-type: none">• abweichendes Aroma: oft fehlendes Aroma, fad, bitter etc.• Weniger Proteolyse	pH 24h > 5,00pH Citrat < 2mmol/kg OPA 4 Monate > 150 mmol/kg °SH Kulturen
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<ul style="list-style-type: none">• Weniger Proteolyse → weniger Proteolyse	



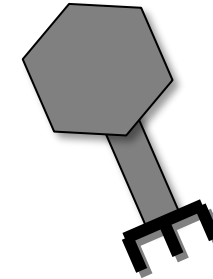
Abwehrmechanismen von Bakterien gegen Phagen



Änderung der Zellhülle (Der Virus kann sich nicht mehr binden).



Die injizierte Virussubstanz wird abgebaut oder funktionsunfähig gemacht.

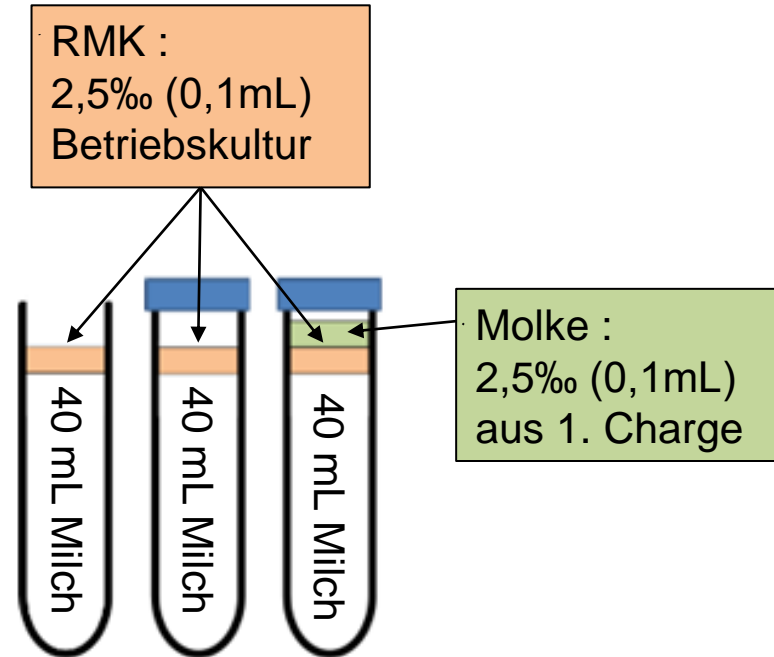


Die infizierte Zelle zerstört sich selbst, bevor sich der Phage reproduzieren kann.



Empfindlichkeit der Kultur gegenüber Luft und Molke aus der Käserei

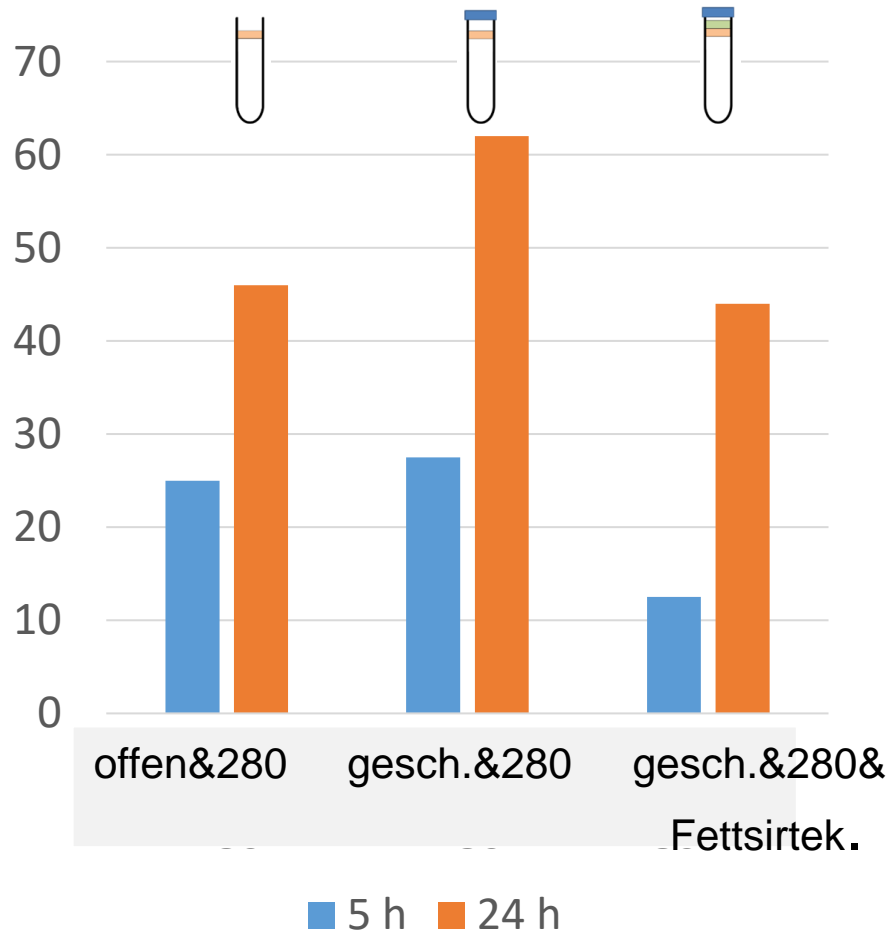
Versuchsgestaltung



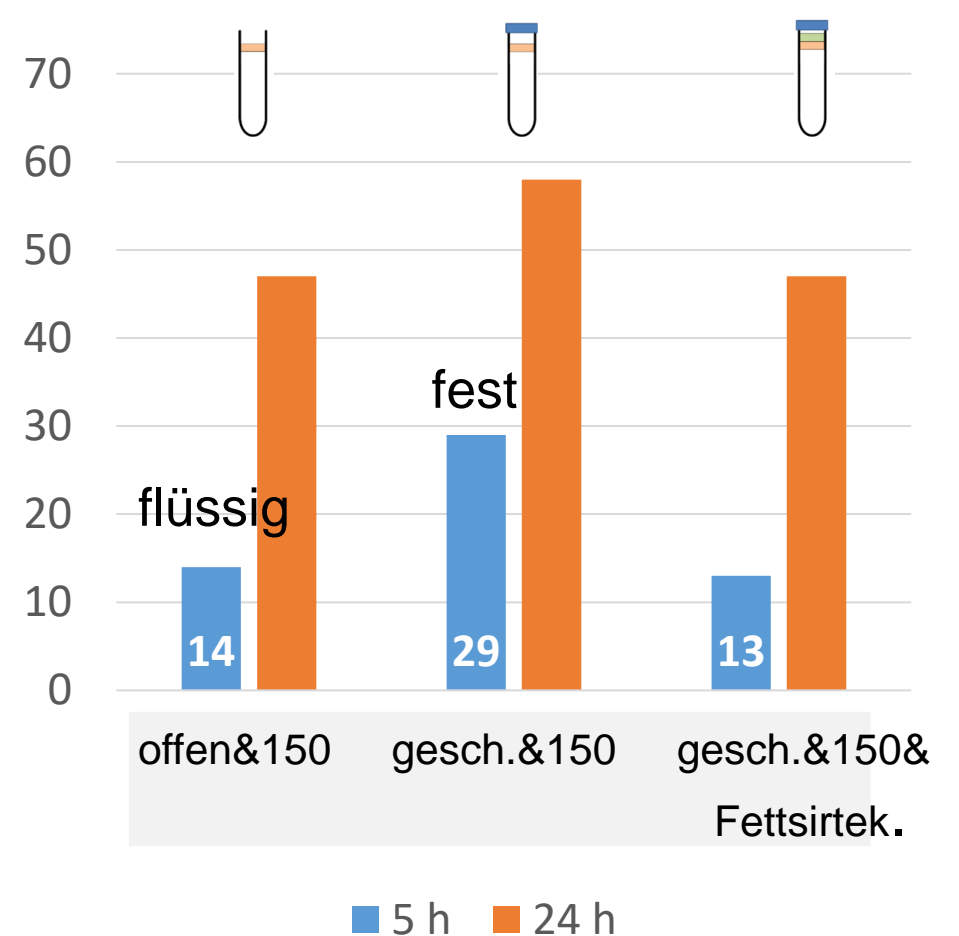


°SH der Proben

Rohmilch & RMK 280 bebrütet bei 38°C



Rohmilch & RMK 150 bebrütet bei 38°C





Schnellmethode zur Phagen-Detektion in Käsereien



- Streifen nur für *Streptococcus thermophilus* und *Lactococcus lactis/cremoris*
- qPCR-Methode = genetische Erkennung von lebenden oder toten Organismen



Nachweisgrenze



TARGET	RESULT	Mesophage SQ (PARTICLES PER 20- μ L REACTION)	UNDILUTED DAIRY SAMPLE (PARTICLES PER mL)
	Detected - High	16,001 +	100,000,001+
	Detected - High/Medium	1,601-16,000	10,000,001 - 100,000,000
	Detected - Medium	161-1,600	1,000,001 - 10,000,000
	Detected - Low/Medium	17-160	100,001 - 1,000,000
	Detected - Low	1-16	10,001 - 100,000
	Not Detected	0	< 10,001

Beispiel: Ergebnisse von Lactococcus Phagen in einer Käserei

Kessimilch mit Kulturen, Molke aus dem Kessi während dem Vorkäsen, Molke unter der Presse beim Abfüllen, Molke im Tank



CIP Lauge 1, CIP Lauge 2

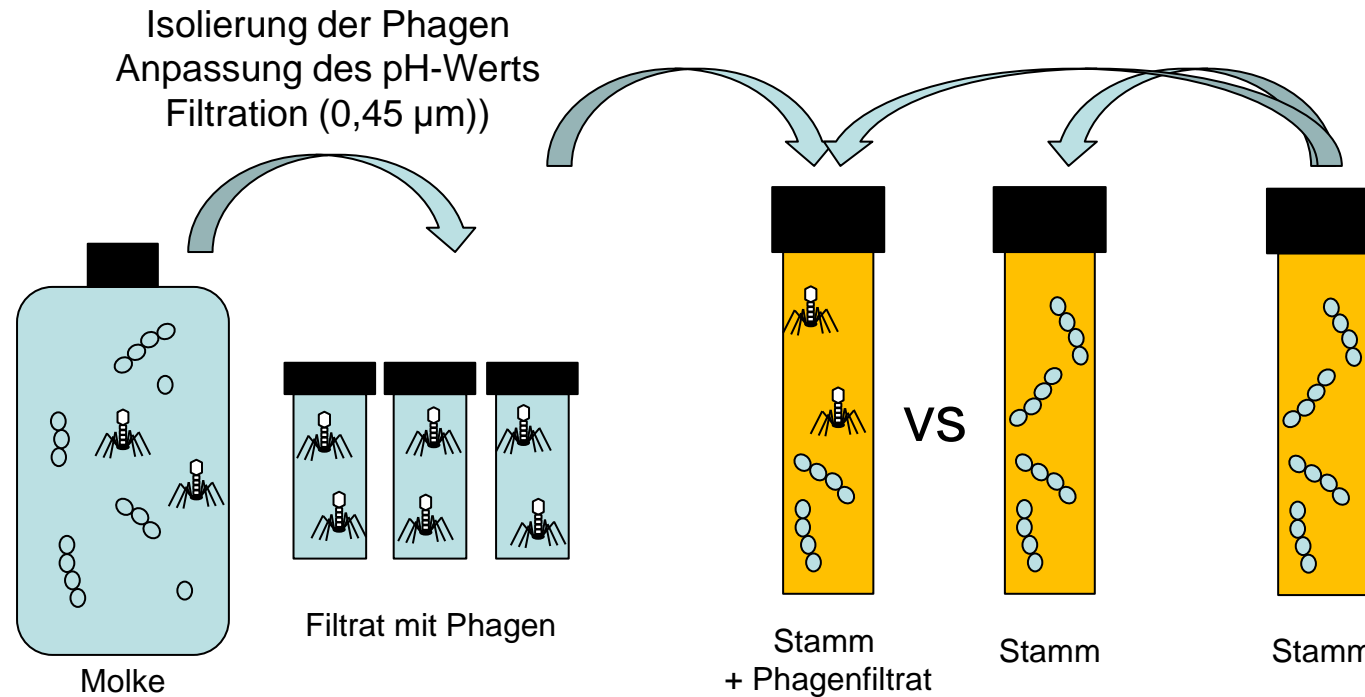
CIP Säure 1, CIP Säure 2, Produzentenmilchen (Morgen). Mischmilch im Tank, Kessimilch ohne Kulturen, Betriebskulturen





Analyse der Empfindlichkeit einzelner Stämme

- **Definierte Kulturen → Verfügbare Bakterienwirtstämme**
- **Empfindlichkeit einer Kultur gegenüber Phagen?**
- **Die verdächtige Molke wird mit Stämmen der Kultur in Kontakt gebracht**





Analyse der Empfindlichkeit einzelner Stämme

Bakterienwirtstamm

Bakterienwirtstamm
+ Phagenfiltrat

Stamm XY
+ Phagenfiltrat



Bakterienwirtstamm

Bakterienwirtstamm
+ Phagenfiltrat

Stamm XY
+ Phagenfiltrat



Der Stamm ist
nicht gewachsen



Analyse der Empfindlichkeit einzelner Stämme

«Umgekehrte pH-Kurve»

Stamm x mit Phag. Stamm y mit Phag.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
B	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
C	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
D	-	-	-	∩	∩	∩	-	-	∩	∩	-	-
E	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩
F	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩	∩

Stamm mit vollständigem Ausfall

Kontrolle

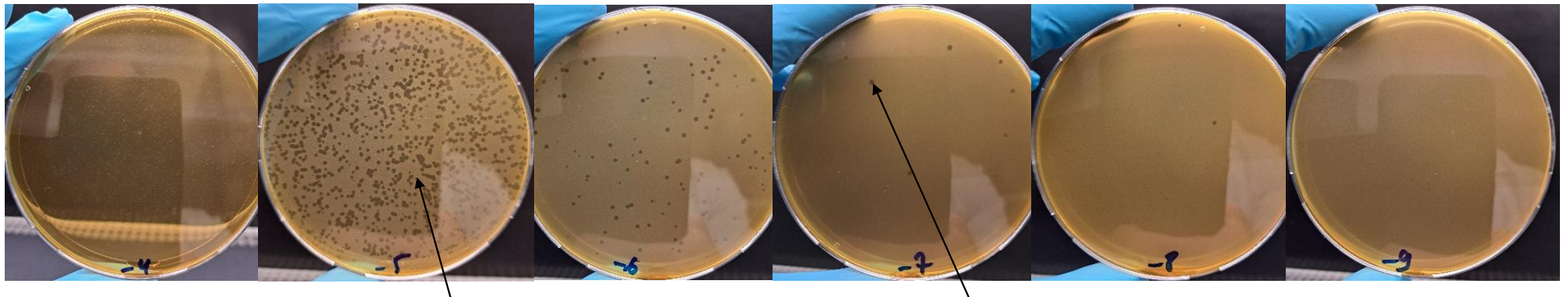
Phagen resistenter Stamm

Verspätete Säuerung

Phagen zählen und isolieren

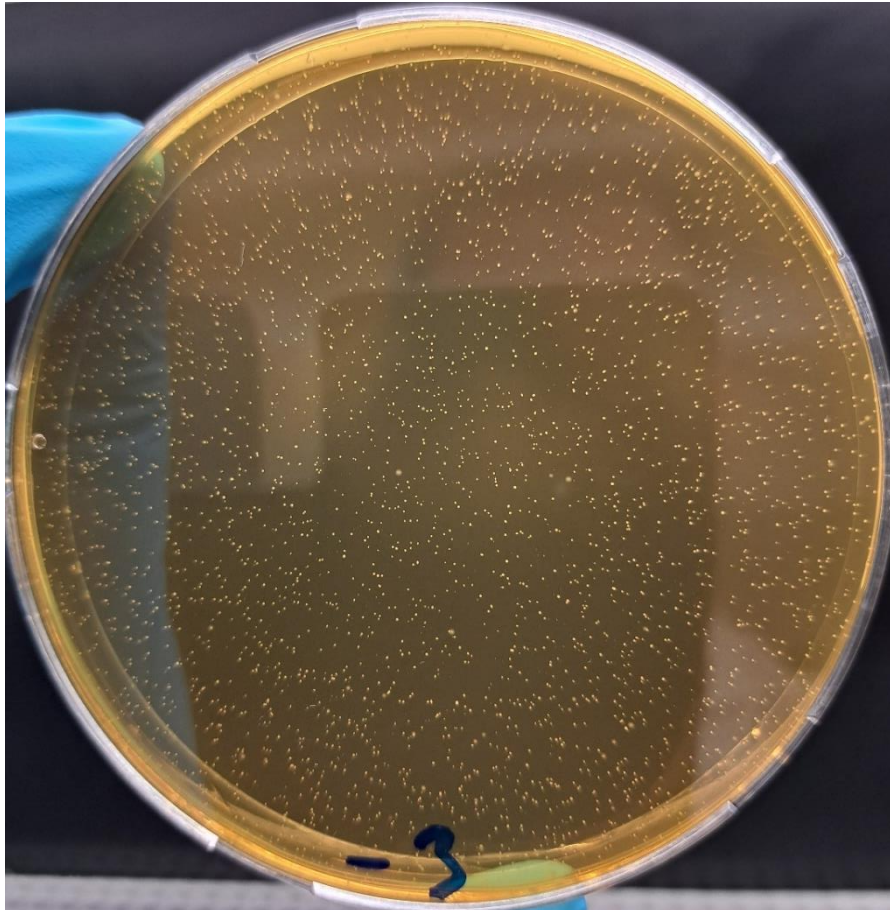
Die Phagen
haben alle
Bakterien lysiert

Keine Kolonie
wurde lysiert



Jedes Loch ist ein Phage, der sich vermehrt hat und die Bakterien im mikrobiellen Rasen lysiert hat.

Bacteriophage insensitive mutants (BIMs)



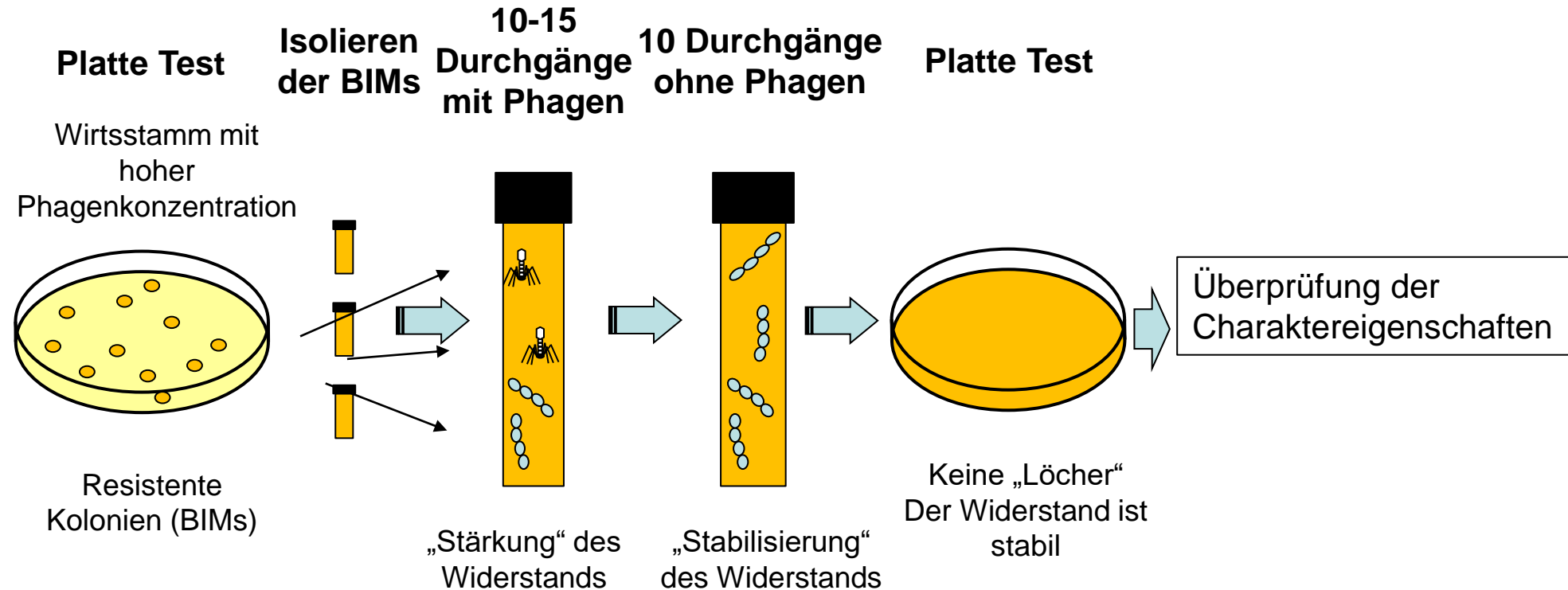
Mutation → Natürlich resistente Subpopulationen



Erstellen von BIM's «Bacteriophage insensitive mutants»

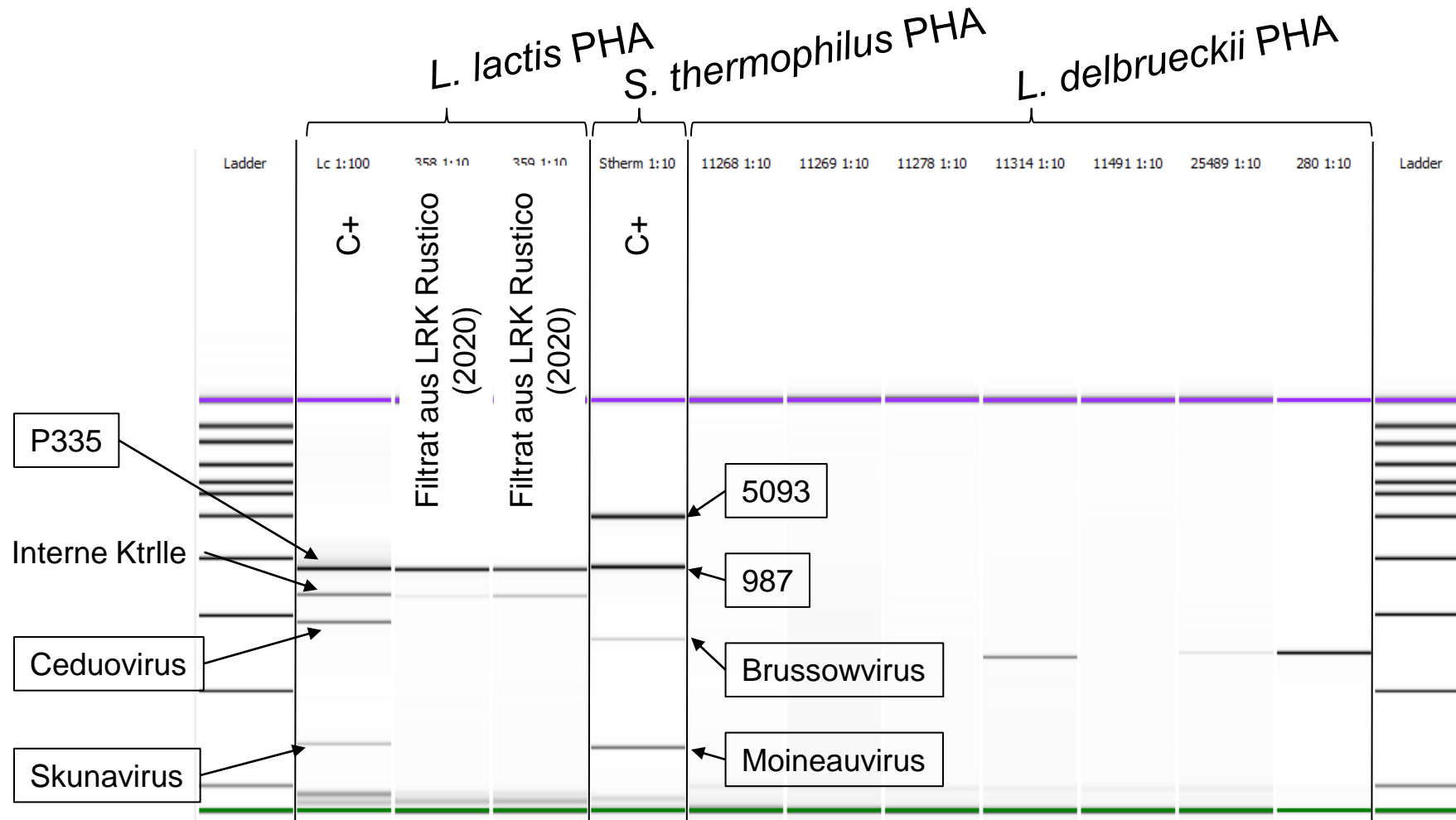
Voraussetzung

- Isolierter Phage
- Bakterienwirtstamm





Bestimmung von Phagentypen mit Molekularbiologie





Infektionsquellen für Milchsäurebakterien

Molke = Aerosol

- Rückstände in der Käserei, Lagerung, Molkenrahm
- Labgärprobe
- Anlagen und Material
- Schlamm alkalische CIP-Lösung

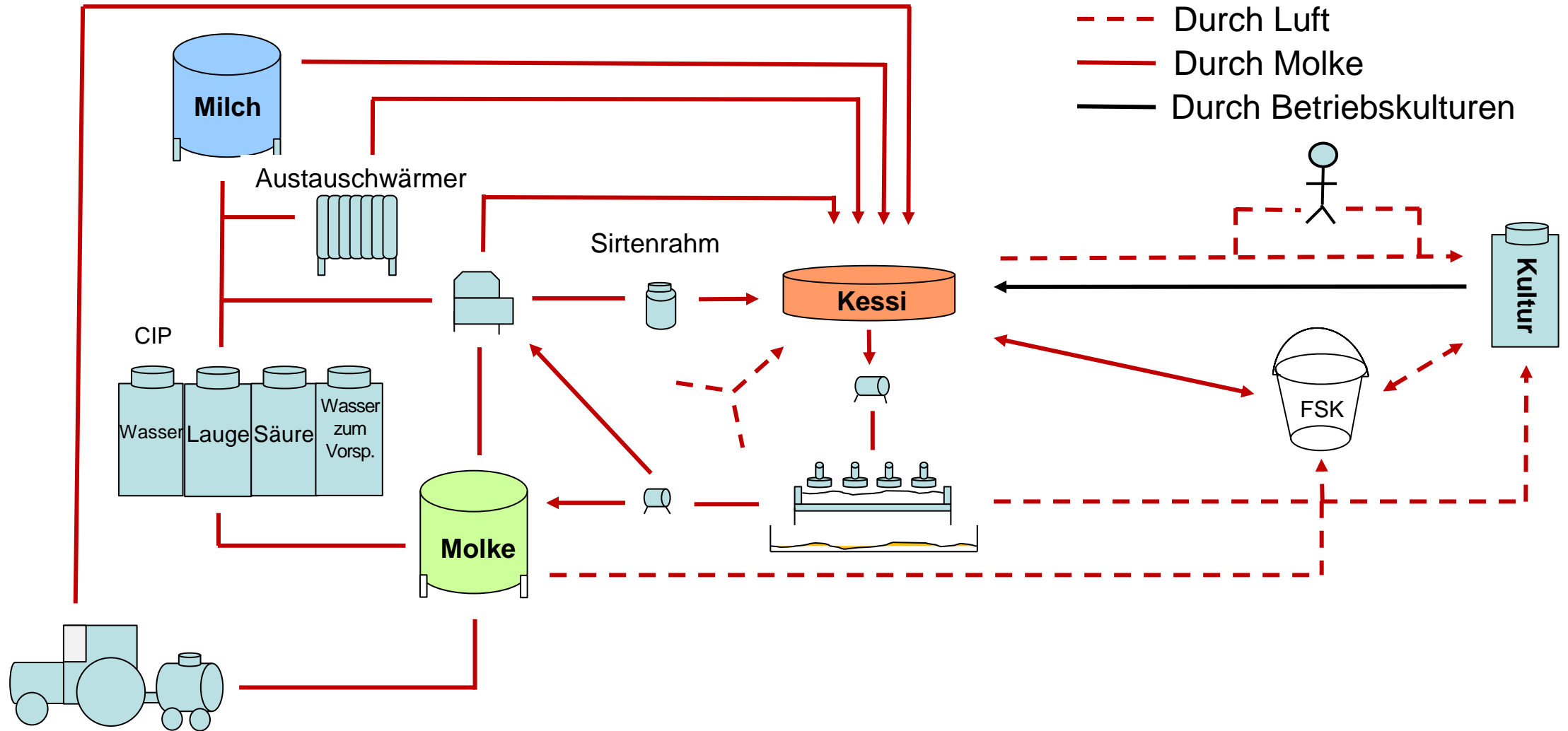
Kulturen

- Fettsirtenkulturen
- Prophagen in gekauften Kulturen

Milch = vor allem bei der Rücknahme von Molke durch den Milchbauern



Vermehrung in geschlossenen Kreisläufen oder Zyklen





Massnahmen gegen phagenbedingte Säuerungsstörungen I

Quelle der Phagen	Strategie	Massnahmen
Käserei	Planung, Gestaltung, Installation	Trennung der Produktionsbereiche, Geschlossene Anlagen (z. B. geschlossener Tank), Luftfiltration, Produktionsbereich mit Überdruck, Massnahmen zur Vermeidung von Aerosolen
	Ablauf des Prozesses	Optimierung der Prozesse, Staffelung in der Zeit, Rotation der Kulturen
	Reinigung/Desinfektion	Reinigung/Erneuerung der alkalischen Lösung im CIP, Wechselnde Reinigung mit Säure, Desinfektion (Peressigsäure), UV, Massnahmen zur Vermeidung von Aerosolen
Rohmilch	Mikrobiologie	Kühlung verhindert die Vermehrung der Phagen
	Milchbehandlung	Wärmbehandlung



Massnahmen gegen phagenbedingte Säuerungsstörungen II

Quelle der Phagen	Strategie	Massnahmen
Kulturen	Phagenfreie Kulturen	Verwendung resistenter Kulturen Arbeiten unter sterilen Bedingungen Separater Raum (Überdruck), ausserhalb des Produktionsbereichs Kleidung wechseln, Hände desinfizieren
	Unterbrechung der Zyklen	Kulturenrotation
	Kulturmedium	Steriles Kulturmedium Spezielle phagenhemmende/anti-phagen Kulturmedien (z. B. Additive, die Calcium binden, wie Citrate, Polyphosphate usw.)
	Profil verschiedener Phagen	Auswahl der Kulturen
Rückführung von Milchbestandteilen	Molke	Massnahmen zur Vermeidung der Bildung von Aerosolen (beim Befüllen, Reinigen usw.)
	Rahm aus Molke	Hochpasteurisation Unterbrechung des Kreislaufs einmal pro Woche
Andere	Rücknahme der Molke durch Milchproduzenten	Keine Transportbehälter in der Käseproduktion lassen
	Wartung	Dichtungen regelmässig kontrollieren Überprüfen, ob der Tank/Behälter Risse aufweist



Phagen fördernde Umstände in Käsereien

- Keine Kulturenrotation
- Verwendung von Betriebskulturen, besonders wenn definierte Kulturen verwendet werden.
- Keine räumliche Trennung (Vorbereitung Kultur / Produktion).
- Mehrchargenfabrikation.
- Verarbeitung von Sirtenrahm.
- Rückführung der Molke in den Produktionsraum (auch Entleerung des CIP-Molketanks).
- Unzureichende CIP (einphasig usw.) oder verschmutzte Lösung.
- Mangelnde Hygiene



Präventive Massnahmen in Käsereien

Allgemein

- Zeitliche und räumliche Trennung heikler Prozesse.
- Kontrollierter Belüftungsstrom, Überdruck: Kulturenraum und Produktionsraum (Kessi).

Rezeptur

- Betriebskulturen kurz vor dem Schütten “zubereiten”.
- Vorreifezeit verkürzen (mit der einsetzenden Labgerinnung der Milch können sich Phagen nicht mehr einfach verbreiten).
- Kulturenrotation
- Bei Verwendung definierter Kulturen (wenige Stämme!) sollte im Fall einer Phagenstörung die betroffene Kultur für einen längeren Zeitraum gemieden werden.
- Sirtenrahm hochpasteurisieren.



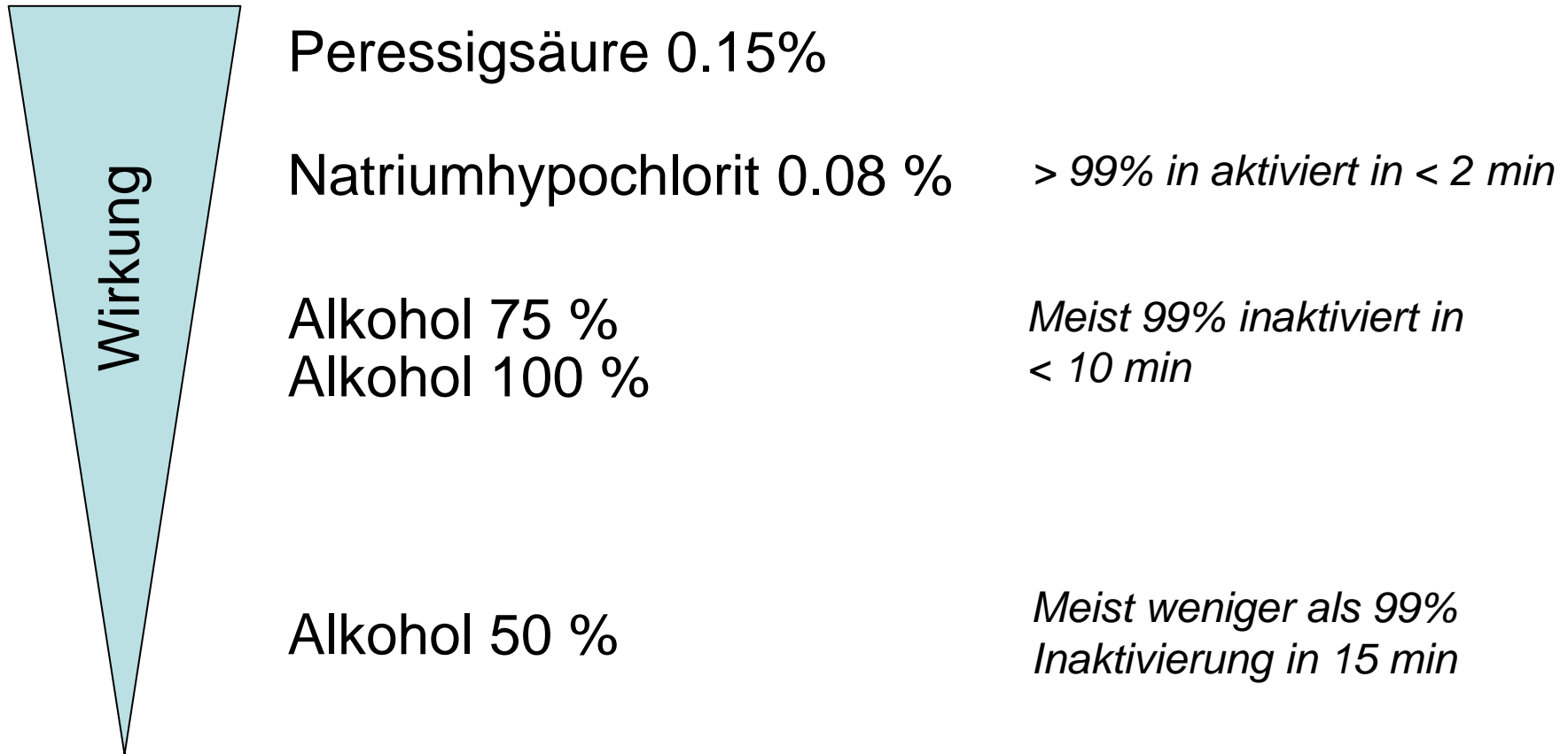
Herstellung von Betriebskulturen

- **Gut belüfteter Raum**
- **Ausserhalb vom Fabrikationslokal = nicht im Labor**
- **Saubere Kleidung und Haare, Vor dem gang durch die Käserei**
 1. Hände waschen
 2. Desinfektionsmittel mit Alkohol: Hände, Verpackung Kultur Milchkatron, Alkohol 80 % oder Isopropanol 70 %, Einwirkzeit min. 1 Minute.
 3. Bunsenbrenner starten
 4. Einimpfen
 5. Schliessen
 6. Gut stürzen-mischen





Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln zur Inaktivierung von Phagen

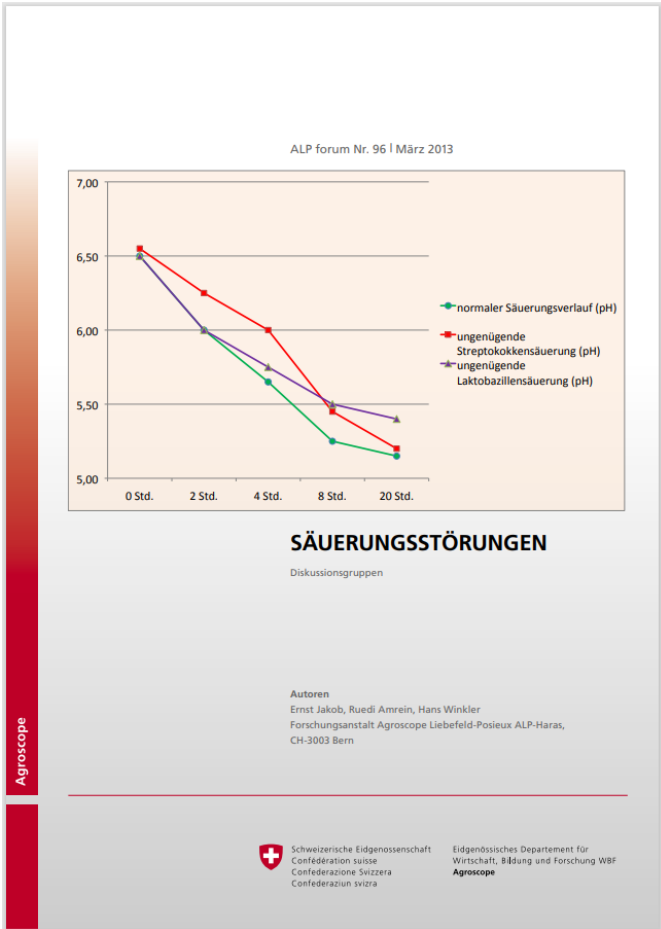


Quelle: Guglielmotti D.M. et al. Frontiers in Microbiology 2, Article282, 1-11, 2012



Zusammenfassung

- Bakteriophagen sind in der Regel in Kulturen präsent, wenn nicht als **freie Phagen**, dann als **Prophagen**.
- Virulente Phagen vermehren sich **extrem schnell** und erreichen extrem hohe Zahlen, Säuerungsstörung, Infektionsdruck!
- Ein **einzelner Phagen-Stamm** kann die Säuerung einer **RMK** in der Regel **nicht signifikant stören**. Befallene Stämme werden in der Regel durch resistente kompensiert.
- Desinfektion mit **Alkohol** zur sicheren Inaktivierung von Phagen braucht **lange Einwirkungszeiten** (mehrere Minuten!).
- **Definierte** Kulturen sind **besonders phagenanfällig**. Kulturenrotation und die direkte Beimpfung der Kessmilch entschärfen das Problem.
- **Phagenrestistenz** der Kulturen bleibt ein wichtiges Forschungsthema bei allen Kulturenherstellern.



Denrées alimentaires
Agroscope Transfer | N° 59 / Mars 2015

Les fermentations lactiques
Groupes de discussion

Auteurs
Daniel Goy, Ernst Jakob, John Haldemann

Agroscope une bonne alimentation, un environnement sain

Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Département fédéral de l'économie,
de la formation et de la recherche DFLR
Agroscope

PRODUKTION & QUALITÄT PRODUCTION & QUALITY

Cultures liquides, sont-elles encore d'actualité?

Dans l'industrie laitière, se passer des cultures d'ensemencement direct est désormais inconcevable. Cependant, de nombreux fabricants de fromage utilisent toujours des cultures liquides et en voici la raison.

Acidification rapide
Malgré qu'il existe des cultures à ensemencement direct, de nombreuses fromageries artisanales ainsi que des fromageries industrielles utilisent aujourd'hui encore des cultures d'acidification liquides. Pour certaines sortes de fromages avec appellation d'origine protégée, l'utilisation de cultures d'exploitation est fixée dans le cahier des charges AOP. Une autre raison est leur bonne activité acidifiante. L'acidification se déclenche de manière instantanée alors que les cultures d'ensemencement direct lyophilisées ou congelées nécessitent un temps de réactivation.

Bonne résistance aux phages
En règle générale, les fabricants de cultures à ensemencement direct proposent plusieurs variantes pour chaque type de culture, qui se différencient par rapport à leur sensibilité à l'encontre des différentes souches de bactériophages. Etant donné qu'en général les cultures à ensemencement direct contiennent seulement une à trois souches par espèce de bactéries, elles sont particulièrement sensibles aux phages, raison pour laquelle une rotation des cultures est indispensable. Cependant, une rotation est également judicieuse lors de l'utilisation.

Ceci permet de réduire la durée de fabrication, ce qui représente un avantage considérable pour les fromageries qui produisent plusieurs charges par jour. Lors de la fabrication de fromages au lait cru, une acidification plus rapide contribue considérablement à augmenter la sécurité alimentaire et à diminuer le nombre de fermentations indésirables. Enfin, la fabrication des cultures d'exploitation est moins onéreuse.

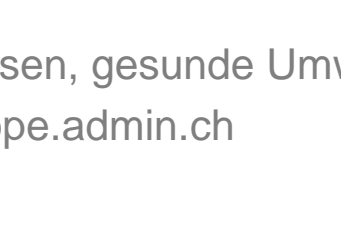
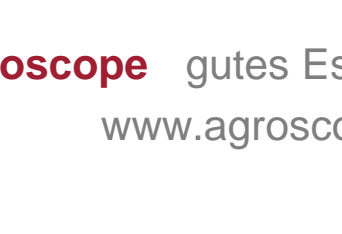
Sind Flüssigkulturen für die Käsefabrikation noch zeitgemäss?

Direktstarterkulturen sind in der Milchindustrie nicht mehr wegzudenken. Viele Käsehersteller setzen aber immer noch auf Flüssigkulturen. Nachfolgend werden die Gründe dargelegt.

Schnelle Säuerung
Trotz der Verfügbarkeit von Direktstartern setzen viele gewerbliche sowie industrielle Käseereien auch heute noch flüssige Säuerungskulturen ein. So ist zum Beispiel bei einigen Käsesorten mit geschützter Ursprungsbezeichnung die Verwendung von selbst geschützten Betriebskulturen im AOP-Pflichtbereich festgelegt.

Ernst Jakob*, Christoph Kohn*, Elisabeth Eugster* Seit den frühen Achtzigerjahren sind Direktstarterkulturen erhältlich, die im Käsefertiger direkt zur Milch gegeben werden können. Damit entfällt das Züchten von Betriebskulturen, was gerade in Kleinbetrieben, aber auch in Käsereien, die ein breites Sortiment an Spezialitäten herstellen, als Vorteil betrachtet wird. Den Weltmarkt für Direktstarter teilen sich heute rund fünf Hersteller. Flüssigkulturen – vor allem die Bohmischkulturen von Agroscope – besetzen dagegen eine einzigartige Nische.

aliments 312015



Danke für Ihre Aufmerksamkeit

nicolas.feher@agroscope.admin.ch

Agroscope gutes Essen, gesunde Umwelt

www.agroscope.admin.ch

