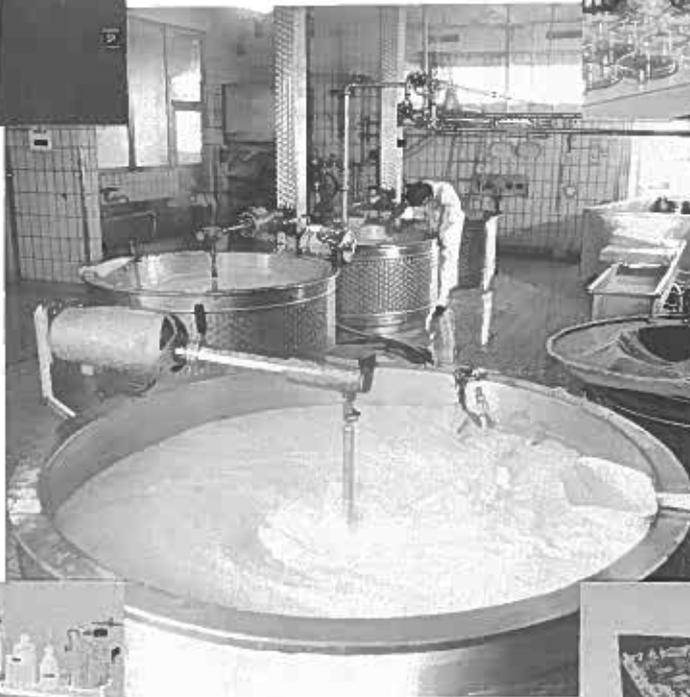


EFAM INFORMATION

Juni 1979/82

Herausgegeben von der
Eidgenössischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld
Direktor: Prof. Dr. B. Blanc



«Zur Ermittlung möglicher Ursachen der Nachgärung wurden in reifen Emmentalerkäsen zahlreiche Analysen durchgeführt. Die Resultate zeigen, dass der Milchqualität, den Milchsäurebakterienkulturen und der Fabrikation eine grosse Bedeutung zukommt.»
(Foto EFAM)

Vergleichende Untersuchungen von Käsen mit und ohne Nachgärung

von Chr. Steffen, H. Glättli und B. Nick

Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern

Eingereicht am 14. 12. 1978

III. Bakteriologische und enzymatische Untersuchungen

Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an Käsen mit und ohne Nachgärung haben gezeigt, dass in den 4½ Monate alten Käseproben keine signifikanten Unterschiede in den Keimzahlen der psychrotrophen Lactobazillen, Fremdkeime, salztoleranten Bakterien, Propionsäurebakterien, Proteolyten, Lipolyten und Enterokokken nachweisbar sind.

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Käsegruppen wurden dagegen beim Nachweis verschiedener Metabolite und Enzymaktivitäten ermittelt. Die Resultate ergeben für die Käse mit Nachgärung einen intensiveren Eiweissabbau in die Tiefe sowie eine stärkere Propionsäuregärung. Diese Abweichungen werden auf eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Bakterienflora in der Käsemasse zurückgeführt.

1. Einleitung

Die Mikroorganismen sind bei der Entstehung der Nachgärung wesentlich mitbeteiligt. Dank ihres biochemischen Leistungsvermögens sind sie für den Abbau der Lactose, des Lactates, des Caseins und anderer Inhaltsstoffe im Käse verantwortlich.

Die CO₂-Bildung im Lagerkeller ist für das Nachgärungsproblem von zentraler Bedeutung. Für die Lochbildung im Emmentalerkäse ist die CO₂-Produktion durch die Propionsäurebakterien unbedingt notwendig. In verschiedenen Arbeiten konnte aber auch ein fortdauernder Milchsäureabbau im Lagerkeller und somit eine weitere CO₂-Produktion nach erfolgter Lochbildung nachgewiesen werden (28, 32). Der Milchsäureabbau bei einer Lagerkellertemperatur von 10—13 °C kann jedoch erheblich variieren. In 90 untersuchten Emmentalerkäsen schwankt die im Lagerkeller der Käseerei abgebaute Milchsäuremenge zwischen 0,15 und 0,54% (29). Daraus lässt sich nach der Gärungsgleichung für die Propionsäuregärung eine CO₂-Menge von 0,13—0,45 Liter pro kg Käse errechnen.

Reife Käse mit Nachgärung weisen deutlich tiefere Milchsäurekonzentrationen auf als Käse guter Qualität (37). Demzufolge wird im Käse mit Nachgärung während der Lochbildung mehr Milchsäure vergoren (34).

Das für die Entstehung der Nachgärung verantwortliche CO₂ kann aus verschiedenen Reaktionen stammen. Der Hauptteil des im Emmentalerkäse vorhandenen CO₂ entsteht aus der Propionsäuregärung. Wie an anderer Stelle gezeigt (10), müssen aber noch weitere CO₂-Quellen vorhanden sein. Es liegt nahe, dass die Vielfalt der Abbauprodukte des Caseins, namentlich die Aminosäuren, zusätzliche CO₂-Quellen darstellen. Käseversuche haben einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den Milchsäurebakterienkulturen und der Nachgärung gezeigt (22, 30, 36). Im Käse mit Nachgärung erfolgte ein intensiverer Eiweissabbau in die Tiefe. Anhand verschiedener Parameter (höhere LAP-, p-Benzochinon- und NPN-Werte) wurde dies bewiesen (37). Die Teigbeschaffenheit war fester. In den fehlerhaften Käsen wurden bereits im Verlaufe der Reifung 30—40% höhere p-Benzochinonwerte gemessen. Die Disposition zu einem stärkeren Eiweissabbau kann deshalb bereits relativ früh erkannt werden.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der umfassenden Untersuchungen von Käsen mit und ohne Nachgärung. Sie enthält die Ergebnisse der bakteriologischen Analysen und der enzymatischen Untersuchungen.

2. Material und Methoden

Probematerial

Die Erhebung des Probematerials und dessen Aufarbeitung für die Laboratorien wurde in einer früheren Arbeit beschrieben (33). Für den Nachweis verschiedener Metabolite und Enzyme erfolgte die Probeentnahme aus Versuchskäse der Käseerei Uettligen.

Methoden

Bakteriologische Methoden

Für die bakteriologischen Untersuchungen wurden die Käseproben aufgebrochen und an verschiedenen Stellen mit einem sterilen Skalpell total 2 g Käse entnommen, mit 2 ml Na-Citrat (20%) und 16 ml Peptonmolke (10 g Pepton Merck; 3 g Hefeextrakt; 1000 ml enteisste Molke; pH 7,0) versetzt und in einem Colworth Stomacher 80 während 2 Minuten aufgeschlossen. Für die weiteren Verdünnungen wurde physiologische Kochsalzlösung (0,9%) verwendet.

«Psychrotrophe» Laktobazillen

Ansatz: Dreifache Reihe der Verdünnung in 10%iger rekonstituierter Pulvermagermilch

Bebrütung: 5 Tage bei 15 °C

Auswertung: Most Probable Number-Methode von Mc Crady. Die Laktobazillen wurden mikroskopisch in den positiven Röhrchen ermittelt. Stichprobeweise erfolgte zusätzlich die Milchsäurebestimmung.

(Eiweissabbauende Milchsäurebakterien)

Fremdkeime (Nichtsäurebildner)

Ansatz: Sugar Free Agar (BBL 11672)

Bebrütung: 3 Tage bei 30 °C

Auswertung: Durchschlagende Milchsäurebakterien wurden durch Subkulturen auf rekonstituierter Pulvermagermilch (3 Tage, 30 °C) erfasst und von der Koloniezahl abgezogen.

(Die Funktion der Fremdkeime kann nicht streng definiert werden, jedoch sind dabei sowohl mögliche Proteolyten, Lipolyten, wie auch CO₂-Bildner eingeschlossen.)

Salztolerante Keime

Ansatz: Mannitol Salt Agar (BBL 11407)

Bebrütung: 2 Tage bei 37 °C

(Diesen Fremdkeimen kommt eine besondere Bedeutung zu, weil sie weniger Ansprüche an die Wasseraktivität (a_w-Wert) stellen und dadurch ihre Tätigkeit im reifenden Käse unabhängig von der Salzkonzentration fortsetzen können.)

Propionsäurebakterien

Ansatz: Laktatagar, hohe Schicht (20 ml Na-Laktat [60%]; 30 g Pepton [Merck]; 30 g Hefeextrakt; 6 g Agar; 1000 ml dest. Wasser; pH 6,8—7,0)

Bebrütung: 10 Tage bei 30 °C

Auswertung: Auszählen der typischen linsenförmigen oder geflügelten, fleischfarbigen Kolonien

Im Zweifelsfalle: Mikroskopisches Bild, Katalasetest mit H₂O₂ (3%).

Proteolyten (Kaseolyten)

Methode nach FRAZIER und RUPP (12)

(Starke Eiweissabbauer im Gegensatz zu den Laktobazillen.)

Lipolyten

IDF/FIL-Standard-Methode 41 (13)

(Eine Decarboxylierung der bei der Fettspaltung anfallenden Fettsäuren bilden eine mögliche CO₂-Quelle.)

Enterokokken

Ansatz: Enterococcosel Agar (BBL 12205)

Bebrütung 1 Tag bei 37 °C

Auswertung: Auszählen der typisch gefärbten Kolonien. Mikroskopisches Bild.

(Verschiedene Arbeiten weisen auf die Bedeutung der Enterokokken im Zusammenhang mit der Nachgärung hin [15, 16, 17, 18, 20, 26].)

Differenzierung der Enterokokken

Pro Platte wurden je 10 Kolonien nach einem stark vereinfachten Schema differenziert und der Anteil der einzelnen Spezies in Prozenten festgehalten:

	Sc. faecialis	Sc. faecium	Sc. durans	(übrige Enterokokken)	
	u. Subsp.			Sc. bovis	Sc. equinus
Säure aus Mannit	+	+	—	—	—
Säure aus Sorbit	+	—	—	—/+	—
Wachstum bei 10 °C	+	+	+	—/+	—

—/+ = vorwiegend negativ

Enzymatische Methoden

Aufarbeitung: Das im Labor eingegangene Probematerial wurde in Portionen, luftdicht verschlossen, eingefroren und für die jeweilige Analyse am Tage der Bestimmung wieder auf Zimmertemperatur gebracht. Vorversuche, in welchen frische mit eingefrorenen Proben verglichen wurden, zeigten im Gehalt keine Unterschiede. Die Enzymaktivitätsbestimmungen erstreckten sich auf 2—3 Tage, der Nachweis von Stoffwechselprodukten auf 3—5 Tage. Für die jeweilige Analyse wurde vorerst am Hochfrequenzhomogenisator (Polytron PT 10-35) mit gekühltem, dest. Wasser ein Käsehomogenisat hergestellt. Zur Enzymaktivitätsbestimmung diente das filtrierte Homogenisat (in Verdünnung 1:20) direkt als Probelösung, für die Metabolitenbestimmung wurde das nicht filtrierte Homogenisat sofort der notwendigen Weiterverarbeitung zugeführt.

Gesamtmilchsäure, L-Lactat, D-Lactat

Enzymatische Bestimmung mit L-, bzw. D-LDH (28)

Die Gesamtmilchsäurewerte entsprechen der Summe der enzymatisch bestimmten L- und D-Milchsäure.

Pyruvat

Enzymatische Bestimmung mit L-LDH und NADH (5).

Acetat

Es wurde die Testkombination Boehringer Mannheim (UV-Test) zur Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln verwendet. Das zu Acetyl-CoA umgesetzte Acetat reagiert bei Anwesenheit von Citrat-Synthase und Oxalacetat zu Citrat und CoA. Die dem Acetyl-CoA äquivalente Menge Oxalacetat wird über Malat und MDH unter Reduktion von NAD bereitgestellt (vorgeschaltete Indikatorreaktion). Ver-

suche haben ergeben, dass Propionsäure auch in mehrfacher Menge, wie sie in Emmentalerkäse vorkommt, die Reaktion nicht stört.

Succinat

Enzymatische Bestimmung mit Succinyl-CoA-Synthetase über Inosin-5'-diphosphat, das mit Phosphoenolpyruvat bei Anwesenheit von Pyruvat-Kinase Pyruvat bildet. Die Brenztraubensäure wird unter Oxidation von NADH durch LDH zu Milchsäure reduziert (4). Da die Käseextrakte ATP und AMP enthalten, und die Succinyl-CoA-Synthetase aus Schweineherz (Boehringer Nr. 161 543) noch geringe Mengen Myokinase enthalten kann, ist zur Stabilisierung der Reaktion ein Zusatz des Myokinase-Hemmers Di-(adenosin-5')-pentaphosphat notwendig (3). Succinat kann im Perchlorsäure-enteiweissten Käseextrakt bis zu einer Konzentration von 600 mg/Liter mit guter Reproduzierbarkeit (VK < 2%) nachgewiesen werden.

L-Glutamat

Bestimmung der L-Glutaminsäure mit Glutamat-DH und NAD. Der quantitative Umsatz wird analog der Milchsäurebestimmung durch Abfangen der Ketosäure mit Hydrazin, NAD-Ueberschuss und alkalischem Milieu erzwungen (2).

p-Benzochinonwert

Durch Addition primärer und sekundärer Amine an p-Benzochinon entstehen N-(dihydroxyphenyl)-amine, die mit überschüssigem Chinon intensiv gefärbte 1:1 Charge-Transferkomplexe bilden (23, 24). Als p-Benzochinonwert bezeichnen wir das Resultat der photometrisch ermittelten Farbintensität in der Bestimmung mit Perchlorsäure-ent-

Tabelle 1: Resultate der bakteriologischen Analysen

Physiologische Gruppe	Mittelwert (log der Keimzahlen pro g Käse)	Standardabweichung (log der Keimzahl pro g Käse)	Irrtumswahrscheinlichkeit	
			zwischen mit u. ohne NG	zwischen Teilvers.
Psychrotrophe Laktobazillen	4,30	1,54	—	○
Fremdkeime	5,93	1,12	—	○
Salztolerante Keime	6,16	1,67	—	○
Propionsäurebakterien	8,57	2,24	—	○
Proteolyten	4,00	1,58	—	○
Lipolyten	3,17	1,63	—	○
Enterokokken	6,53	0,97 (N = 100)	—	○

- N = 120, ausser wo speziell angegeben
 *** = Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1%
 ** = Irrtumswahrscheinlichkeit 0,11 bis 0,99%
 * = Irrtumswahrscheinlichkeit 1,00 bis 5,00%
 ○ = Irrtumswahrscheinlichkeit < 5%
 — = keine Signifikanz

Tabelle 2: Resultate der Enterokokken-Differenzierung

Keimgruppe	Mittelwert (log der Keimzahlen pro g Käse)	Standardabweichung (log der Keimzahl pro g Käse)	Irrtumswahrscheinlichkeit	
			zwischen mit u. ohne NG	
Enterokokken total	6,53	0,97	—	
— Sc. faecalis u. Subsp.	5,69	1,28	—	
— Sc. faecium	5,58	1,19	—	
— Sc. durans	5,01	1,25	—	
übrige Enterokokken	4,97	1,21	—	

N = 100

Tabelle 3: Ergebnisse der Bestimmung verschiedener Enzymaktivitäten im Käse

Variable		Mittelwert		Standardabweichung		Irrtumswahrscheinlichkeit	
		ohne NG	mit NG	ohne NG	mit NG	zwischen mit u. ohne NG	zwischen Teilvers.
β -Gal.	IE	533	807	234	378	***	—
LDH	IE	7 930	9 593	2 134	2 890	***	○
MDH	IE	5 509	7 046	1 403	2 025	***	—
LAP	IE	3,8	7,0	3,1	7,7	**	—
GAA	IE	64,9	54,1	10,7	12,0	***	○
LAA	IE	8,6	14,3	7,8	11,6	**	—
PAA	IE	11,7	15,5	2,4	4,0	***	—

*** = Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1%

** = Irrtumswahrscheinlichkeit 0,11 bis 0,99%

* = Irrtumswahrscheinlichkeit 1,00 bis 5,00%

○ = Irrtumswahrscheinlichkeit < 5%

— = keine Signifikanz

Tabelle 4: Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung von Metaboliten

Variable		Mittelwert		Standardabweichung		Irrtumswahrscheinlichkeit	
		ohne NG	mit NG	ohne NG	mit NG	zwischen mit u. ohne NG	zwischen Teilvers.
Gesamtmilchsäure	μ Mol/g	39,6	27,9	20,9	21,1	**	—
L(+)-Milchsäure	μ Mol/g	11,2		10,1			—
D(—)-Milchsäure	μ Mol/g	27,0	18,2	16,1	13,8	**	—
Pyruvat	μ Mol/g	7,1		4,7			○
Acetat	μ Mol/g	53,4	60,1	5,0	5,5	***	○
Succinat	μ Mol/g	11,5	13,9	2,5	3,2	***	○
Glutamat	μ Mol/g	28,2	39,2	7,2	9,5	***	—
p-Benzochinon	μ Mol/g	287,3	380,1	59,2	79,2	***	—

*** = Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1%

** = Irrtumswahrscheinlichkeit 0,11 bis 0,99%

* = Irrtumswahrscheinlichkeit 1,00 bis 5,00%

○ = Irrtumswahrscheinlichkeit < 5%

— = keine Signifikanz

revealed that there are no significant differences in the following bacteria counts: psychrotrophic lactobacilli, foreign aerobic germs, salt-tolerating bacteria, propionic acid bacteria, proteolytic and lipolytic germs and enterococci.

On the other hand, significant differences have been found between both cheese groups when determining certain metabolites and enzymatic activities. As the results show, proteolysis is more intensive in depth and propionic acid fermentation is stronger in cheeses with late fermentation. These differences are attributed to variations in metabolic activity of the bacterial flora in cheese.

Literatur

- 1 BERGMAYER, H. U. und BERNT, E., in Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 1 (1974)
- 2 BERNT, E. und BERGMAYER, H. U., in Methoden der enzymatischen Analytik, Bd. 2 (1974)
- 3 BOEHRINGER, biochemica-dienst Nr. 37
- 4 BOEHRINGER, Mannheim, Methoden der enzymatischen Lebensmittel-Analytik 77/78
- 5 CZOK, R. und LAMPRECHT, W., in Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2 (1974), Verlag Chemie Weinheim
- 6 DALLA TORRE, M., unveröffentlichte Arbeit, EFAM (1974)
- 7 DIRAR, H. und COLLINS, E. B., J. Gen. Microbiol., **73**, 233—238 (1972)
- 8 ERLANGER, B. F. et al.: Arch. Biochem. Biophys., **95**, 271 (1961)
- 9 ERLANGER, B. F. et al.: Arch. Biochem. Biophys., **115**, 206 (1966)
- 10 FLUECKIGER, E., WALSER, F. und STEFFEN, C., Schweiz. Milchzeitung, **104**, 592 (1978)
- 11 FLUECKIGER, E. und WALSER, F., Schweiz. Milchztg. **103**, 640 (1977)
- 12 FRAZIER, W. C. und RUPP, P., J. Bact., **16**, 65—78 (1928)
- 13 IDF/FIL, International Standard, **41** (1966)
- 14 ISOLINI, D. und GLAETTLI, H., unveröffentlichte Arbeit, EFAM (1978)
- 15 KIELWEIN, G., Deutsche Molkereizeitung, **96** (46), 1514—1522 (1975 a)
- 16 KIELWEIN, G., Deutsche Molkereizeitung, **96** (48), 1592—1598 (1975 b)
- 17 KIELWEIN, G., Deutsche Molkereizeitung, **96** (49), 1625—1626 (1975 c)
- 18 KIELWEIN, G., Deutsche Molkereizeitung, **97** (1/2), 17—24 (1976)
- 19 KNOOP, A. M. und PETERS, K. H., Milchwissenschaft, **30**, 674 (1975)
- 20 KURMANN, J. L. und SCHILT, P., Schweiz. Milchzeitung, **99** (9), 57—58 (1973)
- 21 LAVANCHY, P., BUEHLMANN, C. und BLANC, B., Schweiz. Milchw. Forsch., **8** (1), (1979)
- 22 LAVANCHY, P., BUEHLMANN, C. und BLANC, B., XX. Int. Milchw. Kongr., 522 (1978)
- 23 LORENZ, K. Z., Anal. Chem., **269**, 182 (1974)
- 24 MOXON, G. H. und SLIFKIN, M. A., Biochim. Biophys. Acta, **286**, 98—102 (1972)
- 25 RICHTERICH, R., Klin. Chemie (1971)
- 26 RITTER, W., Deutsche Molkereizeitung, **97** (23), 680—684 (1976)
- 27 RITTER, W., Deutsche Molkereizeitung, **97** (51/52), 1635—1637 (1976)
- 28 STEFFEN, C., Diss. Nr. 4630, Eidg. Techn. Hochschule Zürich (1971)
- 29 STEFFEN, C., Schweiz. Milchw. Forsch., **5**, 43 (1976)
- 30 STEFFEN, C., Schweiz. Milchzeitung, **103**, 334 (1977)
- 31 STEFFEN, C., Lebensm.-Wiss. u. Technol., **8**, 1—6 (1975)
- 32 STEFFEN, C. und BLANC, B., Schweiz. Milchzeitung, **97**, 1079 (1971)
- 33 STEFFEN, C., BUEHLMANN, C., SCHNIDER, J., SCHAER, H. und RENTSCH, F., Schweiz. Milchw. Forsch., **8**, 3 (1979)
- 34 STEFFEN, C., NICK, B. und FIECHTER, H., Schweiz. Milchzeitung, **101**, 123 (1975)
- 35 STEFFEN, C. und NICK, B., unveröffentlichte Arbeit, EFAM (1978)
- 36 STEFFEN, C., RENTSCH, F. und MEIER, P., Schweiz. Milchzeitung, **101**, 606 (1975)
- 37 STEFFEN, C. und PUHAN, Z., Schweiz. Milchw. Forsch., **5**, 51 (1976)
- 38 TUPPY, H. et al., z. Phys. Chem., **329**, 278 (1962)
- 39 WACHSMUTH, E. D. et al., Biochem., **5**, 169 (1966)
- 40 WEBER et al., Biochem. z. **339**, 498 (1964)
- 41 WEBER, H., D. med. Wo. Schrift, **90**, 1170—1174 (1965)

Die D-Milchsäurekonzentration ist in den qualitativ guten Käsen eindeutig höher als in den fehlerhaften Käsen. Das Verhältnis von L- zu D-Milchsäure erlaubt ebenfalls gewisse Rückschlüsse auf die an der Milchsäuregärung beteiligten Lactobazillenstämme (31). Die vorliegenden Resultate bestätigen deshalb Unterschiede in der Milchsäurebakterienflora der beiden Käsegruppen. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die *Lb. lactis*-Stämme in den Käsen ohne Nachgärung stärker vertreten waren.

Eindeutig höhere Werte wurden in der Aktivität der Enzyme β -Galactosidase und Lactatdehydrogenase in den Nachgärungskäsen gemessen (Tabelle 3). Dies bestätigt Unterschiede in der Milchsäurebakterienflora (insbesondere der Lactobazillen). Die enge Korrelation der β -Galactosidase zu verschiedenen Aminosäuren, dem p-Benzochinon- und NPN-Wert erhärtet diese Annahme.

Käse mit und ohne Nachgärung zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Es ist jedoch festzustellen (Abbildung 3), dass zu Beginn der Dürrfütterung ein Anstieg der Phosphataseaktivität im Käse stattfindet, während in den Monaten März bis Oktober die Werte unter dem Jahresdurchschnitt liegen. Ein Zusammenhang zwischen Phosphataseaktivität und Eiweissabbau ist nicht ausgeschlossen. Nach KNOOP und PETERS (19) spaltet die Phosphatase die Caseinstränge in Submizellen auf und erleichtert damit den Zutritt der Proteasen. Möglicherweise könnte hier ein Ansatzpunkt für das vermehrte Auftreten der Nachgärung während der Dürrfütterperiode liegen.

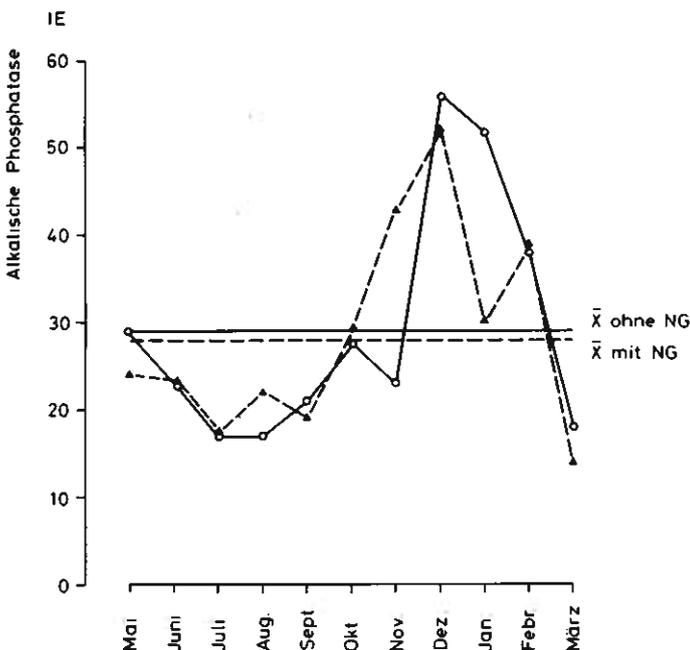


Abb. 3: Phosphataseaktivität in Käsen mit und ohne Nachgärung im Verlaufe eines Jahres

5. Folgerungen

Untersuchungen in Käsen mit und ohne Nachgärung haben einerseits eine intensivere Propionsäuregärung und andererseits einen wesentlich stärkeren Eiweissabbau in die Tiefe für die Nachgärungskäse ergeben. Inwieweit die intensivere Proteolyse den Milchsäureabbau durch die Propionsäurebakterien beeinflusst, lässt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht eruieren. Die in den Nachgärungskäsen deutlich höhere Succinatkonzentration, wie

die stärkere MDH-Aktivität lassen jedoch eine gegenseitige Beeinflussung vermuten.

Das Ausmass der verschiedenen Gärungsvorgänge im Käse ist kaum stöchiometrisch erfassbar, weil in der Käsemasse weder eine einheitliche Mikroflora noch einheitliche Bedingungen vorliegen. Einerseits sind es die gezielt eingesetzten Milchsäure- und Propionsäurebakterien, die für die Käseerzeugung verantwortlich sind. Andererseits darf aber die in der Milch vorkommende, natürliche Bakterienflora nicht ausseracht gelassen werden, da sie kaum in jedem Falle durch den Fabrikationsprozess und die Milchsäuregärung vollständig ausgeschaltet werden kann. Diese Vielfalt von Mikroorganismen, die weitere verschiedene Stoffwechselforgänge zur Folge haben können, machen es praktisch unmöglich, eine präzise Gärbilanz zu erstellen. Dies um so mehr, als die Gärtätigkeit stets fortschreitet und zu keinem Zeitpunkt zum Erliegen kommt.

Verschiedene Untersuchungen, wie die Aktivität der Enzyme β -Galactosidase, LDH, LAP, LAA, PAA und GAA sowie die Milchsäurekonfiguration, bestätigen Unterschiede in den für die Milchsäuregärung und die anschliessende Käseerzeugung verantwortlichen Bakterien. Diese Hinweise geben Anhaltspunkte, dass in Nachgärungskäsen vermehrt Stämme von *Lb. helveticus* an der Milchsäuregärung beteiligt sind, während in den Käsen guter Qualität *Lb. lactis*-Stämme dominieren. Diese Problematik muss jedoch in weiteren Versuchen noch eingehender abgeklärt werden.

Die aus dem Milchsäureabbau und der Acetatmenge errechnete CO_2 -Produktion liegt mit maximal 1,3 Liter pro kg Käse deutlich unter den von FLUECKIGER et al. (10) ermittelten Gasmengen von 1,4—1,8 Litern. Es besteht somit bezogen auf das aus dem Acetat errechnete CO_2 eine Differenz von 0,1—0,6 Liter. Diese Differenz dürfte durch Umsetzungsreaktionen der Aminosäuren gedeckt werden (21).

Frau E. Lingg, Fr. J. Brühlhart, Fr. E. Finger und Fr. H. Holzer möchten wir an dieser Stelle für die Mitarbeit bei der Ausführung der Analysen bestens danken.

Résumé

Essais comparatifs sur fromages avec et sans fermentation secondaire

III. Analyses bactériologiques et enzymatiques

Des analyses bactériologiques comparatives effectuées dans des échantillons de fromage de 4½ mois avec et sans fermentation secondaire ne présentent pas de différences significatives dans le nombre des germes suivants: lactobacilles psychrotrophes, germes étrangers, bactéries tolérantes au sel, bactéries propioniques, germes protéolytiques, germes lipolytiques et entérocoques.

Par contre, on a trouvé des différences nettes entre les deux groupes de fromage en ce qui concerne les métabolites et les activités enzymatiques. Comme le démontrent les résultats, la protéolyse est plus intense en profondeur et la fermentation propionique plus forte dans les fromages avec fermentation secondaire. Ces divergences sont imputées à l'activité métabolique variable de la flore bactérienne dans la masse du fromage.

Abstract

Comparative tests with cheeses with and without late fermentation

III. Bacteriological and enzymatic analyses

Comparative bacteriological analyses of 4½ months old cheese samples with and without late fermentation have

fikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Ausgehend von der theoretischen Bilanz der Propionsäuregärung ($3 \text{ Lactat} \rightarrow 2 \text{ Propionat} + 1 \text{ Acetat} + 1 \text{ CO}_2$) kann unter Normalbedingungen für Käse mit Nachgärung eine CO_2 -Produktion pro kg von 0,78 Litern und für die qualitativ guten Käse, also ohne Nachgärung, von 0,69 Litern errechnet werden. Die durchschnittliche Differenz von 0,09 Liter pro kg Käse ist relativ gering. Ob diese Mehrproduktion für die Nachgärung verantwortlich sein kann, möchten wir bezweifeln. Nach FLUECKIGER et al. (10) variiert die im Käse gemessene Gasmenge während der 5-monatigen Reifung immerhin zwischen 1,4 und 1,8 Liter pro kg Käse.

Die intensivere Propionsäuregärung in den Käsen mit Nachgärung wird durch die enzymatische Acetatbestimmung (Tabelle 4) erhärtet. Die fehlerhaften Käse haben einen durchschnittlich um $7 \mu\text{Mol/g}$ höheren Acetatgehalt. Daraus lässt sich wie oben aus dem Milchsäureabbau eine CO_2 -Menge errechnen, die für Käse ohne Nachgärung 1,19 Liter pro kg und für die Nachgärungskäse 1,34 Liter pro kg beträgt. FLUECKIGER und WALSER (13) konnten eine CO_2 -Produktion bereits während der Milchsäuregärung im Käse nachweisen. Sowohl die homofermentativen Streptokokken wie auch die Lactobazillenstämme sind in der Lage, aus Lactose CO_2 zu bilden (14). Acetat kann ebenfalls während der Milchsäuregärung entstehen (7). Ferner ist zu berücksichtigen, dass die theoretische Bilanz der Propionsäuregärung nicht mit dem tatsächlichen Acetatanteil übereinstimmen muss (6).

Succinat ist ein Metabolit der Propionsäuregärung und des Zitronensäurezykluses. Ebenso ist die Malat-Dehydrogenase (MDH) an beiden Stoffwechselwegen beteiligt. Die Succinatkonzentration und die MDH-Aktivität steigen mit dem Beginn der Propionsäuregärung deutlich an (35). Andererseits könnten Succinat und MDH ebenfalls Umwandlungen von Aminosäuren anzeigen (21). Dies wird durch den hohen Korrelationskoeffizienten zu mehreren Aminosäuren und zum NPN-Wert bestätigt. Die höhere Konzentration im Käse mit Nachgärung lässt jedenfalls erkennen, dass dem Succinat eine Regulierfunktion im Stoffwechsel zukommt und die MDH ein Indikator für diese Reaktionen sein kann.

Der Pyruvatgehalt nimmt mit dem Beginn der Propionsäuregärung im Käse zu (31). Die beiden Käsegruppen unterscheiden sich aber nach $4\frac{1}{2}$ Monaten nicht (Tabelle 4). Dem Pyruvatnachweis kommt somit in bezug auf das Nachgärungsproblem keine besondere Bedeutung zu. Ebenfalls lässt die jahreszeitliche Auswertung keinerlei Hinweise auf einen möglichen Einfluss der Fütterung erkennen.

Mit dem p-Benzochinonwert wird der Eiweissabbau in die Tiefe ermittelt. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, weisen die Käse mit Nachgärung deutlich höhere p-Benzochinonwerte auf als die Käse guter Qualität. Damit wird der intensivere Eiweissabbau zu niedermolekularen Verbindungen erneut bestätigt. Die Korrelationsfaktoren zwischen dem p-Benzochinonwert und dem Total der freien Aminosäuren, dem NPN-Wert, dem Prolin und dem Isoleucin sind hoch (0,9). Für Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Methionin, Leucin, Phenylalanin, Lysin, Histidin sowie für die Wassersorption und Succinat liegt der Korrelationsfaktor zwischen 0,7 und 0,9. Weiter korreliert der p-Benzochinonwert zur β -Galactosidase, MDH, LAP, LAA und PAA.

Der enzymatische Glutamatnachweis ergibt für die Käse mit Nachgärung ebenfalls deutlich höhere Werte (Tabelle 4). Dies bestätigt den intensiveren Eiweissabbau in die Tiefe in den Nachgärungskäsen.

Eine intensivere proteolytische Aktivität zeigen ferner die in Nachgärungskäsen signifikant höheren Werte der Enzymgruppen L-Leucin-Arylamidase (LAP), L-Lysin-Arylamidase (LAA) und L-Prolin-Arylamidase (PAA). Im Gegensatz dazu ist die L-Glutaminsäure-Arylamidase (GAA)-Aktivität in den qualitativ guten Käsen deutlich höher. Diese Feststellung würde somit bezüglich der Proteolyse im Widerspruch zu den übrigen Resultaten stehen. In Versuchen mit Rohmischkulturen zur Käseherstellung konnten wir jedoch feststellen, dass sich die GAA entgegengesetzt zur LAA und LAP verhält und eine Aussage über die in den Kulturen eingesetzten Lactobazillenarten erlaubt.

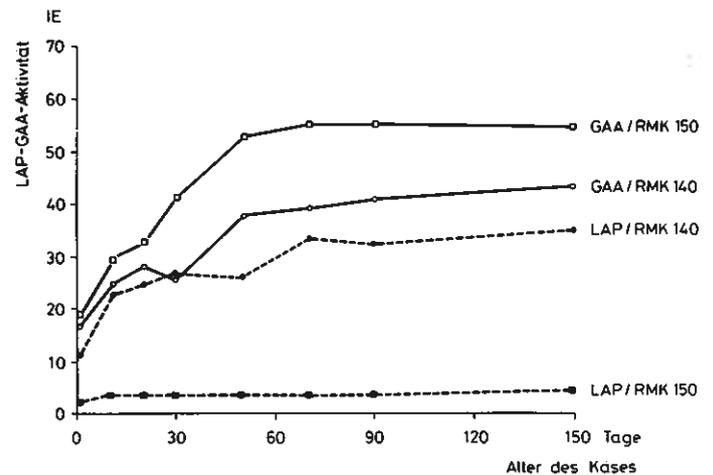


Abb. 1: L-Leucin-Arylamidase- und L-Glutaminsäure-Arylamidase-Aktivität in Käsen, hergestellt mit verschiedenen Kulturen

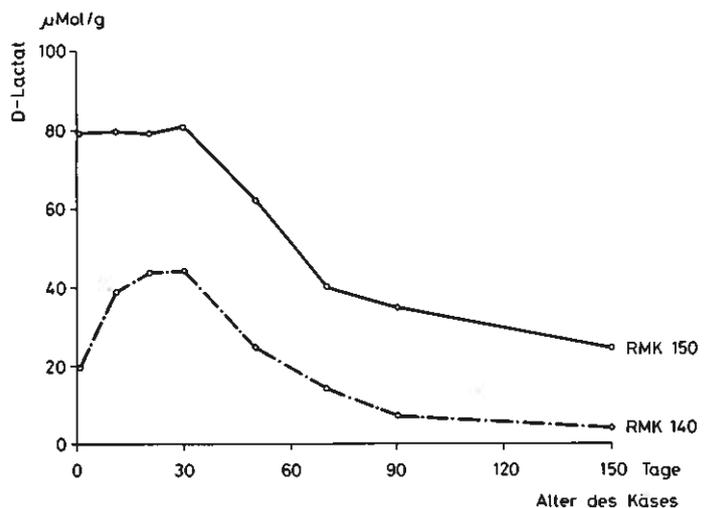


Abb. 2: D-Lactat in Käsen, hergestellt mit verschiedenen Kulturen

Die Rohmischkultur (RMK) 150 enthält *Sc. thermophilus* und *Lb. lactis*-Stämme, während die RMK 140 *Sc. thermophilus* und *Lb. helveticus*-Stämme aufweist. Aus den Abbildungen 1 und 2 geht hervor, dass die *Lb. lactis*-Stämme im Käse einen höheren Anteil von D-Milchsäure, tiefere LAP- sowie höhere GAA-Werte als die Kulturen mit *Lb. helveticus*-Stämmen ergeben. Diese Feststellung konnte in der Folge mit Reinkulturen bestätigt werden. Zudem wurde eine sehr enge Korrelation zwischen LAA und LAP (Korrelationskoeffizient 0,95) ermittelt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen somit vermuten, dass in Käsen mit Nachgärung die *Lb. helveticus*-Stämme stärker vertreten sind.

eweisstem Käseextrakt. Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf den Standard «L-Glutaminsäure», welche als freie Aminosäure in reifem Emmentalerkäse am stärksten vertreten ist.

Enzymaktivitätsbestimmungen:

Die optimalen Reaktionsbedingungen (pH, Substrat- und Aktivatorkonzentration) für das Käsehomogenisat wurden in Vorversuchen ermittelt. β -Galactosidase, LDH und MDH konnte direkt während 3 Min. registriert und anhand des Enzymwinkels berechnet werden. Die alkalische Phosphatase wurde während 30 Min., die Aminosäure-Arylamidasen während 120 Min. unter Lichtabschluss inkubiert.

Mit Ausnahme der alk. Phosphatase, wo mittels eines Standards berechnet wurde, rechneten wir mit den entsprechenden mikromolaren Extinktionskoeffizienten.

Die Enzymaktivitäten sind in Internationalen Einheiten ($\mu\text{Mol Substratumsatz} \times 1000 \text{ g}^{-1} \times \text{Min.}^{-1}$) angegeben und bei 25 °C (Ausnahme: Alk. Phosphatase 37 °C) gemessen.

β -Galactosidase (β -Gal) (40)

2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid 1 mM

Phosphatpuffer 1/15 M (+ 1,6 mM Mg^{2+}) pH 7,4

Lactatdehydrogenase (LDH) (25)

Na-Pyruvat 0,86 mM; NADH 0,4 mM

Triäthanolaminpuffer 50 mM (+ 5 mM EDTA) pH 7,5

Alkalische Phosphatase (41)

p-Nitrophenylphosphat- Na_2 3,8 mM

Ammediol-HCl-Puffer 50 mM (+ 0,5 mM Mg^{2+}) pH 10,0

Malat-Dehydrogenase (MDH) (1)

Oxalacetat 1,1 mM; NADH 0,22 mM

Phosphatpuffer 0,1 M (+ 5 mM EDTA) pH 7,2

Das Substrat Oxalacetat wird direkt in der Küvette enzymatisch durch GOT, Ketoglutarat und Aspartat bereitgestellt.

Aminosäure-Arylamidasen

In Vorversuchen hatten wir verschiedene der von der Firma Merck erhältlichen Aminosäure-4-Nitroanilide (8, 9, 38, 39) getestet (L-Glutaminsäure-5-; L-Glutaminsäure-1-; L-Leucin-; L-Lysin-; L-Prolin-; N-Glutaryl-L-Phenylalanin-; N-Benzoyl-Arginin-; Succinyl-Phenylalanin- und Phenylalanin-4-Nitroanilid).

Das Käsehomogenisat zeigte unter den vorliegenden Testbedingungen lediglich bei den p-Nitroaniliden der Aminosäuren Glutaminsäure, Leucin, Lysin und Prolin eine messbare Aktivität. Ueber die mit L-Leucin-4-nitroanilid gemessene, exoproteolytische Aktivität in Emmentalerkäse wurde bereits berichtet (37). Trotz der anzunehmenden «breiten Unspezifität» gegenüber den 4 genannten Aminosäure-4-nitroaniliden, wurden sie in die vergleichenden Untersuchungen aufgenommen. Vor allem auch des Umstandes wegen, dass diese Aminosäuren in der oben aufgeführten Reihenfolge mehr als die Hälfte der im Käse vorliegenden Menge an freien Aminosäuren ausmachen.

L-Leucin-Arylamidase (LAP)

(früher als Leucin-Amino-peptidase bezeichnet)

L-Leucin-4-nitroanilid 1 mM

Phosphatpuffer 1/15 M (+ 1,8 mM Mg^{2+}) pH 7,4

L-Glutaminsäure-Arylamidase (GAA)

L-Glutaminsäure-5-(4-nitroanilid) 2 mM

Phosphatpuffer 1/15 M pH 7,4

L-Lysin-Arylamidase (LAA)

L-Lysin-4-nitroanilid 2 mM

Phosphatpuffer 1/15 M pH 7,4

L-Prolin-Arylamidase (PAA)

L-Prolin-4-nitroanilid 2 mM

Phosphatpuffer 1/15 M pH 7,4

3. Ergebnisse

Entgegen den Erwartungen hat die Gesamtauswertung der bakteriologischen Analysen gezeigt, dass die vergleichenden Untersuchungen im Käse mit und ohne Nachgärung keine signifikanten Unterschiede hervorbrachten. In Tabelle 1 wurde deshalb für jede der untersuchten Keimgruppen nur ein Mittelwert angegeben. Weiter kommt in dieser Tabelle zum Ausdruck, dass zwischen den Teilversuchen, d. h. von einer monatlichen Probeentnahme zur andern, signifikante Unterschiede vorhanden sind. Der statistischen Auswertung gemäss, handelt es sich eindeutig nicht um saisonale Einflüsse, sondern um methodische Streuungen, die personalbedingt waren.

Tabelle 2 zeigt, dass die Differenzierung der Enterokokken ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Käsegruppen aufwies. Die untersuchten Spezies waren gleichmässig in beiden Varianten vertreten.

Die Ergebnisse der Bestimmung verschiedener Enzymaktivitäten sowie einiger Metabolite ergeben zwischen den beiden Gruppen zum Teil recht deutliche Unterschiede und sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst.

4. Diskussion

Im Gegensatz zu den enzymatischen Analysen weisen die bakteriologischen Untersuchungen zwischen Käse mit und ohne Nachgärung keine signifikanten Unterschiede auf. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Alter der Käse zur Zeit der Analyse rund 4 1/2 Monate betrug. Eine bakteriologische Untersuchung deckt nur den momentanen bakteriologischen Status des Käses auf und sagt daher nichts über das vorgängige bakteriologische Geschehen (Vermehrung, Autolyse) und die spezifische Aktivität der bakteriellen Enzyme aus. Während der Käsereifung muss stets mit einer Autolyse eines Teils der Mikrobenpopulation gerechnet werden. Lebendkeimzahl und Enzymaktivität müssen deshalb nicht in direktem Zusammenhang stehen. Eine bakteriologische Keimzahlbestimmung allein sagt ferner nichts aus über die gegenseitige Beeinflussung einzelner physiologischer Bakteriengruppen durch Stoffwechselprodukte.

Die Resultate der bakteriologischen Analysen (Tabellen 1 und 2) stehen im Widerspruch zu den von KIELWEIN gemachten Feststellungen (15, 16, 17, 18). Es konnte in den untersuchten Proben keine erhöhte Enterokokkenzahl (im Speziellen *Sc. durans* und *Sc. faecium*) nachgewiesen werden.

RITTER (26, 27) verweist vor allem auf die Fähigkeit einer grossen Zahl von Mikroorganismen, Aminosäuren zu decarboxylieren. In diesem Zusammenhang sei speziell die Arbeit von KURMANN und SCHILT (20) erwähnt, in der die Decarboxylierung von Tyrosin und Arginin durch *Sc. faecalis* aufgezeigt wird. DALLA TORRE (6) beschreibt die Fähigkeit der Propionsäurebakterien, bestimmte Aminosäuren zu decarboxylieren.

Die Käse mit Nachgärung weisen einen um 12 $\mu\text{Mol/g}$ tieferen durchschnittlichen Milchsäuregehalt auf. Diese Differenz ist höchstwahrscheinlich durch eine intensive Propionsäuregärung bedingt, wie in einer früheren Arbeit gezeigt wurde (37). In einigen Herstellerbetrieben wurde in der entsprechenden Periode der Milchsäuregehalt der 24-stündigen Käse bestimmt. Die Erhebungen zeigten einen Durchschnittswert von 133 $\mu\text{Mol/g}$ und keinen signi-