

August 1993 / 262 P/W

**Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft
CH-3097 Liebefeld-Bern**

Ursachen der Entstehung von braunen Tupfen im Käse

A. Baer, I. Ryba und M. Grand

Schweiz. Milchw. Forschung 22 (1) 3-7 (1993)

Ursachen der Entstehung von braunen Tupfen im Käse

A. BAER, I. RYBA und M. GRAND

Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
3097 Liebefeld-Bern
Eingereicht am 24. September 1992

Dank praktischen Versuchen, die an 54 Emmentaler-Versuchskäsen vorgenommen wurden, konnten die Bedingungen für das Erscheinen von braunen Tupfen aufgeklärt werden. Durch Beimpfung unterschiedlicher Mengen an Propionsäurebakterien war es möglich, das Auftreten von braunen Tupfen zu provozieren. Die bei diesen Versuchen erhaltenen reproduzierbaren Resultate stimmen mit in den 20er Jahren erhaltenen überein, wonach jeder braune Tupfen eine Kolonie Propionsäurebakterien darstellt. Wir konnten nun zeigen, dass es sich dabei um P. freudenreichii handelt. Alle untersuchten Stämme dieses Keimes konnten diesen Fehler hervorrufen.

Die Untersuchung des Verhältnisses zwischen der Menge der zugesetzten Impfkulturen und der wiedergefundenen Menge an Propionsäurebakterien ergab, dass praktisch alle Keime im Käsebruch zurückgehalten werden.

Das Studium des Wachstumsverhaltens ergab, dass der Beginn des exponentiellen Wachstums bis zu 20 Tagen variieren konnte, ohne dadurch das Erscheinen von braunen Tupfen hervorzurufen. Hingegen traten in allen Fällen, in denen weniger als $7 \cdot 10^7$ Propionsäurebakterien pro 1000 Liter Milch beimpft wurden, braune Tupfen auf. Nach einer Käsereifungszeit von 120 Tagen betrug die Zahl der Propionsäurebakterien, unabhängig von der eingepflichten Menge, stets zwischen 10^9 und 10^{10} /g Käse.

Aus den Resultaten kann geschlossen werden, dass das Erscheinen von braunen Tupfen ausschliesslich von der bei der Fabrikation des Käses in der Kesselmilch vorhandenen Menge an Propionsäurebakterien abhängt. Sobald die Zahl der Propionsäurebakterien um ca. 100mal geringer ist als bei der Emmentaler-Käse-Fabrikation normalerweise üblich, treten braune Tupfen auf.

1. Einleitung

Das Auftreten von braunen Tupfen in Hart- und Halbhartkäsen wurde erstmals bereits vor einem Jahrhundert beschrieben (4). Es handelt sich dabei um von blosserem Auge sichtbare dunkelbeige bis rötliche Punkte von ca. 0,5 mm Durch-

messer. Ihre Verteilung im Käse ist unregelmässig. Zwischen dem zweiten und dritten Monat der Käsereifung können pro cm^2 Schnittfläche bis zu 6 Punkte auftreten. Dabei handelt es sich eher um einen Schönheitsfehler, der die organoleptischen Qualitäten des Käses in keiner Weise beeinflusst. Obschon dieses Phänomen in der Literatur immer nur beim Emmentaler-Käse beschrieben wurde, tritt es auch beim Appenzeller, Tilsiter und Sbrinz in Erscheinung.

Die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen dieses Phänomens (4) zeigten, dass jeder einzelne braune Tupfen einer grossen Bakterienkolonie entsprach. Die in diesen Kolonien gefundenen Bakterien wuchsen unter anaeroben Bedingungen, waren unbeweglich und hatten die Form von kurzen, oft etwas gebogenen Stäbchen. Thoeni und Allemann (6) identifizierten diese Keime als Propionsäurebakterien. Da die braunen Tupfen nur in Käsen mit wenig Propionsäurebakterien auftraten, schloss Burri (4), dass sich bei wenig Propionsäurebakterien die einzelnen zu sehr grossen Kolonien entwickeln können und dadurch von blosserem Auge in Form von braunen Tupfen sichtbar werden so wie dies auf Agar geschieht, wenn nur wenig Keime beimpft werden. Die Farbe der Tupfen wurde oft einem Pigment der Propionsäurebakterien zugeschrieben, ohne dass dieses jedoch je einmal hätte isoliert werden können. Im Gegensatz dazu konnte aus den Propionsäurebakterien, die für die Bildung der roten Tupfen verantwortlich (P. rubrum, früher P. thoenii) und nicht mit den braunen Tupfen zu verwechseln sind, ein Pigment isoliert werden.

Während heute die roten Tupfen in den Schweizerkäsen kaum mehr vorkommen (3), treten sporadisch immer wieder Käse mit braunen Tupfen auf. Solche Käse erleiden bei der Taxation eine Minderbewertung. Die vorliegende Untersuchung wurde durchgeführt, um die Gründe für die Bildung solcher braunen Tupfen zu verstehen und um deren Entstehung zu vermeiden. In einer anderswo publizierten Untersuchungsserie (2) konnten verschiedene, in den letzten 50 Jahren gemachte und publizierte Beobachtungen bestätigt werden. So konnten wir ebenfalls bestätigen, dass die braunen Tupfen

durch das Wachstum von Kolonien von Propionibacterium freudenreichii verursacht werden. Diese Bakterien besitzen eine blass-beige Farbe. Die sehr hohe Konzentration von Keimen, die in einer Kolonie im Käse auftreten, führt optisch zur Bildung von dunkel gefärbten Tupfen. Dabei handelt es sich nicht um spezifische Keime, die diesen „Schönheitsfehler“ verursachen. Hingegen bestehen zwischen den 6 verschiedenen Stämmen, aus welchen sich die „P-Kultur“ zusammensetzt, bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedener Parameter der Käsefabrikation, Unterschiede. In der vorliegenden Arbeit berichten wir hauptsächlich über Versuche mit Käsen, in welchen versucht wurde, die Bildung von braunen Tupfen zu provozieren. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen schien die Bildung der braunen Tupfen mit der Anzahl Propionibakterien und / oder mit dem Wachstum dieser Keime im jungen Käse zusammenzuhängen. Deshalb wurde zuallererst der Zusammenhang zwischen eingepflichter Keimzahl und der Keimzahl nach 24 Stunden Reifung näher untersucht. Weiter haben wir das Wachstumsverhalten dieser Keime in Abhängigkeit der Impfmenge während der Käsereifung eingehend untersucht.

2. Material und Methode

Die Bakterien wurden nach der früher beschriebenen Methode (1) aus 2,0 g Käse isoliert. In einigen Fällen wurde dem Extraktionsmedium 1% Tween-80 oder Triton X-100 hinzugefügt. Die Extraktionsdauer betrug normalerweise drei Minuten, in einigen Fällen wurde aber auch eine Extraktionszeit von 20 Minuten angewendet. Die Bakterien wurden bei 30°C während 8 Tagen unter anaeroben Bedingungen wachsen gelassen. Die Propionsäurebakterien wurden mikroskopisch sowie mittels Katalasetest identifiziert. Im Falle einer unklaren Identifikation wurde eine serologische (3) oder elektrophoretische (1) Nachweismethode angewendet. Letztere geschah durch elektrophoretische Auftrennung des Bakterienextraktes und Vergleich des Elektropherogrammes mit denjenigen von Referenzstämmen. Die Bakterienisolation aus den braunen Tupfen geschah gemäss oben beschriebener Methode. Die Keime aus diesen Isolaten erwiesen sich als reine *P. freudenreichii*. Um eine Kontamination sicher auszuschliessen, wurden vor der Herstellung der Impfkultur zwei Passagen durchgeführt.

Die Versuchs-Emmentalerkäse wurden aus 120 Liter Milch hergestellt. Die Zahl der bei der Fabrikation hinzugefügten Propionsäurebakterien wurde durch entsprechende Verdünnung der Propionsäurebakterien-Versandkultur der FAM (P-Kultur; Gemisch von 6 *P. freudenreichii*-Stämmen) gewonnen. Die genaue Keimzahl wurde durch Bestimmung der „KBE“ (Koloniebildende Einheit) berechnet. Für den Versuch wurden in zwei Serien Versuchskäse fabriziert. In einer Serie wurden während drei Tagen 6 Käse je Tag hergestellt, so dass für den gesamten Versuch 36 Versuchskäse hergestellt wurden. Aufgrund der Resultate der ersten Serie wurden die Fabrikationsbedingungen für die zweite Serie modifiziert. Verschiedene Analysen wurden ebenfalls an 18 Käsen durchgeführt, die zu anderen Zwecken hergestellt wurden. In den Kontrollkäsen betrug die den 120 Liter Milch zugefügte Zahl der Propionsäurebakterien $5 \cdot 10^7$.

3. Resultate und Diskussion

Einfluss der Extraktionsmethode auf die nachgewiesene Keimzahl in 24-stündigen Käsen

Die in einem 24stündigen Käse nachgewiesenen Propionsäurebakterien-Zahl ist nur von der eingesetzten Impfmenge und der sich in der Milch anwesenden Propionsäurebakterien abhängig. Dabei ist zu

Tabelle 1: Einfluss des Mediums und der Extraktionstechnik eines 24stündigen Käses auf die nachweisbare Keimzahl

| | | | | |
|-------------------------|----------------------|------------------------|-----------|-----------|
| FAM-Citrat | Skalpelli | 600/1400 ¹⁾ | 1100/1800 | 1600/2800 |
| | Knoblauch- presse | 700/1100 | 1100/1400 | 1000/1400 |
| FAM-Citrat +Tween 1% | Skalpelli | 1600/2900 | 2400/2200 | 1300/1500 |
| | Knoblauch- presse | 300/1500 | 800/900 | 400/900 |
| FAM-Citrat +Triton | Skalpelli | 1200/400 | 1300/1100 | 900/1300 |
| | Knoblauch- presse | 200/500 | 100/800 | 400/900 |

¹⁾ Die zwei Ziffern stellen die Resultate aus zwei Serien von Käsen dar.

beachten, dass einzig diejenigen Keime, die im Bruch die Fabrikationsbedingungen überlebt haben, nachgewiesen werden können. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Wachstum stattgefunden hat, ist die Keimzahl recht gering. Aus diesem Grunde muss eine Extraktionsmethode angewendet werden, die es ermöglicht, in den 2 g Probenmaterial möglichst alle vorhandenen Keime nachzuweisen. Aus diesem Grunde wurden zwei Extraktionsmethoden, verschiedene Solubilisierungszeiten sowie verschiedene Extraktionsmedien ausgetestet. Die Resultate dieser Experimente sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass aus bakteriologischer Sicht und unter Berücksichtigung der sehr niedrigen Zahl von Keimen in 2 g 24stündigem Käse weder das Extraktionsmedium noch die Extraktionsmethode die nachgewiesene Keimzahl signifikant beeinflussen (Tab. 1). Weiter scheint es, dass

die Keime nicht agglutinieren, da die Zugabe von Tween oder Triton die auf die Oberflächenspannung der Zellen wirken, keinen Einfluss hat. Ebenso wenig scheint das Auflösen der Micellen einen Einfluss auf die Abtrennung der Bakterien vom Kasein auszuüben, da das Citrat, das durch Bindung der Ca-Ionen die Auflösung des Kaseins fördert, die Resultate auch nicht beeinflusst. Diese Resultate sind deshalb bemerkenswert, weil die Extraktionszeit keinen Einfluss hat (Tab. 2), obschon makroskopisch betrachtet nach 20 Minuten Extraktionszeit keine Kasein-Partikel mehr feststellbar sind und die Lösungen nach Behandlung mit der Knoblauchpresse klarer erschienen als jene nach Entnahme mit dem Skalpell. Diese Resultate zeigen zudem, dass die Propionsäurebakterien während der Käsefabrikation in Kasein-Matrix eingeschlossen sind, so dass sie nicht mit der Molke entfernt werden. Sobald aber im

Tabelle 2: Einfluss der Extraktionszeit eines 24stündigen Käses auf die nachweisbare Propionsäurebakterien-Keimzahl

| Extraktions- medium | Extraktions- technik | Extraktionszeit (min) | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----|------|------|
| | | 3 | 6 | 12 | 20 |
| | | KBE / g Käse | | | |
| FAM mit Citrat | Skalpelli | 500 | 600 | 1400 | 1300 |
| | Knoblauch- presse | 700 | 700 | 400 | 600 |
| FAM ohne Citrat | Knoblauch- presse | 700 | 400 | 500 | 500 |
| FAM mit Citrat und Tween | Skalpelli | 900 | 400 | 700 | 900 |
| | Knoblauch- presse | 500 | 700 | 900 | 600 |

Laufe der Probenaufbereitung Änderungen in der Umgebung auftreten wie z.B. Auflösen der Kaseingallerte, Temperatur-, pH- oder Ionenstärke-Veränderungen, werden die Propionsäurebakterien freigesetzt.

Verteilung der Propionsäurebakterien während der verschiedenen Fabrikationsphasen

Die Tabelle 3 zeigt die Anzahl Bakterien, die nach Einimpfen von $5 \cdot 10^7$ Keimen pro 120 Liter Milch später in der Molke, im Bruch sowie im 24stündigen Käseteig nachgewiesen wurde. Daraus ist ersichtlich, dass die Anzahl der in der Molke nachgewiesenen Propionsäurebakterien gegenüber der zugefügten Menge verschwindend klein ist. Dies lässt vermuten, dass sich der grösste Teil der Propionsäurebakterien an das Kasein der Kessimilch adsorbiert. Dieses Resultat wird durch die Berechnung der Gesamtkeimzahl in einem 24stündigen Käse bestätigt, die mit den eingepfunden $5 \cdot 10^7$ Keimen sehr gut übereinstimmt (Tab. 3). In einer zweiten Untersuchungsserie mit 18 Käsen und einer dritten mit 9 Käsen der Sommer- und 9 Käsen der Winter-Produktion konnten diese Resultate bestätigt werden. Aus den Untersuchungen

Tabelle 3: Anzahl nachgewiesener Propionsäurebakterien und Anzahl berechneter Keime im 24stündigen Käse

| Käse-Nr. | Kessimilch KBE / ml | Molke KBE / ml | Bruch KBE/g·10 ³ | 24std Käse KBE/g·10 ³ | Käsege- gewicht (kg) | Total im 24std Käse KBE/g·10 ⁷ |
|----------|------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|
| 1 | 800 | 80 | 2,6 | 3,2 | 10,3 | 3,30 |
| 2 | 900 | 40 | 2,5 | 3,0 | 10,5 | 3,15 |
| 3 | 1100 | 70 | 2,3 | 2,6 | 10,5 | 2,73 |
| 4 | 1200 | 60 | 2,4 | 4,0 | 10,5 | 4,20 |
| 5 | 1200 | 60 | 2,4 | 3,8 | 10,5 | 4,00 |
| 6 | 900 | 80 | 3,7 | 4,0 | 10,5 | 4,20 |
| 7 | 1100 | 60 | 4,5 | 2,5 | 10,9 | 2,70 |
| 8 | 800 | 100 | 3,6 | 2,7 | 10,7 | 2,9 |
| 9 | 1000 | 70 | 3,9 | 2,1 | 10,9 | 2,29 |
| 10 | 1300 | 100 | 3,4 | 3,5 | 10,7 | 3,74 |
| 11 | 1300 | 130 | 3,0 | 3,4 | 10,7 | 3,64 |
| 12 | 1400 | 110 | 3,2 | 2,9 | 10,7 | 3,10 |
| 13 | 600 | 90 | 4,3 | 3,2 | 9,9 | 3,17 |
| 14 | 800 | 80 | 2,5 | 2,9 | 9,75 | 2,82 |
| 15 | 500 | 80 | 3,4 | 2,5 | 9,8 | 2,45 |
| 16 | 300 | 60 | 3,0 | 2,8 | 9,75 | 2,73 |
| 17 | 400 | 70 | 3,6 | 5,4 | 10,0 | 5,40 |
| 18 | 400 | 90 | 3,2 | 4,5 | 10,0 | 4,50 |

* Theoretisch berechnete Werte in Funktion der im 24stündigen Käse nachgewiesenen Keime sowie des Käsegewichtes. Diese Werte sind zu vergleichen mit der eingepfunden Keimzahl (10^7 Keime / Kessi à 120 Liter Milch)

kann geschlossen werden, dass die angewendete Extraktionsmethode zum Nachweis der geringen Anzahl Propionsäurebakterien in 2 g Käse zuverlässige Resultate liefert. Weiter kann aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Titerbestimmung in den 54 untersuchten Käsen geschlossen werden, dass die Verteilung der Propionsäurebakterien im 24stündigen Käseteig gleichmässig ist.

Wachstumsverhalten der Propionsäurebakterien im Käse in Abhängigkeit der eingepfunden Keimzahl

Abbildung 1 zeigt das Wachstum der Propionsäurebakterien in Modellkäsen in Funktion der eingepfunden Keimzahl. Daraus geht hervor, dass je grösser die eingepfunde Keimzahl war umso später die exponentielle Wachstumsphase eintrat. Bei 10 Keimen/g Käse beginnt die exponentielle Wachstumsphase nach ca. 6 Tagen. Wegen der relativ langen Generationszeit dauert es über 20 Tage, bis bei einer Anfangskeimzahl von $3 \cdot 10^5$ KBE/g Käse eine Vermehrung beobachtet werden kann. Je höher die Zahl der Propionsäurebakterien im Käse, umso rascher wird das Laktat aufgebraucht. Bei einer Konzentration von ca. 10^9 KBE/g Käse erreicht die Wachstumskurve ein Plateau. Die drei Kurven der Figur 1 zeigen dieses Phänomen auf: werden 100 mal weniger Keime als im Kontrollkäse eingepfunden ($3 \cdot 10^5$ anstelle von $3 \cdot 10^7$), dauert es anstelle von 60 deren 90 Tage, um das Ende des exponentiellen Wachstums zu errei-

chen. Weiter geht aus den Kurven hervor, dass unabhängig von der eingepfunden Keimmenge bei ca. 10^9 KBE/g Käse ein Plateau erreicht wird. Die Versuche zeigten ebenfalls, dass die braunen Tupfen im Käse, bei einer Einsaat von $3 \cdot 10^5$ Keimen, ab dem 90. Tage erscheinen. In zwei weiteren ähnlichen Versuchsserien, deren Resultate hier nicht enthalten sind, konnte dies bestätigt werden. Es ist somit möglich, das Auftreten von braunen Tupfen in Emmentalerkäse durch Einimpfen von nur einer kleinen Zahl von Propionsäurebakterien zu induzieren.

Bedingungen für das Auftreten von braunen Tupfen im Käse

Tabelle 4 fasst die Resultate der durchgeführten drei Versuchsserien zusammen. In jeder Versuchsserie wurden drei Propionsäurebakterien-Kulturen unterschiedlicher Herkunft in je zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Ziel dieser Versuche war einerseits die Ermittlung der Propionsäurebakterien-Konzentration, die für das Erscheinen der braunen Tupfen notwendig ist und andererseits um abzuklären, ob Keime, isoliert aus braunen Tupfen, diesen Fehler leichter übertragen als die P-Kultur oder eine andere Propionsäurebakterien-Kultur. Für diese Versuche wurde der Stamm FAM-1409 ausgewählt, weil dieser in Laborversuchen vor dem Wachstum auf Laktat eine ausgesprochen lange Latenzzeit aufwies (2).

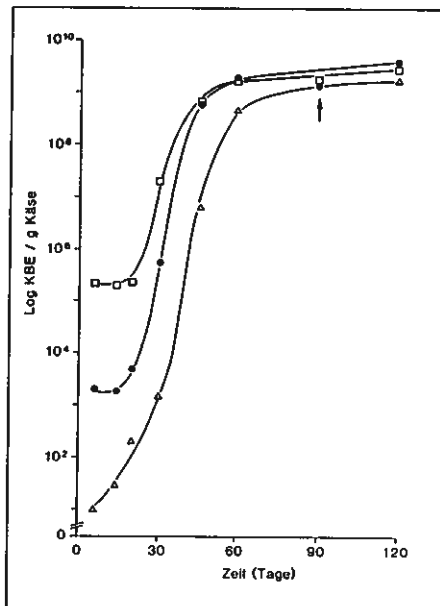


Abbildung 1:
Kinetik des Propionsäurebakterien-Wachstums in einem Versuchskäse in Abhängigkeit der beimpften Keimmenge. Anzahl Keime einer P-Kultur, die 120 Liter Milch zugesetzt wurden: $3 \cdot 10^5$ (Δ); $5 \cdot 10^7$ (\circ); $3 \cdot 10^9$ (\square). In der Praxis werden normalerweise $5 \cdot 10^7$ Keime in 120 Liter Milch eingepfunden. Erst bei einer Impfmenge von weniger als $3 \cdot 10^5$ Keimen pro 120 Liter Milch treten ab dem 90. Tage braune Tupfen auf (t).

Aus der Tabelle 4 geht hervor, dass die Resultate der drei Serien sehr ähnlich und somit reproduzierbar sind. Gemäss Figur 2, die die Resultate der 2. Serie wieder gibt, stellt man fest, dass der Zeitpunkt des Wachstumsbeginns keinen Einfluss auf das Auftreten von braunen Tupfen hat. So hat am 30. Tag eine 100 mal kleinere Konzentration an FAM-1409 Keimen keinen Einfluss auf die Bildung von braunen Tupfen um den 120. Tag. Einzig die eingepflichte Keimzahl ist für das Erscheinen der braunen Tupfen verantwortlich. Eine Keimzahl unterhalb von $5 \cdot 10^2$ KBE pro g Käse nach 24 Stunden (entspricht einer um das 10-fach kleineren Impfmenge als normal) führt zur Tupfenbildung. Alle diese mit Modellkäsen erhaltenen Resultate konnten in der Praxis mit einem Emmentalerkäse bestätigt werden. Nach dem Einimpfen von $2,5 \cdot 10^6$ Keimen der P-Kultur in 1000 L Milch traten nach 90 Tagen Reifung braune Tupfen auf.

In Tilsiter- und Appenzeler-Käse ist die Tupfenbildung ebenfalls bekannt. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese auch durch *P. freudenreichii* hervorgerufen werden.

4. Schlussfolgerung

Aufgrund der Analyse von 54 Emmentaler-Modellkäsen, bei welchen unterschiedliche Propionsäurebakterien-Stämme wie auch unterschiedliche Impfmengen verwendet wurden, gelang es uns, die Bedingungen, die zur Bildung von braunen Tupfen führen, zu ermitteln. Weiter konnten wir die bereits seit langer Zeit in der Literatur geäusserte Meinung bestätigen, dass es sich bei den braunen Tupfen um grosse Propionsäurebakterien-Kolonien handelt.

Die Resultate zeigen, dass es keine spezifische *P. freudenreichii*-Kultur gibt, die für die Bildung von braunen Tupfen verantwortlich ist. Weiter zeigten die Un-

tersuchungen, dass auch die P-Kultur braune Tupfen induzieren kann, wenn die Impfmenge an Propionsäurebakterien zu gering ist. Diese Resultate entsprechen den Beobachtungen von Sollberger (5). Dieser „Schönheitsfehler“ tritt nie auf, wenn mehr als $5 \cdot 10^2$ KBE pro g 24stündigem Käse vorhanden sind. Selbst wenn das Wachstum der Keime gegenüber der Norm um 20 Tage verzögert ist, treten nach 120 Tagen keine braunen Tupfen auf, wenn im 24stündigen Käse die Propionsäurebakterien-Dichte mehr als $5 \cdot 10^2$ KBE pro g betragen hat (Abbildung 2). Da bei der Emmentalerkäse-Herstellung ausreichend Propionsäurebakterien hinzugefügt werden, ist die Gefahr der Entstehung von braunen Tupfen geringer. Das Auftreten von braunen Tupfen kann somit durch Zufügen von grösseren Mengen an Propionibakterien verhindert werden.

BAKTERIENTITER IM LAUFE DER REIFUNG IN ABHÄNGIGKEIT DER EINGEIMPFTEN PROPIONSÄUREBAKTERIENZAHLE

| Stamm | Geimpfte KBE in 120 l | Kesselmilch KBE/ml | Käsealter (Tage) | | | | | Tupfen |
|------------------|-----------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------|--------|
| | | | 1 | 30 | 60 | 90 | 120 | |
| Serie I | | | | | | | | |
| P-Kultur | $4,1 \cdot 10^7$ | 500 | 5'100 | $3,0 \cdot 10^7$ | $1,5 \cdot 10^9$ | $1,0 \cdot 10^{10}$ | $6,5 \cdot 10^9$ | - |
| | $9,6 \cdot 10^5$ | 50 | 200 | $2,4 \cdot 10^7$ | $8,6 \cdot 10^8$ | $9,0 \cdot 10^9$ | $1,3 \cdot 10^9$ | + |
| FAM 1409 | $4,0 \cdot 10^7$ | 1'800 | 900 | $4,2 \cdot 10^7$ | $6,8 \cdot 10^8$ | $1,6 \cdot 10^{10}$ | $1,5 \cdot 10^9$ | - |
| | $1,04 \cdot 10^6$ | <10 | 80 | $6,2 \cdot 10^6$ | $6,0 \cdot 10^8$ | $4,3 \cdot 10^9$ | $1,2 \cdot 10^9$ | + |
| Tupfen-Keime | $4,0 \cdot 10^7$ | 1'200 | 10'000 | $3,2 \cdot 10^8$ | $5,7 \cdot 10^8$ | $2,2 \cdot 10^9$ | $1,6 \cdot 10^9$ | - |
| | $1,1 \cdot 10^6$ | 40 | 200 | $9,9 \cdot 10^7$ | $8,7 \cdot 10^8$ | $5,0 \cdot 10^9$ | $2,0 \cdot 10^9$ | + |
| Serie II | | | | | | | | |
| P-Kultur | $4,0 \cdot 10^7$ | 550 | 540 | $5,6 \cdot 10^6$ | $1,1 \cdot 10^9$ | $3,0 \cdot 10^9$ | $2,2 \cdot 10^9$ | - |
| | $2,7 \cdot 10^5$ | <10 | <10 | $1,4 \cdot 10^3$ | $1,3 \cdot 10^8$ | $9,0 \cdot 10^8$ | $1,0 \cdot 10^9$ | + |
| FAM 1409 | $1,12 \cdot 10^7$ | 1'070 | 3'300 | $2,4 \cdot 10^4$ | $4,8 \cdot 10^8$ | $3,1 \cdot 10^9$ | $1,8 \cdot 10^9$ | - |
| | $3,0 \cdot 10^5$ | 50 | 110 | $2,0 \cdot 10^2$ | $1,4 \cdot 10^8$ | $1,4 \cdot 10^{10}$ | $2,0 \cdot 10^8$ | + |
| Tupfen-Keime | $4,0 \cdot 10^7$ | 360 | 4'800 | $4,4 \cdot 10^6$ | $8,0 \cdot 10^8$ | $1,7 \cdot 10^9$ | $1,5 \cdot 10^9$ | - |
| | $3,7 \cdot 10^5$ | 20 | 20 | $2,8 \cdot 10^4$ | $2,5 \cdot 10^8$ | $1,5 \cdot 10^9$ | $1,2 \cdot 10^9$ | + |
| Serie III | | | | | | | | |
| P-Kultur | $4,6 \cdot 10^7$ | 330 | 600 | $1,04 \cdot 10^8$ | $2,1 \cdot 10^9$ | $2,8 \cdot 10^9$ | $2,1 \cdot 10^9$ | - |
| | $3,0 \cdot 10^5$ | <10 | <10 | $2,0 \cdot 10^7$ | $3,3 \cdot 10^8$ | $6,0 \cdot 10^8$ | $7,4 \cdot 10^8$ | + |
| FAM 1409 | $6,6 \cdot 10^6$ | 50 | 200 | $8,0 \cdot 10^5$ | $2,3 \cdot 10^8$ | $5,0 \cdot 10^8$ | $1,0 \cdot 10^9$ | + |
| | $2,4 \cdot 10^5$ | <10 | 10 | $3,8 \cdot 10^4$ | $8,0 \cdot 10^6$ | $1,5 \cdot 10^8$ | $2,0 \cdot 10^8$ | + |
| Tupfen-Keime | $4,18 \cdot 10^7$ | <10 | <10 | <10 | <100 | <100 | <100 | - |
| | $3,8 \cdot 10^5$ | <10 | <10 | <10 | <100 | <100 | <100 | - |

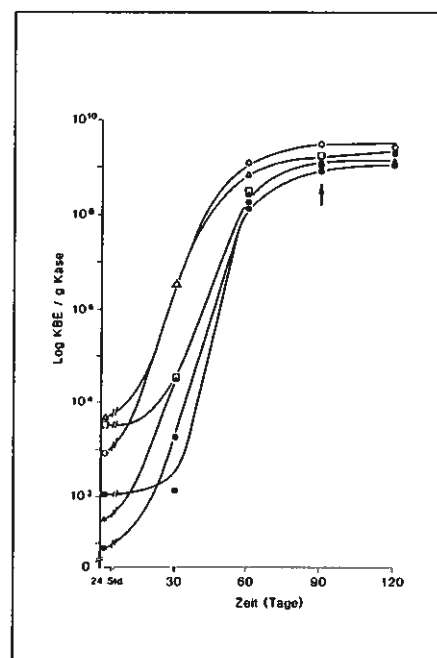


Abbildung 2

Einfluss der Zahl an Propionsäurebakterien in einem 24stündigen Käse auf die Bildung von braunen Tupfen während der Reifung des Käses. Es wurden drei verschiedene Propionsäurebakterien-Stämme verwendet: P-Kultur (O); FAM-1409 (□) und Tupfenkeime (Δ). Ausgefüllte Symbole: weniger als $5 \cdot 10^2$ Keime, offene Symbole: mehr als $5 \cdot 10^2$ Keime pro g 24stündigem Käse. Die braunen Tupfen erschienen ab dem 90. Tage (†) mit allen eingesetzten Stämmen, wenn der Initialtiter weniger als $5 \cdot 10^2$ betrug (ausgefüllten Symbolen).

5. Dank

Die Autoren danken Herrn Dr. Fürst für die kritische Durchsicht und die Uebersetzung des Manuskripts.

6. Literatur

1. BAER, A.

Identification and differentiation of propionibacteria by electrophoresis of their proteins. *Milchwissenschaft* 42, (7) 431 (1987)

2. BAER, A. et RYBA, I.

Les points bruns dans le fromage. Rapport interne 24/89, Biochemie (1989)

3. BAER, A. and RYBA, I.

Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples. *International Dairy Journal*, 2, (5), 299. (1992)

4. BURRI, R.

Ueber das Vorkommen relativ grosser Bakterienkolonien in fehlerhaftem Emmentalerkäse. *Zentralbl. für Bakteriologie. Abteilung II, Bd. IV*, 608 (1898).

5. H.SOLLBERGER, H.

Einfluss der P-Kultur bei 2 verschiedenen Ausziehtemperaturen. Interner Bericht Nr. 40 Forschungsanstalt f. Milchwirtschaft, Liebefeld (1987).

6. THÖNI, F. und ALLEMANN, D.

Ueber das Vorkommen von gefärbten, mikroskopischen Bakterienkolonien in Emmentalerkäse. *Zentralbl. für Bakteriologie* 25, 8 (1910)

Résumé

Etude sur l'apparition des points bruns dans les fromages

A. Baer, I. Ryba et M. Grand.

Schweiz. Milchw. Forschung 22 (1) 3-7 (1993)

Les conditions nécessaires à l'apparition des points bruns dans les fromages ont été déterminées grâce à des expériences pratiques réalisées sur 54 fromages d'essai type Emmental. En variant les quantités de germes propioniques ensemencés, l'apparition des points bruns a pu être provoquée. Les résultats obtenus, très reproductibles, ont confirmé des analyses anciennes, qui montraient que chaque point était constitué d'une seule colonie de bactéries propioniques. Nous avons établi qu'il s'agissait de *P. freudenreichii*. Toutes les souches des bactéries propioniques utilisées ont provoqué ce défaut,

La détermination du rapport entre le nombre de germes ensemencés et le

nombre de germes retrouvés dans le fromage de 24 heures a mis en évidence qu'il n'y avait presque aucune perte des bactéries dans le petit lait, les bactéries propioniques restant adsorbées au caillé. L'étude de la cinétique de croissance des bactéries a montré que le début de la phase exponentielle pouvait varier d'une vingtaine de jours sans que cela n'influence l'apparition des points bruns. Par contre, ce défaut est apparu dans tous les fromages dont l'ensemencement était inférieur à $5 \cdot 10^2$ germes par g de fromage de 24 heures. Après 120 jours de maturation, le nombre de bactéries propioniques par g de fromage a toujours été compris entre 10^9 et 10^{10} , quelle que soit la quantité de germes ensemencés.

On peut conclure que l'apparition des points bruns dans les fromages est uniquement due au nombre des bactéries propioniques, présentes au moment de la fabrication des fromages. Les points apparaissent dès que l'ensemencement est environ 100 fois inférieur à l'ensemencement habituellement utilisé pour un fromage d'Emmental.

Summary

Study on the appearance of brown-spotting in cheese

A. Baer, I. Ryba and M. Grand.

Schweiz. Milchw. Forschung 22 (1) 3-7 (1993)

The conditions which lead to the occurrence of brown spots in cheese were determined by means of practical experiments performed on 54 small Emmental cheeses. It was possible to induce the

appearance of brown spots by varying the amount of propionibacteria added to the cheese milk. The results obtained were reproducible and confirmed those performed early this century, which showed that each brown spot was a single colony of propionibacteria. These bacteria were identified as *P. freudenreichii*. All strains of propionibacteria used brought about this fault.

The ratio of the bacteria added to the milk to the number of bacteria found in 24 h cheese showed that almost no bacteria were lost in the whey since they were retained in the curd.

The growth kinetics of the bacteria showed that the onset of the exponential phase could vary by about twenty days without influencing the appearance of brown-spots. However, the fault appeared in every cheese whose propionibacteria count was below $5 \cdot 10^2$ CFU per g of 24 h cheese. After 120 days of ripening the number of propionibacteria per g of cheese always ranged between 10^9 and 10^{10} , independently of the amount of bacteria added to the milk.

From the results obtained, it may be concluded that the formation of brown spots in cheeses is due to the low levels of propionibacteria added. Brown spots always appear as soon as the amount of bacteria added is approximately 100 times less than the amount usually used in Emmental cheese manufacture.