

# Lebensmit

## Screening-Methode und Lipolyse: Übertragbarkeit auf Käse

Dino Isolini und Marie-Therese Fröhlich-Wyder, Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld (FAM), CH-3003 Bern  
Auskünfte: Dino Isolini, E-Mail: Dino.Isolini@fam.admin.ch, Fax +41 (0)31 323 82 27, Tel. +41 (0)31 323 82 59

### Zusammenfassung

**Mit einer einfachen Methode basierend auf der Bebrütung der Zellen in Milchfett und der anschliessenden Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren sind sechs Stämme von Propionsäurebakterien bezüglich ihrer lipolytischen Aktivität auf Laborstufe differenziert worden. Die Produktion von Versuchskäsen mit den untersuchten Stämmen hat bestätigt, dass hauptsächlich die Propionsäurebakterien für die Lipolyse in Emmentaler verantwortlich sind, und dass die lipolytische Aktivität in Käse tatsächlich stammspezifisch ist. Es besteht eine schwache Korrelation zwischen den mit der angewandten Screening-Methode erhaltenen Ergebnissen und den Resultaten im Käse. Es hat sich nochmals gezeigt, dass zwar die Vorselektionen auf Laborstufe wichtig ist, die Käseversuche aber massgebend bleiben.**

Durch die Lipolyse (Fettspaltung) werden im Käse Fettsäuren freigesetzt. Die verantwortlichen Enzyme sind Lipasen und Esterasen.

Da nur freies verfügbares Fett gespalten werden kann, spielt die Schädigung der Fettkügelchenmembran durch thermische und mechanische Belastung in der Ausgangsmilch bei der Lipolyse im Käse eine wichtige Rolle.

Eine zu starke Lipolyse ist nicht erwünscht, da der Käse damit ranzig wird; wenn aber die Spaltprodukte in der richtigen Menge vorliegen, können sie das Aroma entscheidend mitprägen (Bachmann 1998). Die freien Fettsäuren werden weiter in  $\beta$ -Keton-säuren und Methylketone umgewandelt, welche geschmacks- und geruchsintensiv sind (Kammerlehner 1977). Bei Rohmilchkäse stammen die Lipasen hauptsächlich aus der Milch selber (bei nicht hoch gebrannten Käsen) und aus der Rohmilchflora (hitzeresistente Lipasen) (Bachmann 1998).

Die lipolytische Aktivität der Milchsäurebakterien ist langsam und schwach; die entsprechenden Enzyme sind oft intrazellulär lokalisiert und werden erst nach der Zellyse freigesetzt. Im Hinblick auf die Lipolyse spielen die Milchsäurebakterien nur bei länger gereiften Käsen eine Rolle (Law 1984).

Die Lipolyse kann eine wichtige Rolle bei der Bildung von Aroma und Geruch in verschiedenen Käsesorten spielen: im Falle von Blauschimmel-Käse, durch die lipolytische Aktivität des Schimmels; bei langgereiften Parmigiano und Grana, durch die Lipolyse der Milchsäurebakterien (Bachmann 1998).

Im Emmentaler ist der Beitrag der Propionsäurebakterien bei der Lipolyse von zentraler Bedeutung (Bachmann 1998). Die lipolytische Aktivität dieser Keime scheint stammabhängig zu sein (Chamba und Perreard 2002).

Da die Propionsäurebakterien bei der Fabrikation von Emmen-

taler einen unverzichtbaren Teil darstellen, kann es von technologischem Interesse sein, die Lipolyse durch diese Keime zu beeinflussen. Um die Selektion von Stämmen mit hoher lipolytischer Aktivität zu erleichtern oder überhaupt zu ermöglichen, wäre es von zentraler Bedeutung, eine Screening-Methode auf Laborstufe zu entwickeln. Für die Forschung ist diese Vorselektion wesentlich, um mit ausgewählten Stämmen, welche die gewünschte Eigenschaft besitzen, Käseversuche durchzuführen.

Verschiedene Methoden werden zu diesem Zweck in der Literatur beschrieben. Sie basieren hauptsächlich auf zwei Prinzipien: die Bebrütung der Mikroorganismen in käseähnlichem Milieu (Ur-Rehman *et al.* 1998, Roberts *et al.* 1995, Jollivet *et al.* 1994) und die Bebrütung mit Triglyceriden oder Milchfett (Dupuis *et al.* 1993, Kakariari *et al.* 1998).

Ziel dieser Arbeit war, verschiedene Stämme von Propionsäurebakterien aufgrund ihrer lipolytischen Aktivität mit einer einfachen Methode auf Laborstufe zu differenzieren. Wie oben erwähnt, sind stammspezifische Unterschiede zu erwarten. Durch Käseversuche wollten wir anschliessend überprüfen, ob die Resultate dieses Screenings auf den Käse übertragbar sind, und ob die Lipolyse in Käse durch gefundene stammspezifische Unterschiede beeinflussbar ist.

Die von uns ausgewählte Methode basiert auf der Bebrütung der

Bakterienzellen in Milchlief und der anschliessenden Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren.

### Screening auf Laborstufe

Die Bakterien werden unter optimalen Bedingungen gezüchtet und anschliessend zweimal in Natrium-Phosphat-Puffer (0.1 M, pH 7.0) gewaschen. Die Zellen werden im gleichen Puffer resuspendiert; dabei wird die Konzentration durch Messung der Extinktion eingestellt.

Als Milchlief wird sterile bei 42°C verflüssigte eingesottene Butter verwendet.

Zu 100 mL Butter werden 20 mL Bakterien suspension zugegeben und gut gemischt. Die Emulsionen werden unter Rühren bei 4°C erstarren gelassen und anschliessend bei der für die Bakterien optimalen Temperatur bebrütet (30°C für Propionsäurebakterien; 20°C für *Pseudomonas aeruginosa*, 38°C für *Lactobacillus*).

*Pseudomonas* und *Lactobacillus* werden als positive beziehungsweise als negative Kontrolle eingesetzt.

Als Blindwert wird eine Emulsion von Puffer und Butter verwendet.

Die durch die lipolytische Aktivität der Bakterien in Butter freigesetzten Fettsäuren (FFS) werden nach verschiedenen Bebrütungszeiten mittels Gaschromatographie bestimmt (Collomb *et al.* 2003).

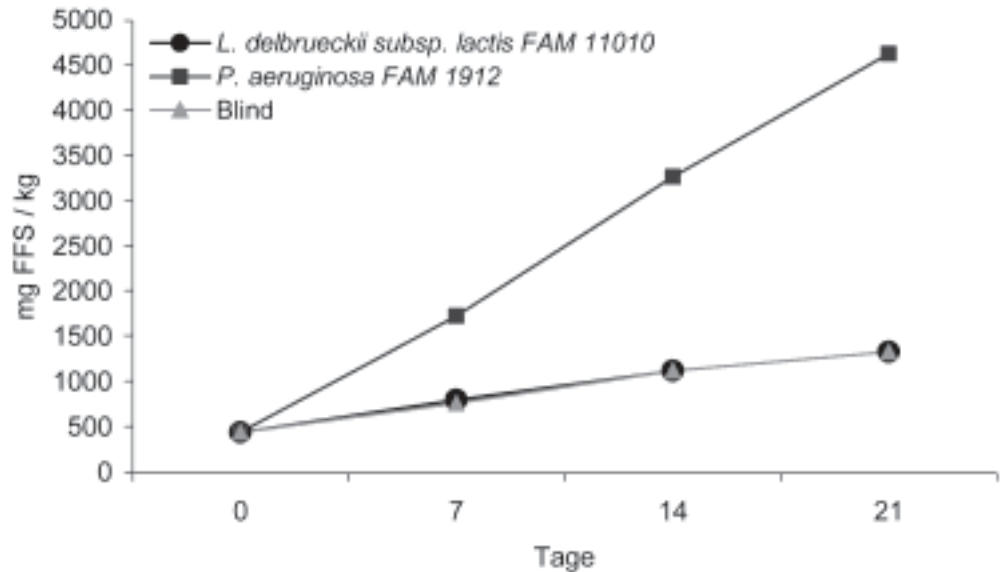


Abb. 1. Bildung von freien Fettsäuren (C4-C20) in steriler Butter (Blind) und durch *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* während der Bebrütung bei 30°C.

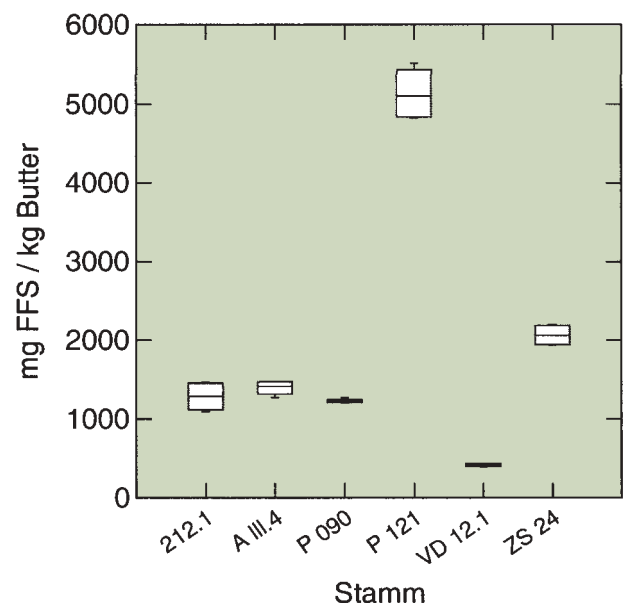
In der sterilen nicht beimpften Butter nimmt die Konzentration der FFS über die Zeit konstant zu (Abb. 1). Die Freisetzung der Fettsäuren ist nicht auf die Wirkung von mikrobiellen oder milcheigenen Lipasen zurückzuführen, da die Butter mit Hitze sterilisiert wurde. Es ist anzunehmen, dass eine Hydrolyse in der wässrigen Phase stattfindet.

Mit dieser Methode ist es möglich, Bakterien auf ihre lipolytische Aktivität zu screenen. (Abb. 1) Erwartungsgemäss zeigt *Pseudomonas aeruginosa* im Gegensatz zu *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* eine gewisse lipolytische Aktivität.

Die Abbildung 2 zeigt die Resultate der Untersuchungen nach 35 Tagen Bebrütung von vier Stämmen von *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* (P121, P090, ZS24 und 212.1) und zwei Stämmen von *Propio-*

*nibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii* (AIII4 und VD12.1). Mit einem n = 5 ist die Reproduzierbarkeit im Labor gut. Die sechs untersuchten Stämme lassen sich gut trennen, mit der Voraussetzung, dass die Unterschiede nicht unter 100 mg/kg

Abb. 2. Bildung von freien Fettsäuren (C4-C20) durch verschiedene Stämme von Propionsäurebakterien in beimpfter Butter nach 35 Tagen bei 30°C (n = 5) (Blindwert abgezogen).



**Tab. 1. FFS als Prozentualanteil der gesamten FFS in Butter (Mittelwerte n=5)**

FFS		Stamm					
		% der gesamten FFS					
		212.1	VD12.1	P121	ZS24	All.4	P090
n-Butansäure	nC4	3,6	<b>7,4</b>	1,8	2,4	2,8	2,8
n-Hexansäure	nC6	1,6	<b>3,0</b>	1,2	1,4	1,7	1,5
Octansäure	C8	1,5	1,7	1,0	1,4	1,5	1,5
Decansäure	C10	2,8	<b>4,2</b>	2,1	2,4	2,6	2,7
	<i>Total C4 bis C10</i>	9,5	<b>16,3</b>	6,1	7,6	8,6	8,5
Decensäure	C10:1	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3
Dodecensäure	C12	4,3	5,9	3,6	4,1	4,4	4,4
Dodecensäure + aiso-Dod,	C12:1 + C12 aiso	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3
Iso-Tridecensäure	C13 iso	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Tetradecensäure	C14	12,6	13,9	10,7	12,0	12,9	11,8
Tetradecensäure + Iso Tet,	C14:1 + C14 iso	1,5	2,2	1,2	1,4	1,5	1,4
aiso-Tetradecensäure	C14 aiso	1,4	<b>3,8</b>	0,7	0,9	1,0	1,4
Pentadecensäure	C15	1,4	1,3	1,2	1,3	1,4	1,3
Pentadecensäure + Iso-Pen,	C15:1 + C15 iso	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Hexadecensäure	C16	31,3	<b>25,2</b>	31,4	31,0	31,0	30,6
Hexadecensäure	C16:1	2,2	1,8	2,2	2,4	2,4	2,4
Iso-Hexadecensäure	C16 iso	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6
aiso Hexadecensäure	C16 aiso	0,7	0,9	0,5	0,6	0,6	0,6
Heptadecensäure	C17	0,7	1,3	0,8	0,7	0,7	0,9
Heptadecensäure	C17:1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
Octadecensäure	C18	6,0	5,2	8,6	6,9	6,2	6,3
Octadecensäure	C18:1	22,2	<b>16,8</b>	26,4	24,5	22,9	24,0
Octadecadiensäure	C18:2	2,5	2,1	2,8	2,8	2,8	2,8
Octadecatriensäure	C18:3	0,7	0,1	0,5	0,7	0,7	0,7
Konjugierte Fettsäuren	Konj, FS	1,2	1,0	1,5	1,2	1,1	1,1
Eicosensäure	C20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

liegen. Die Stämme P121, VD12.1 und ZS24 unterscheiden sich deutlich voneinander und von der Gruppe der übrigen drei Stämme.

Bei Betrachtung des relativen Anteils der einzelnen FFS ist ersichtlich, dass keine grossen Unterschiede bezüglich spezifischer Lipaseaktivität bestehen (Tab. 1). Die prozentualen Anteile der freigesetzten Fettsäuren unterscheiden sich nicht zwischen den Stämmen. Einzig beim Stamm VD12.1 ist der Anteil an FFS C4 bis C10 etwas höher als bei den übrigen Stämmen. Diese Tendenz wird im Käse bestätigt (Resultate hier nicht dargestellt). Dies könnte auf einen gewissen

Unterschied der Spezifität zurückgeführt werden.

### Käsereiversuche

Zwei Versuche wurden mit den im Labor untersuchten Stämmen durchgeführt: ein Modellversuch und ein Versuch im Massstab 1:1.

Beim Modellversuch handelte es sich um Emmentaler-Käse aus je 100 Litern pasteurisierter Milch. Diese sind in der Modellkäserei in Liebefeld fabriziert und gereift worden. Als Propionsäurebakterien-Kulturen wurden die sechs auf Laborstufe untersuchten Stämme eingesetzt; als Kontrolle wurde ein Käse ohne Propionsäure-

bakterien fabriziert. Der Versuch ist drei Mal wiederholt worden (n = 3).

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, dass die Lipolyse bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich verläuft, und dass sich die Versuchskäse nach 180 Tagen in ihrem FFS-Gehalt deutlich unterscheiden. Die Schwankungen innerhalb der Parallelproben sind jedoch relativ gross (siehe Abb. 4). Diese Resultate zeigen, dass die lipolytische Aktivität der Propionsäurebakterien stammabhängig ist, wie dies schon auf Laborstufe deutlich zum Vorschein kam und von Chamba und Perreard 2002 postuliert wurde.

Das Wachstum vom Stamm VD12.1 ist für einen normalen Emmentaler-Käse ungenügend. Nach 180 Tagen war die Keimzahl um eine Potenz tiefer als bei den anderen Stämmen (Resultate der Keimzahl-Bestimmungen hier nicht wiedergegeben). Im Kontrollkäse bleibt die Konzentration der FFS während der gesamten Reifungsperiode praktisch unverändert, was den Einfluss der Propionsäurebakterien auf die Lipolyse in Emmentaler-Käse bestätigt.

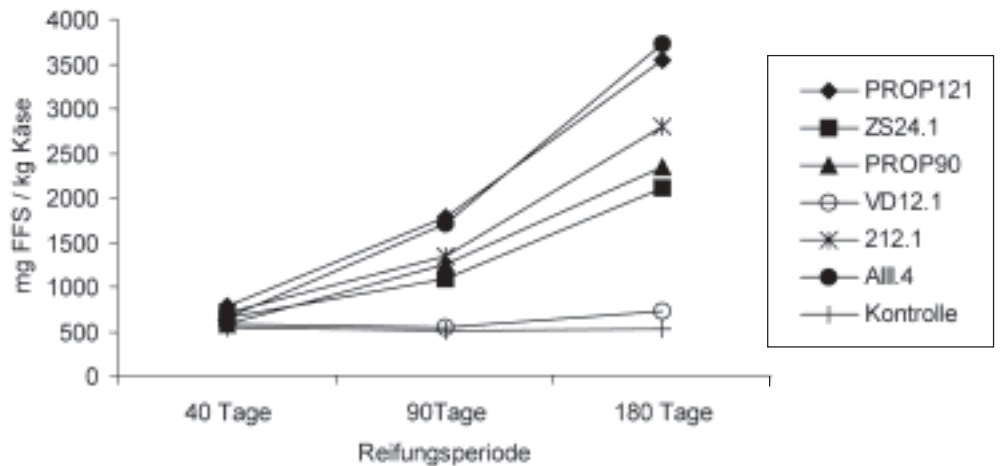


Abb. 3. Zunahme des Gehaltes an freien Fettsäuren- im Emmentaler hergestellt mit verschiedenen Stämmen von Propionsäurebakterien während der Reifung (Mittelwerte, n=3).

Die Käse unterschieden sich bezüglich Aromaintensität nicht signifikant; die Benotung der Aroma zeigt jedoch gewisse signifikante Unterschiede innerhalb der Stammvarianten. Es treten ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich Lochung auf (Tab. 2).

Auch die Käse dieses Versuches weisen nach 180 Tagen einen unterschiedlichen FFS-Gehalt auf und bestätigen damit die Resultate des Modellversuches (Abb. 5). Die Werte in den Rohmilchkäsen sind im Allgemeinen höher als diejenige in den Modellkäsen aus pasteurisierter Milch. Dies kann auf die lipolytische Aktivität der Rohmilchflora zurückgeführt werden.

Die Tatsache, dass die Gärungsintensität der Propionsäurebakterien die Stärke der Lipolyse im Käse beeinflusst (Bachmann 1998), könnte die Unterschiede zwischen den Resultaten im Labor und denjenigen in Käse erklären. Allfällige Unterschiede in der Gärintensität, welche im

Beim Versuch im Massstab 1:1 handelt es sich um Emmentaler aus Rohmilch, welche in der Versuchskäserei in Uetligen fabriziert und gereift wurden. Als Propionsäurebakterien wurden dieselben sechs Stämme eingesetzt, es ist jedoch kein Kontrollkäse ohne Propionsäurebakterien fabriziert worden.

#### Aussagekraft der Screening-Methode

Beim Vergleich der Resultate in Butter mit denjenigen im Käse (Abb. 4) ist eine gewisse Korre-

lation für vier der sechs Stämme erkennbar. Wenn man aber die beiden Stämme 212.1 und AIII.4 in die Beurteilung mit einbezieht, ist diese Korrelation wieder stark in Frage gestellt, wobei auch letztere aufgrund der Screening-Resultate nicht verworfen wurden.

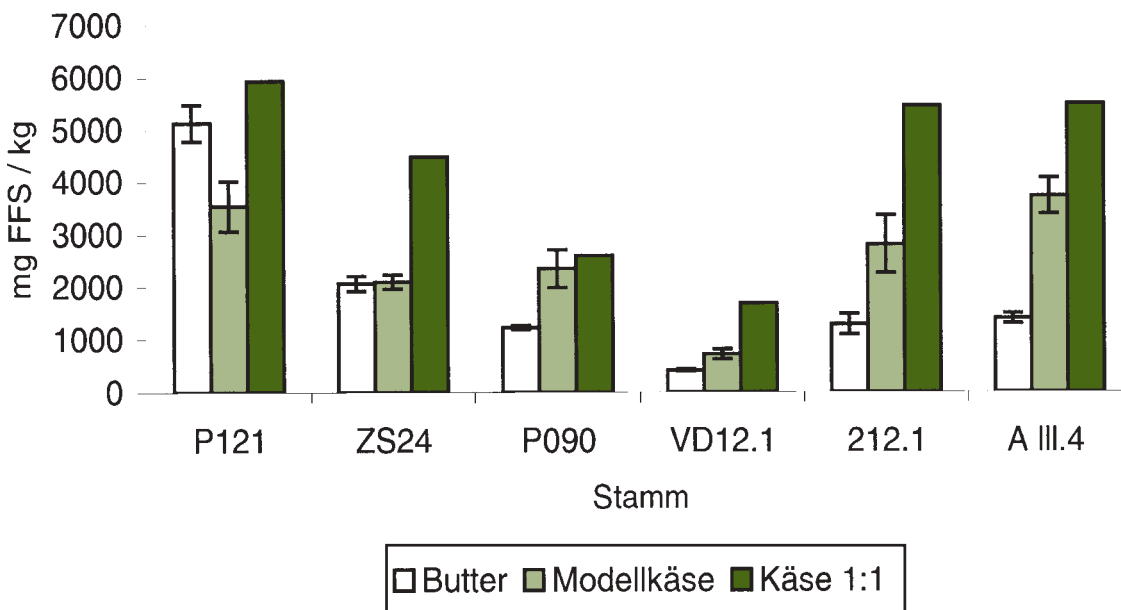


Abb. 4. Vergleich des Gehaltes an freien Fettsäuren (Mittelwerte) in Butter (n=5), Modellkäse (n=3) und Käse 1:1 (n=1) mit verschiedenen Stämmen von Propionsäurebakterien (Alter vom Käse: 180 Tage).

**Tab. 2 Resultate der Käsebeurteilung durch den Fachpanel**

Stamm		QNL		QNT		QNAr		ARI		FEA		Sues	
212,1	X	3,75	AB	4,58		3,50	B	4,92		1,58		1,58	A
	s	1,15		0,52		0,50		0,38		0,29		0,14	
All4	X	3,92	AB	5,17		4,42	A	5,17		1,25		1,67	A
	s	1,04		0,29		0,38		0,52		0,25		0,29	
Prop121	X	4,00	AB	4,92		3,83	AB	4,92		1,33		1,58	A
	s	1,39		0,38		0,80		0,14		0,29		0,29	
PROP90	X	4,50	A	5,00		3,75	AB	4,58		1,50		1,75	A
	s	0,75		0,00		0,25		0,52		0,25		0,00	
VD12,1	X	1,58	C	4,25		3,17	B	4,50		1,50		0,83	B
	s	0,38		0,50		0,14		0,50		0,25		0,14	
ZS24,1	X	2,42	BC	4,67		4,33	A	5,00		1,08		1,67	A
	s	0,38		0,38		0,29		0,43		0,29		0,14	
ANOVA		*		ns		*		ns		ns		***	

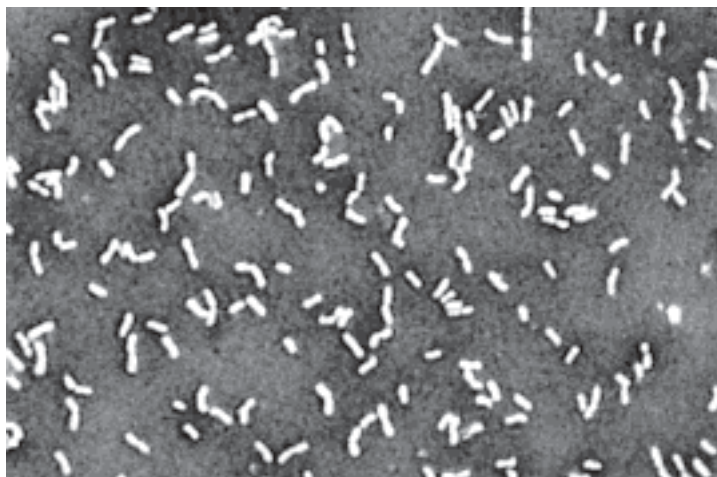
X = Mittelwert; s = Standardabweichung; ns = nicht signifikant\*)  $p \leq 0.05$ , \*\*)  $p \leq 0.001$  Paarweise Vergleich mit Fisher LSD Test  $p < 0.05$  Stamm: A > B > C oder AB = A und B QNL = Qualitätsnote Lochung; QNT = Qualitätsnote Teig; QNAr = Qualitätsnote Aroma; ARI = Aromaintensität; FEA = Fehler Aroma; Sues = Süssigkeit

Käse zum Ausdruck kommen können, werden bei dieser Screening-Methode nicht berücksichtigt, da dabei mit ruhenden Zellen gearbeitet wird.

Es ist oft schwierig, die Resultate eines Labor-Modells auf Käse zu übertragen (Bouton *et al.* 1994). Meistens machen die Autoren nur Angaben über die

Screening-Methode und nicht über deren Übertragbarkeit auf Käse (Ur-Rehman *et al.* 1998, Roberts *et al.* 1995, Jollivet *et al.* 1994, Dupuis *et al.* 1993, Kakariari *et al.* 1998). Trotzdem sind solche Methoden wichtig, um die Stämme zu differenzieren und damit eine erste grobe Selektion durchführen zu können. Massgebend bleiben jedoch die Resultate der Käseversuche. Es hat sich jedoch wieder einmal gezeigt, dass die Ergebnisse aus einem Modellversuch gut auf einen 1:1-Massstab übertragbar sind.

Konsequenz für die Zukunft: eine Vorselektion auf Laborstufe ist mit realitätsnahen Modellen tatsächlich möglich. Diese wird jedoch immer mit entsprechenden Käseversuchen bestätigt werden müssen.



**Abb. 5. Propionsäurebakterien unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 625 x).**

## Literatur

- Bachmann H.P., 1998. Lipolyse im Käse: nicht zu viel - nicht zu wenig. *Agrarforschung* **5** (6), 293-295.
- Bouton Y., Guyot P., Dasen A. et Grappin R., 1994. Activité protéolytique de souches de lactobacilles thermophiles isolées de levains et de Comté. II. Applications en sites industriels. *Lait* **74**, 1-88.
- Chamba J.F. and Perreard E., 2002. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait* **82**, 33-44.
- Collomb M., Malke M., Spahni M., Sieber R. und Bütikofer U., 2003. Winter- und Sommerkäse mit unterschiedlicher Lipolyse. *Agrarforschung* **10** (5), 189-192.
- Dupuis C., Corre C. and Boyaval P., 1993. Lipase and Esterase Activities of *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol* **59** (12), 4040-4009.
- Jollivet N., Chataud J., Vayssier Y., Bensoussan M. and Bellin J.M., 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link. *J. Dairy Res.* **61**, 241-248.
- Kakariari E., Dlezios I., Tsakalidou E. and Kalantzopoulos G., 1998. 2<sup>nd</sup> International Symposium of Propionibacteria, University College, Cork.
- Kammerlehner J., 1977. Die Käsesereifung - multifaktorielle Prozesse - ihre Einflüsse auf die Käsequalität. *Dt. Milchwirtschaft* **48** (23), 973-977.
- Law B.A., 1984. Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheese. *Progr. Ind. Microb.* **19**, 245-283.
- Roberts M., Wijesundera C., Bruinenberg P.G. and Limsowtin G.K.Y., 1995. Development of an aseptic cheese curd slurry system for cheese ripening studies. *Aust. J. Dairy Technol.* **50** (2), 66-69.
- Ur-Rehmann S., McSweeney P.H.L. and P.F. Fox, 1998. Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Lait* **78**, 607-620.

## RÉSUMÉ

### Transposition à la production d'emmental des résultats de screening de l'activité lipolytique des bactéries propioniques

En utilisant une méthode simple basée sur l'incubation des cellules dans la matière grasse du lait et la détermination subséquente des acides gras libérés, on a différencié, au niveau du laboratoire, six souches de bactéries propioniques par rapport à leur activité lipolytique. La production de fromages d'essai avec les souches analysées a confirmé que les bactéries propioniques sont essentiellement responsables de la lipolyse dans l'Emmental et que l'activité lipolytique dans le fromage est effectivement spécifique à la souche. Il existe une faible corrélation entre les résultats obtenus avec la méthode de screening utilisée et ceux dans le fromage. On a pu constater une fois de plus que la présélection au niveau du laboratoire est certes importante, mais que les essais en fromagerie restent déterminants.

## SUMMARY

### Results of screening of lipolytic activity in propionibacteria extrapolated to Emmental cheese production

The lipolytic activity of six strains of propionibacteria were differentiated in laboratory, using a simple method based on the incubation of cells in milk fat and the subsequent determination of free fatty acids. The production of cheese with the analysed strains confirmed that the propionibacteria are essentially responsible for the lipolysis in Emmental cheese and that the lipolytic activity in cheese depends on the strain. A slight correlation exists between the results obtained with the screening method and those in the cheese. Again we could confirm that preselection in the laboratory is important but that those tests in the cheese dairy remain essential.

**Key words:** cheese, emmentaler, lipolysis, propionibacteria, screening