

Lebensmi

Das Verhalten von *Lactobacillus gasseri* K7 in gereiftem Halbhartkäse

Ulrich Zehntner, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, CH-3003 Bern
Auskünfte: Ulrich Zehntner, E-Mail: ulrich.zehntner@alp.admin.ch, Tel. +41 323 82 64

Zusammenfassung

Die technologische Eignung von zwei Stämmen der Art *Lactobacillus gasseri* als Zusätze im Käse wurde geprüft. Dazu wurden die Stämme bei der Herstellung zweier verschiedener Halbhartkäse (Tilsiter und Grosslockkäse mit Oberflächenreifung) zusammen mit den Starterkulturen zugesetzt. In definierten zeitlichen Abständen wurde das Überleben der *L. gasseri*-Stämme geprüft. Es zeigte sich, dass nur der Stamm K7 in Konzentrationen über einer Million KBE/g während der ganzen 90-tägigen Reifungsperiode sowohl in Tilsiter wie auch in Grosslockkäse nachweisbar war. Im Geschmack wurden die Käse durch die probiotischen Zusätze nicht beeinträchtigt.

Die meisten probiotischen Zusätze in europäischen Milchprodukten lassen sich auf wenige etablierte Stämme zurückführen. *Lactobacillus* (*L.*) *casei* GG, *L. johnsonii* La1, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sind die meist genannten und auch am besten untersuchten probiotischen Keime. Hinter dieser «Front» der ersten Generation werden in verschiedenen Instituten und Universitäten eine Reihe neu isolierter Organismen auf ihre Eignung als Probiotika untersucht.

Innerhalb der sogenannten Acidophilus-Gruppe, einer klassifikatorischen Zusammenfassung verwandter Arten wie *L. acidophilus* und *L. johnsonii*, sind Stämme der Spezies *L. gasseri* in den Blickpunkt gerückt. Sie wurden in unabhängigen Studien aus Asien, Afrika und Europa als natürliche Darm- und Hautbewohner identifiziert (Pavlova *et al.* 2002, Bergonzelli *et al.* 2005, Olivares *et al.* 2006). Für einen dieser Stämme, *L. gasseri* K7, hat ALP eine

Lizenz für den Vertrieb in der Schweiz erworben.

K7 überlebt drei Stunden in 0,3 % Gallensalz und wird in saurem Milieu (pH 3) in derselben Zeit um die Hälfte reduziert (Bogovic-Matijasic und Rogelj 1999). Diese relative Resistenz ist ein entscheidender Faktor bei der Beurteilung, ob ein Stamm die Magen-Darm-Passage in genügender Zahl überstehen kann, um im Darm eine probiotische Wirkung zu entfalten. Nach Bogovic-Matijasic *et al.* (2003) ist K7 im Stande, die Coli-Adhäsion an menschlichen Caco-2-Darmzellen *in vitro* zu behindern.

Die Einsatzfähigkeit von K7 als probiotischer Futterzusatz wurde bei abgesetzten Ferkeln getestet (Bogovic-Matijasic *et al.* 2004). Futteraufnahme und Gewichtszunahme wurden durch den Probiotikaeinsatz nicht beeinflusst. Hingegen war die Futterverwertung signifikant günstiger in der K7-Gruppe.

K7 weist bakteriozine Eigenschaften auf. Das bedeutet, dass die potenziell hemmende Wirkung des K7-Bakteriozins auf Laktobazillen der Starterkulturen bei allen eingesetzten Stämmen getestet werden muss. *Streptococcus thermophilus* scheint nicht betroffen zu sein (Matijasic *et al.* 2007).

In der hier beschriebenen Arbeit wurde das Überleben von *L. gasseri*-Stämmen in Halbhartkäse des Typs Tilsiter und in Grosslockkäse geprüft.

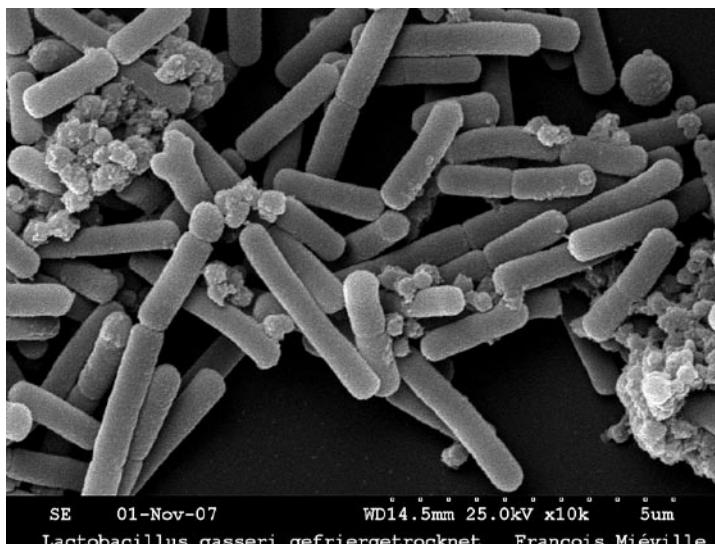


Abb.1. Rasterelektronische Aufnahme von gefriergetrockneten Zellen von *L. gasseri* K7 (François Miéville, ALP)

Die Herstellung der Versuchskäse

Als Starterkultur wurde MK 401 (mit den Hauptkomponenten *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) aus dem ALP-Sortiment verwendet. Für die Herstellung des Grosslochkäses wurde zusätzlich eine Propionsäurebakterienkultur aus dem ALP Versandsortiment eingesetzt.

Es wurden zwei Stämme von *L. gasseri* als konzentrierte Zusätze eingesetzt:

■ *Lactobacillus* K7 ist ein Isolat aus Faeces eines einwöchigen Säuglings in Slowenien. K7 wurde aufgrund seiner Morphologie (Abb. 1), von Substratabmuster und Zellwandanalysen, Studien der ribosomalen DNA und des *tuf*-Gens zur Spezies *L. gasseri* zugeordnet (Bogovic-Matijasic und Rogelj 1999 und 2000).

■ *L. gasseri* 17266 ist in der Stammsammlung von ALP hinterlegt und wurde 2002 isoliert und identifiziert (Chavagnat *et al.* 2002).

Die Herstellung der Versuchskäse erfolgte nach Standardrezepten von ALP für Modell-Grosslochkäse und Modell-Tilsiter, wobei bei letzterem als Maximaltemperatur beim Wärmen und Ausrühren 38°C statt 44°/43°C gewählt wurde. Zusätzlich zu den beiden Varianten mit probiotischen Zusätzen wurde eine

Kontrollvariante nur mit Starterkulturen produziert. Alle Varianten wurden am gleichen Tag mit derselben pasteurisierten Milch hergestellt und an einem anderen Produktionstag einmal wiederholt.

Die Zugabe von konzentrierten Probiotika-Kulturen (Minimalkonzentration nach Zentrifugation > 10¹⁰ KbE/g) erfolgte zum Zeitpunkt der normalen Starterkultur-Zugabe, sodass die Zielkonzentration im Kessi von mindestens 10⁷ KbE/ml erreicht wurde.

Selektiver Nachweis von *L. gasseri*

Die Stämme von *L. gasseri* wurden quantitativ auf MRS-Trehalose (ohne Glukose) bestimmt.

Sensorische Tests

Die geschmackliche Beurteilung wurde vom geschulten Sensorik-

Panel von ALP mit zwölf Prüfpersonen im Blindtest durchgeführt.

Unterschiedliche Überlebensfähigkeit während der Reifung

Die Startkonzentration der probiotischen Zusätze von mindestens 10⁷ KbE/ml in der Kessimilch wurde bei allen Varianten erreicht. K7 hat sich im jungen Käse in der ersten Woche noch vermehrt und ist dann bei konstanter Abnahme der Lebendkeimzahlen in allen Proben bis zum Reifungsende nach drei Monaten in Konzentrationen über 10⁶ KbE/g nachweisbar (Abb. 3).

L. gasseri 17266 hat sich in der ersten Woche der Reifung in drei der vier Käse noch vermehrt (Abb. 2). Sie bleiben auch nach drei und sechs Wochen auf einem Level über 10⁷ KbE/g, sinken dann aber unterschiedlich

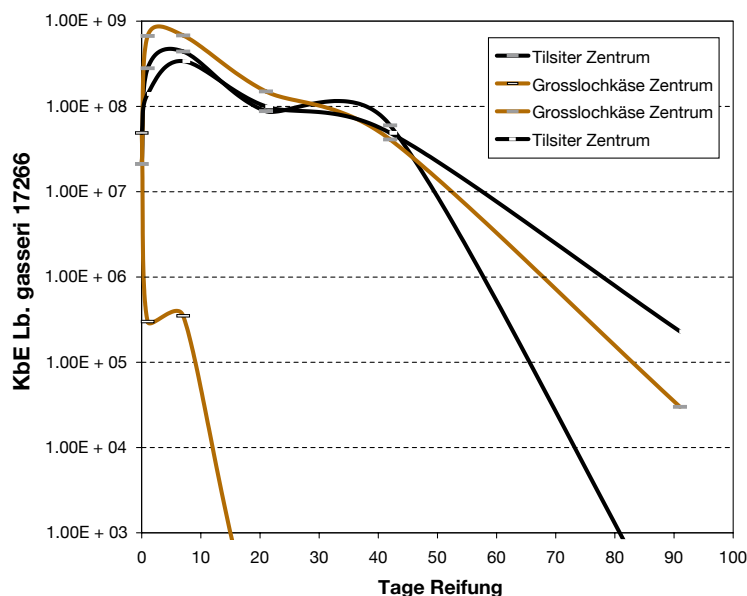
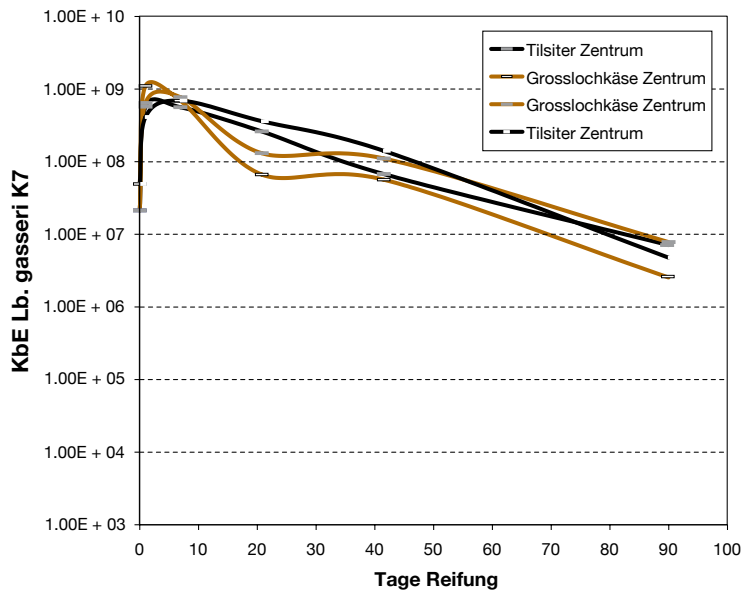


Abb. 2. Nachweis der lebensfähigen Zellen von *Lactobacillus gasseri* 17266 in zwei Halbhartkäsen während der 3-monatigen Reifung (Messpunkte nach 1 Tag, nach 7, 21, 42, und 91 Tagen, Kurve geglättet). Braun: Proben aus dem Zentrum von Grosslochkäse, schwarz: Proben aus dem Zentrum von Tilsiter. Doppelansatz aus der Käseherstellung von zwei verschiedenen Fabrikationstagen.

Abb. 3. Nachweis der lebensfähigen Zellen von *Lactobacillus gasser* K7 in zwei Halbhartkäsen während der 3-monatigen Reifung (Messpunkte nach 1 Tag, nach 7, 21, 42, und 91 Tagen, Kurve geglättet). Braun: Proben aus dem Zentrum von Grosslochkäse, schwarz: Proben aus dem Zentrum von Tilsiter. Doppelansatz aus der Käseherstellung von zwei verschiedenen Fabrikationstagen.



rasch. In einem der Grosslochkäse sind die Keimzahlen nach einem Tag und nach einer Woche auf 500'000 KbE/g gesunken und in den folgenden Proben nicht mehr nachweisbar.

Beim Tilsiter wie beim Grosslochkäse wurde vom Sensorik-Panel keine Variante gefunden, die sich in beiden Doppelproben von den Kontrollkäsen unterscheiden (Abb. 4 und 5). Die Mittelwerte der Beurteilungen aller Varianten liegen im Streubereich von typischen Normalwerten für diese Käsesorten.

K7 eignet sich für weitere Käseversuche

Das Verhalten von K7 in den vier Käsen ist auffallend einheitlich, unabhängig von der Tagesproduktion und der Käsesorte. Einer Zellzunahme in den ersten 24 Stunden steht eine langsame kontinuierliche Abnahme während dreier Monate gegenüber, welche die Schwelle von 10^6 KbE/g nie unterschreitet.

Demgegenüber ist die Überlebensfähigkeit von *L. gasser* 17266 schwankend und unzuverlässig, so dass ein Einbezug in

weiteren Versuchen nicht empfohlen wird. Die Ergebnisse liefern ein weiteres Indiz, dass jeder potenziell probiotische Stamm individuell auf seine technologische Eignung geprüft werden muss.

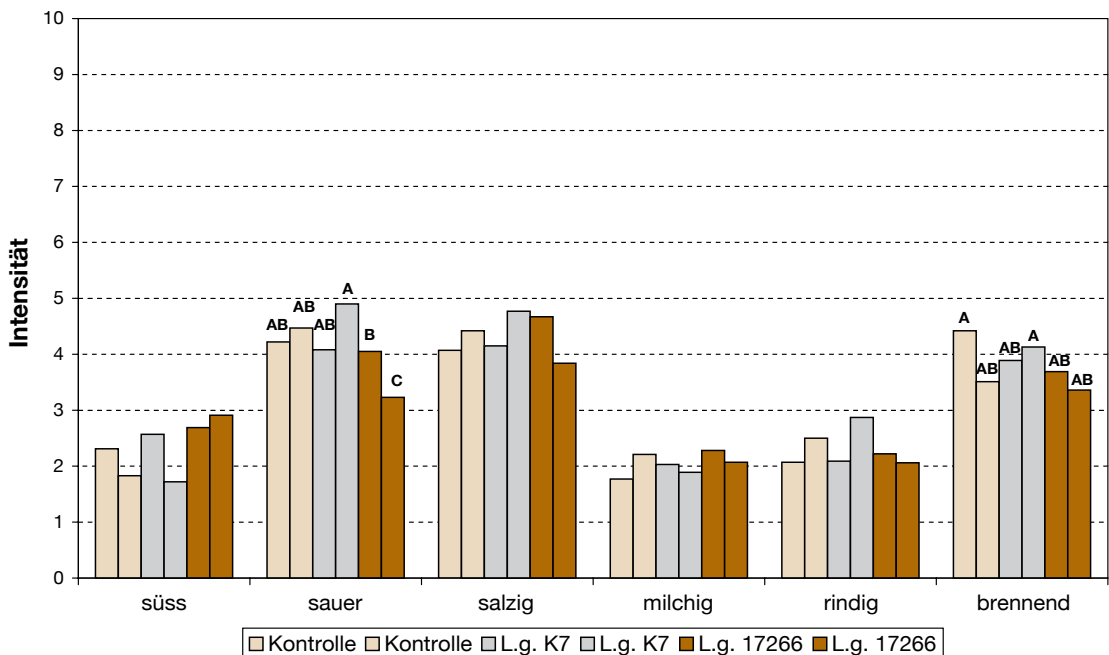
Geschmacklich werden die Käse von K7 weder positiv noch negativ beeinflusst. Ebenso wenig war eine Beeinträchtigung des Säuerungs- und Reifungsverlaufs festzustellen. Das bedeutet, dass die eingesetzten Starterkulturen unter dem Aspekt einer probiotischen Zugabe von K7 in ihrer Wirkung auf das Produkt nicht neu beurteilt werden müssen.

Angesichts der bakteriozinogenen Eigenschaften von K7 ist im weiteren einerseits seine Verträglichkeit mit anderen Starterkulturen und andererseits seine potenzielle Schutzwirkung gegenüber Buttersäurebazillen in reifendem Käse zu prüfen.

Literatur

- Bergonzelli G.E., Blum S., Brusow H. & Corthesy-Theulaz I., 2005. Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? *Digestion* 72 (1), 57-68.
- Bogovic-Matijasic B. & Rogelj, I., 1999. Bacteriocinogenic activity

Abb. 4. Beurteilung der Tilsiterkäse (3 Monate Schmierreife) nach 6 Kriterien im Sensorik-Panel (Mittelwerte von 12 Prüfern). Beim Einlesen zugesetzte Bakterienstämme von links nach rechts: Kontrolle (nur Starterkultur, beige), *L. gasser* K7 (grau), *L. gasser* 17266 (braun). Differenzen von Levels ohne Buchstabenbezeichnung oder mit gleichem Buchstaben sind nicht signifikant.



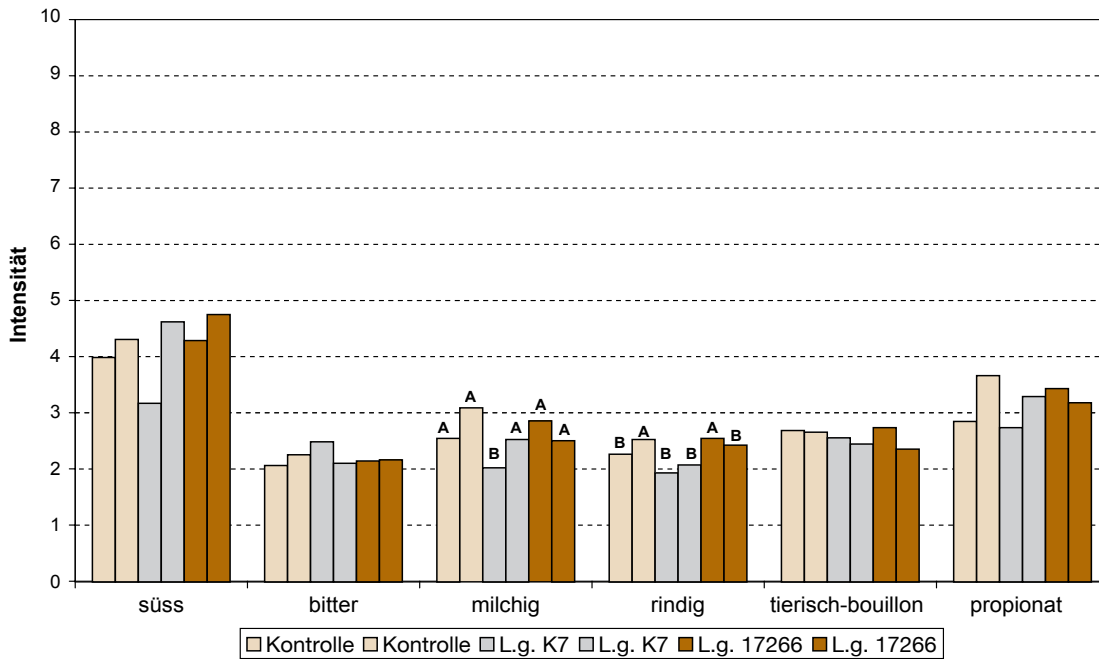


Abb. 5. Beurteilung der Grosslochkäse (3 Monate Standardreifung) nach 6 Kriterien im Sensorik-Panel (Mittelwerte von 12 Prüfern). Beim Einlaben zuge-setzte Bakterienstämme von links nach rechts: Kontrolle (nur Starterkultur, beige), *L. gasseri* K7 (grau), *L. gasseri* 17266 (braun). Differenzen von Levels ohne Buchstabenbezeichnung oder mit gleichem Buchstaben sind nicht signifikant.

of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technol. Biotechnol.* **37**, 93-100.

■ Bogovic-Matijasic B. & Rogelj, I., 2000. Lactobacillus K7 - A new candidate for a probiotic strain. *Food Technol. Biotechnol.* **38**, 113-119.

■ Bogovic Matijasic B., Narat, M., & Zoric, M., 2003. Adhesion of two Lactobacillus gasseri probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, 83-88.

■ Bogovic Matijasic B., Stojkovic, S., Salobir, J., Malovrh, S., & Rogelj,

I., 2004. Evaluation of the Lactobacillus gasseri K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Res.* **53**, 35-44.

■ Chavagnat F., Haueter M., Jimeno J. & Casey M. G., 2002. Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**, 177-183.

■ Matijasic B. B., Rajsp M. K., Perko B., & Rogelj I., 2007. Inhibition of Clostridium tyrobutyricum in cheese by Lactobacillus gasseri. *Int. Dairy J.* **17**, 157-166.

■ Olivares M., Diaz-Ropero M.P., Martin R., Rodriguez M. & Xaus J., 2006. Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* **101** (1), 72-79.

■ Pavlova S.I., Kilic A.O., Kilic S.S., So J.S., Nader-Macias M.E., Simoes J.A. & Tao L., 2002. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* **92** (3), 451-459.

RÉSUMÉ

Comportement de la souche probiotique *Lactobacillus gasseri* K7 dans du fromage à pâte mi-dure affiné

L'aptitude technologique de deux souches de l'espèce *Lactobacillus gasseri* en tant qu'additifs dans le fromage a été étudiée. A cet effet, les souches ont été ajoutées avec des cultures starters lors de la fabrication de deux fromages à pâte mi-dure (Tilsit et fromage à gros trous avec affinage en surface). La capacité de survie des souches *L. gasseri* a été testée à des intervalles de temps définis. Il s'est avéré que seule la souche K7 était détectable dans des concentrations supérieures à un million d'UFC/g pendant toute la période d'affinage de 90 jours aussi bien dans le Tilsit que dans le fromage à gros trous. Le goût des fromages n'a pas été altéré par les souches probiotiques.

SUMMARY

Behaviour of the probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in ripened semi-hard cheese

Two strains of *Lactobacillus gasseri* were tested for their suitability as probiotic additive to cheese. They were added separately along the processing of semi-hard cheese (Tilsit type and Swiss type cheese) together with the starter cultures. Samples were drawn from the center region in defined intervals during the ripening phase to determine the survival of the probiotic strains. Only the strain K7 showed an ability to remain in concentrations above 10^6 cfu/g during the entire 90-day ripening period. No compromising effects were observed regarding acidification and flavour development by the addition of *L. gasseri* strains.

Key words: *Lactobacillus gasseri*, probiotic, cheese ripening, semi-hard cheese