

## Tête de Moine AOP: eine neue Kultur für den Herkunftsnachweis

John Haldemann, Hélène Berthoud, Alexandra Roetschi, Ueli von Ah, Deborah Rollier und Elisabeth Eugster, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras, 3003 Bern, Schweiz

Auskünfte: John Haldemann, E-Mail: john.haldemann@agroscope.admin.ch, Tel. +41 31 323 43 34



**Abb. 1** | Beim Vergleich der Schnittbilder der Tête de Moine-Proben aus dem Praxisversuch gibt es keine Auffälligkeiten zwischen der Kontrolle (oben links) und den Versuchskäsen.

Landwirtschaftliche Erzeugnisse mit geschützter Ursprungsbezeichnung (GUB/AOP) erzielen auf dem Markt als traditionell hergestellte Produkte mit geografisch definierter Herkunft einen Mehrwert. Es kommt aber immer wieder vor, dass AOP-Produkte kopiert werden. Agroscope Liebefeld hat eine Methode entwickelt, mit der über die eingesetzten Kulturen die Herkunft des Tête de Moine AOP nachgewiesen werden kann. Die Kultur für den Herkunftsnachweis ist seit Januar 2013 im Einsatz.

Den Tête de Moine-Käsern entgehen jedes Jahr Einnahmen aufgrund von gefälschtem, nicht nach den strengen Richtlinien des AOP-Pflichtenhefts hergestellten Käse, welcher illegal auf den Markt gelangt. Um dagegen anzukämpfen und um die Konsumenten vor Täuschung zu schützen, hat Agroscope ein neues Verfahren mit

molekularbiologischen Methoden entwickelt, das effizient und kostengünstig ist. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden Bakterien nachzuweisen, die während der Herstellung des Käses als Kultur zugegeben wurden. Der Nachweis der Bakterien erfolgt über die Analyse ihres Erbguts (Eugster *et al.* 2013; Eugster *et al.* 2011). Analog eines Vaterschaftstests können die sogenannten «Markerbakterien» in einem Stück reifen Tête de Moine AOP nachgewiesen werden (World Intellectual Property Organization, 2011).

### Hohe, langjährige Kompetenz im Bereich Kulturentwicklung im Liebefeld

Die Entwicklung von Kulturen für den Herkunftsnachweis begann vor etwa zehn Jahren und wurde in einem zwölfköpfigen Team vorangetrieben. 2006 wurden AOP-

Tab. 1 | Spezifische Nachweisbarkeit von drei Markerbakterien in Tête de Moine (Pilot-Plant-Versuch)

Zugabe KbE/ml	Stamm A			Zugabe KbE/ml	Stamm B			Zugabe KbE/ml	Stamm C		
	1 M	3 M	6 M		1 M	3 M	6 M		1 M	3 M	6 M
ohne				10 <sup>3</sup>	–	–	–	10 <sup>3</sup>	–	–	–
ohne				10 <sup>4</sup>	+	+	+	ohne			
ohne				10 <sup>4</sup>	+	+	+	ohne			
ohne				ohne				10 <sup>4</sup>	–	–	–
ohne				ohne				10 <sup>5</sup>	–/+	+	–/+
10 <sup>2</sup>	+	+	+	10 <sup>5</sup>	+	+	+	10 <sup>3</sup>	–	–	–
10 <sup>2</sup>	+	+	+	10 <sup>5</sup>	+	+	+	10 <sup>4</sup>	–	–	–

+: positiver Nachweis: Kopien pro Reaktion liegt über 10<sup>4</sup>

–: negativer Nachweis: Kopien pro Reaktion liegen unter 10<sup>3</sup>

+/-: kein eindeutiges Ergebnis: Kopien pro Reaktion liegen zwischen 10<sup>3</sup> und 10<sup>4</sup>

Kulturen für den Gruyère und 2011 die Herkunftsnachweiskulturen für den Emmentaler AOP lanciert. Da Agroscope diese Kulturen exklusiv nur an Betriebe in der Schweiz verkauft, ist der Nachweis der darin enthaltenen Stämme ein sicherer Indikator dafür, dass der Käse tatsächlich in der Schweiz hergestellt wurde. Weitere Sortenorganisationen – darunter auch die Sortenorganisation Tête de Moine – erteilten Agroscope daraufhin ebenfalls ein Mandat für die Entwicklung von Kulturen für den Herkunftsnachweis in Käse.

Dazu musste zuerst nach geeigneten Bakterien gesucht werden, die natürlicherweise im Käse vorkommen, die Käseherstellung überleben und die auch nach einer Reifungszeit von drei und sechs Monaten noch nachgewiesen werden können. Zudem dürfen solche Kulturen keinen Einfluss auf das Aussehen und die organoleptischen Eigenschaften des Käses haben. In der Agroscope-Stammsammlung, die etwa 13 000 Bakterienisolate umfasst, konnten schnell geeignete Bakterien gefunden werden.

Die Wahl fiel auf Milchsäurebakterien, die aus dem Ursprungsgebiet des Tête de Moine stammen und die, in sehr kleiner Zahl zugesetzt, nach sechs Monaten Reifungszeit im konsumreifen Käse sowie in Rosetten nachgewiesen werden können. In einem weiteren Schritt ging es darum, unter diesen Milchsäurebakterien geeignete Stämme zu finden, die sich anhand stammspezifischer Sequenzen durch molekularbiologische Methoden nachweisen lassen.

#### Aufwändige Versuchsreihen

Die ausgewählten Milchsäurebakterien wurden sowohl im Labor als auch in der Praxis auf ihre Tauglichkeit geprüft. Die Stämme A, B und C wurden für Anwendungstests im Pilot Plant und in der Praxis ausgewählt. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus zwei Versuchen dargestellt. Die ausgewählten Markerbakterien können je nach Dosierung den Gehalt an freien Aminosäuren sowie den pH-Wert und die Gasbildung im Käse beeinflussen. Mit zunehmender Dosierung der Herkunftsnachweiskulturen...

Tab. 2 | Mittelwerte (n=7) der Ergebnisse der chemischen Untersuchung nach 100 Tagen Lagerung

Variante	Total FAS (OPA) mmol/kg	Total FAS (HPLC) mg/kg	Total fl. FS mmol/kg	Citronensäure mmol/kg	pH-Wert –	biogene Amine mg/kg
Kontrolle	196,7	21 383	15,7	5,5	5,68	599
ABC	216,7	na	17,9	5	5,7	na
AB	201,7	21 925	17,3	5,2	5,7	524
AC	191,5	na	14,8	5,6	5,64	na
ohne	196,7	21 383	15,7	5,5	5,68	599
mit	203	21 925	16,6	5,3	5,68	524
t-Test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

na: nicht analysiert

ns: nicht signifikant



Abb. 2 | Versandkultur CCO-TdM.

nachweiskultur nehmen der Gehalt an freien Aminosäuren (gemessen mit der OPA-Methode) und der pH-Wert zu (Tab. 2). Dies bedeutet, dass das Gleichgewicht zwischen Nachweisbarkeit der Markerbakterien und deren Einfluss auf die Käsequalität optimiert werden muss.

In einem Pilot-Plant-Versuch wurden die drei Markerbakterien (Stamm A, B und C) in unterschiedlicher Konzentration – allein oder in Kombination – eingesetzt. Stamm A konnte bei einer Animpfmenge im Kessi von  $10^2$  KbE/ml im Käse über die gesamte Reifungsdauer nachgewiesen werden (Tab. 1). Bei Stamm B ist die Nachweisbarkeit im Käse ab einer Zugabemenge von  $10^4$  KbE/ml Kessimilch gewährleistet. Eine Zugabemenge von  $10^5$  KbE/ml ist wirtschaftlich nicht interessant, weshalb Stamm C als Kultur für den Herkunftsnachweis nicht in Frage kam.

Der Effekt der ausgewählten Markerbakterien auf die organoleptischen Eigenschaften im konsumreifen Käse wurde in mehreren Praxisversuchen untersucht. Insbesondere der pH-Verlauf, die Bildung von freien Aminosäuren, die Bildung von biogenen Aminen sowie die Gasbildung wurden genau beobachtet. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der chemischen Untersuchung der Tête de Moine-Käse im Alter von 100 Tagen dargestellt. An diesem Versuch nahmen sieben (der insgesamt acht) Tête de Moine-Käsereien teil; die Zugabemenge in die Kessimilch betrug bei der Variante ABC  $10^2$  KbE/ml für den Stamm A sowie  $10^3$  KbE/ml für den Stamm B und Stamm C; bei der Variante AB  $10^2$  KbE/ml für Stamm A sowie  $5 \times 10^4$  KbE/ml für den Stamm B; bei Variante AC  $10^2$  KbE/ml für Stamm A sowie  $10^5$  KbE/ml für Stamm C.

In der Molekularbiologie konnten die beiden Stämme A und B in allen Proben nachgewiesen werden. Wie bereits in den Pilot-Plant-Versuchen beobachtet,

erwies sich der Stamm C auch im Praxisversuch als schlecht nachweisbar. Die Auswertung der Käseproben aus dem Labor mit Hilfe eines t-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben, die mit Markerbakterien hergestellt wurden und der Kontrolle (Abb. 1). Die Variation über die sieben Käsereien war grösser als der Effekt der Markerbakterienzugabe.

Beim Vergleich der Schnittbilder der Kontrolle (ohne Markerbakterien) mit den Versuchskäsen konnte in Bezug auf die Lochbildung kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 1).

### Standardisierte Versandkultur

Zur gleichen Zeit wurde auch der Herstellprozess für die Produktion einer standardisierten lyophilisierten Kultur (Abb. 2) in der Agroscope-Kulturenproduktion im Liebefeld entwickelt. Die fertige CCO-TdM (culture pour la certification d'origine) wird seit dem 1. Januar 2013 alle drei Monate an die Tête de Moine AOP-Käsereien verschickt. Können die zugesetzten Milchsäurebakterien im untersuchten Käse (als Schnittkäse oder als Rosette) nicht nachgewiesen werden, ist davon auszugehen, dass es sich um ein Imitat handelt.

### Literatur

- Eugster E., Wechsler D. & Von Ah U. Keine Nachsicht mehr mit Emmentaler Fälschern, dmz 2/2013.
- Eugster E., Guggenbühl B. & Wechsler D. Käsefälschern geht es nun an den Krugen. *Lebensmittel-Technologie* 4/2011.
- World Intellectual Property Organization, Authentication method of dairy products, WO 2011/039359 A2, 7. April 2011