



Aus dem Institut für Mikrobiologie  
der Bundesanstalt für Milchforschung  
in Kiel

**Einsatz und Charakterisierung definierter Oberflächenstarterkulturen  
für verschiedene Rotschmierekäse**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
Beate Heidrun Jäger

Kiel, 2005

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Der Dekan

---

# INHALT

<b>INHALT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 KÄSEKUNDE</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 OBERFLÄCHENGEREIFTE KÄSE</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 FLORAZUSAMMENSETZUNG DER ROTSCHMIERE</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 IDENTIFIZIERUNG UND KLASSIFIZIERUNG DER BAKTERIEN</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 STAND DER FORSCHUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 CHEMIKALIEN</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 STÄMME</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3 STAMMHALTUNG UND KULTIVIERUNG</b> .....	<b>21</b>
2.3.1 Anzucht von Reinkultur.....	22
2.3.2 Herstellung von lagerungsfähigen Reinkulturen .....	23
<b>2.4 OBERFLÄCHENANALYSEN VON ROTSCHMIEREKÄSE</b> .....	<b>23</b>
2.4.1 Isolierung von Bakterien.....	23
2.4.2 Isolierung und Identifizierung von Hefen und Schimmeln .....	26
2.4.3 Lebendkeimzahlbestimmung .....	27
2.4.4 Probennahme von Hefen und Bakterien.....	27
<b>2.5 KÄSUNGSVERSUCH ALKALISIERUNGSVERSUCHE VON HEFEN IN MILCHMEDIEN</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 KÄSUNGSVERSUCH</b> .....	<b>27</b>
2.6.1 Salzbad .....	28
2.6.2 Arbeitsschmiere.....	28
<b>2.7 SCHNITTKÄSE</b> .....	<b>28</b>
2.7.1 Versuchskäse.....	28
2.7.2 Käsereifung.....	29
<b>2.8 WEICHKÄSE</b> .....	<b>31</b>
2.8.1 Versuchskäse.....	31
2.8.2 Käsereifung.....	31
<b>2.9 SAUERMILCHKÄSE</b> .....	<b>33</b>
2.9.1 Herstellung von Sauermilchkäse .....	33
2.9.2 Käsereifung.....	33
<b>2.10 DIFFERENZIERUNG MIT HILFE VON MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN</b> .....	<b>36</b>
2.10.1 Puffer und Lösungen .....	36

---

2.10.2	Amplified Ribosomal DNA- Restriction Analyse (ARDRA) .....	37
2.10.3	Isolierung und Reinigung von Gesamt-DNA .....	37
2.10.4	Einsatz von ganzen Zellen .....	37
2.10.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
2.10.6	Restriktionsanalyse .....	38
2.10.7	Gelektrophorese .....	39
<b>2.11</b>	<b>SEQUENZIERUNG.....</b>	<b>39</b>
2.11.1	Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen .....	39
2.11.2	Sequenzierungsprimer .....	39
2.11.3	Partielle Sequenzierung .....	40
2.11.4	Gelelektrophorese.....	40
2.11.5	Auswertung der Sequenzdaten .....	41
<b>2.12</b>	<b>PULSFELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE) .....</b>	<b>41</b>
2.12.1	Zellzucht und Zellernte.....	41
2.12.2	Fixierung der Zellen in Agarose und Präparation der Bakterien-DNA.....	41
2.12.3	Präparation von Einzelkolonien bzw. Plattenausstrichen.....	42
2.12.4	Restriktionsanalyse.....	42
2.12.5	Gelelektrophorese.....	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>OBERFLÄCHENANALYSE KOMMERZIELLER ROTSCHMIEREKÄSE.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>ALKALISIERUNGSVERSUCHE VON HEFEN IN MILCHMEDIEN .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>EINFLUSS DES SALZBADES AUF DIE OBERFLÄCHENREIFUNG.....</b>	<b>49</b>
3.3.1.1	Charge 1/ 1a.....	49
3.3.1.2	Charge 2/ 2a.....	52
<b>3.4</b>	<b>KÄSUNGSVERSUCHE.....</b>	<b>53</b>
3.4.1	Schnittkäse Versuchsreihe I.....	53
3.4.1.1	Charge 3 .....	55
3.4.1.2	Charge 4 .....	56
3.4.1.3	Charge 5 .....	57
3.4.2	Schnittkäse Versuchsreihe II.....	59
3.4.2.1	Charge 3a.....	59
3.4.3	Weichkäse.....	60
3.4.3.1	Versuchskäsungen mit Starterkulturen für oberflächengereifte Schnittkäse.....	61
3.4.3.2	Reifung von Limburger- ähnlichen Käsen im Labormaßstab .....	62
3.4.3.3	Charge W4:.....	63
3.4.3.4	Charge W5.....	64
3.4.4	Sauermilchkäse .....	65
3.4.4.1	Oberflächenanalyse industrieller Kulturkäse.....	66
3.4.4.2	Einsatz einer definierten Starterkultur zur Produktion von Kulturkäse .....	67

---

3.4.4.3	Charge S1 .....	67
3.4.4.4	Charge S2 .....	69
3.4.4.5	Bedeutung der Hefeflora des Quarkes für die Sauermilchkäserei.....	70
3.4.4.6	Charge S3 / S3a.....	71
3.4.4.7	Charge S4 / S4a.....	73
<b>3.5</b>	<b>AMPLIFIED-RIBOSOMAL-DNA-RESTRICTION-ANALYSIS (ARDRA).....</b>	<b>74</b>
3.5.1	<i>Arthrobacter</i> spp. und <i>Microbacterium</i> spp. ....	74
3.5.2	<i>Staphylococcus</i> spp.....	80
3.5.3	<i>Brevibacterium</i> spp.....	87
3.5.4	<i>Corynebacterium</i> spp.....	90
<b>3.6</b>	<b>PARTIELLE SEQUENZIERUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>3.7</b>	<b>PULSFELDGELELEKTROPHORESE (PFGE) .....</b>	<b>97</b>
3.7.1	Actinomycetales .....	97
3.7.2	Staphylokokken.....	100
3.7.3	Überprüfung definierter Oberflächenstarterkulturen .....	102
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>HEFEN.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2</b>	<b>EINFLÜSSE AUF DIE KÄSEREIFUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>4.3</b>	<b>REIFUNGSKULTUREN FÜR ROTSCMIEREKÄSE.....</b>	<b>112</b>
<b>4.4</b>	<b>VERSUCHSKÄSUNGEN .....</b>	<b>114</b>
4.4.1	Pilotkäsung im Bereich Schnittkäse .....	115
4.4.2	Weichkäse.....	120
4.4.2.1	Versuchskäse .....	121
4.4.3	Sauermilchkäse .....	125
4.4.3.1	Käseversuche .....	127
<b>4.5</b>	<b>MOLEKULARE DIFFERENZIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON ROTSCMIEREBAKTERIEN..</b>	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>148</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>164</b>

## ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
<i>aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
$a_w$	Wasseraktivität
bidest.	zweimal destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CPH	Caseinpeptonhydrolysat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddNTP	Didesoxynucleotide
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtOH	Ethanol
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
ME	Malzextrakt
ml	Milliliter
mM	milli Molar
mPC	modifiziertes Plate-Count-Medium
nm	Nanometer
$pO_2$	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Species (Plural), (sämtliche) Arten einer Gattung
subsp.	Subspecies, Unterart
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
u	unit
$\mu$	Mikro
rpm	Umdrehungen pro Minute

Vol	Volumen
vvm	Volumen Gas pro Liter Fermentervolumen und Minute
Wff	Wasser in der fettfreien Käsemasse
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht



## 1 EINLEITUNG

Bevor man sich mit den aus Milch hergestellten Produkten befaßt, sollte man dieses vielseitige Nahrungsmittel näher betrachten. In der Fachliteratur wird Milch als ein weißes polydisperses Drüsensekret mit einem pH-Wert von 6,5-6,7 beschrieben (Renner, 1989; Schlimme, 1990a). Dieses Grundnahrungsmittel stellt für alle Säuger über längere Zeit die einzige Nahrung dar. Die Milch enthält in der idealen Zusammensetzung alle notwendigen Energie-, Aufbau- sowie Abwehrstoffe, so dass die Nährstoffansprüche des Nachwuchses optimal abgedeckt werden. Allerdings gilt dies nur für den Nachwuchs der eigenen Art, denn die Milch keiner Säugetierart entspricht in ihrer Zusammensetzung völlig denen anderer Säugetierarten. Der Gehalt der einzelnen Inhaltsstoffe zeigt zwischen den einzelnen Arten unterschiedliche Variationsbreiten (Fett 1,8–22%, Eiweiß 1,1–15,5%, Lactose 1,3–7%, Asche 0,2–2,6 % und Trockenmasse 11–38%). Wenn jedoch von Milch gesprochen wird, wird im allgemeinen und gesetzlichen Sprachgebrauch Kuhmilch verstanden.

Die Milchbildung erfolgt im Verlauf der Laktraktionsperiode kontinuierlich in den Drüsenlappen des Euters. Zusammengesetzt ist ein Drüsenlappen aus etwa 200 Alveolen, welche den eigentlichen Syntheseort der Milchbildung darstellen. Die Alveolen sind ca. 0,2 mm große feine Bläschen, die mit Drüsenepithelzellen ausgekleidet sind. Um einen intensiven Stoffaustausch zu ermöglichen sind sie von einem dichten Geflecht venöser und arterieller Blutkapillaren umfasst. Von der Intensität der Durchblutung hängt die Milchleistung ab. Wie wichtig die Blutversorgung des Euters für die Milchsynthese ist zeigt, dass für die Bildung von einem Liter Milch im Durchschnitt 540 Liter Blut das Euter durchströmen müssen. Aus dem Blut gelangen Mineralstoffe, Vitamine, Spurenelemente und Hormone unverändert in die Milch. Die Vorstufen für die Synthese der Milchinhaltstoffe Lactose, Milchfett und Milcheiweiß, die in der Milchdrüse selbst gebildet werden, werden ebenso dem Blutstrom entnommen.

Die Lactose stellt ein spezifisches Syntheseprodukt der Milchdrüse dar. Neben seiner Wirkung als Nähr- und Geschmacksstoff ist sie mit der wichtigste osmotisch wirksame Bestandteil der Milch. Sie hat somit entscheidenden Einfluss auf die produzierte Milchmenge.

Bisher galt Milchfett als wichtigster Bestandteil der Milch. Diese wirtschaftliche Bedeutung führte dazu, dass durch Züchtung und Fütterung der Milchfettanteil laufend erhöht wurde. In der Milch liegt das Milchfett in feinsten Tröpfchen vor. Die Fettsäuren des Milchfettes bestehen aus langkettigen ( $C_{14}$ – $C_{22}$ ), mittelkettigen ( $C_8$ – $C_{12}$ ) sowie kurzkettigen ( $C_4$ – $C_6$ ) Anteilen. Die langkettigen Fettsäuren werden bevorzugt aus

langkettigen Vorstufen, die der Lipidfraktion des Blutes direkt entnommen werden, synthetisiert. Die kurzkettigen und mittelkettigen Fettsäuren werden direkt in den Alveolarzellen synthetisiert. Die hierfür notwendigen Vorstufen werden dem Blut entnommen und entstehen im Pansen bei der mikrobiellen Aufarbeitung der Futterstoffe.

In einer Reihe milchwirtschaftlicher Erzeugnisse spielt der Eiweißgehalt eine entscheidene Rolle. Seit der ersten veröffentlichten Nomenklatur der Milchproteine, im Jahre 1956, werden diese in zwei Hauptfraktionen eingeteilt. In die Caseine und die Molkeproteine.

Beim Rind werden die wichtigsten Milchproteine von sechs Genen codiert (Eggen und Fries, 1995, Threadigill u. Womack, 1990, Vaiman et al., 1995). Bisher wurden in den sechs Hauptproteinen der Kuhmilch 39 genetische Varianten gefunden (Ayse, 2001). Dadurch variieren einzelne Milchproteinkomponenten wie auch die gesamte Milchproteinmenge quantitativ von Tier zu Tier. Assoziationen zwischen genetischen Varianten der Milchproteine und Eigenschaften der Milch wurden bereits intensiv untersucht (Ayse, 2001; Bobe et al., 1999; Ojala et al., 1997; Ng-Kwai-Hang, 1991). Dieses Wissen ist von großer technologischer und wirtschaftlicher Bedeutung. So hängt die Käseausbeute wesentlich vom Eiweißgehalt der Kesselmilch ab. Ein Unterschied im Eiweißgehalt der Milch von 0,1-0,3% kann je nach Käsesorte eine Differenz von 2-5% in der Ausbeute zur Folge haben.

## **1.1 Käsekunde**

Käse ist eines der ältesten und wahrscheinlich auch am weitesten verbreitetsten Nahrungsmittel überhaupt. Nach der Käseverordnung vom 14. April 1986 in der jeweils geltenden Fassung sind Käse frische oder in verschiedenen Graden der Reifung befindliche Erzeugnisse, welche aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt sind. Weltweit gibt es heute fast 4000 verschiedene Käsetypen, die sich durch ihre regional üblichen, in der Regel von altersher überlieferten Herstellungs- und Reifungsmethoden voneinander unterscheiden. Die Herstellung von Käse beruht auf einem ganz einfachem Prinzip, in dem die festen Inhaltsstoffe der Milch von den Flüssigen getrennt werden. Oberflächlich betrachtet hat es den Anschein, als würden alle Käsesorten nach dem gleichen Schema hergestellt: die Milch wird im Fettgehalt eingestellt, mit Starterkultur versetzt, dickgelegt, der Bruch bearbeitet und von der Molke getrennt, gesalzen und der „grüne Käse“ gereift und gelagert, bis er die Konsumreife erreicht hat. Die Vielfalt der Sorten mit ihren charakteristischen Merkmalen und Besonderheiten liegt in der Variation der Herstellungsschritte begründet. Einzelheiten der Herstellung, Sorteneigenschaften, Fettstufen usw. werden in der Käseverordnung (Zipfel und Rathke, 2001) geregelt.

In der Käseverordnung ist unter anderem festgelegt, mit welchem Gerinnungsstarter die Dicklegung der Kesselmilch (Käsereimilch) zu erfolgen hat. So kann die Dicklegung der Kesselmilch, abhängig von der Käsesorte, durch Milchsäurebakterien und/oder Labenzyme erfolgen. Je nach Zugabe dieser Gerinnungsstarter erfolgt eine Unterscheidung zwischen den Hauptgruppen Sauermilch- und Labkäse. Als ein weiteres Einteilungskriterium gilt die Konsistenz der Käse. Einen entscheidenden Einfluss auf die Konsistenz des Käses nimmt die Bruchbearbeitung. Je nach dem wie groß man die Milchgallerte schneidet und wie intensiv man sie bearbeitet, beeinflusst man die Festigkeit der Käse. Es gilt allgemein die Regel: „Je fester der Käse, desto kleiner der Bruch“. Anhand der Konsistenz der Käse ist eine Einteilung in unterschiedliche Käsegruppen möglich. Für die Eingruppierung eines Käses in eine Käsegruppe ist der Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse (Wff) maßgebend. Dieser Wert wird in Prozent angegeben. Nach der Käse-VO § 6 lassen sich folgende Gruppen unterscheiden: Hartkäse (56% oder weniger), Schnittkäse (54%-63%), Halbfester Schnittkäse (61%-69%), Sauermilchkäse (60%-73%), Weichkäse (mehr als 67%) und Frischkäse (mehr als 73%). Es bestehen Überlappungen von je 2% zwischen den einzelnen Gruppen. Innerhalb einer Käsegruppe können die Käse hinsichtlich ihres Fettgehaltes variieren. Zur Unterscheidung wurde der Begriff des „Fettgehaltes in der Trockenmasse“ (F.i.Tr.) eingeführt. Dieser Begriff hat den Vorteil, dass sich der Anteil des Fettes in der Trockenmasse während der Reifung nur unbedeutend ändert, während der Wassergehalt des Produktes doch beträchtliche Schwankungen ausgesetzt sein kann.

Jedoch die für den Verbraucher deutlichsten Unterscheidungsmerkmale sind das Aussehen wie z.B. die Lochung, der Geruch, sowie der Geschmack. So wird ein Edamer nie wie ein Brie schmecken. Für die Ausbildung dieser spezifischen Eigenschaften sind in erster Linie die verwendeten Kulturen verantwortlich. Einheitlich für alle Käse ist der gezielte Abbau der Käseinhaltsstoffe, vor allem das Eiweiß. So wird aus dem geschmacklosen Frischeiweiß das für die jeweilige Käsesorte typische, aromatische Produkt.

Um die Käse vor Austrocknung und Fremdkontaminanten zu schützen, wird bei einigen Käsen eine Rindenbildung forciert (Busse, 1989; Philipp, 1993). So zeichnen sich die typischen Schnittkäse wie Edamer, Gouda und Emmentaler durch eine feste Rinde aus. Meistens wird die Oberfläche zusätzlich mit einer Paraffin- oder Wachshülle beschichtet. Zur Schimmelverhütung erfolgt oft bei Hartkäse, Schnittkäse und halbfesten Schnittkäse mit geschlossener Rinde eine Behandlung mit Natamycin, einem Fungizid. Als Alternative erfolgt das Reifen der Käse in einer Kunststoff-Folie. Einen besonderen Schutz gegen die Umgebung findet man bei den oberflächengereiften Käsen.

## 1.2 Oberflächengereifte Käse

Im Gegensatz zu Käsen nach Holländerart mit Rinde, reifen diese Käse mit einer „lebenden“ Oberfläche. Die wohl bekannteste Gruppe bilden hier die Schimmelkäse, wie Camembert oder Brie. Die Oberfläche dieser Käse ist meist mit einem weißlichen, etwas pelzigen Schimmelrasen überzogen. Eine etwas andere Form der Oberflächenreifung findet man bei Rotschmierenkäse. In dieser Gruppe sind unterschiedliche Käsesorten vereint, wie Hartkäse (Gruyère, Emmentaler, Beaufort und Appenzeller), Schnittkäse (Tilsiter, Saint Paulin, Danbo), Weichkäse (Limburger, Trappist, Romadur) und Sauermilchkäse (Harzer, Mainzer, Korbkäse, Olmützer Quargel). Die Käsereifung wird durch eine sich auf der Käsoberfläche entwickelnde komplexe heterogene Mikroflora aus Hefen, Schimmeln und verschiedenen Gram-positiven Bakterien gekennzeichnet (Bockelmann et al., 1997a; Brennan et al., 2002; Hoppe-Seyler, 1998; Smacchi et al., 1999). Wie eine Rinde oder ein Wachsüberzug schützt die Schmiere den Käse vor Austrocknung und unerwünschten Kontaminationen (Busse, 1989; Philipp, 1993). Durch die Oberflächenflora bedingte Stoffwechselfvorgänge und spontanen chemischen Umsetzungen erhalten Rotschmierenkäse während der Reifung ihr typisches Erscheinungsbild und deutlich pikantes Aroma (Hoppe-Seyler, 1998, Smacchi et al., 1999a, b; Petersen et al., 2002).

Die mikrobielle Zusammensetzung der Oberfläche zeigt innerhalb bestimmter Gruppen an Bakterien und Pilzen Übereinstimmungen. Zu den verbreiteten Mikroorganismen der Rotschmiere gehören coryneforme Bakterien (*Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Microbacterium* spp. und *Brevibacterium* spp.) Staphylokokken, Gram-negative Stäbchen (Pseudomonaden und coliforme Bakterien), als auch Hefen und Schimmel (Bockelmann et al., 2002; Bonaiti et al., 2004; Eliskases-Lechner and Ginzinger, 1995b; Smacchi et al., 1999; Stadhouders und Langeveld, 1966, Petersen et al., 2002; Valdes-Stauber et al., 1997). Auf der Gattungs- und Speziesebene unterscheiden sich hingegen nicht nur verschiedene Käsesorten, sondern auch gleiche Rotschmierenkäse verschiedener Käsereien.

Die Zusammensetzung der Oberflächenflora einer jeweiligen Käserei resultiert aus dem mikrobiellen Status des Salzbadens und der Reifungsräume, den Wachstumsgeschwindigkeiten einzelner Mikroorganismen sowie als Folge symbiontischer und antagonistischer Vorgänge zwischen den verschiedenen Mikroorganismen (Brennan et al., 2002; Philipp, 1993). Zu Beginn der Reifung wird ein Selektionsdruck zugunsten der salztoleranten Hefen und coryneformen Bakterien ausgeübt. Zusätzlich nehmen Faktoren wie Art und Häufigkeit der Oberflächenbehandlung (Keller und Puhon, 1985), der pH- und  $a_w$ -Wert der Oberfläche, sowie der Salzgehalt zu Beginn der Reifung Einfluss auf die Entwicklung der Mikroflora (Kammerlehner, 1995; Philipp, 1993). So ist es nicht weiter erstaunlich, dass mit Ausnahme der Kulturzugaben zum Schmierwasser das Anwachsen der Mikroorganismen auf der Oberfläche weitgehend dem Zufall überlassen bleibt (Brennan et

al., 2001; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1994; Marcellino et al., 2001; Valdes-Stauber et al., 1997).

Der eigentliche Reifungsprozess der Rotschmierekäse kann in zwei Abschnitte gegliedert werden, welche im Zusammenhang mit dem Oberflächen pH-Wert zu sehen sind. Nach dem Salzen der Käse in einem 16-22%igen Salzbad ist der Oberflächen pH-Wert der Käse auf 4,8-5,2 abgesunken. Zu diesem Zeitpunkt sind nur die salz- und säuretoleranten Organismen befähigt, die Oberfläche zu besiedeln. Prädestiniert dafür sind die Hefen, welche zum Teil als natürliche Flora bereits im Salzbad enthalten sind. Diese Erstbesiedelung hat eine essentielle Bedeutung für die Reifung. Die Assimilation von Laktat, sowie die Freisetzung alkalischer Stoffwechselprodukte durch die Hefen, führen zu einer allmählichen Erhöhung des pH-Wertes der Käsoberfläche (Busse, 1989; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b; Keller und Puhon, 1985; Leclercp-Perlat et al., 1999; Mayr, 1990; Petersen et al., 2002; Reys, 1993; Sauter, 1986). Wenn infolge der Alkalisierung ein pH-Wert von ca. pH 6,0 auf der Oberfläche erreicht worden ist, beginnt der zweite Abschnitt der Reifung. Durch die Anhebung des pH-Wertes können sich nun die schwach säuretoleranten Rotschmierebakterien (z.B.: *Brevibacterium linens*, *Arthrobacter nicotianae* und *Microbacterium gubbeenense*) auf der Oberfläche etablieren (Bockelmann et al., 2002, 2003; Busse, 1989; Bockelmann und Hoppe-Seyler, 2001; Carnio et al., 1999; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b; Hoppe-Seyler, 1998; Mayr, 1990). Im weiteren Reifungsverlauf kommt es zur Ausbildung der typischen aromatischen Rotschmiere. Am Beispiel oberflächengereifter Weichkäse wie Limburger und Romadur wurde ein vollständiger Dominanzwechsel zwischen Hefen- und Bakterienflora mehrfach dokumentiert (Mayr, 1990; Sauter, 1986). Rotschmierekäse reifen je nach Sorte zwischen wenigen Tagen und mehreren Monaten zur Marktreife heran.

### 1.3 Florazusammensetzung der Rotschmiere

Schmieregereifte Käse, wie Tilsiter, Limburger und Münster, sind charakterisiert durch die Entwicklung einer undefinierten Mikroflora auf der Oberfläche (Brennan et al., 2001; Valdes-Stauber et al., 1997). Die Zusammensetzung der Oberflächenflora ist einem komplexen Ökosystem gleichzusetzen. Die Mikroflora setzt sich aus unterschiedlichen Gattungen und Spezies zusammen. Welche Bakterien und Hefen in der Flora enthalten sind, ist abhängig von der Hausflora der Käserei als auch von der Käsesorte.

#### Hefen

Hefen gehören zu den eukaryotischen Mikroorganismen und werden den Pilzen zugeordnet. Im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzen sind Hefen in der Regel Einzeller. Eine Besonderheit stellt hier die Hefe *Geotrichum candidum* dar, die wie ein

Schimmelpilz ein Mycel ausbildet. *G. candidum* wird daher im Volksmund auch mit dem Namen Milchsimmel bedacht. In ihren Wachstumsbedingungen sind Hefen äußerst variabel. Sie tolerieren einen pH-Bereich von pH 3 bis 11 und Temperaturen von 0-45°C. (Krämer; 1992). Das Vorkommen von Hefen ist ubiquitär. Neben ihrem natürlichen Standort in den obersten Schichten des Erdbodens und der Oberfläche von Pflanzen, sind sie wichtige Vertreter der äußeren und inneren epidermalen Schicht von Mensch und Tier.

Hefen stellen in den Käsereien einen festen Bestandteil der Hausflora dar. Diese Hefen können über die Luft, und verwandten Gerätschaften, mit denen die Milch und der Käse in Berührung kommen und so übertragen werden. Zum Teil können sich auch die Hefen, welche direkt der Rohmilch entstammen, auf der Käseoberfläche etablieren. Als eine besonders wichtige Anreicherungsquelle für Hefen gilt das Salzbad und das Salzwasser (Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b).

In den Produktionsstätten können sich eine Vielzahl unterschiedlicher Gattungen etablieren. So konnte Eliskases-Lechner und Ginzinger (1995b) von Tilsiter Käse und dem Salzbad von 14 verschiedenen österreichischen Käsereien 12 verschiedene Hefearten isolieren. Isoliert wurden *Candida butyrii*, *C. catenulata*, *C. inconspicua*, *C. intermedia*, *C. zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula minuta*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon beigelii* und *Yarrowia lipolytica*. In mehreren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass nicht alle Hefen, die in einer Käserei anzutreffen sind, sich auch auf der Käseoberfläche etablieren können (Martin et al., 2001). Für die Produktion von Rotschmierekäse nehmen die Spezies *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* und *Candida krusei* eine dominante Position ein (Bockelmann et al., 1997a, 2002, 2003; Engel und Roesch, 1995; Martin et al., 2001)

### **Coryneforme Bakterien**

Auf der Käseoberfläche stellen coryneforme Bakterien etwa 75-95% der bakteriellen Schmiereflora. Von der Oberfläche zu isolieren sind hauptsächlich Spezies der Gattungen *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Microbacterium* spp., sowie *Brevibacterium* spp.. Sie sind in der 9. Auflage von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Band 2 (1986) in der Sektion 15 (irreguläre, nicht sporenbildende, Gram-positive Stäbchen) und entsprechend ihren Sauerstoffansprüchen in die Gruppe der aeroben oder fakultativ anaeroben Bakterien zusammengefaßt. Sie wachsen am besten auf salzigen, pH-neutralen Oberflächen, und sind empfindlich auf tiefe pH-Werte. Ihr Wachstumsoptimum liegt bei pH 6,5–7,0, bei pH 5,6 wachsen die meisten bereits nicht mehr. Charakteristisch sind die pleomorphen Entwicklungszyklen, die je nach Gattung unterschiedlich ausgeprägt sein können (Ratray und Fox, 1999; Stackebrandt et al., 1983). Besonders deutlich findet man diese in der strikt aeroben Gattung *Arthrobacter*. Während hier in der logarithmischen

Wachstumsphase vorwiegend Langstäbchen ausgebildet werden, liegen in der stationären Phase infolge des reduzierten Wachstums kokkoide Zellformen vor. Ein weiteres Kennzeichen der coryneformen Bakterien ist das „Schnappen“ während der Zellteilung. Infolge des verschieden schnellen Aufreißen der Wandverbindungen winkeln sich hierbei die Zellen v-förmig gegeneinander ab. Simultane Vielfachspaltungen in viele Kurzstäbchen aus einer großen Zelle kann ebenfalls angetroffen werden (Clark, 1972; Keddie, 1978; Schlegel, 1992).

Anzutreffen sind coryneforme Bakterien in allen Bereichen. Salztolerante Vertreter sind vor allem auf der Haut, auf Meeresfischen und auf der Käsoberfläche anzutreffen (Crombach, 1972).

Das wohl bekannteste und meist untersuchteste Rotschmierebakterium ist *Brevibacterium linens*. Das Vorhandensein dieser coryneformen Bakterien auf der Käsoberfläche wird als notwendige Voraussetzung für die Entwicklung der charakteristischen Farben, Aroma, Geschmack und Textur von Rotschmierkäse angesehen (Ades und Cone, 1969; El-Erian, 1969; Hemme und Richard, 1986, Reys, 1993). So wird das oft orangerötliche Erscheinungsbild der Käseschmiere im Zusammenhang mit der Ausbildung des carotinoiden orangefarbenen Pigments aus der Zellwand von *B. linens* gesehen (Burri, 1999; Rattray und Fox, 1999). Weiterhin ist *B. linens* für die Bildung wichtiger Aromakomponenten verantwortlich. Insbesondere kommt den flüchtigen Schwefelverbindungen hier eine wichtige Funktion zu (Kadota und Ischida, 1972; Lewis, 1981; Sharpe et al., 1977).

### **Staphylokokken / Mikrokokken**

Diese Gattung nimmt im allgemeinen nur einen geringen Anteil bei den gereiften Käsen an der Oberflächenflora ein. Es sind Gram-positive, unbewegliche, nicht sporenbildende runde Zellen, welche einzeln, paarig oder in unregelmäßigen Zellhaufen vorkommen. Das natürliche Vorkommen dieser Gattungen ist die Haut von Säugetieren, die Oberfläche von Fleisch und in Milchprodukten sowie die Erde und Wasser.

In früherer Literatur wurde hauptsächlich das Vorkommen von Mikrokokken auf Rotschmierkäse beschrieben (Accolas et al., 1978; El-Erian, 1969; Lefortier-Medvey, 1993; Mayer, 1990; Philipp, 1993; Piton-Malleret und Gorriere, 1992; Reys, 1993; Sauter, 1986; Seiler, 1986). Hingegen wird in neueren Veröffentlichungen das Vorkommen von nicht pathogenen Staphylokokken auf Käsen beschrieben (Bockelmann et al., 1997a, b; Hoppe-Seyler, 1998; Irlinger et al., 1997, Place et al., 2002). Diese Änderung läßt sich durch eine taxonomische Neueinordnung einiger Mikrokokken zur Gattung *Staphylococcus* erklären. So gehörten *Micrococcus* und *Staphylococcus* lange zur gleichen Familie der *Micrococcaceae* welche von Schleifer (1986) im Bergey's Manual of

systematic Bacteriology, Vol. 2 beschrieben wurde. Stackebrandt et al. (1997) nahm eine neue Einordnung der Bakterien anhand von 16S rDNA/rRNA Sequenzierungen vor. Aufgrund der so erhaltenen Verwandtschaftsgrade wurde die Gattung *Micrococcus* spp. der Klasse *Actinobacteria* zugeordnet, zusammen mit den bereits erwähnten coryneformen Rotschmierebakterien.

### **Gram-negative Bakterien**

Diese Bakterien treten häufig auf nasser Schmiere auf. Nur ein kleiner Teil von ihnen sind coliforme Bakterien der Risikogruppe 2-3. Die besten Wachstumsbedingungen finden diese Bakterien auf Weich- und Schnittkäsen vor. Analysen der Rotschmiereflora von Käsen aus Deutschland, Frankreich und der Schweiz zeigten, dass diese Flora weit verbreitet ist (Burri, 1999; Carnio et al., 1999). Das Vorkommen Gram-negativer Bakterien ist im allgemeinen ein Hinweis auf hygienische Mängel im Produktionsprozess. Für einige nicht pathogene Gram-negative Bakterien konnte eine antilisterielle Wirkung nachgewiesen werden (Ennahar und Deschamps, 2000; Loessner, 2000). Inwieweit der Einsatz dieser nicht pathogene Gram-negative Bakterien für die Oberflächenreifung von Interesse sein könnte, wäre näher zu untersuchen.

### **1.4 Identifizierung und Klassifizierung der Bakterien**

Aufgrund unterschiedlicher Merkmale lassen sich Bakterien identifizieren und in ein System einordnen. Bestimmt werden zum einen morphologische Merkmale, wie Form, Anordnung der Zellen, Vorhandensein von Kapseln und Geißeln, Endosporen, und zum anderen stoffwechsel-physiologische Eigenschaften, wie Sauerstoffbedarf, Pigmentbildung, Enzymleistungen, Nährstoffbedarf und pathogene Eigenschaften. Ein wichtiges Einteilungskriterium in der Bakteriensystematik beruht auf der Gramfärbung. Hierbei werden die Bakterien in gram-positive (dunkelblau-violett) und gram-negative (rot) eingeteilt. Diese Art der Identifizierung ist auf die unterschiedliche Struktur und chemische Zusammensetzung der Zellwände zurückzuführen. Obwohl sich die Unterscheidung anhand von phänotypischen Merkmalen gut in den Laboralltag integrieren lässt, ist diese Form der Identifizierung problematisch. Ein genereller Nachteil der Unterscheidung aufgrund phänotypischer Merkmale liegt in der variablen Expression der Genprodukte. Der Phänotypus unterliegt einer Variabilität, die durch physikalische, chemische und biologische Faktoren geprägt wird.

Die Alternative zur Identifizierung anhand der phänotypischen Merkmale ist die Genotypisierung. Dabei werden Analysen der genomischen Struktur zur Identifizierung herangezogen. Zu den genotypischen Methoden zählen: Plasmid-Analyse, Ribotypisierung, Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus



(PCR-RFLP), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), PCR basierend auf repetitiven chromosomalen Elementen (Rep-PCR), Amplifizierter-Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP), Sequenzierung, um nur einige zu nennen. Diese Methoden sind recht zeit- und kostenintensiv und werden daher kaum im Routinelabor durchgeführt, auch wenn sie in vielen Bereichen aussagekräftiger sind.

Nach ihren Eigenschaften werden die Bakterien stufenweise in Einheiten und Gruppen geordnet. Die Grundeinheit ist der Stamm, Stämme werden zu Arten (Spezies), letztere zu Gattungen (Genus) und diese in Familien zusammengefasst. Das bekannteste und am häufigsten verwendete künstliche Klassifizierungsschema ist Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Die Einteilungen der Gattungen erfolgt im Bergey's Manual of Systematic Bacteriology weitgehend über phänotypische Merkmale der Zellwandanalyse, der Lipid- und Nukleinsäurezusammensetzung nach Grundlagen der numerischen Taxonomie.

## 1.5 Stand der Forschung und Problemstellung

Die Mikroflora der Rotschmiere ist ein komplexes Ökosystem. Wie in jedem Ökosystem nehmen abiotische und biotische Faktoren Einfluss. Aus nicht immer klar zu definierenden Gründen kann dieses System aus dem Gleichgewicht geraten. Die Folge daraus sind häufig Reifungsstörungen (Busse, 1989; Hahn und Hammer, 1990, 1993; Sauter, 1986). Die Probleme, die auftreten können, sind vielfältig. So kann eine schleppende Entsäuerung der Käseoberfläche das Anwachsen einer unerwünschten Schimmelflora begünstigen, da Rotschmierebakterien bei niedrigem pH-Werten nicht anwachsen können. Das Erscheinungsbild der Käse kann nicht nur durch Schimmel negativ beeinflusst werden, sondern auch durch einige in der Produktion eingetragene unerwünschte Mikroorganismen. So kann ein Befall mit *Enterococcus faecalis* zu einer Weißfleckung, mit Pseudomonaden zu Rotfleckung und mit *Serratia rubida* zu Blutfleckung führen (Kammerlehner, 1995), nicht zu vergessen *Penicillium commune*, der durch Ausbildung extrazellulärer zitronengelber Pigmente zur Gelbfleckung führt. In diesen Fällen kann mit einer intensiveren Käsepflege und gezielten Gegenmaßnahmen wie Schmierern mit Kultur das Produkt zur Marktreife gelangen. Jedoch sind solche Maßnahmen recht zeit- und kostenaufwendig, zu dem leidet meist die Qualität des Produktes.

Leider können nicht alle Kontaminanten so leicht erkannt und beseitigt werden wie die oben genannten. Ein besonderes Problemfeld stellen hier pathogene Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und Salmonellen dar. Rotschmierekäse sind im Vergleich zu anderen Käsen in hohem Maße von Listerien-Kontaminationen betroffen (Becker u. Holzapfel, 2000; Breer, 1986; Busse, 1989; Hahn und Hammer, 1993; Hammer et al., 1989; Reyser, 1999; Reyser et al., 1994; Terplan et. al., 1986; VDM, 99a,

99b). Dieses ist zum einen auf die sehr guten Lebensbedingungen für Listerien auf der Käseoberfläche zurückzuführen, welche anspruchslos und widerstandsfähig sind. Das Wachstum erfolgt bei pH-Werten zwischen 5,5 und 9,5 unter aeroben bis fakultativ anaeroben Bedingungen, wobei das pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich liegt (Seeliger und Jones, 1986). Eine Vermehrung findet im Temperaturbereich von 1-45°C statt, wobei das Optimum zwischen 30 und 37°C liegt. Neben dem Auftreten pathogener Kontaminanten stellen die zunehmenden Antibiotikaresistenzen ein wichtiges weiteres Problemfeld dar. Eine häufig beschriebene Kontaminationsflora sind die Enterobakterien (Burri, 1999; Carnio et al. 1999; Gianotti, 1999). In schweizer Studien waren mehr als 50% aller isolierten Enterobakterien 5-fach Antibiotikaresistenzen (Gianotti, 1999; Teuber, 1999, 2000). Diese übertragbaren Antibiotikaresistenzen stellen bei Enterobakterien und Enterokokken ein nicht zu unterschätzendes Problem dar. Im Rahmen der Produktsicherheit müssen die zunehmenden Bakterienresistenzen mit berücksichtigt werden (Brennan et al., 2002; Burri, 1999; Gianotti, 1999; Teuber, 1999, 2000).

Für die Verbreitung derartiger Keime innerhalb einer Käserei ist die jeweilige Strategie der Oberflächenbehandlung während der Käsereifung von entscheidender Bedeutung. In der Industrie werden Sprüh- und Bürstenautomaten mit einem Flüssigkeitstank eingesetzt. Der Tank ist gefüllt mit einer Salzlake, die zusätzlich mit kommerziell erhältlichen Starterkulturen (*Brevibacterium linens* und *Debaryomyces hansenii*) angereichert sein kann. Die periodische Oberflächenbehandlung dient der gleichmäßigen Verteilung der nicht beweglichen Mikroorganismen auf der gesamten Käseoberfläche, und sichert über den Salzgehalt einen Selektionsvorteil der natürlichen Rotschmiereflora gegenüber unerwünschten Kontaminanten (Busse, 1989; Keller und Puhon, 1985; Mayr, 1990; Philipp, 1993). In den Käsereien wird noch immer das „Alt-Jung-Schmiereverfahren“ angewendet. Hierbei werden zum Anfang der Käsepflege die älteren Käse, welche bereits eine voll ausgebildete Rotschmiere besitzen, zu Beginn geschmiert. Dadurch kommt es im Flüssigkeitstank des Automaten zu einer Keimanreicherung. Diese angereicherte Suspension gelangt im weiteren Pflegeverlauf auf die jüngeren Käse. Bei der Produktion von Sauermilchkäse ist das Problem anders gelagert. Hier erfolgt kein Übertragungskreislauf über die Käsepflege mit Kultur, sondern durch das Beimpfen der Quarkmasse mit dem sogenannten „Kulturkäse“. Es handelt sich bei diesem Käse um einen gereiften Sauermilchkäse mit einer gut entwickelten Mikroflora. Die Kulturkäse werden nicht separat produziert, sondern entstammen der laufenden Produktion. Produktionstechnisch erscheint es sinnvoll, die jungen Käse in dieser Form mit einer hohen Keimzahl zu schmieren, jedoch aus hygienischen Gesichtspunkten ist dieses Vorgehen recht fragwürdig. Durch dieses Verfahren wird zwar ein optimaler Reifungsverlauf der Käse sichergestellt, aber auch eine Durchseuchung der Käserei mit unerwünschten Kontaminanten und pathogenen Keimen begünstigt (Becker und Holzapfel, 2000; Breer, 1986, Hahn und Hammer, 1990; Rudolf und Scherer, 2001). Notwendige intensive

Hygienemaßnahmen bei Auftreten pathogener Keime in einer Käserei sind nur eingeschränkt durchführbar. Da Käsereien zum heutigen Zeitpunkt noch entscheidend von der eigenen Hausflora abhängig sind, können Desinfektionsmaßnahmen das ökologische Gleichgewicht zerstören und damit die Reifung stark beeinträchtigen. Selbst bei einer vollständigen Desinfektion einer Molkerei können sich Listerien wieder etablieren (Busse, 1989; Loessner, 2000).

Die für die Entwicklung einer typischen Rotschmiereflora entscheidenden Parameter werden immer besser verstanden. Bekannt ist die Bedeutung der Entsäuerung der Käseoberfläche durch die Hefen für die Entwicklung einer bakteriellen Rotschmiereflora (Brennan et al., 2002; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b; Keller und Puhán, 1985; Mayr, 1990; Petersen et al., 2002; Sauter, 1986). Weitere Wechselwirkungen zwischen Hefen und Bakterien der Rotschmiere wurden vor allem gegenüber *Brevibacterium linens* nachgewiesen. So benötigen *B. linens* Stämme als essentiellen Wachstumsfaktor Pantothenensäure, die neben Nicotinsäure und Riboflavin von Hefen synthetisiert wird (Purko et al., 1951a, b). Nachdem die schimmelhemmende Wirkung von *B. linens* über die Bildung von Methylmercaptan nachgewiesen werden konnte (Beattie und Torrey, 1986; Lewis, 1981, 1982), konzentrierten sich zunehmend die Forschungsarbeiten auf antagonistische Effekte von Rotschmierebakterien gegenüber pathogenen Bakterien auf entsprechenden Käsen (Carnio et al., 1999, 2000; Loessner, 2000; Maoz et al., 2003; Valdes-Stauber, 1991; Valdes-Stauber und Scherer, 1994, 1996). Der Einsatz derartiger Stämme in der Praxis dürfte jedoch problematisch sein, da die beschriebenen Bacteriocine ein weites Spectrum von Bakterien hemmen. Da neben *Bacillus* spp. und *Listeria* spp. auch Stämme der Gattung, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* und *Micrococcus* gehemmt werden, wird bei der gezielten Anreicherung von Bacteriocin-produzierenden Bakterien auf der Käseoberfläche mit Störungen im Wachstum wichtiger Oberflächenbakterien und damit mit Fehlreifungen zu rechnen sein.

Ziel dieser Arbeit war es, eine funktionsfähige Oberflächenstarterkultur herzustellen, mit der es unter typischen Reifungsbedingungen möglich war, die aromatischen und optischen Eigenschaften der jeweiligen Käsespezialitäten zu gewährleisten. Erste Erfolge mit einer definierten Oberflächen-Starterkultur wurden bereits für Schnittkäse beschrieben (Bockelmann et al., 1997b; Hoppe-Seyler, 1998). Es bestand jedoch noch die Notwendigkeit die Reifungsbedingungen zu optimieren und neue Oberflächen-Starterkulturen zu entwickeln die dem Erscheinungsbild der Käsespezialitäten gerecht werden.

Wie bereits von Eliskases-Lechner und Ginzinger (1994) beschrieben, etablieren sich auf der Käseoberfläche nicht nur die eingesetzten Starter, sondern vorwiegend die natürliche käsereieigene Hausflora. Für Versuche zur Entwicklung einer Starterkultur ist es daher von Bedeutung, die Stämme, welche sich auf der Käseoberfläche befinden, genau identifizieren

zu können. Es sollte eine Methode etabliert werden, um die eingesetzten Stämme im Reifungsverlauf zu überprüfen. Hierfür mußte eine klare Ununterscheidung zwischen Kulturstämmen und Stämmen der Hausflora erreicht werden. Die bisher angewandten physiologische Verfahren zur Klassifizierung, wie beispielsweise API-Tests (BioMérieux; Frankreich), lassen im Bereich der bakteriellen Rotschmiere oft nur sehr zweifelhafte Identifizierungen zu (Bockelmann und Hoppe-Seyler; persönliche Mitteilung). Es wurde daher versucht, eine Identifizierung der Rotschmierebakterien mit molekularbiologischen Methoden über Amplified Ribosomal DNA- Restriction Analyse (ARDRA) und Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zur Anwendung zu bringen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der p.A. Reinheitsstufe. Wenn nicht anders erwähnt, wurden diese von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.2 Stämme

Die verwendeten Bakterienstämme entstammten vornehmlich der Kultursammlung des Instituts für Mikrobiologie der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel. Diese Stämme wurden ursprünglich aus der Schmiere oberflächengereifter Käse isoliert. Für weitere Versuche wurden ferner Typstämme und kommerziell erhältliche Stämme der unterschiedlichen Spezies von der Deutschen Stammsammlung (DSMZ, Braunschweig), der Culture Collection, University of Göteborg (CCUG, Göteborg, Schweden), sowie von verschiedenen Kulturenherstellern bezogen.

#### Brevibakterien

*Brevibacterium casei* DSM 20657-T, *B. casei* DSM 20658, *B. casei* DSM 9657, *B. casei* MD 047.0399 (MD-Food), *B. epidermidis* DSM 20660-T, *B. epidermidis* DSM 20659, *B. epidermidis* DSM 9586, *B. linens* DSM 20425-T, *B. linens* ATCC 9174, *B. linens* SR3 10D (Rhodia/Texel), 95016 (Br14), 95020 (Br17), 95024 (Br2), 95025 (Br3), 95037 (Br6), 95159 (Br4), 95160 (Br5), 95161 (Br7), 95162 (Br8), 95163 (Br9), 95165 (Br13), 95166 (Br15), 95167 (Br16), 95168 (Br18), 95229 (ES), 95295, 95221

#### Corynebakterien

*Corynebacterium ammoniagenes* DSM 20306-T, *C. ammoniagenes* MD 047.0522, *C. aquaticum* MD 017.0038, *C. casei* DPC 5298-T, *C. flavescens* DSM 20296-T, *C. glutamicum* MD 017.0031, *C. glutamicum* MD 025.0051, *C. glutamicum* MD 047.0134, *C. kutscheri* DSM 20755-T, *C. lilium* MD 017.0045, *C. lilium* MD 025.0066, *C. mooreparkense* DPC 5310-T, *C. pseudodiphthericum* MD 017.0044, *C. pseudodiphthericum* MD 025.0077, *C. renale* MD 017.0047, *C. striatum* MD 017.0043, *C. striatum* MD 047.0139, *C. variabile* DSM 20132-T, *C. variabile* MD 025.0165, *C. xerosis* MD 017.0027, 95149 (CA3), 95151 (CA8), 95157(CA18), 95206, 95208, 95209, 95210, 95211, 95212, 95213, 95214, 95215, 95216, 95217, 95218, 95219.

### Arthrobakterien

*Arthrobacter citreus* DSM 20133-T, *A. globiformis* DSM 20124-T, *A. nicotianae* DSM 20123-T, *A. sulfureus* DSM 20167-T, *A. rhombi* CCUG 38812 und CCUG 38813-T, *A. globiformis* SBI 627602 (SKW-Biosystems, France), *A. nicotianae* MGE 10D (Rhodia-Food, France), CA13, CA14, 95292, 95293, 95294, 95299, 95207

### Mikrobakterien

*Microbacterium barkeri* DSM 20145-T, *M. gubbeenense* DPC 5286-T, *M. imperiale* DSM 20530-T, *M. laevaniformans* DSM 20140-T, 985292, CA12, CA15, 95292.

### Staphylokokken

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 2569, DSM 799, *S. cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260-T, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM 6718-T, *S. epidermidis* DSM 1798, *S. equorum* DSM 20674-T, DSM 20675, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328-T, *S. kloosii* DSM 20676-T, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T, *S. lentus* DSM 6672, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T, *S. simulans* DSM 20322-T, *S. succinus* subsp. *casei* DSM15096-T, *S. warneri* DSM 20316-T, and *S. xylosus* DSM 20266-T, *S. xylosus* DSM 6179, *S. xylosus* (MVA 10D/91092 / Rhodia-Food, Frankreich), 91075, 91076, 91097, 91105, 91106, 91109, 91115, 91125, 91126, 91127, 91128, 91129, 91131, 91145, 91156, 91157, 91160, 91161, 91162, Staph 1, Staph 2, Staph 3, Staph 4, Staph 5, and Staph 9

Die für die Käseversuche eingesetzten Hefen wurden von der Abteilung Mykologie der Bundesanstalt für Milchforschung Kiel zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Isolate der Spezies *Debaryomyces hansenii* 6004, 6075, 5691, 5674, *Geotrichum candidum* 6201, 6202, 6203, 6204, 6205, 6206, 6207, 6215, 6216, 6217, *Candida krusei* 60143, 6020, 6023, 6028, 6048, 6057, 6096, 60125, 60132 sowie *Kluyveromyces marxianus*, 5672, 5680, 5699, 5613, 5636, 5637, 5638, 5639, 5645, 5651, 5675 zusätzlich getestet wurden *Kleiveromyces lactis* (56100) und *Cryptococcus curvatus* (DH6084).

## 2.3 Stammhaltung und Kultivierung

Die Bakterienstämme wurden auf modifiziertem Plate-Count-Medium (mPC), die Hefen auf Malzextrakt-Medium (ME) als Schrägagar- oder Agarplattenkulturen bei 4°C gelagert. Zur Kulturhaltung wurden die Stämme in einem Rhythmus von 3-4 Monaten überimpft. Die Kultivierung erfolgte auf Agarplatten. Für die Anzucht wurden die Agarplatten, welche vorher mit der Lagerungskultur beimpft wurden, bei 23°C für Bakterien und 25°C für Hefen inkubiert. Für die Bakterien musste zusätzlich auf eine ausreichende Luftfeuchtigkeit geachtet werden. Sie wurden in einem Exsikkator bebrütet, dessen Grund mit aqua dest. gefüllt war. Die Kultivierung erfolgte für 24 bis maximal 48h.

**modifizierten Plate-Count-Medium (mPC):**

Pepton aus Casein	5,0 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
D(+)-Glucose	1,0 g/l
Magermilchpulver	1,0 g/l
Casein-Pepton-Hydrolysat	10,0 g/l
Hirn-Herz-Bouillon	10,0 g/l
NaCl	30,0 g/l
Vitaminlösung	0,5% (v/v)

(Serva, Nr.47292 BME-Vitamin-Lsg.)

pH:  $7.0 \pm 0.01$

Agar-Medien wurde 15 g Agar-Agar zugesetzt.

**Malzextrakt-Medium [ME] (Merck,Nr.5398):**

Malzextrakt	50,0 g/l
Mykologisches Pepton	5,0 g/l

pH:  $5.6 \pm 0.1$

Agar-Medien wurde 12 g Agar-Agar zugesetzt;

Die Lösungen wurden mit *Aqua dest.* angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Vitaminlösung wurde separat nach Abkühlung unter 50°C steril filtriert (0,2 µm Membranfilter; Millipore, Bedford, USA) zugegeben.

**2.3.1 Anzucht von Reinkultur**

Die Anzucht der Reinkulturen wurde in mPC- bzw. ME-Bouillon bei 21°C bzw. 25°C durchgeführt. Für die Anzucht von Reinstämmen zum Zweck einer DNA-Extraktion wurde dem mPC-Medium 20mM DL-Threonin (Serva) zugesetzt. Es wurden für die Anzucht 200 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Diese Kolben wurden mit 100 ml des jeweiligen Anzuchtmediums befüllt und mit einer Impföse einer 24h Agar-Kultur beimpft. Je nach eingesetztem Stamm wurde bei 21°C oder 25°C auf einem Rotationsschüttler (Inkubationsschüttler; GFL; Burgwedel) mit 290 rpm bebrütet. Das Wachstum wurde anhand der Veränderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 620 nm (Mikroprozessor Photometer MPM1500, WTW, Weilheim in Oberbayern) verfolgt.

### 2.3.2 Herstellung von lagerungsfähigen Reinkulturen

Die Anzucht der benötigten Stämme erfolgte entsprechend 2.3.1 in mPC- bzw. ME-Bouillon. Pro eingesetzten Stamm wurden zwischen 50 und 400 ml Kultur angesetzt. Die Stämme wurden bei 21°C auf einem Inkubationsschüttler mit 290 rpm bebrütet und nach 20-21h in der späten logarithmischen Phase steril geerntet (Beckman Kühlzentrifuge, Model J2-21; Rotor JA 10; Beckman Instruments, München) 6000 upm für 15 min. bei 4°C. Die erhaltene Zellmasse wurde im halben Ausgangsvolumen in Lagerungsmedium (0,5% Pepton aus Casein 0,2% Glucose und 2% NaCl) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die Hefen wurden im Lagerungsmedium zehnfach aufkonzentriert. Neben den Lagerungskulturen wurden lyophilisierte Kulturen (Olló-Edimo, 2002) sowie schockgefrostete Kulturpellets (Golecki, 1998) hergestellt.

## 2.4 Oberflächenanalysen von Rotschmierekäse

### 2.4.1 Isolierung von Bakterien

Die für die Isolierung der Bakterien benötigten Selektivmedien wurden mit 1g/l Delvolid versetzt um ein Wachstum von Hefen und Schimmeln zu unterbinden. Die Bestimmung der bakteriellen Lebendkeimzahlen erfolgten auf mPC-Agar, zur besseren Differenzierung pigmentierter coryneformer Bakterien wurde zusätzlich mod. Milchagar (Hoppe-Seyler et al., 2000) verwendet. Für die Identifizierung von *B. linens* Stämmen wurde der KOH-Test (Jones et al., 1973) eingesetzt. Die Differenzierung von Mikrokokken wurde mit FTO-Agar (Rheinbaben von et al., 1981) durchgeführt. Staphylokokken wurden auf SK-Agar (Schleifer et al., 1980) selektiert. Um vermeintliche Pathogenität zu kontrollieren, wurde das Wachstum isolierter Staphylokokken-Stämme auf Baird-Parker-Agar überprüft (Wachstum koagulase-positiver Stämme, z.B. *S. aureus*) bzw. eine Bestimmung über ID 32 Staph (BioMérieux; Frankreich). durchgeführt. Pseudomonaden und Aeromonaden wurden auf GSP-Agar, Salmonellen, Shigellen und Vibrionen auf DCLS-Agar, und Enterokokken auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar selektiert. Die Keimzahl fäkaler coliformer Bakterien erfolgte über die Titerbestimmung mit Brila-Bouillon.



**modifizierter Milchagar** (Hoppe-Seyler, 2000)

Plate Count-Agar	22,5 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
D(+)-Glucose	1,0 g/l
Casein-Pepton-Hydrolysat	10,0 g/l
Hirn-Herz-Bouillon	10,0 g/l
NaCl	30,0 g/l

Der Ansatz erfolgte in 800 ml dest. Wasser. Es wurde pH 7,0 ( $\pm 0,01$ ) mit 0,1 N NaOH eingestellt. Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 48°C erfolgte die Zugabe von 0,5% (v/v) Vitaminlösung (Serva, Nr.47292 BME-Vitamin-Lsg.) steril filtriert und 200 ml tyndallisierte Magermilch.

**FTO-Agar** (Rheinbaben von et al., 1981)

Trypton	15,0 g/l
Phyto-Pepton	5,0 g/l
Hefeextrakt	1,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Tween 80	5,0 g/l
Agarose	15,0 g/l
pH: 7,3	

Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert; nach Abkühlen auf ca. 48°C erfolgte unter langsamem Rühren die Zugabe von 100 ml Furazolidonlösung (0,05% in Aceton) und 1 ml Oil Red O-Lösung (0,5% in Aceton).

**SK-Agar** (Schleifer et al., 1980):

Trypton	10,0 g/l
Fleischextrakt	5,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
Glycerin	10,0 g/l
Natriumpyruvat	10,0 g/l
Glycin	0,5 g/l
KSCN	22,5 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,6 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,9 g/l
LiCl	2,0 g/l
Agarose	13,0 g/l
pH: 7,2 $\pm$ 0,1	

Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert; nach Abkühlen auf ca. 45°C wurden 10 ml einer steril filtrierten 0,45%igen NaN<sub>3</sub>-Lösung (0,2  $\mu$ m Membranfilter; Millipore, Bedford, USA) zugegeben.

**Baird-Parker-Agar (Merck, Nr. 5406):**

Pepton aus Casein	10,0 g/l
Fleischextrakt	5,0 g/l
Hefeextrakt	1,0 g/l
Natriumpyruvat	10,0 g/l
Glycin	12,0 g/l
LiCl	5,0 g/l
Agarose	15,0 g/l
[Eigelb-Tellurit-Emulsion	50,0 ml/l]

pH:  $6,8 \pm 0,2$

Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert; nach Abkühlen auf 50-45°C wurde die Eigelb-Tellurit-Emulsion eingemischt.

**GSP-Agar (Merck, Nr. 10230):**

Na-L(+)-glutamat	10,0 g/l
lösliche Stärke	20,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	2,0 g/l
$\text{MgSO}_4$	0,5 g/l
Phenolrot	0,36 g/l
Agarose	12,0 g/l
Penicillin-G-Natrium	100,000 I.E./l

pH:  $7,2 \pm 0,2$

Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 45°C wurde die Penicillin-G-Natrium (Höchst, Frankfurt/Main) eingemischt.

**DCLS-Agar (Merck, Nr. 10270):**

Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Fleischextrakt	5,0 g/l
Laktose	10,0 g/l
Saccharose	10,0 g/l
tri-Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O	6,0 g/l
Natriumthiosulfat	4,0 g/l
Natriumdesoxycholat	3,0 g/l
Ammoniumeisen(III)-citrat	1,0 g/l
Neutralrot	0,02 g/l
Agarose	13,0 g/l

pH:  $7,5 \pm 0,1$

Die Lösung wurde unter Erwärmen vollständig gelöst und zum Gießen der Platten schnell gekühlt.

**Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (Merck, Nr. 5222):**

Pepton aus Casein	20,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Natriumcitrat	1,0 g/l
NaN <sub>3</sub>	0,15 g/l
Kanamycinsulfat	0,02 g/l
Äsculin	1,0 g/l
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5 g/l
Neutralrot	0,02 g/l
Agarose	15,0 g/l
pH: 7,1 ± 0,2	
Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.	

**Brila-Bouillon (Merck: Nr. 5454):**

Pepton	10,0 g/l
Laktose	10,0 g/l
Ochsengalle, getrocknet	20,0 g/l
Brillantgrün	0,0133 g/l
pH: 7,2 ± 0,1	
Die Lösung wurde in mit DURHAM-Röhrchen versehene Reagenzgläser abgefüllt und 20 min bei 121°C autoklaviert.	

**2.4.2 Isolierung und Identifizierung von Hefen und Schimmeln**

Die Selektion der Pilze sowie die Keimzahlbestimmung der Hefen erfolgten hierbei auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGCA).

**YGCA (Merck, Nr. 16000):**

Hefeextrakt	3,0 g/l
Malzextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Casein	5,0 g/l
Glucose	10,0 g/l
Chloramphenicol	0,1 g/l
Bromphenolblau	0,01 g/l
Agarose	20,0 g/l
pH: 6,6 ± 0,2	
Die Lösung wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.	

Die Identifikation einzelner Hefen erfolgte nach biochemischen Methoden der klassischen Mykologie. Schimmel wurde zur Differenzierung nach morphologischen Merkmalen auf ME-Agar angezüchtet.

### 2.4.3 Lebendkeimzahlbestimmung

Die Lebendkeimzahlen von Hefen und Bakterien wurden über das Koch'sche Gußplattenverfahren bestimmt. Die Verdünnungsreihe der Proben erfolgte in Ringerlösung in dezimalen Schritten. Zur Bestimmung wurden 100 µl der einzelnen Verdünnungstufen ausplattiert. Für die Dreifachbestimmung wurde diejenige Verdünnungstufe gewählt, bei der sich zwischen 10 und 300 KbE auf den Platten befanden. Die Inkubation der Hefen fand für 5 Tage bei 25°C, der Bakterien für 2-3 Tage bei 23°C im Exsikkator statt. Da verschiedene coryneforme Bakterien ihre Pigmentierung erst bei Lichteinfluß ausbilden (Mulder et al., 1966), wurden die Platten bei Tageslicht inkubiert.

### 2.4.4 Probennahme von Hefen und Bakterien

Die Probennahme erfolgte auf einer definierten Fläche von 1 cm<sup>2</sup> auf der Käseoberfläche. Hierzu wurde der Bereich zuerst mit einem feuchten, anschließend mit einem trockenen sterilen Baumwolltupfer abgerieben. Beide Tupfer wurden in 3-5 ml Ringerlösung mit 0,1% Pepton vereint und auf einem Vortex (Vortex-Genie 2<sub>TM</sub>, Scientific Industries) gemischt.

## 2.5 Käsungsversuch Alkalisierungsversuche von Hefen in Milchmedien

Die Hefen wurden auf Malzextrakt-Platten vorgezogen. Wenn sie innerhalb von 24h ein optimales Wachstum aufwiesen, wurden sie für die Versuche eingesetzt. Für den Alkalisierungsversuch wurde ein Milchmedium (80ml tyndallisierte 10%ige Milch, 20ml CPH [15%] + NaCl [15%] Stocklösung; 1ml 1M CaCl<sub>2</sub>) verwendet. Es sollten die Bedingungen auf der Käseoberfläche nach dem Salzbad simuliert werden. Der pH-Wert wurde mit einer 10% Lactatlösung auf ca. 5,2 eingestellt. Beimpft wurde das Medium direkt von einer 24h Agar-Platte mit einer Impföse. Die Bebrütung erfolgte bei 21°C und bei 25°C auf einem Inkubationsschüttler mit 290 rpm. Während der Bebrütung wurde in regelmäßigen Abständen eine sterile Probe für die Bestimmung des pH-Wertes entnommen und mit Hilfe eines pH-Meters (Digital-pH-Meter, Firma Mettler Toledo) gemessen.

## 2.6 Käsungsversuch

Die Produktion von oberflächengereiften Käsen ist geprägt durch das traditionelle Reifungsverfahren des „Alt-Jung-Schmierens“. In früheren Versuchen mit immer wieder frisch aus Reinkulturen von *B. linens* hergestellten Schmierwasser sollte dieses traditionelle Verfahren abgelöst werden. In der Praxis zeigte es sich jedoch als meist deutlich unterlegen (Philipp, 1993; Hoppe-Seyler, 1998). In eigenen Käsungs- und Reifungsversuchen, welche in Kooperation mit dem Institut für Verfahrenstechnik der

Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Kiel, durchgeführt wurden, sollte die Effizienz verschiedener Oberflächenkulturen getestet werden. Desweiteren sollte die Frage geklärt werden, ob sich eine solche Starterkultur gegen eine etablierte Hausflora einer Käserei durchsetzen kann.

### **2.6.1 Salzbad**

Als Salzbad wurden Plastikcontainer (25x60x30 cm) verwendet, welche mit je 10 l einer 18%igen NaCl Lösung befüllt waren. Der Ansatz der Salzlake erfolgte steril. Für die verschiedenen Käseversuche wurden Käse in sterilen, als auch in mit Hefen und Staphylokokken beimpften Salzbadern eingebracht. Die Verweildauer im Salzbad richtete sich nach Größe und Sorte der zu salzenden Käse. Die Salzbadern waren auf 16-18°C temperiert. Eine Umwälzung der Salzbadern erfolgte mit Hilfe von Magnetrührern.

### **2.6.2 Arbeitsschmiere**

Für die einzelnen Käseversuche wurde die Mehrstamm-Arbeitsschmiere aus Lagerungskulturen (2.3.2) der Einzelstämme unmittelbar vor dem Schmiervorgang gemischt. Bei einigen Käseversuchen fanden auch lyophilisierte Stämme sowie schockgefrorene Stämme ihren Einsatz. Die lyophilisierten und die schockgefrorenen Kulturen wurden in Lagerungsmedium bzw. Peptonwasser aufgenommen, und eine Stunde bei 25°C auf einem Schüttler bei 240 rpm inkubiert bevor, sie auf die Käsoberfläche aufgebracht wurden.

In dem Großversuch des EU-Projektes CT 98-PL4220 (FAIR-Programm) wurden die Bakterienstämme in Form von Lyophilisaten eingesetzt. Die Lyophilisate wurden von der Firma Rhodia Food gestellt.

## **2.7 Schnittkäse**

Schnittkäse gehört zu den Käsesorten mit einem relativ hohem Trockenmassegehalt. Für die Standardsorten ist mindestens 55% bzw. 53% Trockenmasse als Vollfettkäse vorgeschrieben.

### **2.7.1 Versuchskäse**

Die Versuchskäse wurden mit einem Fettgehalt von 45% in der Trockenmasse in jeweils 180-200 l Chargen hergestellt. Die Käseausbeute lag bei 5-6 Käsen mit jeweils 2,5 kg. Die Käse waren in der handelsüblichen Brotform 33x10x10 cm gepreßt. Die Produktion erfolgte nach dem Fließschema Abb. 1. Für die Reifungsversuche wurden ein Käselaib in vier gleich große Stücke geteilt und für 4h in ein Salzbad eingebracht.

Eine weitere Bezugsquelle war eine spezielle Käserei für Tilsiter (Ascheberg GmbH, Ascheberg). Die von dort bezogenen Käse wurden vor dem Salzbad aus dem Produktionsablauf genommen. Es handelte sich bei diesen Käsen um die Standardsorte mit 45% Fettgehalt in der Trockenmasse.

Für den Großversuch im Zuge des EU-Projektes CT 98-PL4220 (FAIR-Programm) wurden die Käse in der Produktionsstätte ARLA-Food (Dänemark) gefertigt. Es wurden in zwei Durchläufen je 750 kg Käse produziert (pro Charge 250 kg).

### **2.7.2 Käsereifung**

Die Reifung der getrockneten Grünkäse erfolgte in Glasreifungszellen. Diese hatten die Maße 60x30x30 cm. Sie wurden mit besonders dafür angefertigten PVC-Abdeckungen verschlossen. Um die nötige relative Luftfeuchtigkeit von mehr als 96% gewährleisten zu können, wurden die Glasreifungszellen zu einem Drittel mit autoklaviertem *aqua dest.* gefüllt. Die jungen Käse wurden auf einem Gitter oberhalb des Wasserspiegels gelagert. Zusätzlich wurden unter den Reifungsgittern Auffangschalen angebracht, die Tropfkontaminationen des Wasserreservoirs durch die Käseschmiere verhindern sollte. Während der Reifung wurde die Temperatur bis zur Entwicklung der bakteriellen Rotschmiere zwischen 17 und 18°C gehalten. Anschließend wurde die Temperatur auf 14°C abgesenkt. Die Schmierebehandlung erfolgte manuell mit autoklavierten Bürsten in speziellen Kulturschalen. Jeglicher direkter Hautkontakt mit den Käsen wurde durch Tragen von Einmalhandschuhen vermieden. Als Arbeitsschmiere wurden in der Regel 60 ml der jeweiligen Mischkultur eingesetzt.

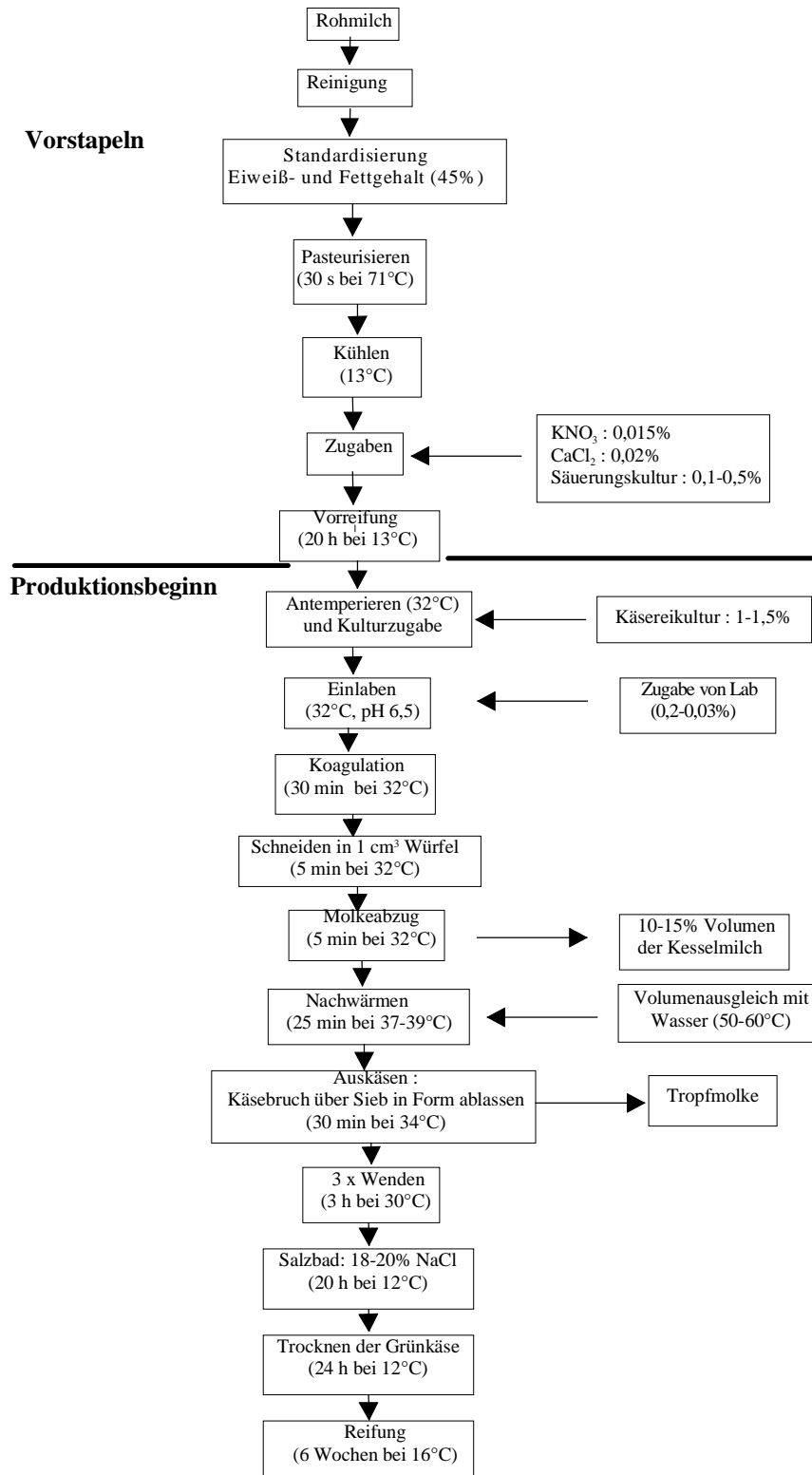


Abb. 1: Fließschema zur Herstellung von Tilsiter Käse

## 2.8 Weichkäse

Weichkäse unterscheiden sich von Hart- und Schnittkäse durch einen höheren Wassergehalt. Der Trockenmassengehalt liegt zwischen 40 und 56%. Bei den Weichkäsen kann man im allgemeinen zwei Untergruppen unterscheiden. Weichkäse mit Schmierebildung und Weichkäse mit Schimmelbildung. Im weiteren Verlauf wird nur das Verfahren für die Produktion von Weichkäse mit Rotschmiere beschrieben. Weichkäse reift verhältnismäßig rasch. Ihre Reifung vollzieht sich von außen nach innen. Sie zeigen häufig erst mit zunehmender Reife, von außen beginnend, die weiche Konsistenz, der sie ihren Namen verdanken

### 2.8.1 Versuchskäse

Alle Versuchskäse wurden mit einem Fettgehalt von 45% in der Trockenmasse hergestellt. Das Chargen Volumen betrug jeweils 20 l. Die entsprechende Käseausbeute lag bei 16-17 Käsen mit jeweils 150 gr.. Die Käseform entsprach der Backsteinform der handelsüblichen Limburger. Die Produktion der Weichkäse erfolgte nach dem Fließschema aus Abb. 2. Zusätzlich zur Starterkultur (Latto Innesto; Wisby) wurde, abweichend zur industriellen Produktion, *Geotrichum candidum* zur Kesselmilch in einer Konzentration von  $10^2$  -  $10^3$  KbE/ml zugegeben. Während der Produktion der Käse sank der pH-Wert von 6,5-6,6 in der Kesselmilch auf 4,8-5,0 auf der Käseoberfläche nach dem Salzbad ab.

### 2.8.2 Käsereifung

Die Weichkäse gelangten nach dem Salzbad in den Beizraum. Dieser Beizraum hatte eine Temperatur von 20°C, die Luftfeuchte lag bei 95%. Die Käse verblieben dort für 24-26h auf Abtropfgittern. Die erste Oberflächenbehandlung erfolgte nach dem die Weichkäse den Beizraum verlassen hatten. Im Gegensatz zu den Schnittkäsen wurde die Oberflächenkultur nicht mit Bürsten aufgebracht, sondern aufgesprüht bzw. aufgeträufelt, und durch Wischen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Die weitere Reifung der Käse erfolgte in Glasreifungszellen (2.5.3) bei einer Reifungstemperatur 16-17°C und einer Luftfeuchtigkeit von 90-95%. Im Verlauf der Reifung wurden die Käse weitere vier Mal einer Oberflächenbehandlung mit Kultur unterzogen.



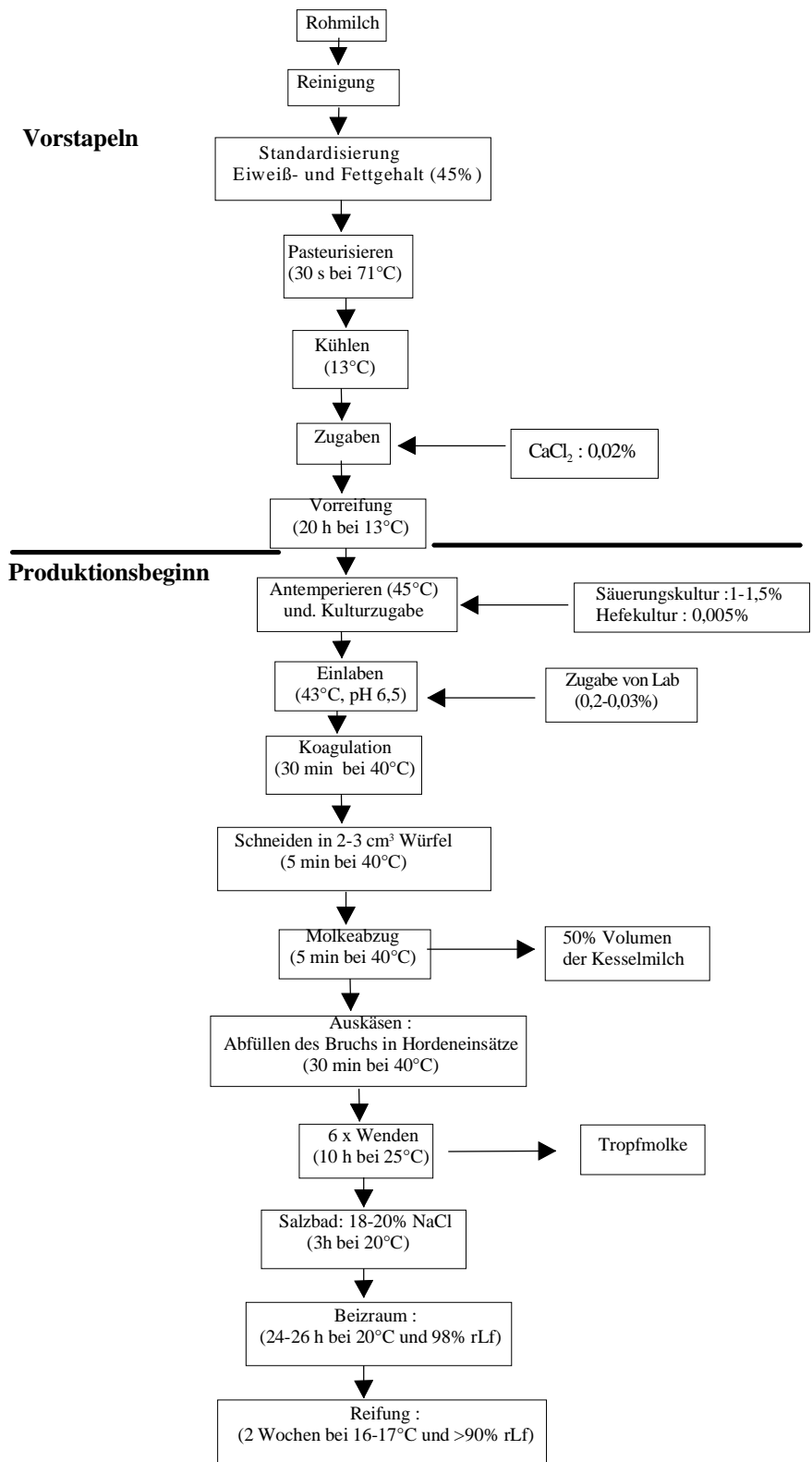


Abb. 2: Fließschema zur Herstellung von Weichkäse

## 2.9 Sauermilchkäse

Bei dieser Käsesorte handelt es sich um eine deutsche Käsespezialität. Diese Käsesorte wird aus entrahmter Milch hergestellt und enthält somit kaum Fett. Sauermilchkäse enthält 60 bis 73% Wasser in der fettfreien Käsemasse. Im Handel ist Sauermilchkäse mit Rot-Gelbschmiere oder mit Edelschimmel auf der Oberfläche zu erhalten.

### 2.9.1 Herstellung von Sauermilchkäse

Für die Versuchskäsungen wurde Sauermilchquark zum Teil aus der laufenden Produktion der Sachsenmilch AG bezogen. Für weitere Versuche wurde in eigener Herstellung der Quark produziert. Der Produktionsablauf ist dem Fließdiagramm Abb. 3 zu entnehmen. Für die Produktion wurde eine kommerziell erhältliche Säuerungskultur (Jogurt 709 Pellet DIP<sup>®</sup>, Danisco Cultor, Niebüll) verwendet. Zusätzlich zur Säuerungskultur wurde der Kesselmilch die Hefen *Candida krusei* und *Kluyveromyces marxianus*, in einer Endkonzentration von  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/ml zugegeben. Bei diesen Hefen handelte es sich um Isolate von oberflächengereiften Käsen. Bei Erreichen eines pH-Wertes von 4,6 wurde die Säuregallerte in Würfeln mit 2 cm Kantenlänge geschnitten. Es folgte das Ausrühren des Bruches. Bei Erreichen der gewünschten Festigkeit wurde der Bruch nochmals absitzen gelassen. Durch Abschöpfen wurden etwa 50% der Molke entfernt. Nach dem Molkeabzug erfolgte das Abfüllen in Leinentüchern zum weiteren Molkeabzug. Um diesen Vorgang zu unterstützen, wurden die Leinentücher über Nacht mit 5 kg Gewichten beschwert, um einen Trockenmassengehalt von 32-33% zu erreichen. Nach 24h wurde der Sauermilchquark in sterile Plastikbeutel abgefüllt unter verschiedenen Bedingungen vorgereift oder direkt weiter verarbeitet. Für die Weiterverarbeitung zu Sauermilchkäse wurde der Quark mit 1,7-1,9% Reifungssalzen und 2,8% Siedesalz versetzt. Durch die Zugabe der Reifungssalze ergab sich eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0-5,2. Mit in die Quarkmasse eingearbeitet wurde Kultur bzw. Kulturkäse. Als Kultur wurde eine Flüssigkultur von *Staphylococcus equorum* und *Staphylococcus sciuri* in einer Konzentration von  $10^6$ - $10^7$  KbE/g beigemischt. Nach dem Animpfen der Quarkmasse erfolgte eine gleichmäßige Durchmischung. Dieses geschah unter Verwendung des Stephan-Cutters bzw. manuell. Die so bearbeitete Quarkmasse wurde in Hordeneinsätze für Weinkäse abgefüllt.

### 2.9.2 Käserreifung

Nach der Ausformung gelangten die Käse in einen Vorreifungsraum, den Schwitzraum. Dieser Raum wies eine Temperatur von 30-33°C, bei einer relative Luftfeuchtigkeit von 98-100% auf. Die Verweildauer in diesem Raum betrug 20-24h. Nach dem Schwitzraum hatten die Käse eine ca. 2 mm dicke Fetthaut ausgebildet. Es handelt sich bei der Fetthaut um eine Hefenschicht, welche die Oberfläche alkalisiert. Der pH-Wert auf der

Käseoberfläche war nach dem Schwitzraum auf 6,8 angestiegen. Nach dem Schwitzraum wurden die Käse für ca. 30 min. abkühlen gelassen. Nach der Abtemperierung erfolgte eine einmalige Oberflächenbehandlung der Käse mit Kultur welche in einer 3% Salzlösung aufgenommen worden war. Nach dem Sprühvorgang erfolgte eine Umlagerung der Käse in Glasreifungszellen. Die Glasreifungszellen wurden in einen Reifungsraum eingebracht, in welchem eine Temperatur von 10-12°C, sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 85% herrschte. Unter diesen Bedingungen wurden die Käse für 12-48h gereift. Im Anschluss wurden die Käse in spezielle Folie verpackt und bei 8°C gelagert.

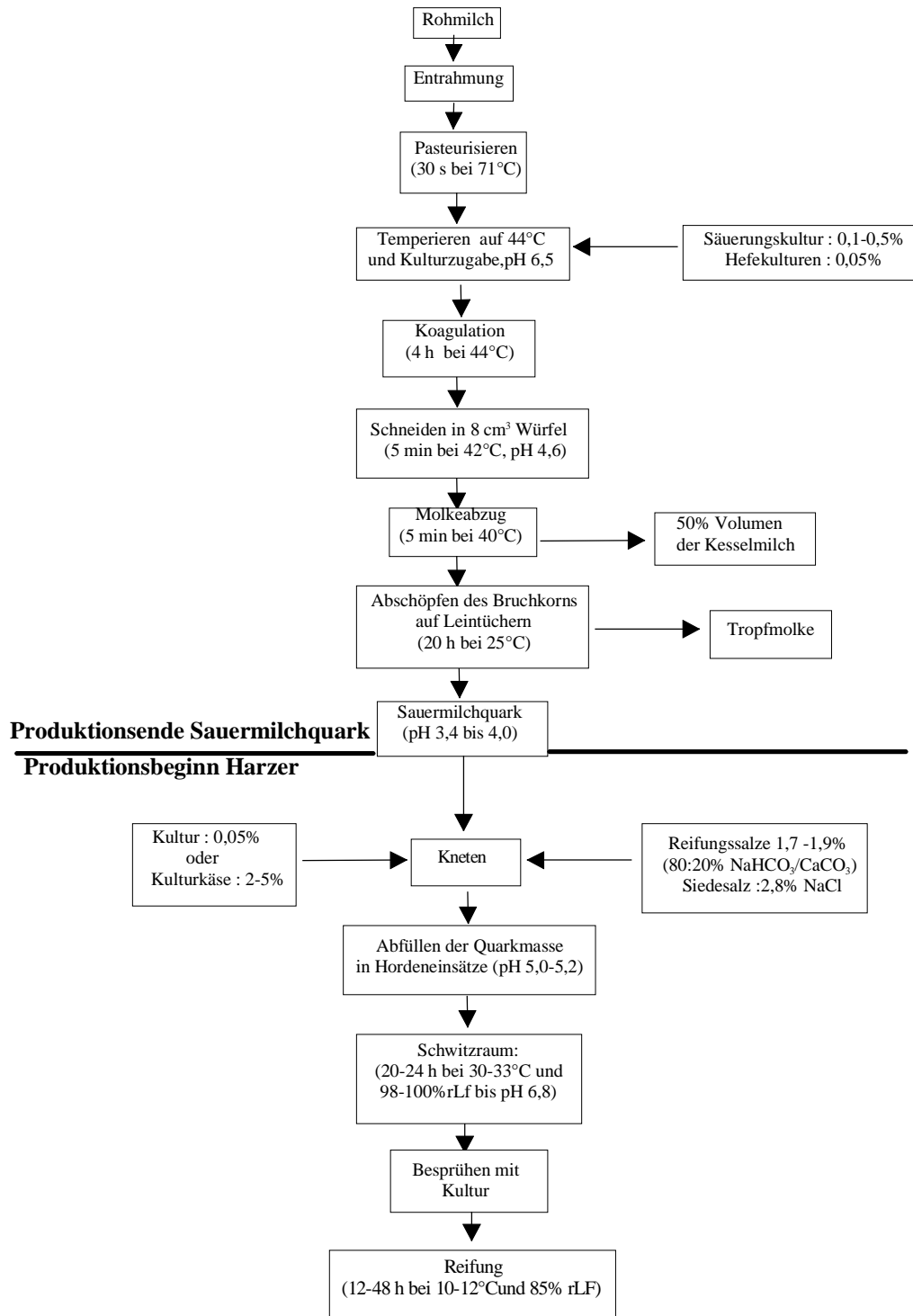


Abb. 3: Fließschema zur Herstellung von Sauermilchkäse

## 2.10 Differenzierung mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden

### 2.10.1 Puffer und Lösungen

Puffer:

#### 10x TAE-Puffer:

Tris	48,4 g/l
Na-EDTA	7,45 g/l
Na-Acetat-Trihydrat	6,8 g/l
Eisessig	25,0 ml
Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 7,85 eingestellt	

#### 10x TBE-Puffer:

Tris	108,0 g/l
Borsäure	55,0g/l
0,5M EDTA ,pH 8,0	40,0 ml

#### 10x TE-Puffer:

Tris	12,11 g/l
Na-EDTA	3,7 g/l
Na-Acetat-Trihydrat	6,8 g/l

Alle Puffer wurden 10fach angesetzt. Bevor sie zum Einsatz kamen, wurden sie 1:10 mit sterilem *aqua dest.* verdünnt. Der TE-Puffer wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

Lösungen:

#### 8x Polyacrylamidlösung

Rapid Gel XL(50%)	50 ml
Harnstoff	168 g
10 x TBE	40 ml

Die Lösung wurde mit bidest auf 400 ml aufgefüllt. Die Substanz Rapid Gel XL wurde von der Firma Bio Whittaker Molecular Applications, USA bezogen.

### **2.10.2 Amplified Ribosomal DNA- Restriction Analyse (ARDRA)**

Je nach Gattung wurde ein Bereich der 16S rRNA [1,4 kb], beziehungsweise ein Bereich der 16S rRNA, 16-23S rRNA-Spacer-Region und ein Teil der 23S rRNA [2,4-2,7 kb] amplifiziert. Die Amplifikate wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen hydrolysiert, um ein spezifisches Schnittmuster für jede eingesetzten Spezies zu erhalten.

### **2.10.3 Isolierung und Reinigung von Gesamt-DNA**

Die Schnellisolierung der Gesamt-DNA erfolgte nach Leehouts et al. (1990). Von einer 21h Kultur (2.3.1.) wurden 1-2 ml abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Im Anschluss wurde die Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lösung A (Saccharose 20% [w/v], Tris-HCl [pH 8.0] 10 mM, EDTA 10 mM und NaCl 50 mM) resuspendiert, mit 20 µl Lysozym (50 mg/ml) und 2-10 µl Mutanolysin (5000 U/ml) versetzt. Diese Suspension wurde für ca. 1h bei – 80°C eingefroren. Anschließend wurde bei 37°C für ca. 30 min inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 25 µl SDS (25% ig). Es wurde bei 60°C inkubiert bis die Lösung klar war. Nachfolgend wurden der klaren Lösung 400 µl Phenol und 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trat eine Trennung in zwei Phasen auf. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt, und mit 100 µl aqua bidest. und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Dieser Ansatz wurde für 5 min durch Ausschütteln gemischt und nachfolgend zentrifugiert. Der Vorgang des Abnehmens der wässrigen Phase und das Zugeben der Lösungen erfolgte so lange, bis sich keine Intrapphase mehr ausbildete. Zum Abschluss bzw. für die Fällung wurde die klare wässrige Phase in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt, und mit 100 µl NaAC, sowie 500 µl Isopropanol vermischt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurde dieser Ansatz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, und das Pellet mit 80% EtOH gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 150 µl TE+RNase resuspendiert. Dieser Ansatz wurde nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der DNA wurden 5 µl des Ansatz mit 5 µl TE-Puffer verdünnt, und über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Es war so möglich, die Ausbeute und die Reinheit der DNA abzuschätzen. Die DNA Lösung wurde bei – 20°C gelagert.

### **2.10.4 Einsatz von ganzen Zellen**

Die Zellen wurden in 200 µl PCR-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) 10 min bei 650 rpm auf 95°C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt und direkt als DNA-Template verwendet .

### 2.10.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurden Universalprimer (Vanechoutte et al., 1992) für die Gattungen *Staphylococcus*, *Arthrobacter* und *Microbacterium* eingesetzt, die zwei konservierten Sequenzabschnitten der 16S - und der 23S rRNA entsprachen:

68- Upstream Primer: 5'-TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC-3'

69 -Downstream Primer: 5'-CCTTCCCTCACGGTACTGGT-3'

Für die Gattungen *Brevibacterium* und *Corynebacterium* wurde der Downstream Primer ausgetauscht. Der hierfür verwendete Downstream Primer entsprach einem Sequenzabschnitt um Position 1450 der 16S rRNA.

1450- Downstream Primer: 5'-CCTTGTTACGACTTAGTCCCAAT-3'

Die Durchführung der PCR erfolgte im Gene-Amp-PCR-System 9600 (Perkin Elmer, Deutschland). In einem sterilem 0,5 ml Reagenzgefäß wurden 49 µl Reaktionsansatz aus 5 µl Puffer (200 mM Tris-HCL, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0,1% [w/v] Gelatine), 8 µl 1,25 mM d NTP-Gemisch, 2 µl 2,5% Tween 20, jeweils 25 mol/µl Primer und 1 unit Taq-Polymerase, welche 1:50 mit Pfu-DNA-Polymerase versetzt wurde, zusammengegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 95°C denaturiert es folgten 35 Zyklen unter folgenden Bedingungen: 20 sec. bei 92°C (Denaturieren der DNA), 20 sec. bei 58°C (Binden der Primer), 150 sec. bei 72°C (Elongation am Temperaturoptimum der Taq-Polymerase). Das Programm wurde mit einem einmaligen Schritt bei 72°C für 10 min beendet. Um die Reinheit der Reagenzien zu überprüfen, wurde bei jeder PCR eine Probe ohne Template zugegeben. Die Überprüfung der Produkte erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese.

### 2.10.6 Restriktionsanalyse

Für den Restriktionsverdau wurden ungereinigte PCR-Fragmente eingesetzt (Turbett und Sellner, 1996). Der Verdau erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Zugabe des PCR-Produktes variierte zwischen 15 und 20 µl. Wenn weniger PCR-Produkt eingesetzt wurde, erfolgte eine Auffüllung zum Endvolumen mit sterilem TE-Puffer. Die Restriktionsenzyme wurden in einer Konzentration von 5 U dem Ansatz, die Puffer nach Angaben der Hersteller (Biolab, Eurogentec) zugegeben. Der Verdau erfolgte bei Temperaturen nach Herstellerangaben und wurde immer über Nacht durchgeführt. Zur Überprüfung der Reinheit, sowie der Aktivität des eingesetzten Enzyms fand zusätzlich ein Kontrollverdau mit λ oder geeigneter Vektor-DNA statt.

### 2.10.7 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 0,8–1,5%igen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989). Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60°C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromidlösung (1µg/ml). Die einzusetzenden Proben wurden mit 3 µl Dye (Bromphenolblau 0,07 [w/v], Glycerol 33,0 [v/v]) versetzt. Zum Größenvergleich wurde ein Längenstandard mit aufgetragen. Die Dokumentation und Analyse der Agarosegele erfolgte unter UV-Licht auf einem Transilluminator (TFL-20 M, Biometra, Göttingen), und mit einem Video Copy Prozessor (Mitsubishi) abgelichtet.

### 2.11 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Als Matritze wurde das PCR-Produkt aus 2.10.5 eingesetzt.

#### 2.11.1 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proben wurden unter UV-Licht (UV-Transilluminator, Serva) als Gelstück ausgeschnitten. Unter Verwendung des Min Elute™ PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) wurde die DNA anschließend nach Angabe des Herstellers aus den Gelstücken extrahiert.

#### 2.11.2 Sequenzierungsprimer

Primer	Spezifität	Sequenz 5'-3'	Annealing Temperatur (°C)	Richtung
68	Eubakterien	TGG CTC AGA TTG AAC GCT GGC GGC	57	>>>
69	Eubakterien	CCT TTC CCT CAC GGT ACT GGT	57	<<<
278	<i>B. linens</i>	GCC ACA CTG GGA CTG AGA CA	61.4	>>>
706	<i>B. linens</i>	GTG TCA GTT ACA GCC CAG	56.7	<<<
911	<i>B. linens</i>	ATT CGA TGC AAC GCG AAG A	54.5	>>>



### 2.11.3 Partielle Sequenzierung

Es wurde nach dem Verfahren der zyklischen Sequenzierung (Murray, 1989.) gearbeitet. Als Template wurden gereinigte PCR-Produkte (2.11.1), in einer Konzentration von 100 ng DNA/kb eingesetzt. Für jede Sequenzreaktion erfolgte eine Zugabe von 2 pmol 68-IRD 800 markierter Primer (MWG Biotech, Ebersberg): Die PCR-Produkte wurden in einem Volumen zwischen 2,5 und 10  $\mu$ l in den Reaktionsansatz gegeben. Desweiteren wurden 1  $\mu$ l Primer und 1  $\mu$ l DMSO zugesetzt. Um auf ein gesamt Volumen von 25  $\mu$ l zu kommen, wurde mit *aqua bidest.* aufgefüllt.

In 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden je 2  $\mu$ l der vier Didesoxynucleotide (Thermo sequenase labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Amersham, USA). gegeben. Jeweils 6  $\mu$ l des „DNA/primer mix“ wurden zu dem Ansatz pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für wenige Sekunden bei 14000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf centrifuge 5417C) zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Überschichtung des Reaktionsansatz mit 20  $\mu$ l „chillont 14“ als Verdunstungsschutz. Die Amplifikation wurde im Mastercycler 5330 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) durchgeführt. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min folgten 30 Zyklen. Der Temperaturverlauf war wie folgt: 30 sec bei 95°C, 30 sec bei der für die Sequenzierungsprimer vorgegebenen Temperatur (2.11.2), 30 sec bei 72°C. Das Programm wurde mit einem einmaligen Schritt bei 72°C für 10 min beendet. Direkt im Anschluss wurden 4  $\mu$ l Stop-Loading- Puffer (Sequi Therm<sup>TM</sup>, Biozym, Oldenburg) zugegeben, und die Proben auf Eis gelagert.

### 2.11.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte (2.11.3) erfolgte über ein 6,5%iges Polyacrylamidgel. Zur Gelbereitung wurden von einer achtfachen Polyacrylamidlösung (2.10.1) 50 ml abgenommen, und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l DMSO, 50  $\mu$ l TEMED (Roth, Karlsruhe), sowie 350  $\mu$ l 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung, wurde das Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten blasenfrei gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 2h konnte das Gel sofort verwendet werden. Die Glasplatten wurden in den LI-COR DNA Sequencer 4000 (MWG-Biotech) eingespannt, und die Detektionseinheit nach Angaben des Herstellers justiert. Nach einem Vorlauf von 30 min erfolgte die Auftragung von 1,5–1,7  $\mu$ l Probe auf das Gel. Die Auftrennung wurde mit TBE- Puffer bei 1,5 kV, 35 W, 31,5 mA und 48°C über Nacht durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Base ImagIR<sup>TM</sup>-Software (Li-COR) ausgewertet.

### **2.11.5 Auswertung der Sequenzdaten**

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte über das Programm „DNASIS for Windows Ver. 2.1“ (Hitachi Software Engineering Co., Ltd., 1995). Homologievergleich wurde mit Hilfe des „BLASTN 2 search service“ des Datenbank Services von EMBL (Heidelberg) durchgeführt (<http://www.dove.embl-heidelberg.de>).

## **2.12 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Bei der herkömmlichen Elektrophorese von DNA-Fragmenten können nur Nukleotidmoleküle bis zu einer Länge von etwa 50 kb getrennt werden. Mit dem Verfahren der PFGE ist es möglich, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von etwa 2000 kb zu trennen. Diese Methode wurde 1984 von Schwartz und Cantor entwickelt.

### **2.12.1 Zellzucht und Zellernte**

Die Zellanzucht erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Zur Zellernte wurden autoklavierte Zentrifugenbecher (JA-20 für 30 ml Kultur bzw. JA-10 für 100 ml Kultur) verwendet. Es wurde 10 min mit 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Avanti<sup>TM</sup>J- 25, Beckmann, U.S.A). Das Pellet wurde nachfolgend zweimal mit dem gleichen Ausgangsvolumen von 50 mM EDTA gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde das Pellet in 4 ml Waschpuffer aufgenommen, und auf zwei sterile 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) aufgeteilt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C (Eppendorf-Kühlzentrifuge, Centrifuge 5402). Das Pellet wurde bei –20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

### **2.12.2 Fixierung der Zellen in Agarose und Präparation der Bakterien-DNA**

Um eine einheitliche Zelldichte in den Inserts zu erhalten, wurde das Pellet eines Reaktionsgefäßes (2.12.1) in 1 ml 50 mM EDTA-Puffer resuspendiert. In ein kleines Glasröhrchen wurden 4,9 ml dest. Wasser gefüllt. Von dem resuspendiertem Ansatz wurden zwischen 20–100µl in das Röhrchen eingebracht, bis eine OD<sub>620</sub> von 0,8–1,2 erhalten wurde. Aus dieser Verdünnung wurde der entsprechende Verdünnungsfaktor für die Ausgangskultur bestimmt. Das Aufnahmevermögen für die Inserts ist nach folgender Formel berechnet.

$$OD_{620} \times 1,5 \times [\text{Verdünnungsfaktor} / 100] = \text{Aufnahmevermögen}$$

Das zweite Pellet wurde im kalkulierten Aufnahmevermögen mit 50 mM EDTA-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 250 µl abgenommen und in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß, welches mit 1,5 ml Low Melting Agarose (1 %)

gefüllt war, pipettiert und vorsichtig gemischt. Um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern, wurde der Ansatz im Wasserbad bei 50°C aufbewahrt. Jeweils 250 µl dieser Agarosesuspension wurden in Plug-Mold-Taschen, welche vorher mit Alkohol gereinigt worden waren, pipettiert und 10 min bei -20°C geliert. Nach der Aushärtung wurden je 6 Inserts pro Container in 5 ml 50 mM EDTA bei 4°C gelagert. Zur Präparation der Bakterien-DNA in den Inserts wurde zuerst ein Verdau mit Lysozym durchgeführt. Die Inserts wurden in 3 ml einer Lysozymlösung (2 mg/ml Lysozym in 50 mM EDTA, pH 8,5 und 0,05% N-lauryl sarcosine) über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einigen Stämmen war es notwendig, zusätzlich 20 U/ ml Mutanolysin zum Ansatz zu geben. Im Anschluss erfolgte der Verdau mit Proteinase K. Es wurden 4–5 Inserts in 5 ml NDS-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1% SDS, und 0,45 M EDTA pH 8,5, 10 mg (Endkonzentration) Protease K (Sigma)) bei 50°C für 72h inkubiert. Nachfolgend wurden die Inserts 5–7 mal mit 50 mM EDTA, pH 8,5 bei 30 min bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend erfolgte eine Aufnahme der Inserts in 50 mM EDTA. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte eine Lagerung bei 4°C.

### **2.12.3 Präparation von Einzelkolonien bzw. Plattenausstrichen**

Für die Präparation von Einzelkolonien aus Oberflächenanalysen erfolgte der Einsatz direkt aus der Plattenanzucht. Unter Verwendung einer 10µl Impföse wurden die Kolonien in 1 ml 50 mM EDTA, pH 8,5 überführt. Die Zellen wurden zweimal in dem Aufnahmepuffer gewaschen. Das so gereinigte Pellet wurde in 100 µl 50 mM EDTA resuspendiert. Die Zellsuspension wurde ohne eine OD<sub>620</sub>-Bestimmung in Agarose aufgenommen. Zur weitere Bearbeitung siehe (2.12.2).

### **2.12.4 Restriktionsanalyse**

Von den in 50 mM EDTA gelagerten Inserts wurden 1–3 mm dicke Gelblöcke eingesetzt. Zur Equilibrierung wurden die Gelblöcke in 500 µl TE – Puffer und nachfolgend in 200 µl des entsprechenden 1x Restriktionspuffers aufgenommen. Die jeweilige Verweildauer in den Puffern betrug 1h bei 4°C. Für den Restriktionsansatz erfolgte eine Überführung der Gelblöcke in ein neues Reaktionsgefäß. Es enthielt 200 µl 1x Restriktionspuffer, 2 µl acetyliertes BSA (1mg/ml) und 5 U des gewünschten Enzyms. Der Ansatz wurde über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

### **2.12.5 Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,1%iges Pulsfeldagarosegel (Pulsed Field Certified Agarose, Biorad) verwendet. Die Agarose wurde in 100 ml 0,5x TBE Puffer (2.10.1) angesetzt. In die Geltaschen des auspolymerisierten Gels wurden die mit Restriktionsenzymen behandelte Gelblöckchen eingebracht und mit 0,8%iger Low Melting

Agarose überschichtet. In das Biorad CHEF–DRII - System (Biorad) wurden 2 Liter 0,5x TBE Puffer gefüllt und auf 14°C temperiert. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 175 V durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte über 24h mit einem Switch-Time Gradient von 0,5–15sek. In einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) wurden die DNA–Fragmente für 1h gefärbt, eine Entfärbung erfolgte im Anschluss für 30 min in *aqua dest.* Eine Dokumentation des Agarosegels fand unter UV-Licht mit Hilfe des Video Copy Prozessor statt. Um die Fragmentgrößen abschätzen zu können, wurde der „low range PFG maker“ (Kombination aus Lamda *HindIII* und Lambda Konkatemeren, Fragmentgrößen, 0,1–200 kb, Biolabs; USA) verwendet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Oberflächenanalyse kommerzieller Rotschmierekäse

Rotschmierekäse sind in den Gruppen Hart-, Schnitt-, Weich- und Sauermilchkäse anzutreffen. Diese Käse zeichnen sich nicht nur durch abweichende Produktionsabläufe und Reifungszeiten aus, sondern zusätzlich durch unterschiedliches Aussehen und Aroma. Zur Analyse der unterschiedlichen Schmierarten wurden mehrere handelsübliche Rotschmierekäse auf die Zusammensetzung ihrer Oberflächenflora hin untersucht. Da diese Proben aus dem Handel bezogen worden waren, waren die Reifungszeiten nicht einheitlich, es handelte sich aber bei allen Käsen um marktreife Käse.

**Tab. 1:** Mikrobielle Zusammensetzung verschiedener Rotschmierarten

Oberflächenflora	Schnittkäse	Weichkäse	Sauermilchkäse
Hefen [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1,7 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> – 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup> – 10 <sup>8</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Corynebacterium</i> spp. (beigefarben)	50-90%	5-50%	5-80%
<i>Arthrobacter</i> spp. <i>Microbacterium</i> spp.	0,1-5%	2-80%	-
<i>Brevibacterium linens</i> (orange)	0,1-15%	1-15%	5-50%
Bewegliche Stäbchen (orange)	-	5-35%	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,1-5%	<1%	5-80%
Schimmel	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas</i>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>
Coliforme Bakterien	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>
Enterokokken	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>4</sup>

Für die verschiedenen Käsesorten waren Hefenkeimzahlen von 10<sup>5</sup>- 10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> zu ermitteln. Bei geschmierten Schnittkäsen dominierte die Hefe *Debaryomyces hansenii*. Die Hefenflora wurde mit dem biochemischen Test ID32C (BioMérieux) analysiert. Bei geschmierten Weichkäsen (Limburger) konnte neben *D. hansenii* auch *Geotrichum candidum* auf allen Proben nachgewiesen werden. Diese genannten Hefen waren für Sauermilchkäse (Harzer Käse) nicht relevant. Für diese Käsesorte waren *Candida krusei* und *Kluyveromyces marxianus* bezeichnend. Zusätzlich konnten noch weitere Hefespezies isoliert werden, welche nicht weiter differenziert wurden.

Die bakterielle Gesamtkeimzahl variierte bei Schnitt- und Weichkäse um eine Zehnerpotenz. Es waren Konzentrationen von  $10^8$  bis  $10^9$  KBE/cm<sup>2</sup> auf der Käseoberfläche nachzuweisen. Bei Sauermilchkäse konnten Schwankungen von vier Zehnerpotenz dokumentiert werden. Die Analysen der verschiedenen handelsüblichen Rotschmierekäse zeigte, dass die Oberflächenflora im Wesentlichen aus coryneformen Bakterien bestand. Bei Schnittkäse (Tilsiter) betrug der prozentuale Anteil der beige pigmentierten Corynebacterium-Spezies zwischen 50-90%, für Weichkäse 5-50%, bei Sauermilchkäsen zwischen 5 und 80% der auf modifiziertem Milchagar gewachsenen Rotschmiere-Oberflächenflora (einschließlich Staphylokokken). Das wohl bekannteste Rotschmierebakterium, *Brevibacterium linens*, wurde im Allgemeinen nur in geringen Konzentrationen auf der Oberfläche von Schnitt- und Weichkäse nachgewiesen. Bei geschmierten Schnitt- und Weichkäsen lag der Anteil an der Oberflächenflora bei 0,1 bis 15%, bei Sauermilchkäsen war der Anteil von *B. linens* an der Oberflächenflora teilweise bis über 50% (Tab. 1).

Als weitere Komponenten der Schmiere waren gelbpigmentierte coryneforme Bakterien der Gattung *Arthrobacter* spp. und/oder *Microbacterium* spp. nur von geschmierten Schnitt- und Weichkäse zu isolieren. Für kommerzielle Sauermilchkäse erfolgte kein Nachweis einer dieser Gattungen. Staphylokokken waren für alle Rotschmierekäse typisch. Dabei dominierte auf geschmierten Schnitt- und Weichkäsen *Staphylococcus equorum*, auf Sauermilchkäsen *S. saprophyticus*. Eine genauere Differenzierung der isolierten Staphylokokken erfolgte durch ID32 Staph (BioMérieux) und ARDRA (3.8.2).

Bei Limburger Käsen einer süddeutschen Käserei konnten über mehrere Jahre bei allen Analysen bewegliche Stäbchen nachgewiesen werden. Diese wurden als *Halomonas* spp. identifiziert. Der Anteil an der Oberflächenflora betrug bei diesen Bakterien bis zu 35% (Tab. 1).

Alle untersuchten, kommerziellen Käsen, wiesen neben der Rotschmiereflora unerwünschte Fremdkontaminanten auf. So konnten Schimmel, Pseudomonaden, coliforme Bakterien, und Enterokokken nachgewiesen werden.

### 3.2 Alkalisierungsversuche von Hefen in Milchmedien

In den Käsereien sind Hefen vorwiegend als technologisch erwünschte Keimflora anzusehen. Überlicherweise ist die Reifung von Rotschmierekäse durch zwei Phasen gekennzeichnet. In der Ersten entwickelt sich die Hefeflora. Der pH-Wert der Oberfläche liegt nach der Produktion bzw. nach dem Salzbad, zwischen pH 4,8 und 5,2. Zu diesem Zeitpunkt können nur die salz- und säuretoleranten aeroben Organismen die Oberfläche besiedeln. Die Hefen entstammen zumeist der jeweiligen Hausflora, mitunter werden in

der Arbeitsschmiere spezielle Hefen als Starter zugesetzt. Die Assimilation von Laktat durch die säuretoleranten Hefen, sowie die Freisetzung alkalischer Stoffwechselprodukte, führt zu einer allmählichen Erhöhung des Oberflächen-pH-Wertes, so dass sich in der zweiten Phase die schwach säuretoleranten Rotschmierebakterien (z.B.: *Brevibacterium linens*) ab einem pH-Wert von 6,0 auf der Oberfläche etablieren. Eine verzögerte Entsäuerung würde die Reifung hinauszögern, und die Kontamination mit Fremdkeimen, insbesondere mit Grünschimmel, ermöglichen. Wie unter 3.1 beschrieben, konnten von der Oberfläche der verschiedenen Käsesorten unterschiedliche Hefegattungen isoliert werden.

Zum Screening auf technologische erwünschte Entsäuerungseigenschaften wurden Stämme der Spezies *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* und *Candida krusei*, wie unter 2.5 beschrieben, durchgeführt.

Wie aus Abb. 4 zu entnehmen, waren die Fähigkeiten zur Alkalisierung des Milchmediums bei den Hefen sehr unterschiedlich ausgeprägt und von der Temperatur abhängig. Bei den getesteten Stämmen der Spezies *G. candidum* zeigte sich bei 21°C eine lag-Phase von einem Tag. Diese verkürzte sich bei 25°C auf wenige Stunden. Nach 1 ½ Tagen konnte in 70% der getesteten Ansätze bei 21°C ein pH-Wert zwischen 5,8 und 6,1 erreicht werden. In den verbleibenden Versuchsansätzen lag der pH-Wert während des gesamten Untersuchungsintervalles zwischen pH 5,4 und 5,8. Bei einer Erhöhung der Versuchstemperatur auf 25°C zeigte sich eine schnellere Alkalisierung des Mediums. In 60% der Ansätze war ein pH-Wert von 6,0 innerhalb eines Tages erreicht worden (Abb.4). Die Hefen, welche bei 21°C eine schwache Alkalisierung zeigten, entsäuerten bei 25°C das Medium im Untersuchungszeitraum über pH 6,0 (Abb. 4).

Ein schnell alkalisierenden Stoffwechsel war bei den Isolaten aus Quark, als auch bei der Oberfläche eines Harzer, sowie eines Camembert vorzufinden.

Bei den Alkalisierungsversuchen im Milchmedium für die Isolate der Spezies *D. hansenii* konnte bei 21°C nach 26h in 60%, und bei 25°C nach 24h in allen Versuchsansätzen ein pH-Wert um 6,0 gemessen werden. Die Versuche im Milchmedium wurden in früheren Untersuchungen bei 16°C (Reifungstemperatur von Tilsiterkäse) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Alkalisierung um ca. 12h verzögert einsetzte. Nach ca. 2 ½-3 Tagen ergab sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 4 bei 21°C (Daten nicht gezeigt).

Deutliche Unterschiede im Alkalisierungsverhalten zeigten sich für die Spezies *C. krusei* und *K. marxianus*. Nur der getestete Stamm der Spezies *C. krusei* alkalisierte das Medium in beiden Versuchsansätzen über pH 6,0 hinaus (Abb. 4). Bei der Spezies *K. marxianus* konnten unterschiedliche Stoffwechselleistungen der einzelnen Stämme

dokumentiert werden. Nur der Stamm 5680 zeigte einen alkalisierenden Stoffwechsel, jedoch nicht über pH 6,0 hinaus. Die weiter getesteten Stämme dieser Spezies führten im Versuchsverlauf zu einer Ansäuerung des Mediums. Das Isolat der Spezies *K. lactis* 56100 alkalisierte das Medium im Versuchszeitraum um einen pH-Wert von 6,0, jedoch nicht darüber hinaus.



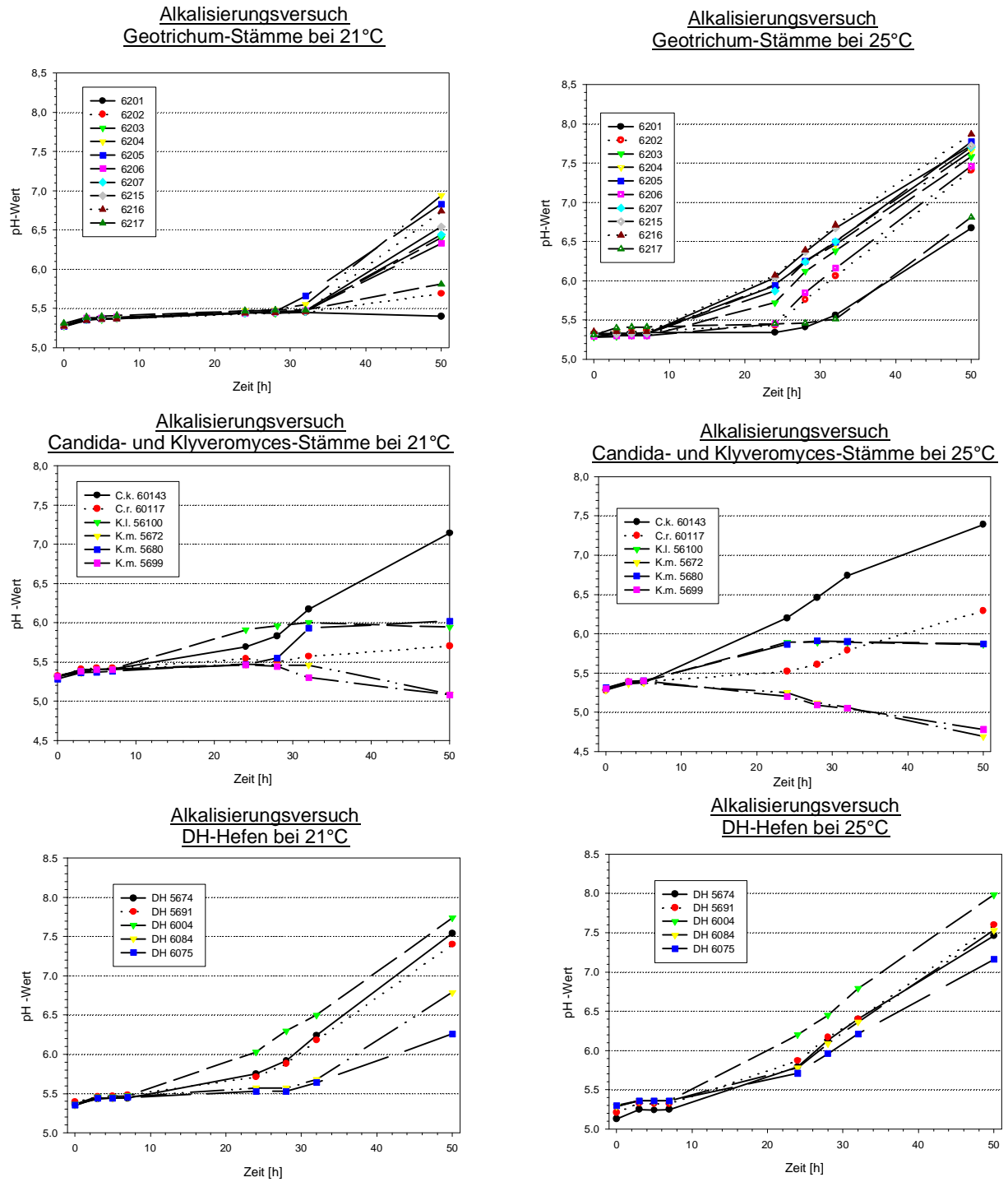


Abb. 4: Alkalisierung von Hefen im Milchmedium.

### 3.3 Einfluss des Salzbadens auf die Oberflächenreifung

Nach Abschluss des Käsungsvorgangs gelangen die gepressten und geformten Käsestücke, bzw. Käselaibe in ein Salzbad mit 16-22% Kochsalz. Es ist bekannt, dass sich in Salzbadern von Käsereien generell eine typische Mikroflora entwickelt. Inwieweit die vorhandene Salzbadmikroflora einen Einfluss auf den Reifungsverlauf nimmt, sollte näher untersucht werden. Um Einflüsse der käsereieigenen Hausflora ausschließen zu können, erfolgte die Produktion der Versuchskäse, wie unter 2.7.1 beschrieben. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde ein Käselaiab in vier gleiche Teile geschnitten. Je Versuchsscharge gelangten zwei Käsestücke in ein Salzbad (2.6.1), welche sich im mikrobiellen Status unterschieden. Die Verweildauer im Salzbad, und das nachfolgende Trocknen erfolgte für alle Versuchskäse einheitlich. Ein Käse aus jedem Salzbad wurde ohne weitere Behandlung in eine Reifungszelle eingebracht. Für die weiteren Versuchskäse erfolgte eine einmalige Behandlung mit einer Oberflächenstarterkultur. Die Reifungsbedingungen wurden wie unter 2.7.2 beschrieben eingehalten. Die Käsepflege erfolgte einmal wöchentlich mit einer 18%igen Salzlake, um eine einheitliche Verteilung der Bakterienflora auf der Oberfläche zu gewährleisten.

#### 3.3.1.1 Charge 1/ 1a

Das verwendete Salzbad war steril angesetzt. Eine mikrobiologische Analyse durch Ausplattieren auf mPC, YGC, usw. (Nachweisgrenze  $10^2$  KbE/ml) zeigte, dass zu Versuchsbeginn keine Kontaminanten vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Für die Oberflächenbehandlung wurde die von Bockelmann et al. (1997b) beschriebene Oberflächenkultur modifiziert eingesetzt. Die Mischkultur enthielt die proteolytisch aktiven Stämme *Microbacterium gubbeenense* CA12, sowie die Stämme Br5 und BL19 der Spezies *Brevibacterium linens*. Weiter enthalten waren die proteasenegativen Stämme *Corynebacterium casei* CA3, und der orange pigmentierte *Staphylococcus equorum* Staph2. Die Anzucht wurde wie in 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Bakterienkeimzahl betrug in der Arbeitsschmiere  $3,7 \times 10^9$  KbE/ml, für die Hefe *Debaryomyces hansenii* DH 6004, lag die Keimzahl bei  $1,1 \times 10^9$  KbE/ml. Der prozentuale Anteil an der Gesamtbakterienkeimzahl stellte sich wie folgt dar: Mikrobakterien bildeten mit 46% den Hauptanteil, gefolgt von Staphylokokken mit 22%, Corynebakterien waren zu 11%, *Brevibacterium* spp. mit dem Stamm BL19 zu 13% und mit Br5 zu 8% enthalten.

Innerhalb der ersten beiden Reifungswochen erfolgte eine tägliche Überprüfung des Oberflächen pH-Wertes (Abb. 5).

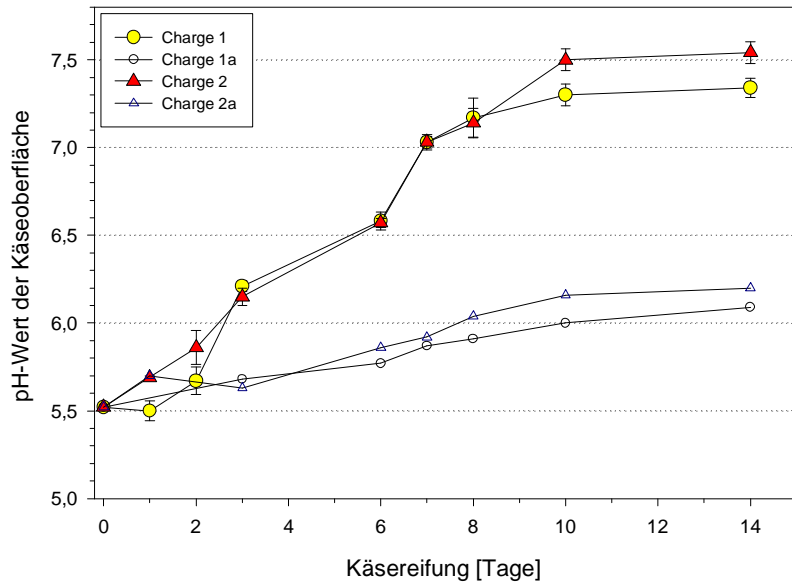


Abb. 5: Alkalisierungsverläufe der Versuchschargen 1/1a und 2/2a.

Wie aus Abb. 5 zu ersehen lag der Oberflächen pH-Wert nach der Salzbadhandlung für die Versuchskäse bei pH 5,5. Der geschmierte Käse (Charge 1), zeigte eine verzögerte Entsäuerung der Oberfläche innerhalb der ersten zwei Reifungstage. Der pH-Wert stieg innerhalb dieser Zeit auf pH 5,6 an. Eine Überprüfung der Hefekeimzahl zu diesem Zeitpunkt erbrachte  $3,3 \times 10^7$  KbE/cm<sup>2</sup> Hefen auf der Oberfläche. Nach fünf Tagen war ein pH-Wert um 6,5 erreicht. Der unbehandelte Käse (Charge 1a) zeigte während des gesamten Reifungsverlaufes nur eine geringe Alkalisierung der Oberfläche. Nach einer Woche lag der Oberflächen pH-Wert bei 5,7. Im Gegensatz dazu erreichte der geschmierte Käse im gleichen Zeitraum einen pH-Wert von 7,1.

Innerhalb der ersten Reifungstage bildete sich auf der Oberfläche des nicht geschmierten Käses der Charge 1a Gelbfleckung und Schimmel. Im Verlauf der weiteren Reifung entwickelte sich ein Schimmelrasen auf der gesamten Oberfläche.

**Tab. 2:** Oberflächenanalyse nach 1 und 3 Wochen der Charge 1/1a aus dem sterilen Salzbad.

	Charge 1a		Charge 1	
	1 Woche	3 Woche	1 Woche	3 Woche
Schimmel	> 10 <sup>9</sup>	> 10 <sup>9</sup>	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1,0 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>8</sup>	5,4 x 10 <sup>7</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	2,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>10</sup>	1,1 x 10 <sup>10</sup>	3,71 x 10 <sup>9</sup>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	-	32,8%	80%	92%
<i>Microbacterium</i> spp.	-	-	0,05%	-
<i>Brevibacterium linens</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	100%	67,2%	19,6%	8%

Die Analysen der Oberflächenmikroflora nach einer und drei Wochen, zeigte eine Kontamination mit Schimmel von >10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup>. Obwohl auf den Zusatz von Hefen im Salzbad verzichtet worden war, konnten auf der Käseoberfläche Hefen isoliert werden (Tab. 2). Die Hefen wurden mit 1,0 x 10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> nachgewiesen. Trotz der hohen Hefenkeimzahl kam es zu keiner Alkalisierung der Käseoberfläche. Zusätzlich wurden Staphylokokken isoliert, welche über ID32 (BioMérieux) und ARDRA (3.3.2) differenziert wurden. Es handelte sich um Stämme der Spezies *S. xylosus*, *S. saprophyticus* sowie *S. succinus* subsp. *casei*. Zusätzlich etablierten sich im Reifungsverlauf nicht weiter differenzierte, coryneforme Bakterien.

Der geschmierte Käse der Charge 1 zeigte im Verlauf der ersten Reifungswoche eine gute Schmiereentwicklung. Die Farbausbildung setzte zum Ende der ersten Reifungswoche ein. Die Schmiere war einheitlich cremefarben, mit einem fleischfarbenen Farbstich. Zum Ende der Reifung war das Erscheinungsbild der Schmiere orange-rot. Im Verlauf der zweiten Reifungswoche bildete sich der tilsitertypische Geruch aus. Über den Reifungsverlauf konnte eine Abnahme der Hefekeimzahl um zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden (Tab. 2). Die Bakterienflora setzte sich überwiegend aus beigefarbenen, coryneformen Bakterien zusammen. Zusätzlich konnten Staphylokokken, welche über ID32 (BioMérieux) zu *S. equorum* zugeordnet wurden, nachgewiesen werden. *Microbacterium* spp. waren nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden. Die eingesetzten *B. linens* Stämme waren während des gesamten Reifungsverlaufes nicht nachzuweisen.

### 3.3.1.2 Charge 2/ 2a

Das Salzen der Käse erfolgte in einem mit *Debaryomyces hansenii* DH 6004 und *Staphylococcus equorum* Staph2 beimpftem Salzbad. Die Animpfkonzentration betrug für *D. hansenii* DH 6004  $5,4 \times 10^6$  KbE/ml, und für *S. equorum*  $1,6 \times 10^7$  KbE/ml. Zur Oberflächenbehandlung kam die unter 3.3.1.1 beschriebene Arbeitsschmiere zur Anwendung. Diese war um die Stämme reduziert, welche bereits im Salzbad enthalten waren. Die Bakterienkeimzahl betrug in der Arbeitsschmiere  $2,2 \times 10^9$  KbE/ml. Den Hauptanteil stellten Mikrobakterien mit 95%, Corynebakterien waren zu 4,5% und Brevibakterien mit 0,5% enthalten.

Nach der Salzbadbehandlung setzte die Entsäuerung der Oberfläche für beide Versuchschargen ohne Verzögerung (Abb. 5) ein. Innerhalb der ersten zwei Reifungstage stieg der pH-Wert von pH 5,5 auf pH 5,7 an. Eine Überprüfung nach zwei Tagen erbrachte auf der Oberfläche des geschmierten Käses (Charge 2) eine Hefenkonzentration von  $3,0 \times 10^6$  KbE/cm<sup>2</sup>. Nach Ablauf der ersten Reifungswoche war ein pH-Wert von 7,1 auf der Oberfläche erreicht. Der nicht geschmierte Käse (Charge 2a) zeigte innerhalb des ersten Tages einen Anstieg von pH 5,5 auf pH 5,7, wie der oberflächenbehandelte Käse. In den ersten 7 Tagen stieg der pH-Wert auf 5,9 an. Zum Ende der Reifung konnte ein pH-Wert von 6,2 festgestellt werden.

Die Käse beider Versuchsansätze zeigten bereits nach dem Salzbad eine Schmierschicht auf der Oberfläche, der Geruch war leicht hefig.

Der unbehandelte Käse bildete innerhalb der ersten Reifungswoche eine deutliche beige-orangefarbene Schmiere aus, die sich aus *S. equorum* und *D. hansenii* zusammensetzte (Tab. 3). Im gesamten Reifungsverlauf blieben die Keimzahlen für die Hefe und die Bakterien konstant. Es konnten sich keine coryneformen Bakterien während der Reifung auf der Oberfläche etablieren (Tab. 3).

**Tab. 3:** Oberflächenanalyse nach 1 und 3 Wochen der Charge 2/2a aus dem beimpften Salzbad

	Charge 2a		Charge 2	
	1 Woche	3 Woche	1 Woche	3 Woche
Schimmel	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,7 x 10 <sup>6</sup>	3,3 x 10 <sup>6</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	4,0 x 10 <sup>9</sup>	3,0 x 10 <sup>9</sup>	1,6 x 10 <sup>10</sup>	1,1 x 10 <sup>10</sup>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	-	-	89,6%	90,7%
<i>Microbacterium</i> spp.	-	-	2,4%	3,4%
<i>Brevibacterium linens</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	100%	100%	7,9%	5,9%

Der oberflächenbehandelte Käse der Charge 2 entwickelte innerhalb der ersten Reifungswoche eine homogene Schmiereschicht, welche eine orange-beige Farbe aufwies. Der tilsitertypische Geruch entwickelte sich in der zweiten Reifungswoche. Die Keimzahlen der Hefen reduzierten sich zwischen den Analysen um eine Zehnerpotenz. Die Bakterienkeimzahl blieb hingegen während der gesamten Reifungsdauer konstant (Tab. 3). Den dominanten Anteil an der Oberflächenflora bildeten im gesamten Reifungsverlauf beigefarbene coryneforme Bakterien. Die Staphylokokken Keimzahl nahm über den Reifungszeitraum kontinuierlich in der Konzentration ab. Der Stamm *M. gubbeenense* CA12 konnte während des gesamten Reifungsverlaufes mit einem geringen Anteil an der Rotschmierflora nachgewiesen werden. Die eingesetzten *B. linens* Stämme konnten bei keiner Analyse von der Oberfläche isoliert werden.

### 3.4 Käsungsversuche

#### 3.4.1 Schnittkäse Versuchsreihe I

Im Rahmen des EU-Projektes (FAIR CT98-4220) erfolgte die Umsetzung der Erkenntnisse aus den Versuchskäseproduktionen im Labormaßstab in einen Pilotmaßstab“. Die Käsungsversuche wurden in Kooperation mit den Käseherstellern Arla Foods (Dänemark) und Rhodia Foods (Frankreich) durchgeführt. In Zusammenarbeit mit weiteren Projektpartnern (Hannah Research Institut, Schottland und NIZO Food Research, Niederlande) fanden die Analysen der Aromakomponenten, Florazusammensetzung und Farbentwicklung statt. Die Isolate wurden auf Speziesebene über ARDRA, auf Stammebene mittels PFGE bestimmt.

Die Produktion und die Reifung der Versuchskäse fanden unter standardisierten Produktionsbedingungen statt. Der Pilotversuch erfolgte in der Produktionsstätte Arla Foods (Dänemark). In zwei zeitlich getrennten Produktionschargen wurden pro Versuchsdurchlauf je 750 kg Käse, welches eine Stückzahl von jeweils 165 Käseläuben entspricht, produziert.

Wie das Produktionsverfahren wurden auch die Kulturen dem industriellen Standard angeglichen. Die lyophilisierten Reinkulturen wurden von Rhodia Foods (Frankreich) zur Verfügung gestellt. Eine Ausnahme machte der Stamm *Corynebacterium variabile* MD 025.0165. Die Zugabe zur Arbeitsschmiere erfolgte als Flüssigkultur.

Der Reifungsraum lag separat von der laufenden Produktion, um Verschleppungen zu vermeiden. Die Reifungstemperatur betrug 16°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Käsepflege wurde im routinemäßigen Arbeitsablauf integriert. Dies bedeutete, dass die Käse während der ersten zwei Reifungswochen täglich, danach zweimal wöchentlich gewendet wurden. Die Oberflächenpflege mit Kultur erfolgte in den ersten zwei Reifungswochen, zweimal wöchentlich. Das Lyophilisat der einzelnen Stämme wurde vor jedem Schmiervorgang frisch in 5 Liter sterilem destilliertem Wasser mit 5% NaCl angesetzt. Die Oberflächenbehandlung erfolgte mittels eines Bürstenautomaten. Vor jedem Schmiervorgang wurde dieser gereinigt und desinfiziert. Zeitgleich zur Oberflächenbehandlung erfolgte eine Überprüfung der pH-Wert Veränderung auf der Käseoberfläche (Abb. 6).

Nach Abschluss der achtwöchigen Reifung wurden die Käse vor dem Verpacken gewaschen und zwischen 4-6h getrocknet.

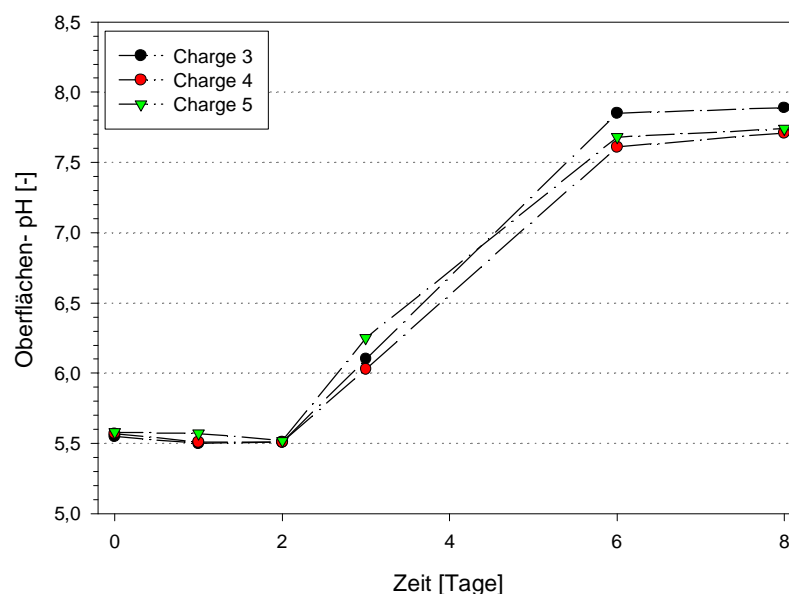


Abb. 6: Oberflächenentsäuerung der Versuchs

### 3.4.1.1 Charge 3

Als Arbeitsschmiere wurde eine 5-Stamm-Mischkultur eingesetzt, bestehend aus *B. linens* Br5, *B. casei* MD 047.0399, *C. casei* CA3, *M. gubbeenense* CA12 und *S. equorum* Staph2.

Die Bakterienkeimzahl der Schmiere betrug  $1,6 \times 10^7$  KbE/ml. Diese setzte sich zu  $1,40 \times 10^7$  KbE/ml aus coryneformen Bakterien und zu  $6,4 \times 10^5$  KbE/ml *Brevibacterium* spp. zusammen. Der Anteil an Staphylokokken lag bei  $10^4$  KbE/ml, *M. gubbeenense* konnte in der Arbeitsschmiere nicht nachgewiesen werden. Die Hefekeimzahl betrug  $1,6 \times 10^6$  KbE/ml.

Die Entsäuerung der Käseoberfläche auf pH 6,1 vollzog sich innerhalb der ersten vier Reifungstage ohne Verzögerung (Abb. 6). Obwohl die Entsäuerung der Käsoberfläche sich ohne Verzögerung vollzog, konnten sich die Schmierebakterien nur schwach auf der Oberfläche etablieren. Mit der verzögerten Besiedelung der Oberfläche durch Rotschmierebakterien konnten sich zu sehr geringen Keimzahlen Schimmelpilze ansiedeln. Sie führten zu Störungen im Reifungsverlauf. Der für Tilsiter typisch aromatische Geruch entwickelte sich in der zweiten Reifungswoche. Die Farbentwicklung setzte zum Ende der ersten Reifungswoche ein. Zu Beginn war die Schmiere hell orange-rot. Nach Abschluss der Reifung zeigten alle Versuchskäse ein dunkel-braunrotes Erscheinungsbild. Bei den Vorbereitungen zur Lagerung zeigten sich nach der Trocknung tiefe Risse auf der Käseoberfläche. Eine Kontrolle des Käseteigs erbrachte, dass die Konsistenz nicht einheitlich glatt, sondern rissig war. Diese Fehler ließen sich auf Probleme bei der Temperatur und Feuchtigkeitsregulierung während der Reifung zurückführen.

**Tab. 4:** Hefen und Bakterien der Oberflächenflora: Käseungsversuch Charge 3

Reifung für....	1 Woche	2 Woche	4 Woche
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$7,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$8,7 \times 10^7$	$7,4 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	90,9%	51,1%	51,3%
<i>Microbacterium</i> spp.	2,9%	14,4%	12,8%
<i>Brevibacterium</i> spp.	5,9%	34,0%	35,3%
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,3%	0,5%	0,6%
Pseudomonas	-	-	-
Coliforme Bakterien	-	-	-
Enterokokken	-	-	-



Aus den Oberflächenanalysen konnte ersehen werden, dass sich die Hefeflora ohne Störungen auf der Oberfläche etablieren konnte (Tab. 4). Die Bakterienkeimzahl erreichte stark verzögert erst in der vierten Reifungswoche ihren Höchstwert.

Im gesamten Reifungsverlauf dominierten die beigefarbenen coryneformen Bakterien (Tab. 4). In der ersten Reifungswoche konnten sich Brevibakterien und Mikrobakterien nur zu einem geringen Anteil an der Oberflächenflora beteiligen. Im Verlauf der zweiten Reifungswoche etablierten sich diese Bakterien auf der Oberfläche. Für Brevibakterien konnte eine Keimzahl von  $2,5 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup>, für Mikrobakterium von  $1,1 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> dokumentiert werden. Ihr prozentualer Anteil an der Oberflächenflora blieb bis zur vierten Reifungswoche relativ konstant. Die Oberflächenanalyse nach Abschluss der achtwöchigen Reifung erbrachte, dass die bakterielle Gesamtkeimzahl ab der vierten Reifungswoche ungefähr gleich geblieben war. Zwischen der vierten und achten Reifungswoche vollzog sich eine Verschiebung in der prozentualen Zusammensetzung der Oberflächenflora. Den Hauptanteil bildeten cremefarbene Corynebakterien mit 90,1%. Brevibakterien und Mikrobakterien waren nur noch in sehr geringem Maße an der Oberflächenflora beteiligt (Daten nicht gezeigt). Während des gesamten Untersuchungsintervalls betrug der prozentuale Anteil der Staphylokokken an der Rotschmiereflora weniger als 1%.

#### 3.4.1.2 Charge 4

Die Arbeitsschmiere stand, bis auf die Corynebakterium Spezies, in Übereinstimmung mit der Charge 3. Es erfolgte ein Austausch des Stammes *C. casei* (CA3), durch den ebenfalls beigefarbenen *C. variable* MD 025.0165.

Die Bakterienkeimzahl in der Arbeitsschmiere betrug  $6,0 \times 10^8$  KbE/ml. Der Anteil der einzelnen Stämme an der Arbeitsschmiere stellte sich wie folgt dar: Corynebakterien bildeten mit  $5,35 \times 10^8$  KbE/ml den Hauptanteil, gefolgt von *Microbacterium* spp. mit  $5,52 \times 10^7$  KbE/ml, Brevibakterien waren zu  $1,02 \times 10^7$  KbE/ml enthalten. Die Staphylokokken Konzentrationen lagen unter  $10^6$  KbE/ml, für die Hefen wurde eine Keimzahl von  $1,1 \times 10^6$  KbE/ml bestimmt.

Im Verlauf der ersten Reifungswoche kam es zu einer schnellen Entsäuerung der Käseoberfläche (Abb. 6, S. 54). Mit Erreichen eines pH-Wertes von 6,0 konnten sich die Rotschmierebakterien etablieren. Zum Ende der ersten Reifungswoche setzte die Farbentwicklung ein. Bis zum Reifungsende entwickelte sich die Schmiere zu einem dunkel-rot-orange. Die orangefarbene Komponente trat deutlich hervor. Der typische Tilsiter Geruch war nach einer Woche festzustellen. Die Analyse der Aromakomponenten zeigte, dass schwefelhaltige Komponenten in der Schmiere dominierten. Wie bereits beschrieben, zeigten sich auch hier zum Ende der Reifung tiefe Risse im Käse.

**Tab. 5:** Hefen und Bakterien der Oberflächenflora: Käsungsversuch Charge 4

Reifung für....	1 Woche	2 Woche	4 Woche
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	8,5 x 10 <sup>7</sup>	6,3 x10 <sup>7</sup>	2,7 x10 <sup>7</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	6,8 x 10 <sup>8</sup>	1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,8 x 10 <sup>9</sup>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	85,1%	95,4%	25,9%
<i>Microbacterium</i> spp.	8,4%	1,3%	27,3%
<i>Brevibacterium linens</i>	6,9%	3,2%	46,8%
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,5%	0,02%	0,01%
Pseudomonas	-	-	-
Coliforme Bakterien	-	-	5,5 x10 <sup>3</sup>
Enterokokken	-	-	-

Die Untersuchung der Oberflächenflora nach einer, zwei, vier und acht Wochen zeigte, dass sich die Hefeflora innerhalb der ersten Woche auf der Oberfläche etablieren konnte. Im gesamten Untersuchungszeitraum war die Hefekeimzahl relativ konstant. Die Bakterienkeimzahl erreichte in der zweiten Reifungswoche den höchsten Wert mit 10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup>.

Bis zur zweiten Oberflächenanalyse bildeten beigefarbene Corynebakterien den Hauptanteil an der Schmierflora. Die zusätzlich in der Arbeitsschmiere enthaltenen Stämme konnten sich nur schwach auf der Oberfläche durchsetzen (Tab. 5). Zwischen der zweiten und vierten Reifungswoche kam es zu einem Florenwechsel. Den Hauptanteil bildete *B. linens* mit 1,31x10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (46,8%), gefolgt von *M. gubbeenense* mit 7,64 x10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (27,3%). Die bis dahin dominanten beigefarbene Corynebakterien waren von einem Anteil von 95,4 % auf 25,9 % zurückgedrängt worden (Tab. 5). Der Anteil von Staphylokokken blieb über den gesamten Reifungszeitraum unter 1%. Ab der vierten Reifungswoche waren zusätzlich coliforme Bakterien von der Oberfläche isoliert worden. Es handelte sich dabei durch Verschleppung aufgetragene Kontaminanten. Im gesamten Reifungsverlauf traten immer wieder Schimmelspots auf der Oberfläche auf.

### 3.4.1.3 Charge 5

Parallel zu Charge 3 und 4 erfolgte das Anschmieren in Charge 5 mit der Arbeitsschmiere der Produktionskäserei (Arla Food, Dänemark).

Die Analyse des Schmierwassers ergab eine Gesamtkeimzahl von 7,9x10<sup>8</sup> KbE/ml. Sie setzte sich aus *D. hansenii* (< 1x10<sup>5</sup> KbE/ml), coryneformen Bakterien (6,9x10<sup>8</sup> KbE/ml),

*Brevibacterium* spp. ( $2,4 \times 10^7$  KbE/ml), *Staphylococcus* spp. ( $1,2 \times 10^7$  KbE/ml) und *Lactococcus* spp. ( $5,9 \times 10^7$  KbE/ml) zusammen. Nicht nachgewiesen werden konnten gelbpigmentierte Stämme der Gattungen *Microbacterium* spp. und/oder *Arthrobacter* spp..

Innerhalb der ersten 4 Reifungstage entsäuerte die Käseoberfläche auf pH 6,25 (Abb. 6). Die Ausbildung einer einheitlichen Schmiereschicht erfolgte bereits in der ersten Reifungswoche. Zum Ende der Reifung zeigte sich die Oberflächenfarbe in einem dunkel-gelb-orange. Der Geruch war tilsitertypisch. Im Vergleich zur laufenden Produktion entwickelte sich die Schmiere ähnlich, es waren jedoch leichte Abweichungen zu dokumentieren, zum Teil durch die bereits erwähnten Probleme bei den Reifungsbedingungen.

**Tab. 6:** Hefen und Bakterien der Oberflächenflora des Referenzkäse: Charge 5

Reifung für...	1 Woche	2 Woche	4 Woche
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$1,6 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3$	$< \times 10^2$
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	94,2%	81,9%	91,2%
<i>Microbacterium</i> spp.	-	-	-
<i>Brevibacterium linens</i>	-	5,7%	1,7%
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,2%	5,7%	1,7%
Pseudomonas	-	-	-
Coliforme Bakterien	-	-	$6,5 \times 10^3$
Enterokokken	-	-	-

Die Oberflächenanalysen zeigten, dass die Hefen nach Ablauf der ersten Reifungswoche ihre höchste Keimzahl mit  $1,6 \times 10^4$  KbE/cm<sup>2</sup> erreicht hatten. Im weiteren Reifungsverlauf reduzierte sich die Hefekeimzahl zwischen den einzelnen Analysen um ca. eine Zehnerpotenz (Tab. 6). Die Bakterienkeimzahl erreichte den höchsten Wert in der zweiten Reifungswoche mit  $1,5 \times 10^9$  KbE/cm<sup>2</sup>. Im gesamten Reifungsverlauf stellten die beigefarbene Corynebakterien den Hauptanteil an der Oberflächenflora. Brevibakterien und Staphylokokken erreichten die höchste Zellzahl in der zweiten Reifungswoche mit jeweils  $8,6 \times 10^7$  KbE/cm<sup>2</sup> (5,7%). Bei der Oberflächenanalyse nach 4 Wochen zeigte sich, dass der Anteil an Brevibakterien und Staphylokokken an der Oberflächenflora deutlich zurückgegangen war. Zusätzlich konnte sich im Verlauf der Reifung Schimmel auf der Oberfläche etablieren.

Abweichend zu den kommerziellen Käsen aus der Produktion konnten auf der Oberfläche der im Pilotmaßstab produzierten Käse keine gelbpigmentierten Kolonien nachgewiesen werden.

### **3.4.2 Schnittkäse Versuchsreihe II**

Das Chargenvolumen sowie die Produktionsbedingungen waren identisch mit den unter 3.4.1 beschriebenen. Zur Oberflächenbehandlung wurde eine Vielstamm-Mischkultur, bestehend aus acht Stämmen (Charge 6, Daten nicht gezeigt), sowie eine 5-Stamm-Mischkultur verwendet. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe erfolgte nur eine zweimalige Oberflächenbehandlung mit Kultur. Die erste Oberflächenbehandlung erfolgte nach dem Salzbad, die zweite nach 14 Tagen.

#### **3.4.2.1 Charge 3a**

Die Zusammensetzung der Arbeitsschmiere war identisch zu Charge 3 (3.4.1.1). Lediglich die Konzentration der Bakterienkeimzahl in der Arbeitsschmiere wurde erhöht; sie betrug  $7,2 \times 10^8$  KbE/ml. Diese setzte sich zu  $4,0 \times 10^8$  KbE/ml aus coryneforme Bakterien und zu  $2,0 \times 10^7$  KbE/ml *Brevibacterium* spp. zusammen. Der Anteil an Staphylokokken lag bei  $3,0 \times 10^8$  KbE/ml, *M. gubbeenense* konnte in der Arbeitsschmiere nicht nachgewiesen werden. Die Entsäuerung der Oberfläche stand in Übereinstimmung mit der Charge 3 (Abb. 6).

Zu Beginn der Reifung entwickelte sich die Oberflächenschmiere verzögert. In der zweiten Woche überzog die einheitliche Schmiere die gesamte Käseoberfläche. Einhergehend mit der Oberflächenbesiedelung bildete sich der typische Geruch aus. Das Erscheinungsbild der Oberfläche war im gesamten Reifungszeitraum trocken. Die Farbentwicklung ging bis zum Ende der Reifung in ein dunkles gelb-bräunlich über. Der Geruch stand in Übereinstimmung mit der Charge 3.

**Tab. 7:** Hefen und Bakterien der Oberflächenflora: Käsuversuch Charge 3a

Reifung für....	1 Woche	2 Woche	4 Woche
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	6,6 x 10 <sup>7</sup>	5,2 x 10 <sup>7</sup>	2,6 x 10 <sup>7</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	2,3 x 10 <sup>8</sup>	2,0 x 10 <sup>9</sup>	5,7 x 10 <sup>9</sup>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	14,7%	40,1%	87,9%
<i>Microbacterium</i> spp.	25,5%	5,3%	5,8%
<i>Brevibacterium linens</i>	24,7%	43,0%	2,8%
<i>Staphylococcus</i> spp.	35,1%	11,6%	3,5%
Pseudomonas	<10 <sup>2</sup>	-	-
Coliforme Bakterien	-	-	-
Enterokokken	-	-	-

Die Ergebnisse der Oberflächenanalysen (Tab. 7) erbrachten für die Hefekeimzahlen einen relativ konstanten Wert über den Reifungszeitraum. Die Bakterienkeimzahl erreichte bereits in der zweiten Reifungswoche die Werte auf der Oberfläche, welche von Charge 3 erst nach vier Wochen erreicht worden waren.

In der ersten Reifungswoche zeigte sich ein recht ausgewogenes Keimspektrum auf der Oberfläche. Den Hauptanteil bildeten zu Beginn der Reifung die Staphylokokken mit 35,1% an der Bakterienkeimzahl. Nach der zweiten Reifungswoche bildeten Brevibakterien und coryneforme Bakterien den Hauptanteil der Schmiereflora. Der eingesetzte Stamm CA12 nahm nur zu einem geringen Prozentsatz Anteil an der Oberflächenflora. Zum Ende der Reifung wurden die eingesetzten Stämme infolge einer sich dominierend entwickelnden Flora aus beigefarbenen Corynebakterien zurückgedrängt. Nach einer vierwöchigen Reifung hatten die beigefarbenen Corynebakterien einen Anteil von 87% an der Gesamtbakterienkeimzahl.

### 3.4.3 Weichkäse

Die Verpackungsreife wird von Weichkäse innerhalb von zwei Wochen erreicht, im Vergleich dazu wird für Schnittkäse eine Reifungszeit von vier bis sechs Wochen benötigt. Nicht nur die Reifungszeiten zeigen deutliche Unterschiede, sondern auch die Reifungsbedingungen. Nach dem Salzbad, welches eine Temperatur von 18-22°C hat (Wessinger, 1981), gelangen die Weichkäse in den sogenannten Beizraum. Dort werden die Käse für 24-26h bei 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% „vorgereift“.

Erst nach diesem Verfahrensschritt erfolgt die erste Oberflächenbehandlung. Die weitere Reifung findet bei 16-17°C bei >90% rLf für 14 Tage statt.

### 3.4.3.1 Versuchskäsungen mit Starterkulturen für oberflächengereifte Schnittkäse

In Vorversuchen wurden unterschiedliche für Tilsiter geeignete Mischkultur zur Reifung von Limburger-ähnlichen Käsen eingesetzt.

Abweichend von dem in Abb. 2 dargestellten Produktionsablauf erfolgte keine Zugabe von *Geotrichum candidum* zur Kesselmilch. Das Salzbad, welches eine Temperatur von 25°C hatte, war mit *D. hansenii* ( $2,6 \times 10^6$  KbE/ml) und *S. xylosus* ( $2,4 \times 10^6$  KbE/ml) angeimpft. Die Reifungsbedingungen waren wie unter 2.8.2 beschrieben.

Für die Oberflächenbehandlung wurden drei unterschiedliche Mischkulturen in Anwendung gebracht (Tab. 8). Die Keimzahlen in der Arbeitsschmiere lagen bei  $10^9$  KbE/ml. Im Versuchsverlauf erfolgte eine zweimalige Oberflächenbehandlung. Die erste Oberflächenbehandlung erfolgte nach dem Beizraum, eine weitere nach vier Tagen. Zur Überprüfung der Oberflächenalkalisierung erfolgte eine tägliche pH-Wert Kontrolle (Abb. 7).

**Tab. 8:** Zusammensetzung der Arbeitsschmiere Charge W 1 bis 3

Bakterien	Charge W 1	Charge W 2	Charge W 3
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$1,04 \times 10^{10}$	$9,7 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$
<i>C. casei</i> CA3	-	6,2%	28,8%
<i>C. glutamicum</i>	11,5%	52,6%	-
<i>B. linens</i> Br5	10,6%	3,1%	51,9%
<i>B. linens</i> BL19	43,3%	38,1%	-
<i>A. nicotianae</i> CA13	34,6%	-	19,3%

Alle Versuchskäse erreichten nach acht Tagen einen pH-Wert um 6,0 (Abb. 7). Die Entwicklung der Oberflächenschmiere setzte stark verzögert ein. Innerhalb der ersten Reifungswoche etablierten sich Schimmel auf der Oberfläche, welcher sich im weiteren Reifungsverlauf manifestierte. Der Geruch der Käse war zu Beginn deutlich hefig. In der zweiten Reifungswoche wurde dieser deutlich untypisch. Es dominierte ein fruchtig, zum Teil fischiger Geruch. Das Erscheinungsbild der Versuchskäse war untypisch gelblich-braun mit fleischfarbenden Rändern. Zusätzlich kam es zu einem Formverlust der Käse.

Aufgrund eines immer stärkeren Abfließens der Käseränder wurde der Versuch vorzeitig beendet.

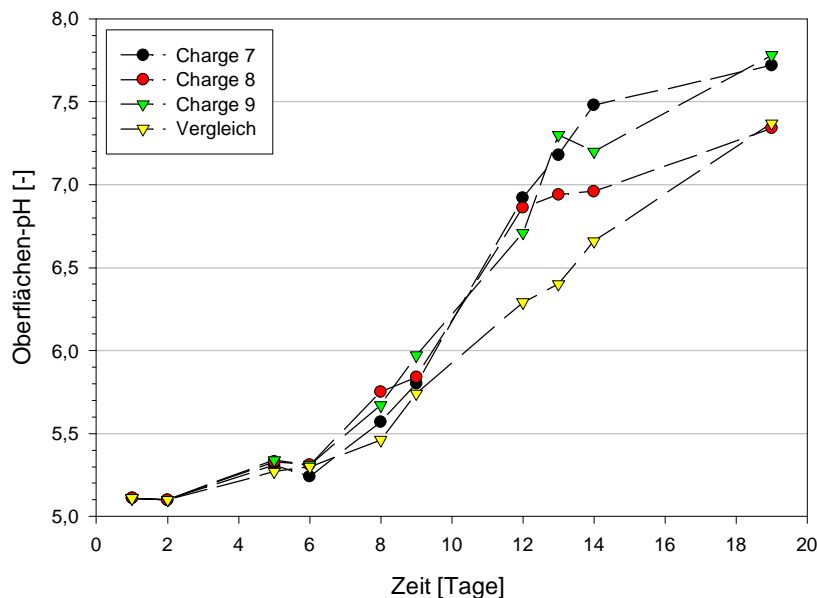


Abb. 7: Oberflächenentsäuerung der Weichkäse der Versuchschargen 1 bis 3

### 3.4.3.2 Reifung von Limburger- ähnlichen Käsen im Labormaßstab

Die Produktion der Versuchskäse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Verfahrenstechnik der Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel. Der Produktionsablauf ist dem Fließdiagramm Abb. 2 zu entnehmen.

Die Kesselmilch wurde mit *G. candidum* (6216) in einer Konzentration von  $1,0 \times 10^3$  KbE/ml angeimpft. Das Salzen der Versuchskäse erfolgte in einem Salzbad, welches mit *D. hansenii* ( $2,0 \times 10^6$  KbE/ml) und *S. equorum* ( $1,5 \times 10^4$  KbE/ml) beimpft war. Alle Versuchskäse wurden unter gleichen Reifungsbedingungen (2.8.2) in Glasreifungszellen gereift. Im Verlauf der ersten Reifungswoche erfolgte viermal, in Abstand von zwei Tagen, eine Oberflächenbehandlung mit der vorgesehenen Arbeitsschmiere. Diese Kultur wurde durch Wischen gleichmäßig auf der Käseoberfläche verteilt. Nach einer zweiwöchigen Reifung folgte das Verpacken in Folie und Lagerung bei 8°C für weitere zwei Wochen. Zur Überprüfung der Käsematrix reife ein Kontrollkäse mit. Dieser Käse reife ohne eine Oberflächenkultur. Zur Dokumentation der Oberflächenalkalisierung erfolgte eine tägliche Kontrolle des pH-Wertes der Käseoberfläche (Abb. 8).

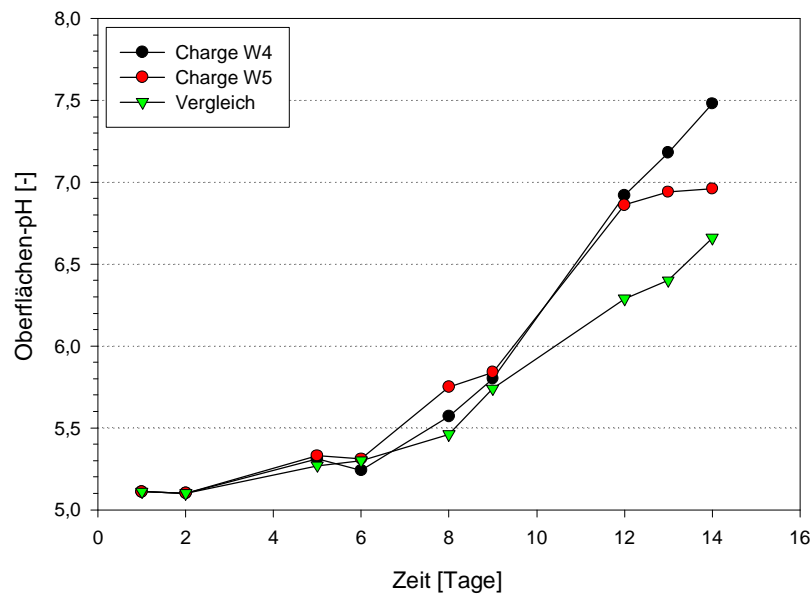


Abb. 8: Oberflächenentsäuerung der Versuchschargen W4 und W5

### 3.4.3.3 Charge W4:

Die Arbeitsschmiere setzte sich aus drei Stämmen der Spezies *B. linens* zusammen (Br9, BL19, 95295). Die Bakterienkonzentration in der Arbeitsschmiere lag bei  $10^7$  KBE/ml. Die Überprüfung der pH-Wert Veränderung belegte eine verlangsamte Alkalisierung der Käseoberfläche. Nach zehn Tagen war ein pH-Wert um 6,0 erreicht (Abb. 8).

Nach dem Beizen zeigte sich ein schwaches Wachstum von *G. candidum* auf der Oberfläche. Dieses änderte sich innerhalb von drei Reifungstagen. Nach dieser Zeit überzog die Hefe gleichmäßig die gesamte Käseoberfläche. Im Verlauf der ersten Reifungswoche kam es zu einem langsamen Anstieg des Oberflächen-pH-Wertes (Abb. 8). Die Besiedelung der Oberfläche durch die aufgetragenen Rotschmierebakterien erfolgte ohne Störungen. Mit deren Etablierung setzte die Farbentwicklung ein. Zu Beginn der Reifung war die Oberfläche matt gelb. Bis zum Reifungsende veränderte sie sich zu einem Rot-braun. Der Geruch entwickelte sich zu Beginn der zweiten Reifungswoche. In der ersten Woche war ein hefiger Geruch dominant, in der zweiten Woche veränderte sich der Geruch zu einer fischigen, für Brevibakterien typischen Komponente. Nach Abschluss der vierwöchigen Reifung war der Geruch typisch und der Geschmack intensiv bis überdeutlich. Die Farbe der Käse war deutlich orange.



**Tab. 9:** Bakterien und Hefen der Oberflächenflora: Weichkäseversuch Charge W4.

Oberflächenflora	1Woche	2Woche	4Woche
<i>Geotrichum candidum</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	6,0x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>	6,6x10 <sup>7</sup>
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	5,5 x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	3,5x10 <sup>7</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	2,8x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>9</sup>
<i>Brevibacterium linens</i> Br9	43,5%	82,9%	60,9%
<i>Brevibacterium linens</i> BL19	14,5%	0,6%	0,8%
<i>Brevibacterium linens</i> 95295	12,7%	11,0%	0,8%
<i>Corynebacterium</i> spp. (beigefarben)	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> spp. (gelb)	-	-	-
Bewegliche Stäbchen (orange)	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	29,3%	5,5%	4,6%
Fremdkeime gelb/orange	-	-	33%

Bei den Oberflächenanalysen nach einer und zwei Wochen wuchsen auf mMMA-Ager nur die drei verschiedenen Kolonietypen der aufgebrauchten *B. linens* Stämme. Wie aus Tab. 9 zu ersehen, konnten sich ebenfalls die Hefen und Staphylokokken aus dem Salzbad auf der Oberfläche etablieren. Der Anteil der Staphylokokken nahm über den Versuchszeitraum stetig ab. Für die Brevibakterien stellte der Stamm Br9 im gesamten Zeitraum den Hauptanteil an der bakteriellen Schmiereflora. Nach dem Verpacken und der zweiwöchigen Lagerung bei 8°C, konnten Fremdkeime in einer Konzentration von 1,2x10<sup>7</sup> KbE/cm<sup>2</sup> auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Es erfolgte keine weitere Differenzierung der Fremdkeime.

#### 3.4.3.4 Charge W5

Die verwendete Mischkultur enthielt die Stämme *B. linens*, *A. rhombi*, *M. gubbeenense* und *Halomonas* spp.. In der Arbeitsschmiere wurde eine Bakterienkonzentration von 10<sup>7</sup> KbE/ml bestimmt.

Im Beizraum kam es zur Erstbesiedelung der Oberfläche durch *G. candidum*, welche die Käseoberfläche gleichmäßig bedeckte. Wie in Abb. 8 dargestellt, vollzog sich die Entsäuerung der Oberfläche auf einen pH-Wert um 6,0 innerhalb von neun Tagen. Mit der sich entwickelnden Flora kam es zur Farb- und Geruchsentwicklung. Nach Abschluss der zweiten Reifungswoche zeigten die Versuchskäse eine einheitliche Schmiere.

Der Geruch hatte deutlich typische Komponenten, war jedoch nicht rein. Es konnte zusätzlich ein silageartiger Geruch wahrgenommen werden. Das Erscheinungsbild der

Schmiere war gelb-orange. Die sensorische Prüfung nach vier Wochen ergab einen typischen Geschmack und Geruch. Hingegen war das Erscheinungsbild nach vier Wochen untypisch dunkel-orange.

**Tab. 10:** Hefen und Bakterien der Oberflächenflora Charge W5.

Oberflächenflora	1Woche	2Woche	4Woche
<i>Geotrichum candidum</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	9,0 x 10 <sup>6</sup>	7,4 x 10 <sup>6</sup>	5,9 x 10 <sup>7</sup>
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	2,9 x 10 <sup>6</sup>	8,2 x 10 <sup>6</sup>	3,5 x 10 <sup>7</sup>
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	3,5 x 10 <sup>7</sup>	1,1 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>Brevibacterium linens</i> BL19	10,1%	60,4%	71,8%
<i>Microbacterium gubbeenense</i> 95292	34,6%	29,2%	14,9%
<i>Arthrobacter</i> spp. (gelb)	49,0%	1,3%	0,5%
<i>Halomonas</i> spp. (orange)	0,3%	6,8%	7,7%
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,1%	2,3%	5,2%
Fremdkeime gelb/orange	-	-	-

Auch hier zeigte sich, dass sich die Hefen und Staphylokokken des Salzbadetes auf der Oberfläche über den Reifungsverlauf etablieren konnten. Die Hefekeimzahlen blieben im gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant (Tab. 10). Die Bakterienkeimzahl erreichte den Höchstwert nach vier Wochen. Zwischen der ersten und zweiten Reifungswoche erfolgte eine Verschiebung der Oberflächenzusammensetzung. In der ersten Woche stellten die gelbpigmentierten Stämme *A. rhombi* und *M. gubbeenense* den Hauptanteil. Bis zum Ende der zweiten Woche konnte sich *B. linens* auf der Oberfläche etablieren. *Arthrobacter* spp. konnte im weiteren Reifungsverlauf nur noch mit geringen Keimzahlen auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu stellte der gelb pigmentierte Stamm *M. gubbeenense* einen festen Bestandteil der Oberflächenflora dar (Tab. 10). Im gesamten Zeitraum konnte *Halomonas* spp. von der Oberfläche isoliert werden. Nicht gefunden wurden Corynebakterien und Fremdkontaminanten wie Enterobakterien und Enterokokken.

#### 3.4.4 Sauermilchkäse

Diese Käsesorte wird nicht direkt aus Milch, sondern aus einem Zwischenprodukt, dem Sauermilchquark mit einer Trockenmasse von 31-33%, hergestellt. Die Dicklegung der Käseemilch erfolgt nicht durch Lab, sondern durch eine Säuerungskultur. In den Käseereien erfolgt die Zugabe von Reifungssalzen, Kulturkäse und bei Bedarf von Gewürzen zur Quarkmasse. Die Reifungszeit bei dieser Käsesorte beträgt maximal drei

Tage bis zur Verpackung. Wie bei Weichkäse erfolgt vor der ersten Oberflächenbehandlung eine „Vorreifung“ im Schwitzraum für 20-24h bei 30-33°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97-98%.

### 3.4.4.1 Oberflächenanalyse industrieller Kulturkäse

Eine in der industriellen Produktion gebräuchliche Methode ist das Animpfen des Sauermilchquarks mit 2-4% Kulturkäse. Dies ist ein Sauermilchkäse, der statt drei Tagen zwei Wochen gereift ist. Durch den Einsatz dieser weit in der Reifung fortgeschrittenen Käse erfolgt eine Übertragung der Bakterienflora auf die noch ungereiften Käse. Die Kulturkäse von fünf Sauermilchkäsereien wurden auf ihren mikrobiellen Oberflächenstatus hin untersucht.

Die Hefekeimzahl lag für alle untersuchten Käse zwischen  $10^7$  und  $10^8$  KbE/cm<sup>2</sup>. Eine Speziesidentifizierung erfolgte mit Hilfe eines biochemischen Tests (BioMérieux). Den Hauptanteil an der Hefeflora stellten *Candida krusei* und *Kluyveromyces marxianus*. Weiterhin wurden Hefen der Spezies *Candida robusta*, *C. valida* und *Torulopsis candida* auf der Oberfläche nachgewiesen. Für die Bakterienkeimzahlen ergaben sich Schwankungen zwischen  $10^6$  und  $10^{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>.

**Tab: 11:** Schwankungsbereich und Zusammensetzung der Mikroflora industrieller Kulturkäsen

Hefen [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1 x 10 <sup>7</sup> - 1 x 10 <sup>8</sup>
Bakterienkeimzahl [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1 x 10 <sup>6</sup> - 1 x 10 <sup>10</sup>
	<b>Anteil an der Bakterienkeimzahl</b>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	40-86 %
<i>Arthrobacter</i> / <i>Microbacterium</i> spp	<1 - 6 %
<i>Brevibacterium</i> spp.	<1 - >50 %
<i>Staphylococcus</i> spp.	1 - 87 %
Enterokokken	4 x 10 <sup>2</sup> - 6 x 10 <sup>4</sup> KbE/cm <sup>2</sup>
Coliforme Bakterien	<10 <sup>1</sup> - 2 x 10 <sup>4</sup> KbE/cm <sup>2</sup>
Pseudomonaden	-

Auf der Oberfläche der untersuchten Kulturkäse dominierten beigepigmentierte, coryneforme Bakterien (Tab. 11). Stämme der Spezies *B. linens* zeigten eine große Schwankungsbreite in den Zellzahlen auf der Oberfläche. Teilweise stellte diese Spezies bis zu 50% der Gesamtkeimzahl. Stämme der Gattungen *Arthrobacter* spp., sowie *Microbacterium* spp. waren nicht nachzuweisen. Ein fester Bestandteil der

Oberflächenflora bildeten Staphylokokken. Eine Identifizierung dieser Gattung erfolgte über ID32 Staph (BioMérieux) sowie ARDRA (3.7.2). Die vorherrschende Spezies auf der Oberfläche war *S. saprophyticus*, ferner konnten die Spezies *S. xylosus* und *S. equorum* isoliert werden.

Zusätzlich zur Rotschmierflora wurde eine unerwünschte Begleitflora, bestehend aus coliformen Bakterien, Enterokokken und Schimmel in unterschiedlichen Konzentrationen, auf allen Käsen vorgefunden.

#### **3.4.4.2 Einsatz einer definierten Starterkultur zur Produktion von Kulturkäse**

Die Versuchskäsungen erfolgten unter Verwendung eines keimarmen Sauer Milchquarks. Der Quark entstammte der laufenden Produktion der Sachsenmilch AG. Für die Produktion eines Kulturkäses wurde eine bereits etablierte Oberflächenstarterkultur aus dem Schnittkäsebereich verwendet. Zur Überprüfung der Reifungsbedingungen erfolgte parallel das Animpfen der Quarkmasse mit einem industriellen Kulturkäse. Die Käsureifung erfolgte für jede Charge in separaten Glasreifungszellen, um eine Verschleppung der Oberflächenflora zu vermeiden. Die Reifungsbedingungen, sowie der Reifungsverlauf sind 2.9.2 zu entnehmen. Eine Oberflächenanalyse der gereiften Käse wurde nach einer und drei Wochen durchgeführt.

#### **3.4.4.3 Charge S1**

Dem Sauer Milchquark wurde zusammen mit den Reifungssalzen die Hefe, *D. hansenii* (DH 6004) in einer Konzentration von  $3,3 \times 10^8$  KbE/ml zugegeben. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter 2.9.1 beschrieben. Als Sprühkultur wurde der von Bockelmann et al. (1997b) beschriebene Tilsiter-Starter modifiziert eingesetzt. Diese Sprühkultur setzte sich aus den proteolytisch aktiven Stämmen *M. gubbeenense* (CA12), *B. linens* (Br5) sowie den nicht proteolytischen Stämmen *C. casei* (CA3) und *S. equorum* (Staph2) zusammen. Die Anzucht der Reinkulturen erfolgte wie unter 2.3.2. beschrieben. Die Bakterienkeimzahl betrug  $3,6 \times 10^8$  KbE/ml. Der prozentuale Anteil an der Arbeitsschmiere stellte sich wie folgt dar: Brevibakterien bildeten mit 41% den Hauptanteil, gefolgt von *Microbacterium* spp. mit 30%, Corynebakterien zu 18% und Staphylokokken waren zu 11% enthalten.

Die ausgeformten Versuchskäse wurden für 24h bei 30°C im Brutschrank („Schwitzraum“) vorgereift. Es unterblieb während dieses Reifungsschrittes die Ausbildung einer Hefeschicht, der pH-Wert lag nach dem Schwitzraum bei pH 5,4. Während des gesamten Reifungsverlaufs kam es zu einer schleppenden Alkalisierung der Quarkmasse. Erst nach acht Tagen war ein pH-Wert von über 6,0 erreicht (Daten nicht

gezeigt). Die dafür charakteristische Aufklärung der Quarkmasse war nicht deutlich vom Quarkkern abzugrenzen sondern durchzog den gesamten Käse.

Es erfolgte eine einmalige Oberflächenbehandlung der abtemperierten Käse nach dem Schwitzraum. Die weitere Reifung erfolgte bei 12°C. Auf der Oberfläche aller Versuchskäse konnte sich innerhalb von 24h eine schwache Schmiere ausbilden. Die Oberflächen wirkten fleckig und rotstichig, der Geruch war nicht harzertypisch. Nach 24h wurden die Käse nicht verpackt, sondern in den Reifungszellen bei 8°C gelagert. Im Verlauf der Nachreifung bildete sich eine untypische, schmierige Schicht auf den Käsen aus. Die Farbe der Käse war rötlich-bräunlich. Alle Käse zeigten den Fehler „Randweich“. Der Geruch war aromatisch-käsiger aber nicht harzertypisch. Nach der dreiwöchigen Lagerung war der Quarkkern noch nicht vollständig abgebaut.

**Tab. 12:** Bakterien und Hefen der Oberflächenflora: Käsungsversuch Charge S1

	1 Woche	3Woche
<i>Debaryomyces hansenii</i> [KbE/cm <sup>2</sup> ]	1,1 x 10 <sup>9</sup>	2,6 x 10 <sup>8</sup>
Schimmel	-	-
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	6,8 x 10 <sup>8</sup>	1,1 x 10 <sup>10</sup>
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	13,4%	15,3%
<i>Microbacterium</i> spp.	23,5%	7,4%
<i>Brevibacterium linens</i>	19,1%	60,1%
<i>Staphylococcus</i> spp.	44,1%	17,2%

Innerhalb der ersten Reifungswoche stellten die Hefen, DH 6004, mit 62% den Hauptanteil an der Oberflächenflora. Nach einer dreiwöchigen Reifung ging der Anteil auf 3% zurück. Die Bakterienkeimzahl lag nach einer Woche bei 6,8x10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup>. Den Hauptanteil an der bakteriellen Oberflächenflora stellten die orangepigmentierten Staphylokokken mit 3,0x10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (44,1%) gefolgt von den gelbpigmentierten *Microbacterium* spp. 1,60x10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (23,5%). Die coryneformen Bakterien und Brevibakterien nahmen mit 9,11x10<sup>7</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (13,4%) und 1,60x10<sup>8</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (19,1%) eine untergeordnete Rolle an der Oberflächenflora ein (Tab.12). In der dritten Reifungswoche war die Bakterienzahl auf der Oberfläche auf 1,1x10<sup>10</sup> KbE/cm<sup>2</sup> angewachsen. Den Hauptanteil stellten die orangepigmentierten *B. linens* mit 6,61x10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (60,1%), gefolgt von den Staphylokokken mit 1,89x10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (17,2%). Die coryneformen Bakterien nahmen mit 1,68x10<sup>9</sup> KbE/cm<sup>2</sup> (15,3%) einen geringeren Anteil an der Oberflächenflora ein. Den geringsten Anteil stellte zu diesem Zeitpunkt

*Microbacterium* spp. mit  $8,14 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> (7,4%). Im gesamten Reifungsverlauf konnten keine Fremdkontaminanten von der Oberfläche isoliert werden.

#### 3.4.4.4 Charge S2

Zusammen mit den Reifungssalzen erfolgte eine Zugabe von 5% Kulturkäse zum Sauermilchquark. Zum Animpfen der Quarkmasse wurde ein industrieller Kulturkäse eingesetzt.

Die Analyse des Kulturkäses erbrachte eine Hefekeimzahl von  $6,9 \times 10^7$  KbE/cm<sup>2</sup>. Es handelte sich um eine Hefemischflora, welche nicht weiter differenziert wurde. Die Bakterienkeimzahl betrug  $6,5 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup>. Diese Keimzahl setzte sich zu 67,4% aus coryneforme Bakterien, und zu 32,6% aus *Staphylococcus* spp. zusammen.

Das Reifungsverfahren war identisch zu dem der Charge S1. Nach dem Schwitzraum zeigten die Versuchskäse eine typische, 2 mm starke Hefeschicht. Der pH-Wert lag zu diesem Zeitpunkt bereits über pH 6,0. Der Geruch war leicht harzertypisch und etwas hefig. Die Besprühung der abtemperierten Käse erfolgte einmalig mit einer industriellen Reifungskultur, bestehend aus *B. linens* ( $9,1 \times 10^7$  KbE/ml). Bei der anschließenden Reifung, bei 12°C für 24h, bildete sich bereits eine leichte Schmiere aus, welche sich gleichmäßig über die Käsoberfläche verteilte. Die Farbe der Käse war gelblich, der Geruch war stark harzertypisch. Für die nachfolgende Lagerung bei 8°C erfolgte keine Verpackung in Folie. Die Käse wurden in den Reifungszellen weiter gelagert. Nach Abschluss der Nachreifung waren alle Versuchskäse gleichmäßig durchgereift und wiesen das typische Aussehen und Aroma auf.

**Tab. 13:** Hefen und Bakterienkeimzahlen der Vergleichskäsung Charge S2

	1 Woche	3 Woche
Hefen [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$1,4 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	$4,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^9$
Coryneforme Bakterien (beigefarben)	1,3%	62,4%
<i>Microbacterium</i> spp.	0,7%	0,7%
<i>Brevibacterium linens</i>	42,4%	22,9%
<i>Staphylococcus</i> spp	55,6%	14,0%

In der ersten Reifungswoche stellten die Hefen 24% an der Schmiereflora. Zum Ende der Reifung gingen sie auf 1% der Gesamtkeimzahl zurück. Die Hefeflora setzte sich, wie auch beim Kulturkäse, aus verschiedenen Spezies zusammen. Die bakterielle Keimzahl

lag nach der ersten Reifungswoche bei  $4,5 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup>. Den Hauptanteil stellten *Staphylococccen* spp. mit  $2,5 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> (55,6%). Zusätzlich konnte sich *B. linens* mit  $1,9 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> (42,4%) etablieren. Die coryneformen Bakterien waren zu diesem Zeitpunkt nur mit  $5,85 \times 10^6$  KbE/cm<sup>2</sup> (1,3%) an der Oberflächenflora beteiligt. Im Verlauf der Reifung kam es zu einer Verschiebung der Florenzusammensetzung auf der Käseoberfläche (Tab. 13). Den Hauptanteil bildeten in der dritten Woche die coryneformen Bakterien mit  $2,12 \times 10^9$  KbE/cm<sup>2</sup> (62,4%) gefolgt von *B. linens* mit  $7,79 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> (22,9%). Staphylokokken waren mit  $4,59 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> nur geringfügig nachzuweisen.

Eine Differenzierung der isolierten Staphylokokken, sowohl von den eingesetzten Kulturkäsen als auch von den Oberflächenisolaten, erfolgte über ID32 (BioMérieux) und ARDRA. Die Isolate konnten den Spezies *S. saprophyticus* und *S. equorum* zugeordnet werden. Den prozentual höheren Anteil bildete *S. saprophyticus* auf der Käseoberfläche.

#### **3.4.4.5 Bedeutung der Hefeflora des Quarkes für die Sauermilchkäserei**

In der kommerziellen Sauermilch-Käserei wird meistens Sauermilchquark verschiedener Hersteller für die Käseproduktion verwendet. Diese Verfahrensweise sichert eine ausgewogene Hefemischflora im Quark, die sich durch eine betriebspezifische, zufällige Hausflora ergibt. Um den Einfluss der Hefen auf den Reifungsverlauf genauer zu untersuchen, erfolgte deren Zugabe in unterschiedlichen Produktionsabschnitten. Für diesen Versuch wurden die Hefeisolate *K. marxianus* (5675) und *C. krusei* (60132) eingesetzt. Diese Hefen zeichneten sich durch gute Alkalisierungseigenschaften im Milchmedium aus (3.2).

Die Produktion des Sauermilchquarks erfolgte in zwei separaten Chargen. Nach der Produktion schloß sich eine Lagerung des Quarks für sechs Tage bei 8°C an. Im Anschluss wurde das unter 2.9.1 beschriebene Verfahren zur Produktion von Sauermilchkäse fortgeführt. Die Reifungsbedingungen wurden, wie unter 2.9.2 beschrieben eingehalten. Zur Kontrolle der Alkalisierung erfolgte eine tägliche Überprüfung des pH-Wertes der Oberfläche (Abb. 9). Die für die Oberflächenpflege verwendete Arbeitsschmiere bestand aus einer Reinkultur von *B. linens* (Br5), welche in 3% NaCl-Lösung aufgenommen wurde. Die Bakterienkeimzahl in der Sprühkultur betrug  $6,8 \times 10^7$  KbE/ml.

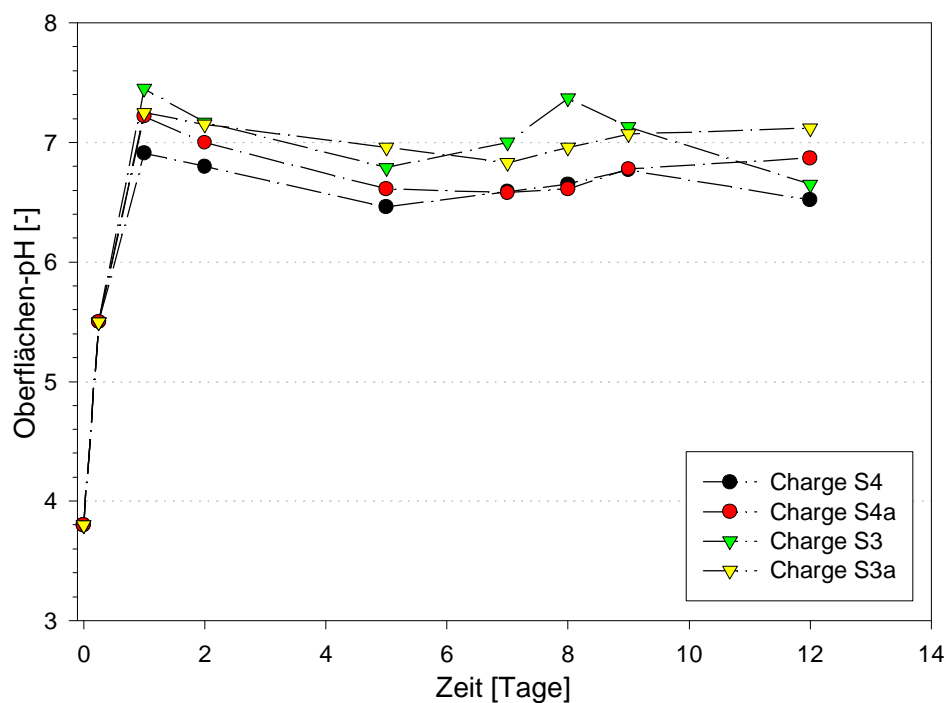


Abb. 9: Oberflächenentsäuerung der Chargen S3 / S3a und S4/ S4a.

#### 3.4.4.6 Charge S3 / S3a

Die Quarkproduktion erfolgte ohne Zugabe von Hefen in die Kesselmilch. Nach der Lagerung wies der Sauermilchquark einen pH-Wert von 3,8 auf. Zusammen mit den Reifungssalzen erfolgte die Zugabe der Hefen *K. marxianus* (5675) und *C. krusei* (60132), von je  $10^3$  KbE/ml. Die Grundquarkmasse wurde geteilt. Der Charge S3 wurde der proteolytisch aktive *S. sciuri* (Staph4) in einer Konzentration von  $10^7$  KbE/ml der Grundquarkmasse zugegeben. Bei der Charge S3a erfolgte der Zusatz des proteasenegativen *S. equorum* (Staph2) in der gleichen Konzentration. Der weitere Produktionsablauf ist Abb. 3 zu entnehmen.

Im Schwitzraum kam es innerhalb des ersten Reifungstages bei beiden Versuchsansätzen zu einer schnellen Entsäuerung der Oberfläche (Abb. 9), der pH-Wert lag um pH 7,0. Die sich entwickelnde Hefeschicht zeigte keine klare Abgrenzung zum Quarkkern, sondern durchsetzte den gesamten Käse. Zu diesem Zeitpunkt war der Geruch hefig und leicht käsigt. Nach dem Schwitzraum erfolgte das Aufsprühen der *B.linens* (Br5) Kultur, welche in 3% NaCl-Lösung aufgenommen worden war.



**Tab. 14:** Hefen u. Bakterienkeimzahlen der Chargen S3 / 3a

	Charge 3		Charge 3a	
	1 Woche	2 Wochen	1 Woche	2 Wochen
Hefen [KbE/cm <sup>2</sup> ]	3,5x 10 <sup>7</sup>	1,2 x10 <sup>8</sup>	2,6x 10 <sup>7</sup>	3,6 x10 <sup>7</sup>
Schimmel	-		-	-
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	4,6 x 10 <sup>8</sup>	7,2 x 10 <sup>9</sup>	5,1 x 10 <sup>8</sup>	4,8 x 10 <sup>9</sup>
<i>Brevibacterium linens</i> (Br5)	34,8%	95,7%	90,7%	98,6%
<i>S. sciuri</i> (Staph 4)	65,2%	4,3%	-	-
<i>S. equorum</i> (Staph 2)	-	-	9,3%	1,4%

Im gesamten Reifungsverlauf zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in den Hefenkeimzahlen der Versuchschargen. Durch die Oberflächenanalyse nach einer Woche wurde belegt, dass sich die als Sprühlösung aufgebrauchte *B. linens* Kultur mit  $1,60 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> auf der Oberfläche etablieren konnte. *S. sciuri* subsp. *sciuri* (Staph4) bildete in der ersten Reifungswoche mit  $3,0 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> den Hauptteil an der Bakterienflora. Während der zweiten Reifungswoche erfolgte eine Verschiebung innerhalb der Oberflächenflora (Tab. 14). Die Spezies *B. linens* konnte sich mit  $6,8 \times 10^9$  KbE/cm<sup>2</sup> (95,7%) auf der Oberfläche durchsetzen. Die sensorische Beurteilung der Käse nach zwei Wochen erbrachte, dass der Geruch hefig und wenig harzertypisch war. Die Konsistenz der Käse war typisch elastisch, die Farbe kräftig gelb-orange bis bräunlich. Die Oberfläche zeigte sich nach der zweiwöchigen Reifung unangenehm schmierig.

Bei der Charge S3a stellte *B. linens* im gesamten Reifungsverlauf den dominanten Anteil an der Oberflächenflora (Tab. 14). Der eingesetzte Stamm Staph2 war nur zu einem geringen Anteil an der Oberflächenflora beteiligt. Nach zwei Wochen waren die Käse im Geschmack und Geruch deutlich hefig und gering harzertypisch. Die Oberfläche wirkte gelblich und fleckig, ansonsten war sie trocken.

Beide Versuchschargen zeigten nach der zweiwöchigen Reifung eine inhomogene Durchreifung. Im gesamten Reifungsverlauf konnten keine anderen Corynebakterien oder Fremdkontaminanten, wie Enterobakterien oder Enterokokken auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

### 3.4.4.7 Charge S4 / S4a

Das Arbeitsverfahren zu Quarkherstellung erfolgte wie unter 2.9.1 beschrieben. Die Hefen *K. marxianus* und *C. krusei* wurden in einer Konzentration von  $10^3$  KbE/ml zur Kesselmilch gegeben. Die Produktion zu Sauermilchkäse (Abb. 3) wurde nach 6 Tagen fortgesetzt. Nach der „Vorreifung“ war die Farbe der Quarkmasse leicht gelblich und der Geruch wies verschiedene aromatische Komponenten auf. Zusammen mit den Reifungssalzen wurde einem Teil der Quarkmasse der proteolytisch aktive Staph4 (Charge S4), dem anderen Teil der proteasenegative Staph2 (Charge 4a) zugesetzt.

Die geformten Käse wurden für 24h im Schwitzraum gereift. Innerhalb dieser Zeit kam es zu einer schnellen Entsäuerung auf der Käsoberfläche (Abb. 9). Beide Versuchschargen (S4/S4a) hatten eine gut zu erkennende und klar abgrenzbare Hefeschicht ausgebildet. Die Versuchskäse waren cremegelb mit matter, leicht pelziger Oberfläche und einer leicht wellig-unebener Haut; der Geruch war leicht käsig mit deutlichen Esterkomponenten. Nach dem Schwitzraum erfolgte das Aufsprühen der in 3% NaCl-Lösung aufgenommenen *B.linens* (Br5) Kultur.

**Tab. 15:** Hefen u. Bakterienkeimzahlen der Chargen S4 u. S4a.

	Charge S4		Charge S4a	
	7 Tage	14 Tage	7 Tage	14 Tage
Hefen [KbE/cm <sup>2</sup> ]	4,4x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>	4,3 x 10 <sup>7</sup>	4,7 x10 <sup>7</sup>
Schimmel	-	-	-	-
Bakterien [KbE/cm <sup>2</sup> ]	7,5 x 10 <sup>8</sup>	1,6 x 10 <sup>9</sup>	7,5 x 10 <sup>7</sup>	5,6 x 10 <sup>9</sup>
<i>Brevibacterium linens</i>	24,0%	38,3%	35,1%	98,3%
<i>S. sciuri</i> (Staph 4)	76,0%	61,7%	-	-
<i>S. equorum</i> (Staph 2)	-	-	64,9%	1,7%

Die Hefekeimzahl lag für beide Chargen im Bereich von  $10^7$  KbE/cm<sup>2</sup>. Diese Keimzahl veränderte sich während des gesamten Reifungsverlaufes nicht.

Für Charge S4 zeigte die Oberflächenanalyse im Reifungsverlauf, dass Staph4 den Hauptanteil an der Oberflächenflora (Tab. 15) stellte. Der aufgebrauchte *B. linens* (Br5) Stamm konnte sich in der ersten Woche mit  $1,80 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> und in der zweiten Woche mit  $6,13 \times 10^8$  KbE/cm<sup>2</sup> auf der Oberfläche etablieren. Während des gesamten Reifungsverlaufes erfolgte eine gute Reifung von außen nach innen. Es war immer eine klare Abgrenzung zwischen Reifungszone und Quarkkern zu erkennen. Die Farbe der

Käse war gelblich mit glasigen Rändern. Der Käseteig war elastisch und einheitlich strukturiert, der Geruch war harzertypisch, die Oberfläche feucht schmierig.

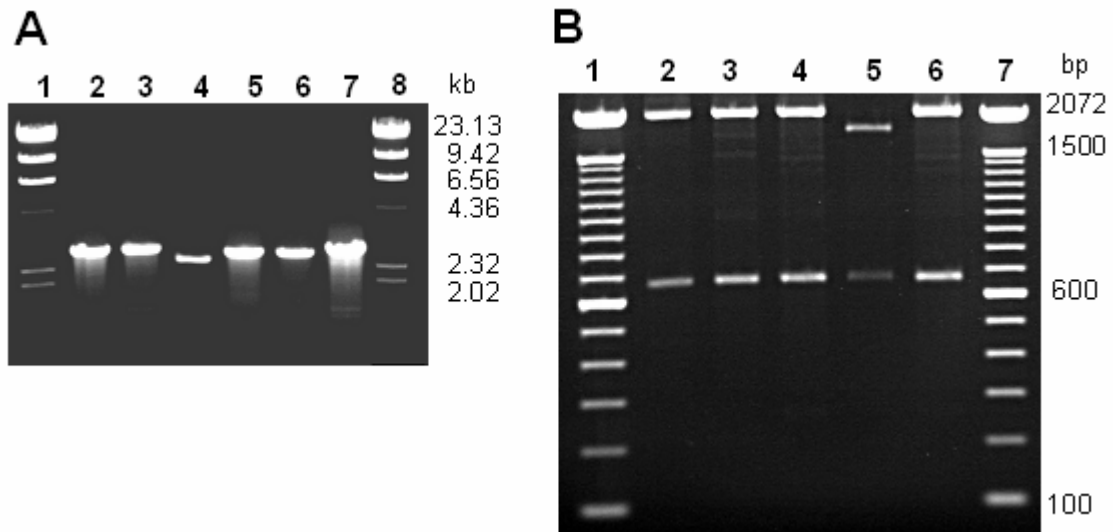
In der ersten Reifungswoche stellte *S. equorum* (Staph2) mit  $4,87 \times 10^7$  KbE/cm<sup>2</sup> den Hauptanteil an der Oberflächenflora. In der zweiten Reifungswoche kam es zu einer Verschiebung innerhalb der Oberflächenflora. Den Hauptanteil der Rotschmiereflora stellte *B. linens*. Auch in dieser Käsecharge zeigte sich ein einheitliches Durchreifen der Käse von aussen nach innen. Der Geruch war harzer typisch bis leicht hefig. Die Farbe war gelblich mit glasigen Rändern. Die Oberfläche der Käse war trocken.

### 3.5 Amplified-Ribosomal-DNA-Restriction-Analysis (ARDRA)

Zur Analytik der Rotschmiereflora wurde die Methode ARDRA etabliert. Mit dieser Methode sollten die verschiedenen Oberflächenisolate schnell und sicher auf Gattungs- und Speziesebene identifiziert werden. Zur Differenzierung wurden die Typstämme der unterschiedlichen Spezies sowie kommerziell erhältliche Stämme und Oberflächenisolate von Rotschmierenkäse eingesetzt. Die Oberflächenisolate wurden über partielle Sequenzierung und physiologische Verfahren, wie beispielsweise API-Tests (BioMérieux; Frankreich) den unterschiedlichen Gattungen bzw. Spezies zugeordnet. Durch den Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sollte für die Gattungen *Arthrobacter*, *Microbacterium* und *Staphylococcus* jeweils ein Bereich amplifiziert werden, der die 16S-, die 16S - 23S-Spacer Region sowie einen Teil der 23S rRNA umfasste. Für die Gattungen *Brevibacterium* und *Corynebacterium* wurde der Bereich der 16S rDNA amplifiziert. Durch einen nachfolgenden Verdau der erhaltenen PCR-Produkte Restriktionsenzymen, wurden diese in speziesspezifische Fragmentmuster geschnitten.

#### 3.5.1 *Arthrobacter* spp. und *Microbacterium* spp.

Gelbpigmentierte coryneforme Bakterien gehören zur typischen Rotschmiereflora. Frühere Studien wiesen darauf hin, dass sich diese Fraktion ausschließlich aus Vertretern der Gattung *Arthrobacter*, insbesondere *Arthrobacter nicotianae*, zusammengesetzt ist. Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich diese Fraktion heterogener dar. Es wurden Typstämme von fünf Spezies der Gattung *Arthrobacter* und vier Spezies der Gattung *Microbacterium*, eingesetzt. Ebenfalls getestet wurden Käseisolate, die zuvor am niederländischen Institut für Milchuntersuchung (NIZO) über partielle Sequenzierung der 16S rDNA klassifiziert worden waren.

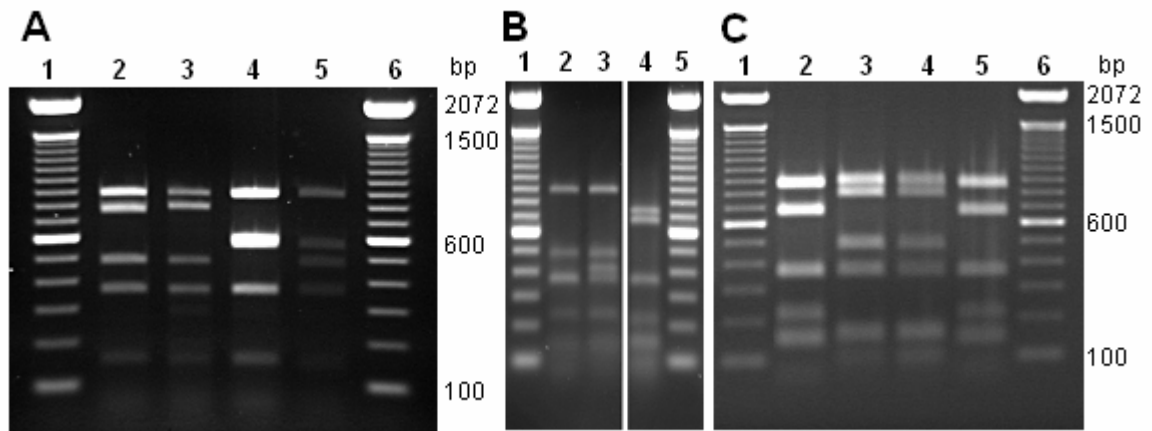


**Abb. 10:** (A): PCR-Produkt von *Arthrobacter* spp. bzw. *Microbacterium* spp. (1.0 % agarose):1+8:  $\lambda$ -*Hind*III marker; 2: *A. nicotianae* MGE 10D; 3: *A. nicotianae* CA13; 4: *M. gubbeenense* CA12; 5: *A. sulfureus* DSM 20167-T; 6: *A. citreus* DSM 20133-T; 7: *A. globiformis* DSM 20124-T. (B): Restriktionsanalyse von *Arthrobacter* spp. mit *EcoRV* (1.5% agarose):1+7:100 bp ladder; 2: *A. nicotianae* (DSM 30123-T); 3: *A. nicotianae* MGE 10D; 4: *A. nicotianae* CA13; 5: *M. gubbeenense* CA12; 6: *A. globiformis* DSM 20124-T.

Es war möglich für alle getesteten Stämme das Zielfragment zu amplifizieren (Abb. 10A). Für *Arthrobacter* spp. wurde ein Produkt mit einer Länge von 2,7 kb gebildet, bei *Microbacterium* spp. wies das Produkt eine Länge von 2,4 kb auf.

Zur Differenzierung wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Enzyme *Bam*HI, *Bgl*I, *Hind*III und *Xba*I hatten keine Erkennungssequenz im amplifizierten Bereich. Die Restriktionsansätze mit *Aat*II, *Av*aII, *Bsp* 143I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nae*I, *Nco*I, *Rsa*I erbrachten ein einheitliches Schnittmuster oder zu kleine Fragmente, um eine eindeutige Differenzierung zu ermöglichen. Eine Differenzierung auf Gattungsebene war mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV möglich (Abb. 10B).

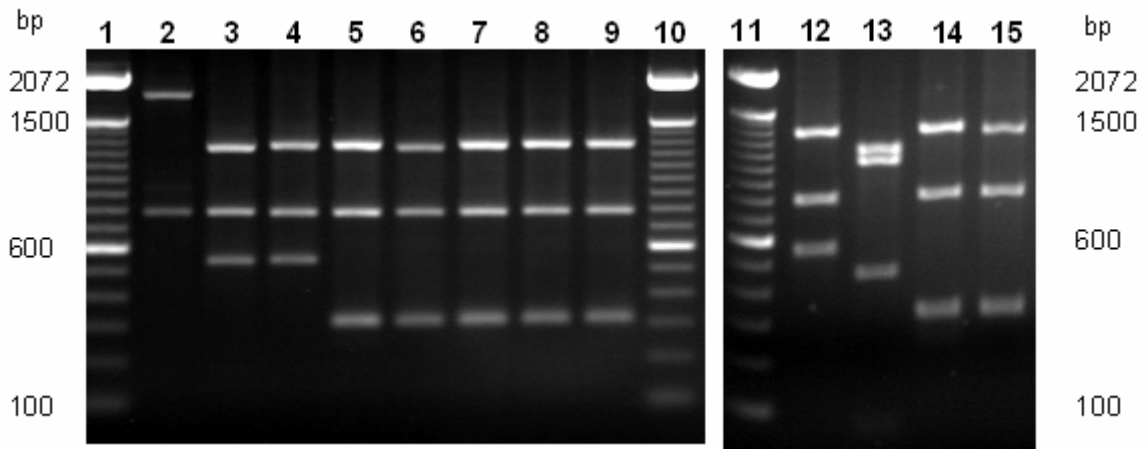
Eine teilweise Differenzierung der *Arthrobacter* spp. und *Microbacterium* spp. wurde durch Restriktionsanalysen der PCR-Produkte mit *Alu*I, *Hin*fI, *Sma*I und *Taq*I (Abb. 11) ermöglicht.



**Abb. 11:** Restriktionsanalyse der PCR-Produkte mit *TaqI* (1,5% Agarose). Typstämme (A): 1+6, 100 bp Leiter; 2, *Arthrobacter nicotianae* DSM 20123-T; 3, *A. globiformis* DSM 20124-T; 4, *A. citreus* DSM 20133-T; 5, *A. sulfureus* DSM 20167-T. Typstämme (B): 1+5, 100 bp Leiter; 2, *A. rhombi* CCUG 33813-T; 3, *A. rhombi* CCUG 33812; 4, *Microbacterium barkeri* DSM 20145-T. Käseisolate (C): 1+6, 100 bp Leiter; 2, *M. barkeri* CA12; 3, *A. nicotianae* CA13; 4, *A. nicotianae* CA14; 5, *M. barkeri* CA15.

Durch den Verdau mit *TaqI* (Abb. 11) war eine Differenzierung zwischen den Spezies *A. citreus*, *A. sulfureus*, *A. rhombi* und *A. globiformis*, *A. nicotianae* zu erreichen. Eine Unterscheidung zwischen den Spezies *A. globiformis* und *A. nicotianae* war aufgrund des identischen Schnittmusters nicht möglich. Die getesteten Spezies der Gattung *Microbacterium* spp. ergaben mit *TaqI* ein abweichendes Schnittmuster zu den getesteten *Arthrobacter* Spezies. Mit diesem Enzym konnte ebenfalls eine Differenzierung zwischen den Spezies *Microbacterium barkeri* und *M. gubbeenense* erfolgen.

Unter Verwendung des Restriktionsenzym *DraIII* (Abb. 12) war eine Differenzierung zwischen den Spezies *A. globiformis* (DSM 20124-T) und *A. nicotianae* (DSM 20123-T) möglich, jedoch wiesen *A. globiformis* (DSM 20124-T) und *A. citreus* (DSM 20133-T) ein identisches Schnittmuster auf. Die Spezies *A. sulfureus* (DSM 20167-T) und *A. rhombi* (CCUG 38813-T) ergaben ein speziestypisches Restriktionsschnittmuster.

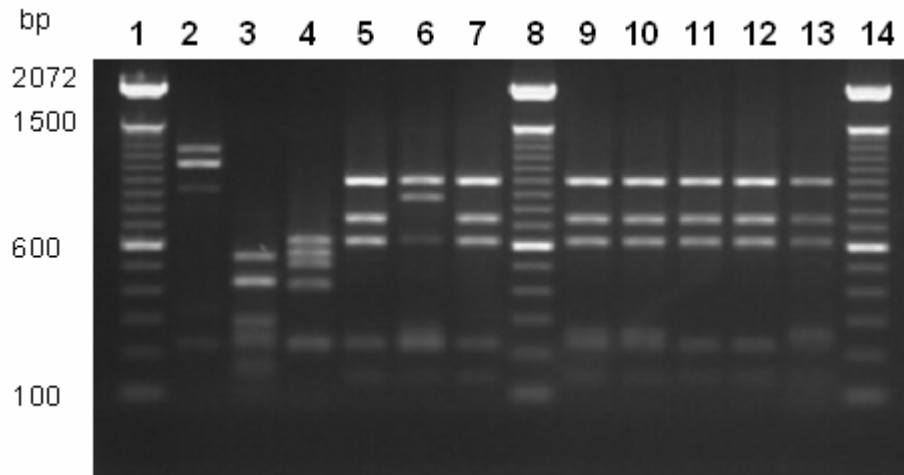


**Abb. 12:** 1,5% Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsansatzes von *Arthrobacter* spp. mit *DraIII*: 1+10+11, 100 bp Leiter; 2, *A. sulfureus* DSM 20167-T; 3, *A. citreus* DSM 20133-T; 4, *A. globiformis* DSM 20124-T; 5, SBI 6276023 (95005); 6, *A. nicotianaе* DSM 30123-T; 7, *A. nicotianaе* MGE 10D; 8, 95293; 9, 95294; 12, *A. globiformis* DSM 20124-T; 13, *A. rhombi* CCUG 38813-T; 14, SBI 627602; 15, *A. nicotianaе* DSM 30123-T

Die getesteten Käseisolate 95293, 95294, sowie der kommerziell erhältliche Stamm SBI 6276023, zeigten ein identisches Schnittmuster zur Spezies *A. nicotianaе*.

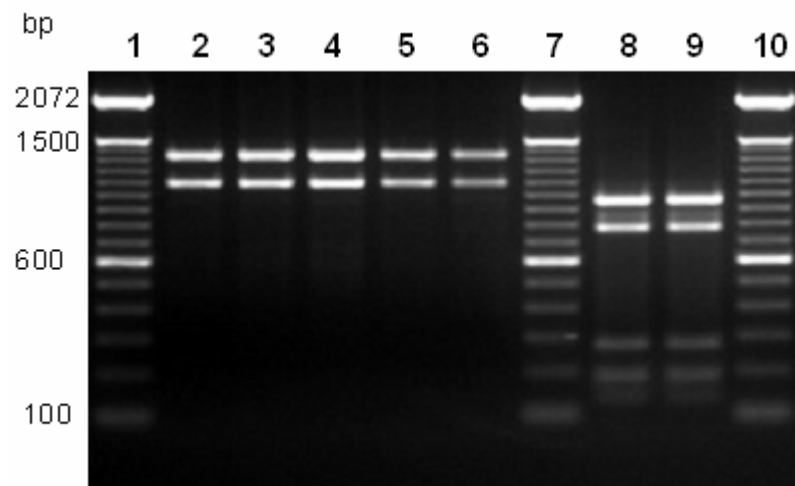
Es war nach der Vorklassifizierung durch NIZO zu erwarten, dass die Käseisolate 95293 und 95294 ein übereinstimmendes Restriktionsmuster zum Typstamm *A. rhombi* CCUG 38813 zeigen sollten. Der kommerzielle Stamm SBI 6276023 hätte mit der Spezies *A. globiformis* ein deckungsgleiches Fragmentmuster ergeben sollen. Die getesteten PCR-Produkte der Gattung *Microbacterium* spp. wurden durch *DraIII* nicht geschnitten. Dieses Enzym ermöglichte eine zusätzliche Abgrenzung zwischen den beiden Gattungen.

Durch den Restriktionsverdau mit *NciI* (Abb. 13) war es möglich, für jede eingesetzte Spezies ein charakteristisches Restriktionsschnittmuster zu erhalten. Eine Zuordnung der *A. nicotianaе* Käseisolate zum Typstamm *A. nicotianaе* DSM 20123-T war nicht möglich. Eine ebensolche Divergenz von *A. nicotianaе* DSM 20123-T zu den *A. nicotianaе* Käseisolaten wurde auch mit *SmaI* nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13:** Restriktionsanalyse von *Arthrobacter* spp. mit *NciI* (1,5% agarose): 1+8+14, 100 bp Leiter; 2, *A. sulfureus*, DSM 20167-T; 3, *A. citreus* DSM 20133-T; 4, *A. globiformis* DSM 20124-T; 5, SBI 6276023; 6, *A. nicotianae* DSM 20123-T; 7, *A. nicotianae* MGE 10D; 9, *A. nicotianae* CA13; 10, *A. nicotianae* CA14; 11, Isolate 95293; 12, Isolate 95294; 13, Isolate 95299

Eine Unterscheidung der Vertreter der Gattung *Microbacterium* war durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzymen *XmnI* (Abb. 14) nur teilweise möglich.

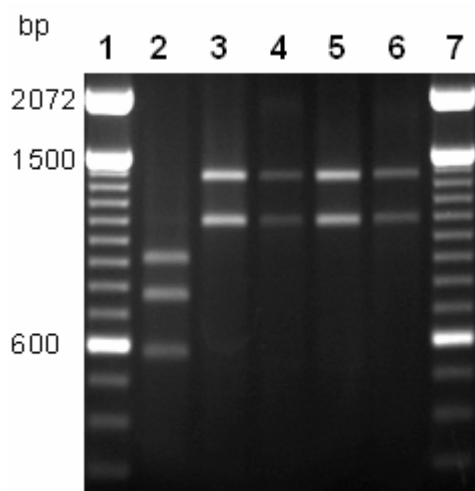


**Abb. 14:** Restriktionsanalyse von *Microbacterien* spp. mit *XmnI* (1,5% agarose): 1+7+10, 100 bp Leiter. 2, *Microbacterium barkeri* DSM 20145-T; 3, *M. gubbeenense* (CA 12); 4, *M. gubbeenense* (CA 15); 5, 95292; 6, 95207; 8, *M. laevaniformans* DSM 20140-T; 9, *M. imperales* DSM 20530-T.

Durch den Verdau mit *XmnI* konnten die Spezies *M. barkeri* DSM 20145-T und *M. gubbeenense* DPC 5286-T von den Spezies *M. imperiale* DSM 20530-T und *M. laevaniformans* DSM 20140-T differenziert werden. Eine Unterscheidung zwischen *M. barkeri* DSM 20145-T und *M. gubbeenense* DPC 5286-T sowie zwischen

*M. imperiale* DSM 20530-T und *M. laevaniformans* DSM 20140-T konnte nicht mit *XmnI* erreicht werden.

Eine eindeutigere Differenzierung zwischen den Stämmen *M. barkeri* DSM 20145-T und *M. gubbeenense* DPC 5286-T war durch das Enzym *AvaII* (Abb. 15) möglich.



**Abb. 15:** Restriktionsanalyse von *Microbacterien* spp. mit *AvaII* (1,5% agarose). 1+7, 100 bp Leiter. 2, *Microbacterium barkeri* DSM 20145-T; 3, *M. gubbeenense* CA12; 4, Isolat 95292; 5, Isolat 95207; 6, *M. gubbeenense* DPC 5286-T.

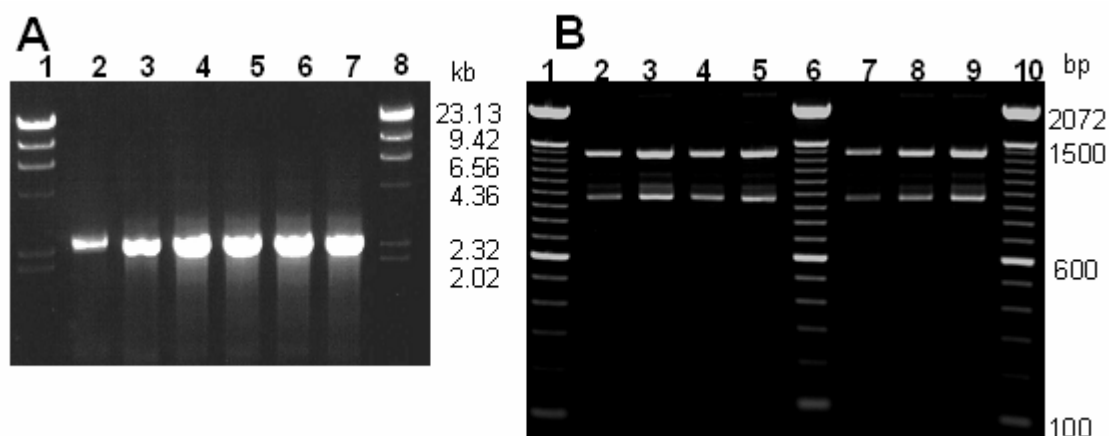
Mit *AvaII* wurde ein Speziesspezifisches Schnittmuster für *M. barkeri* DSM 20145-T und *M. gubbeenense* DPC 5286-T erhalten. Die Isolate CA12, CA15 (nicht gezeigt), 95292 und 95207 zeigten ein identisches Fragmentmuster wie der Typstamm der Spezies *M. gubbeenense*.

Diese Methode wurde zur Differenzierung der gelbpigmentierten Fraktion unterschiedlicher, kommerziell erhältlicher, oberflächengereifter Käsen eingesetzt. Es wurden 12 Isolate getestet. Nach der PCR zeigte sich, dass alle getesteten Isolate eine Fragmentlänge von 2,4 kb aufwiesen und nicht mit *DraIII* geschnitten werden konnten. Durch den Verdau mit *XmnI* und *AvaII* wiesen 10 Isolate ein identisches Reaktionsmuster zur Spezies *M. gubbeenense* auf. Zwei Isolate zeigten ein divergentes Fragmentmuster. Über partielle Sequenzierung der 16S rDNA wurden diese Isolate der Spezies *M. lacticum* zugeordnet.



### 3.5.2 *Staphylococcus* spp.

Zur Differenzierung wurden 12 Spezies, davon zwei Spezies mit einer dazugehörigen Subspezies getestet. Neben den Typstämmen der unterschiedlichen Spezies wurden 45 Oberflächenisolate von Rotschmirekäsens getestet. Es war möglich, für alle eingesetzten Stämme ein einheitliches Fragment mit einer Länge von 2,4 kb zu erhalten (Abb. 16A).



**Abb. 16:** (A): PCR-Produkt *Staphylococcus* Spezies (1% Agarosegel): 1+8,  $\lambda$ -HindIII Standard; 2, *S. kloosii* DSM 20676-T; 3, *S. sciuri* Staph4; 4, *S. xylosus* DSM 6179; 5, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 6672; 6, *S. equorum* DSM 20674-T; 7, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T. (B): Restriktionsanalyse des 2,4 kb PCR-Produktes mit *Sma*I (1.5% Agarosegel): 1+6+10, 100 bp Leiter; 2, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20676-T; 3, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 6672; 4, *S. equorum* DSM 20674-T; 5, *S. equorum* DSM 20675; 7, *S. xylosus* DSM 20226-T; 8, *S. xylosus* MVA 10D; 9, *S. xylosus* DSM 6179.

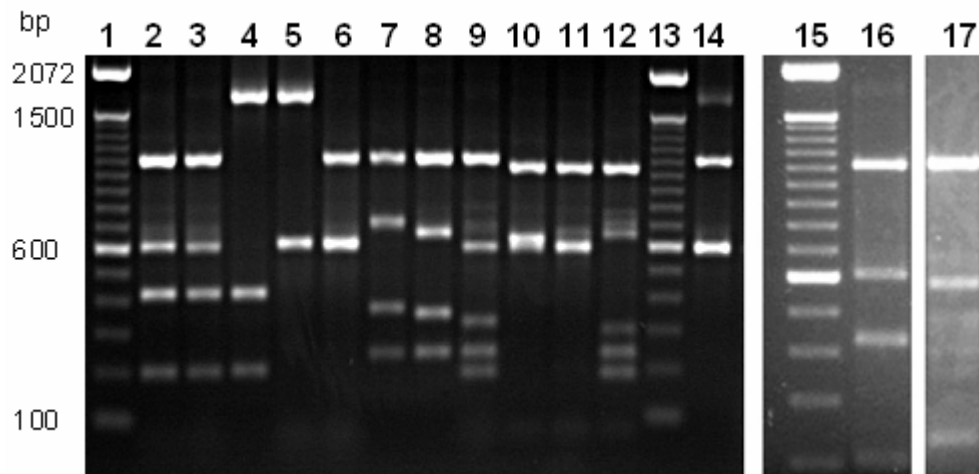
Die Überprüfung, dass die Zielfrequenz amplifiziert worden war, erfolgte über einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sma*I. Nach der Analyse, der von der EMBL-Datenbank zur Verfügung gestellten Sequenzen, war mit dem Enzym *Sma*I an Position 1370 der 16S rDNA eine für die Gattung *Staphylococcus* typische Erkennungssequenz zu erwarten, die für den amplifizierten Bereich aller getesteten Spezies gefunden werden konnte (Abb. 16B).

Weitere gattungsspezifische Restriktionsschnittmuster wurden mit den Restriktionsenzymen *Sac*II, *Aat*II, *Nhe*I, *Pst*I, *Kpn*I, *Sal*I, *Sph*I, *Sty*I, *Xba*I erhalten. In dem amplifizierten Bereich lag keine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme *Bam*HI, *Bgi*I, *Bgi*II, *Eco*RV, *Hpa*I, *Nae*I, *Noc*I, *Not*I, *Stu*I und *Xho*I vor. Eine partielle Differenzierung der Staphylokokken in drei, beziehungsweise vier unterschiedliche Gruppen war mit den Enzymen *Taq*I und *Afl*III möglich (*Afl*III-Daten nicht gezeigt). Eine Differenzierung aller getesteten Spezies war durch Verwendung der Enzym *Hind*III und *Xmn*I möglich (Tab. 16).

**Tab. 16:** ARDRA Differenzierung von *Staphylococcus* Spezies mit *Hind*III und *Xmn*I: (X) Spezies mit einem typischen Restriktionsschnittmuster; Spezies mit einem identischen Restriktionsmuster bei einem Enzym sind mit einer Gruppennummer bezeichnet.

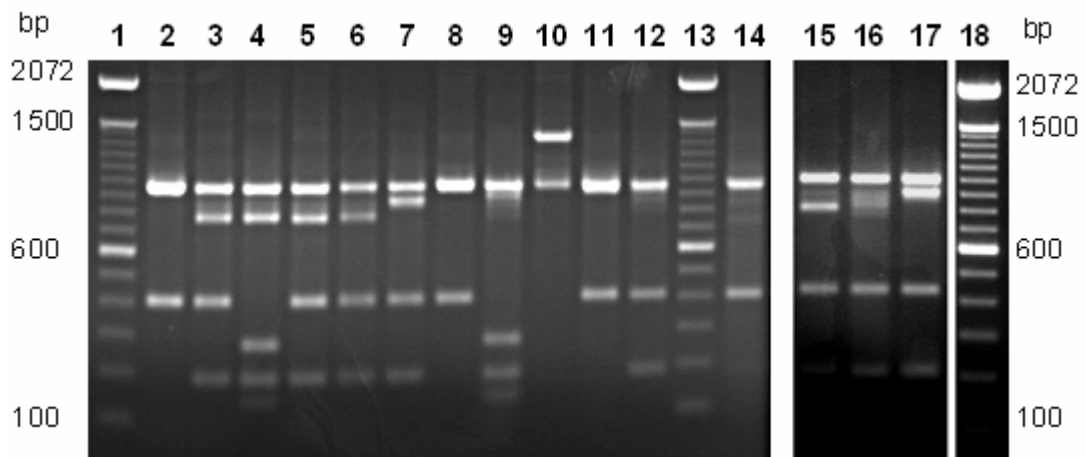
Spezies bzw. Subspezies	<i>Hind</i> III	<i>Xmn</i> I
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	X	X
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	X	4
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	1	4
<i>S. epidermidis</i>	X	X
<i>S. equorum</i>	X	5
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	X	6
<i>S. kloosii</i>	X	X
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saproh.</i>	2	4
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>	3	X
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	3	6
<i>S. simulans</i>	1	6
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>	2	5
<i>S. warneri</i>	X	X
<i>S. xylosus</i>	2	6

Durch die Restriktionshydrolyse mit *Hind*III (Abb. 17) ergaben sich für die sieben Spezies *S. equorum* DSM 20674-T, *S. cohnii* ssp. *cohnii* DSM 20260-T, *S. warneri* DSM 20316, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328, *S. kloosii* DSM 20676, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 2569 und *S. epidermidis* DSM 1798 speziesspezifische Restriktionsschnittmuster. Zwischen den Spezies *S. xylosus* DSM 20226-T, *S. saprophyticus* sup. *saprophyticus* DSM 20229-T und *S. succinus* subsp. *casei* DSM 15096-T, sowie zwischen *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T und *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T, und zwischen *S. cohnii* ssp. *urealyticum* DSM 6718, *S. simulans* DSM 20322 war eine Unterscheidung mit *Hind*III nicht zu erreichen.



**Abb. 17:** Restriktionsanalyse der *Staphylococcus* Typstämme mit *Hind*III (1,5% Agarosegel): 1+13+15, 100 bp Leiter; 2+16, *S. xylosus* DSM 20266-T; 3, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T; 4, *S. equorum* DSM 20674-T; 5, *S. cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260-T; 6, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM6718-T; 7, *S. warneri* DSM 20316-T; 8, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328-T; 9, *S. kloosii* DSM 20676-T; 10, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 11, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 12, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 2569; 14, *S. simulans* DSM 20322-T; 17, *S. epidermidis* DSM 1798.

Die Spezies, die mit *Hind*III ein identisches Fragmentmuster ergaben, konnten durch einen Verdau mit *Xmn*I (Abb. 18) differenziert werden.

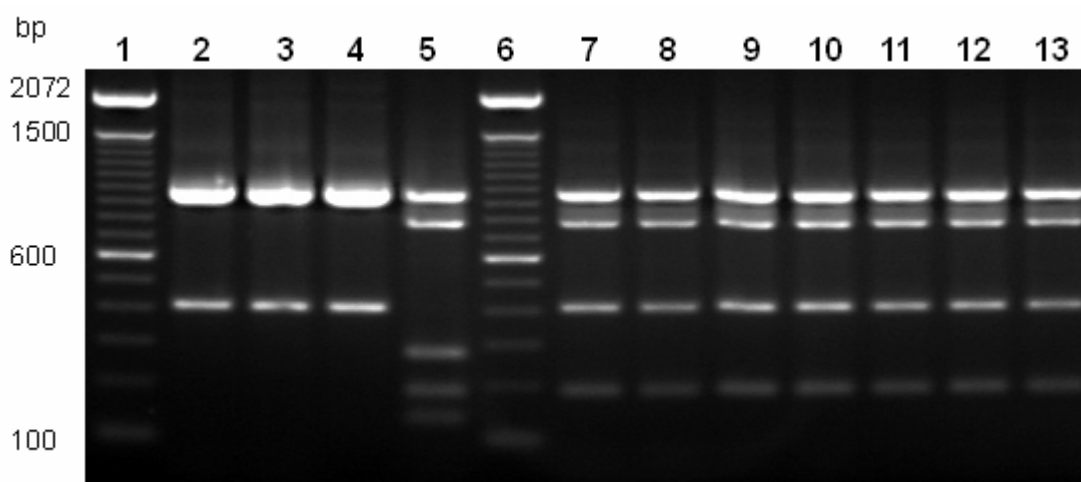


**Abb. 18:** Restriktionsanalyse der Staph. Typstämme mit *Xmn*I (1,5% Agarosegel). Typstämme: 1+13+18, 100 bp Leiter; 2, *S. xylosus* DSM 20266-T; 3, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T; 4, *S. equorum* DSM 20674-T; 5, *S. cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260-T; 6+15, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM6718-T; 7+17, *S. warneri* DSM 20316-T; 8, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328-T; 9, *S. kloosii* DSM 20676-T; 10, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 11, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 12, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 2569; 14, *S. simulans* DSM 20322-T; 16, *S. epidermidis* DSM 1798.

Die Spezies *S. xylosus* (DSM 20226-T), *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (DSM 20229-T) und *S. succinus* subsp. *casei* (DSM 15096-T) zeigten mit dem Enzym *Xmn*I ein

untereinander differenzierbares Fragmentmuster. Ebenso die mit *Hind*III einheitlichen Paare *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T und *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM 6718, *S. simulans* DSM 20322 zeigten mit *Xmn*I voneinander zu unterscheidende Fragmentmuster. Ein speziesspezifisches Fragmentmuster wurde für die fünf Spezies, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 2569, *S. epidermidis* DSM 1798, *S. kloosii* DSM 20676, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T und *S. warneri* DSM 20316 erhalten. Die Spezies *S. cohnii* ssp. *cohnii* DSM 20260-T, *S. cohnii* ssp. *urealyticum* DSM 6718 und *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (DSM 20229-T) zeigten ein deckungsgleiches Schnittmuster mit *Xmn*I. Aufgrund eines identischen Schnittmusters war eine Differenzierung zwischen den Spezies *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T, *S. simulans* DSM 20322 und *S. xylosus* DSM 20226-T nicht möglich. Eine Unterscheidung zwischen *S. succinus* subsp. *casei* (DSM 15096-T) und *S. equorum* DSM 20674-T war mit dem Enzym *Xmn*I nicht gegeben.

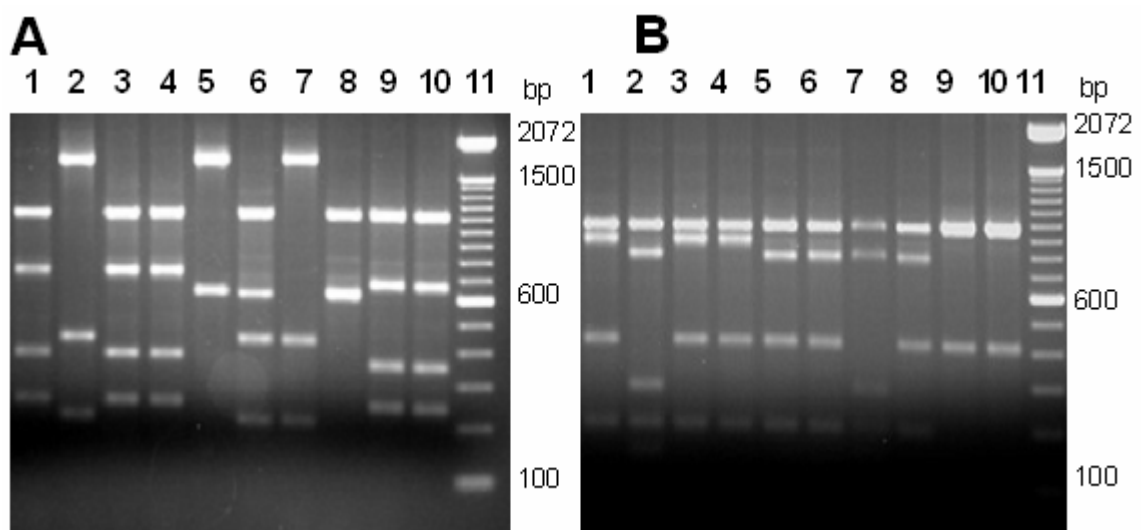
Dieses System der Differenzierung wurde an verschiedenen Käseisolaten und kommerziell erhältlichen Stämmen angewendet. Für die Spezies *S. xylosus* wurden zwei kommerziell erhältliche Stämme, für *S. saprophyticus* und *S. succinus* subsp. *casei* wurden Oberflächenisolate eingesetzt, welche über ID32 Staph (BioMérieux) und partielle Sequenzierung der 16S rDNA identifiziert wurden.



**Abb. 19:** Restriktionsanalyse von *Staphylococcus* spp. mit *Xmn*I (1,5% Agarosegel). 1+6, 100 bp Leiter; 2, *S. xylosus* DSM 20266-T; 3, *S. xylosus* DSM 6179; 4, *S. xylosus* MVA 10D; 5, *S. succinus* subsp. *casei* DSM 15096-T; 7, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T; 8, 91076; 9, 91075; 10, 91105; 11, Staph9; 12, 91125; 13, 91097.

Die eingesetzten Stämme wurden mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut. Für alle Stämme wurde das einheitliche Restriktionsschnittmuster der Spezies *S. xylosus* DSM 20226-T, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T und *S. succinus* subsp.

*casei* DSM 15096-T erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Abgrenzung zwischen den drei Spezies erfolgte durch die Restriktionsanalyse mit *XmnI* (Abb. 19). Dieser Restriktionsverdau ergab für die kommerziell erhältlichen Stämme *S. xylosus* (DSM 20266-T), *S. xylosus* (DSM 6179) und *S. xylosus* (MVA D10) das speziestypische Zweifragmentschnittmuster. Für die Spezies *S. succinus* subsp. *casei* und das Isolat 91126 wurde ein identisches Restriktionsschnittmuster wie für die Spezies *S. equorum* erhalten. Die getesteten Stämme der Spezies *S. saprophyticus* zeigten alle das charakteristische Restriktionsmuster dieser Spezies. Es wurden weitere sieben Isolate von Harzerkäse getestet. Sie konnten alle der Spezies *S. saprophyticus* über Restriktionsanalyse zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

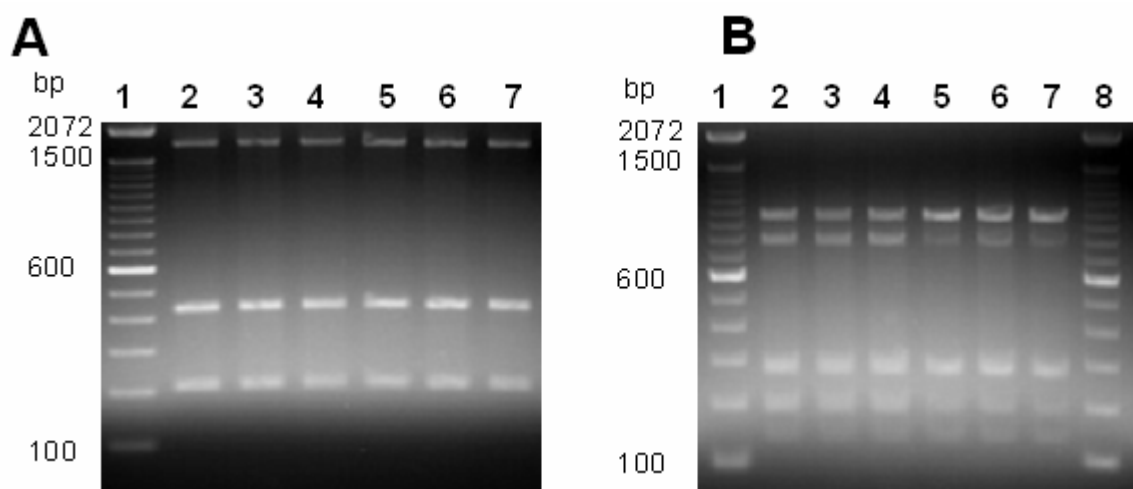


**Abb. 20:** (A): Restriktionsanalyse von *Staphylococcus* spp. mit *HindIII* (1,5% agarose): 11, 100 bp Leiter; 1, *S. warneri* DSM 20316-T; 2, 91097; 3, 91128; 4, 91129; 5, *S. cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260-T; 6, 91097; 7, 91131; 8, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM6718-T; 9, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328-T; 10, 91127. (B): Restriktionsanalyse des PCR-Produkts mit *XmnI* (1,5% agarose): 11, 100 bp Leiter; 1, *S. warneri* DSM 20316-T; 2, 91097; 3, 91128; 4, 91129; 5, *S. cohnii* subsp. *cohnii* DSM 20260-T; 6, 91097; 7, 91131; 8, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* DSM6718-T; 9, *S. hominis* subsp. *hominis* DSM 20328-T; 10, 91127.

Für *S. warneri*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. cohnii* subsp. *urealyticum* und *S. hominis* subsp. *hominis* wurden unterschiedliche Käseisolate getestet. Es wurden Isolate von Rotschmierekäse aus Deutschland und der Schweiz geprüft. Bei der Spezies *S. warneri* wurden neben dem Typstamm *S. warneri* (DSM 20316-T) die vier Isolate, 91109, 91128, 91129 und 91160 mit den Enzymen *HindIII* (Abb. 20A) und *XmnI* (Abb. 20B) getestet. Die Isolate 91128, 91129 und 91160 ergaben ein identisches Schnittmuster mit dem Typstamm *S. warneri* (DSM 20316-T). Das Isolat 91109 zeigt mit beiden Restriktionsenzymen ein abweichendes Schnittmuster welches deckungsgleich mit dem Restriktionsschnittmuster der Spezies *S. equorum* war. Für *S. cohnii* subsp. *cohnii* (DSM 20260-T) wurden die Isolate 91097 und 91131 getestet. Keines der getesteten

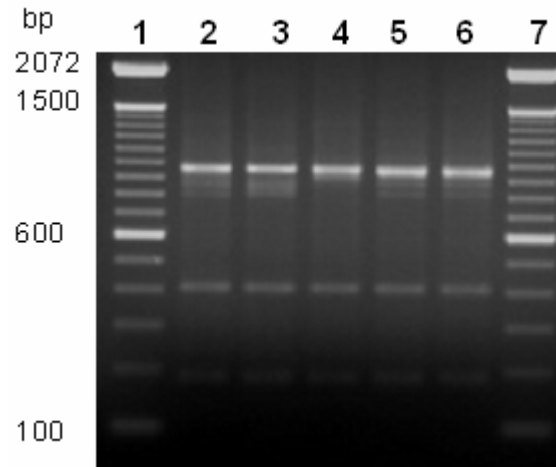
Käseisolate gab ein übereinstimmendes Schnittmuster mit dem Typstamm *S. cohnii* subsp. *cohnii* (DSM 20260-T). Es konnte auch keine Übereinstimmung mit der Subspezies *S. cohnii* subsp. *urealyticum* festgestellt werden. Das Käseisolat 91097 zeigte ein identisches Schnittmuster mit der Spezies *S. saprophyticus* (Abb. 20). Für *S. hominis* wurde der Typstamm *S. hominis* subsp. *hominis* (DSM 20328) und das Isolat 91127 eingesetzt. Das Käseisolat konnte eindeutig der Spezies *S. hominis* zugeordnet werden.

Für die Spezies *S. equorum* wurden die Stämme *S. equorum* (DSM 20674-T), *S. equorum* (DSM 20675) eingesetzt. Die Käseisolate Staph1, Staph2, Staph3 und Staph5, 91131, 91109 konnten durch Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Xmn*I (Abb. 21) der Spezies *S. equorum* zugeordnet werden.



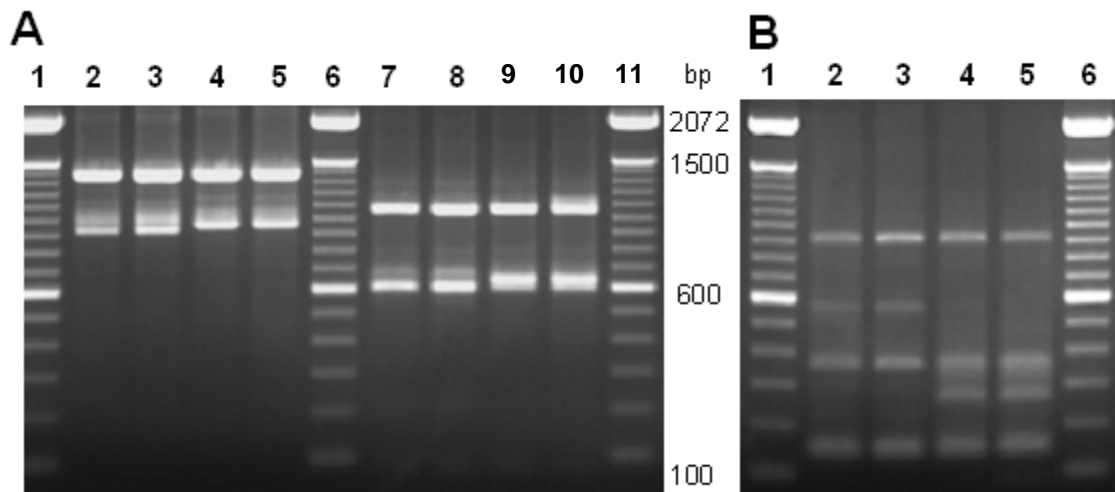
**Abb. 21:** (A): ARDRA von *S. equorum* hydrolysiert mit *Hind*III (1,5% Agarose): 1; 100 bp Leiter; 2, *S. equorum* (DSM 20674-T); 3, *S. equorum* (DSM 20675); 4, Staph1; 5, Staph2, 6, Staph3; 7, Staph5. (B): Restriktionsverdau mit *Xmn*I (1,5% Agarose): 1+8, 100 bp Leiter, 2, *S. equorum* (DSM 20674-T); 3, *S. equorum* (DSM 20675); 4, Staph1; 5, Staph2; 6, Staph3; 7, Staph5.

Bei der koagulasepositiven Spezies *S. aureus* wurden die Vertreter *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 2569-T), *S. aureus* subsp. *aureus* (DSM 799), sowie die Isolate 91106, 91115, 91161 und 91162 eingesetzt. Die Restriktionsanalyse wurde mit den Enzymen *Hind*III und *Xmn*I durchgeführt. Die getesteten Stämme erbrachten untereinander ein übereinstimmendes Restriktionsmuster, welches eine Differenzierung zu den anderen Spezies ermöglichte (Abb. 22).



**Abb. 22:** Restriktionsanalyse von *Staphylococcus aureus* Stämmen mit *XmnI* (1,5% Agarosegel) 1+7, 100 bp Leiter; 2, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 799; 3, *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 2569; 4, Isolat 91106; 5, Isolat 91161; 6, Isolat 91162.

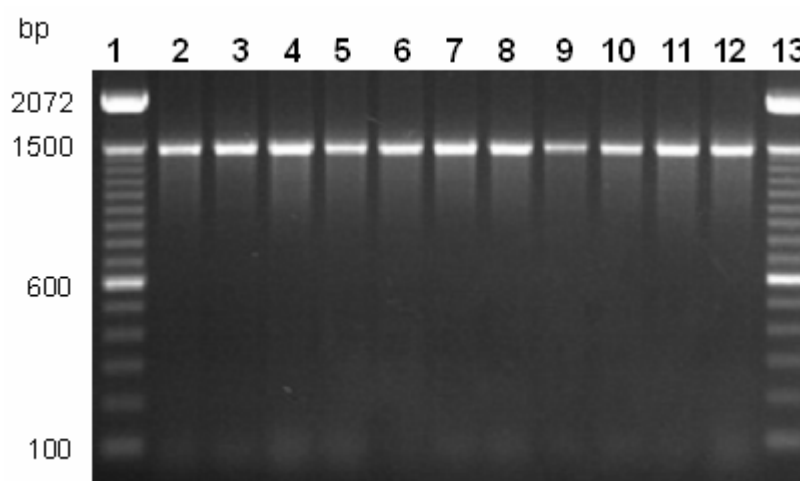
Eine Unterscheidung zwischen den Subspezies *S. sciuri* subsp. *sciuri* (DSM20345-T) und *S. sciuri* subsp. *lentus* (DSM 20352-T) mit den Enzymen *HindIII* und *XmnI* zeigte sich aufgrund des ähnlichen Fragmentmusters als problematisch (Abb. 23). Da diese Methode zu einer schnellen und eindeutigen Erkennung beitragen sollte, erfolgte für diese Spezies ein zusätzlicher Verdau mit dem Enzym *TaqI* (Abb. 23B), welches zwischen beiden Subspezies eindeutig unterschied.



**Abb. 23:** (A): ARDRA von *Staphylococcus* Spezies (1,5% Agarosegel): 2+5, *HindIII* Verdau und von 7-10 *XmnI* Verdau: 1+6+11, 100 bp Leiter; 2, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 3, *S. sciuri* Staph4; 4, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 5, *S. lentus* DSM 6672. (B): Restriktionsverdau mit *TaqI* (1,5% Agarose): 1+6, 100 bp Leiter; 2, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 3, *S. sciuri* Staph4; 4, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 5, *S. lentus* DSM 6672.

### 3.5.3 *Brevibacterium* spp.

Unter Verwendung der Universalprimer (Vanechoutte et al., 1992) war es nicht möglich, mit Ausnahme des Isolates Br8, den vorgesehenen Bereich zu amplifizieren. Für die Differenzierung erfolgte eine Reduzierung des Bereiches auf die 16S rDNA (2.10.5). Zur Differenzierung wurden die Typstämme der Spezies *B. linens*, *B. epidermidis* und *B. casei* eingesetzt. Für die Spezies *B. linens* wurden zwei Stämme von verschiedenen Kulturenherstellern, sowie 15 Käseisolate eingesetzt. Bei den Spezies *B. epidermidis* und *B. casei* wurden je zwei kommerziell erhältliche Stämme mitgetestet. Für die zu testenden Stämme war es möglich, das Zielfragment zu amplifizieren (Abb. 24). Das Amplifikat hatte die erwartete Länge von 1,5 kb.

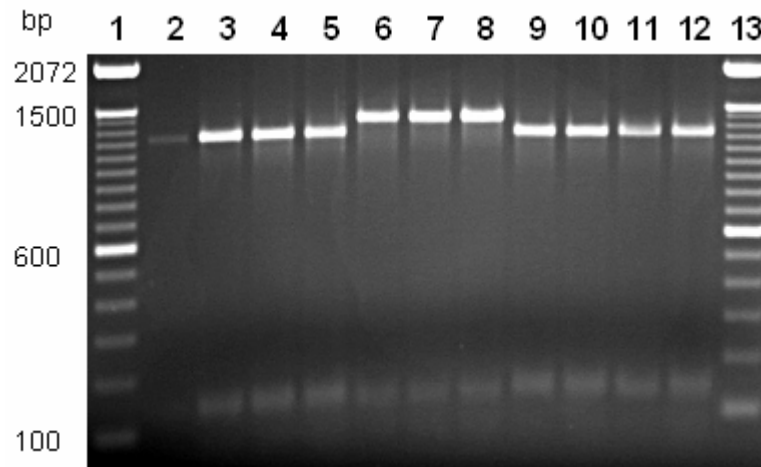


**Abb. 24:** PCR-Produkt von *Brevibacterium* spp. (1% Agarosegel).. 1+13, 100 bp Leiter; 2, *B. linens* DSM 20425-T; 3, *B. linens* SR10D; 4, *B. linens* ATCC 9174; 5, *Br.* 5 95160, 6, *B. epidermidis* DSM20660-T; 7, *B. epidermidis* DSM 20659; 8, *B. epidermidis* DSM 9586; 9, *B. casei* DSM 20657-T; 10, *B. casei* DSM 20658; 11, *B. casei* DSM 9657; 12. BC 220 (95220).

Für die Restriktionsanalyse wurden die Sequenzen der EMBL-Datenbank der zu untersuchenden *Brevibacterium* spp. auf Restriktionsschnittstellen hin untersucht, mit denen eine möglichst umfangreiche Differenzierung durchgeführt werden konnte. Die *in silico*-Kalkulation ermöglichte eine Überprüfung der Restriktionsschnittmuster für die eingesetzten Spezies. Zusätzlich zu den über Sequenzanalyse bestimmten Enzymen wurde das Enzym *AccI* getestet. Dieses Enzym hatte keine Erkennungssequenz in dem amplifizierten Bereich.

Eine Differenzierung der Spezies *B. epidermidis* von *B. linens* und *B. casei* war mit dem Restriktionsenzym *AvaI* (Abb. 25) möglich. Für die Spezies *B. linens* und *B. casei* wurde ein übereinstimmendes Fragmentmuster erhalten, welches keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Spezies zuließ.

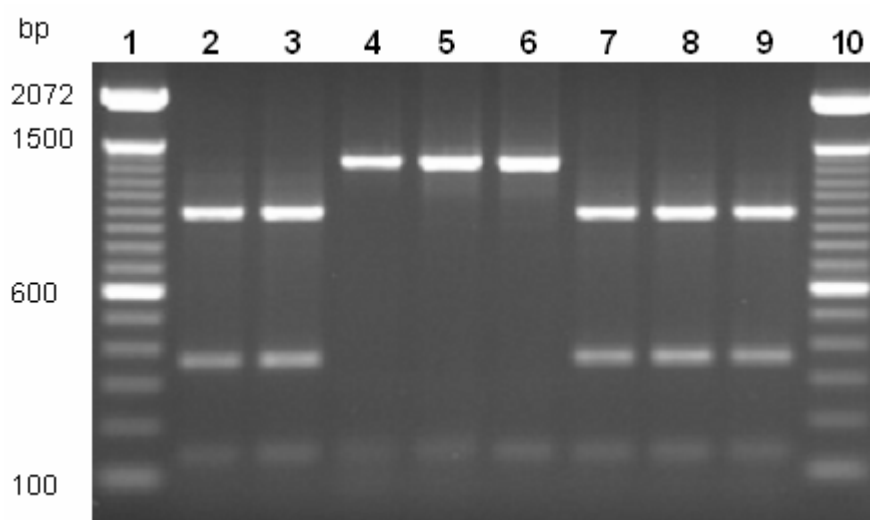




**Abb. 25:** ARDRA für *Brevibacterium* spp. mit *Ava*I (1,5% Agarosegel): 1+13, 100 bp Leiter; 2, *B. linens* DSM 20425-T; 3, *B. linens* SR310D; 4, *B. linens* ATCC 9174; 5, *Br.5* (95160); 6, *B. epidermidis* DSM20660-T; 7, *B. epidermidis* DSM 20659; 8, *B. epidermidis* DSM 9586; 9, *B. casei* DSM 20657-T; 10, *B. casei* DSM 20658; 11, *B. casei* DSM 9657; 12, BC220 (95220).

Die Käseisolate welche der Spezies *B. linens* zugeordnet waren, wurden mit *Ava*I überprüft. Alle getesteten Stämme, mit Ausnahme von Br8, ergaben ein identisches Schnittmuster zur Spezies *B. linens* und *B. casei*. Das Isolat Br8 zeigte ein eigenes Restriktionsschnittmuster, das in keiner Übereinstimmung mit einem der getesteten Spezies stand.

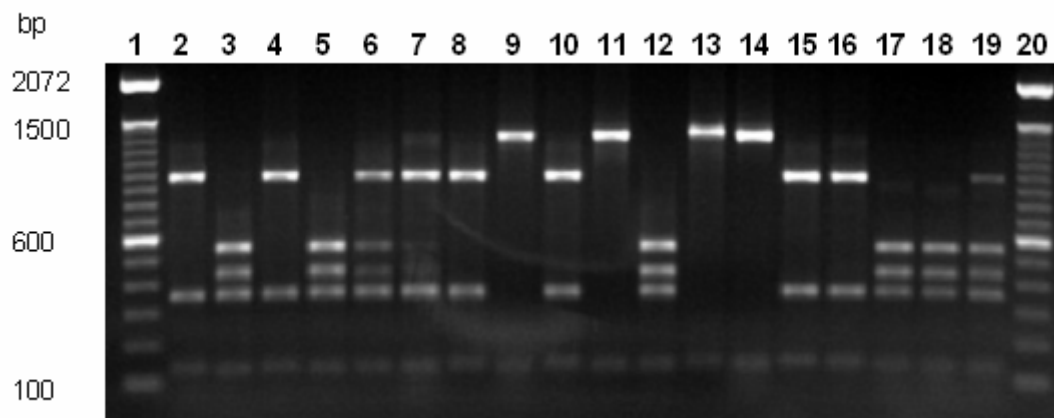
Eine Differenzierung der Spezies *B. casei* von *B. linens* und *B. epidermidis* war mit den Enzymen *Taq*I, *Pvu*I und *Xmn*I (Abb. 26) möglich (*Taq*I, *Pvu*I Daten nicht gezeigt).



**Abb. 26:** Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Xmn*I (1,5% Agarosegel). 1+10, 100 bp Leiter; 2, *Brevibacterium linens* DSM 20425-T; 3, Br.18 (95168); 4, *B. casei* DSM 20657-T; 5, *B. casei* DSM 20658, 6, *B. casei* DSM 9657, 7, *B. epidermidis* DSM20660-T, 8, *B. epidermidis* DSM 20659, 9, *B. epidermidis* DSM 9586.

Die Überprüfung der Restriktionsschnittstellen für *XmnI*, mit den Sequenzdaten der Typstämmen *B. linens* (DSM 20425-T), *B. epidermidis* (DSM 20659-T) und *B. casei* (DSM 20657-T) zeigten, dass für alle eine Erkennungssequenz in Position 1330 vorlag. Für die Stämme *B. linens* DSM 20425-T und *B. epidermidis* DSM 20659-T war eine zusätzliche Erkennungssequenz bei Position 970. Es konnte für die eingesetzten Typstämmen die erwarteten Restriktionsschnittstellen nachgewiesen werden. Für die Typstämmen *B. linens* (DSM 20425-T) und *B. epidermidis* (DSM 20659-T) ergab sich daraus ein übereinstimmendes Fragmentmuster. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse stand mit den kalkulierten Fragmenten aus der Sequenzanalyse in Übereinstimmung.

Eine Differenzierung zwischen den Spezies *B. linens* und *B. casei* konnte mit dem Enzym *XmnI* ermöglicht werden. Zur Überprüfung wurden mehrere Stämme der Spezies *B. linens* mit *XmnI* verdaut (Abb. 27).

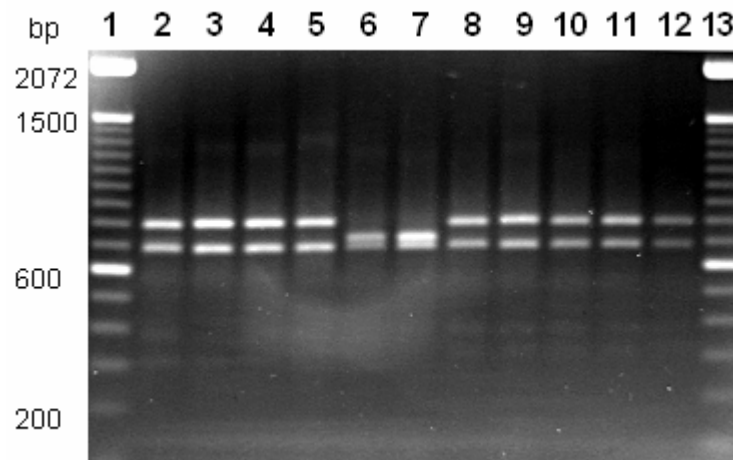


**Abb. 27:** ARDRA *B. linens* verdaut mit *XmnI* (1,5% Agarosegel): 1+20, 100 bp Leiter; 2, *B. linens* DSM 20425-T; 3, Br2 (95024); 4, Br3 (95025); 5, Br4 (95159); 6, Br5 (95160); 7, Br6 (95037); 8, Br7 (95161); 9, Br8 (95162); 10, Br9 (95163); 11, Br13 (95165); 12, Br14 (95016); 13, Br15 (95166); 14, Br16 (95167); 15, Br17 (95020); 16, Br18 (95168); 17, *B. linens* Sr3 10D (95192); 18, *B. linens* ATCC 9174; 19, BC220 (95220).

Mit *XmnI* ergaben die *B. linens* Isolate Br3, Br6, Br7, Br9, Br17 und Br18 ein identisches Schnittmuster mit dem Typstamm *B. linens* DSM 20425. Die Isolate Br2, Br4, Br14, Br19 (SR3 10D) und *B. linens* ATCC 9174 ergaben ein Fragmentmuster, welches mit keinem der getesteten Spezies deckungsgleich war. Die genannten Isolate hatten eine zusätzliche Erkennungssequenz für das Enzym *XmnI* in dem amplifizierten Bereich. Eine Übereinstimmung mit dem Restriktionsschnittmuster von *B. casei* DSM 20657-T zeigten die Isolate Br8, Br13 und Br15. Ein minimal abweichendes Fragmentmuster zeigte Br16. Diesen Isolaten fehlte, wie auch *B. casei*, um Position 970 der 16S rDNA, die Erkennungssequenz für das Enzym *XmnI*. Ein individuelles Schnittmuster wurde für die Isolate Br5, 95220 und 95229 erhalten. Bei der Restriktionsanalyse mit *TaqI* erbrachten

die Käseisolate BL19, BL21 und Br5 ein identisches Fragmentmuster zum Typstamm *B. casei* DSM 20657-T, welches in keiner Übereinstimmung mit dem Typstamm der Spezies *B. linens* stand. Eine Differenzierung der Isolate der Spezies *B. linens* zu *B. casei* DSM 20657-T war durch einen Verdau mit *AvaI* möglich.

Bei dem Verdau mit *AvaII* (Daten nicht gezeigt) zeigte der Stamm *B. casei* DSM 9657 ein abweichendes Schnittmuster zu den Typstämmen *B. casei* DSM 20657-T und dem Stamm *B. casei* DSM 20658. Weitere Besonderheiten traten bei der Restriktionsanalyse mit *DraIII* und *PstI* auf. Mit *DraIII* war, nach der Sequenzüberprüfung der Typstämmen, ein einheitliches Schnittmuster für alle getesteten Typstämmen zu erwarten. Dieses konnte für die getesteten Typstämmen *B. linens* und *B. epidermidis* bestätigt werden. Der Typstamm *B. casei* sowie der Stamm *B. casei* DSM 20658 ergaben ein abweichendes Schnittmuster, welche jedoch untereinander identisch waren (Abb. 28).



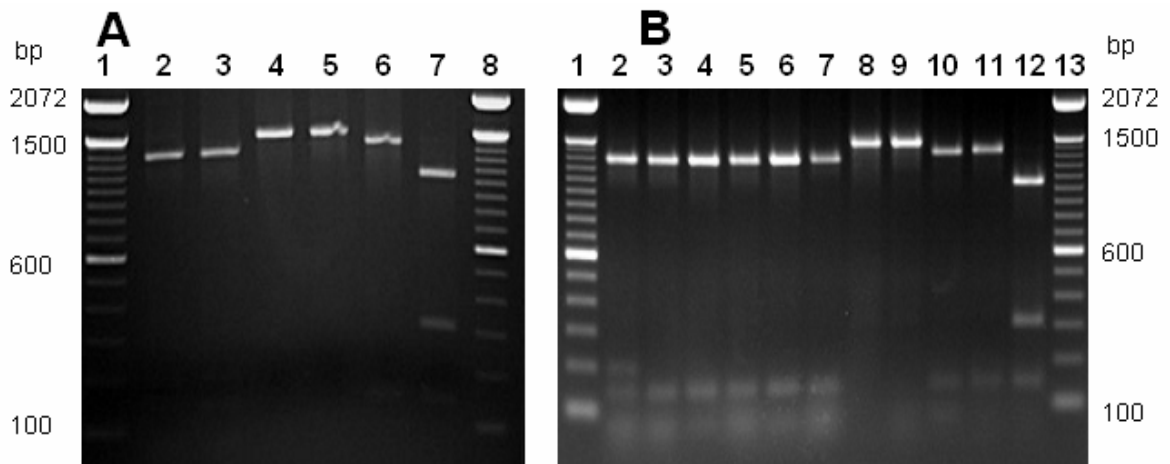
**Abb. 28:** ARDRA für *Brevibacterium* spp. mit *DraIII* (1,5% Agarosegel): 1+13, 100 bp Leiter; 2, *B. linens* DSM 20425-T; 3, *B. linens* Sr3 10D BL. 19; 4, *B. linens* ATCC 9174; 5, Br.5; 6, *B. casei* DSM 20657-T; 7, *B. casei* DSM 20658; 8, *B. casei* DSM 9657; 9, BC220 (95220); 10, *B. epidermidis* DSM20660-T; 11, *B. epidermidis* DSM 20659; 12, *B. epidermidis* DSM 9586.

### 3.5.4 *Corynebacterium* spp.

Für die Differenzierung der Gattung *Corynebacterium* wurde der Bereich der 16S rDNA herangezogen. Es wurden die Typstämmen von sechs Spezies der Gattung *Corynebacterium* eingesetzt, zusätzlich wurden 16 Käseisolate getestet. Nach der PCR wurde für alle getesteten Stämme das erwartete Amplifikat mit einer Länge von 1,5 kb erhalten.

Vor Einsatz der Restriktionsenzyme erfolgte eine *in silico*-Kalkulation der Sequenzen der zutestenden Typstämmen in der EMBL-Datenbank, um die zu erwartenden Restriktionsfragmente abzuschätzen. Für die Enzyme *BsmI* und *DraIII* lag keine

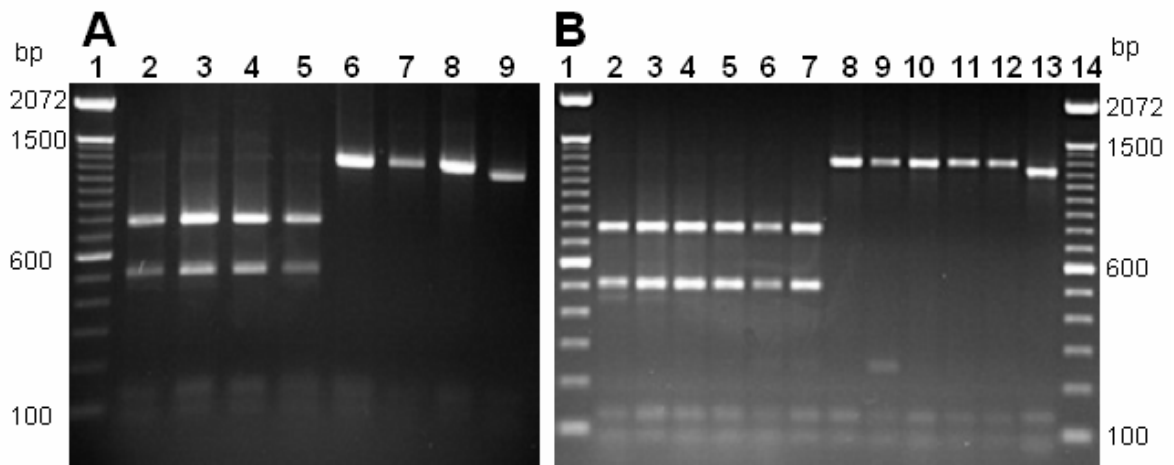
Erkennungssequenz im amplifizierten Bereich vor. Ein gattungsspezifisches Restriktionsschnittmuster konnte mit den Enzymen *AccI* und *EcoRI* erhalten werden. Diese Ergebnisse standen mit den aus den Sequenzen abgeleiteten Ergebnissen in Übereinstimmung. Die Restriktionsanalyse mit *HindIII* (Abb. 29) ermöglichte die Differenzierung verschiedener Spezies.



**Abb. 29:** ARDRA von *Corynebacterium* spp. mit *HindIII* (1,5% Agarosegel): Typstämme (A): 1+8, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, *C. casei* DPC 5298-T; 4, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 5, *C. mooreparkense* DPC 5310-T, 6, *C. flavescens* DSM 20296-T; 7, *C. kutscheri* DSM 20755-T. Getestete Käseisolate (B): 1+13, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, CA 8; 4, CA 18; 5, 95211; 6, 95208; 7, 95215; 8, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 9, 95210; 10, *C. flavescens* DSM 20296-T; 11, 95212; 12, *C. kutscheri* DSM 20755-T.

Es wurden für die Typstämme alle vorkalkulierten Schnittstellen vorgefunden. Für *C. ammoniagenes* wurden Fragmente mit der Länge von 194 bp und 1300 bp erwartet, für *C. casei* DPC 5298-T 155bp, 55bp und 1300bp. Die Differenzierung zwischen *C. ammoniagenes* und *C. casei* erfolgte durch das Vorkommen des 194 bp Fragmentes für *C. ammoniagenes*. Die Stämme *C. variabile* und *C. mooreparkense* sollten keine Schnittstelle in dem amplifizierten Bereich für *HindIII* haben. Für *C. flavescens* wurden Fragmente von 150 bp und 1350 bp erwartet, bei *C. kutscheri* DSM 20755-T von 110 bp, 340 bp und 1050 bp.

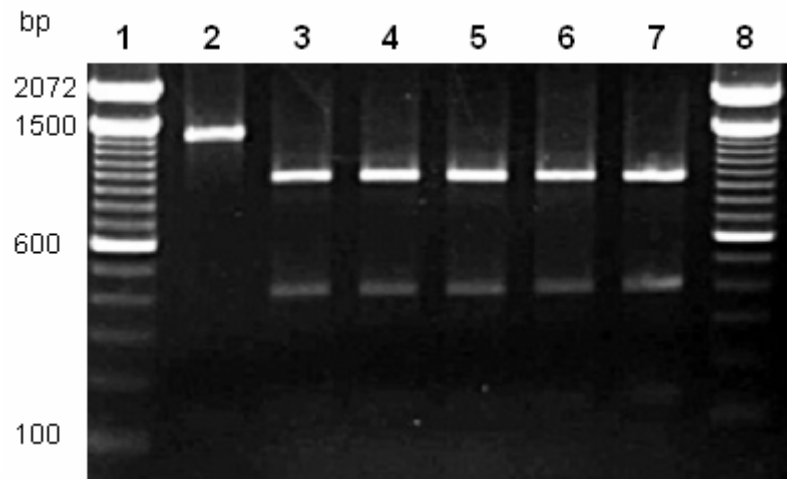
Eine Differenzierung der Spezies *C. ammoniagenes* DSM 20306-T und *C. casei* DPC 5298-T von den restlichen Spezies war mit den Enzymen *BsaHI* und *AvaI* (Abb. 30) zu erreichen.



**Abb. 30:** ARDRA von *Corynebacterium* spp. mit *AvaI* (1,5% Agarosegel): Typstämme (A): 1, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, CA3; 4, CA 18; 5, *C. casei* DPC 5298-T; 6, *C. mooreparkense* DPC 5310-T; 7, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 8, *C. flavescens* DSM 20296-T; 9, *C. kutscheri* DSM 20755-T. Getestete Käseisolate (B): 1+14, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, CA3; 4, CA8; 5, CA18; 6, 95211; 7, 95208; 8, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 9, 95216; 10, 95210; 11, *C. flavescens* DSM 20296-T; 12, 95212; 13, *C. kutscheri* DSM 20755-T.

Durch eine Hydrolyse mit *AvaI* erbrachten die Spezies *C. ammoniagenes* und *C. casei* ein identisches 3-Fragmente-Schnittmuster. Bei den Spezies *C. variabile*, *C. mooreparkense* und *C. flavescens* wurde das Ausgangsfragment nur um einige Basen gekürzt. Eine Unterscheidung zwischen diesen drei Spezies war nicht möglich. Die Spezies *C. kutscheri* zeigte ein abweichendes Restriktionsmuster und ließ sich von den anderen getesteten Spezies differenzieren. Mit *AvaI* war eine Zuordnung der Isolate CA3 (95149), CA8 (95151), CA18 (95157), 95211, 95214, 95218, 95209, 95213, 95215, 95208, 95217 und 95206 zu den Spezies *C. ammoniagenes* oder *C. casei* möglich. Die Isolate 95210, 95216, 95219 und 95212 konnte mit *AvaI* den Spezies *C. variabile*, *C. mooreparkense* oder *C. flavescens* zugeordnet werden.

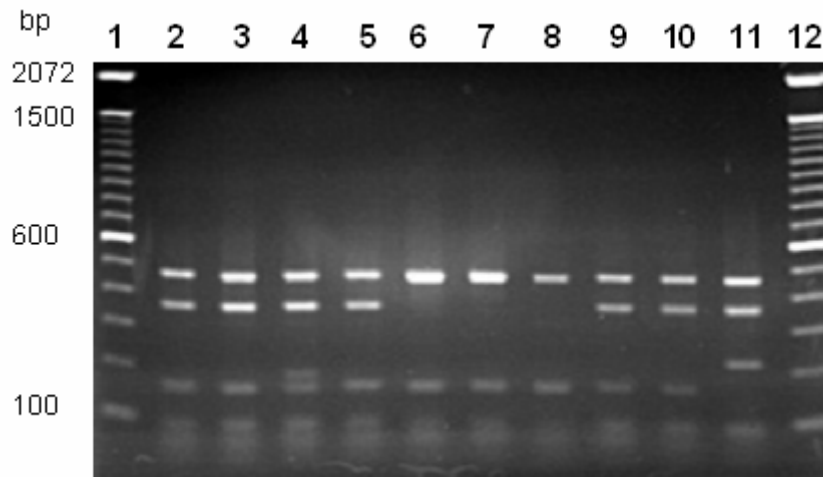
Eine Unterscheidung zwischen den Spezies *C. ammoniagenes* und *C. casei* wurde durch die Restriktionsanalyse mit *XmnI* (Abb. 31) erreicht.



**Abb. 31:** 1,5% Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsansatzes von *Corynebacterium* spp. mit *XmnI*: 1+8, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, *C. casei* DPC 5298-T; 4, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 5, *C. mooreparkense* DPC 5310-T; 6, *C. flavescens* DSM 20296-T; 7, *C. kutscheri* DSM 20755-T.

Die *in silico*-Kalkulation zeigte, dass der Typstamm der Spezies *C. ammoniagenes* in dem amplifizierten Bereich keine Erkennungssequenz für das Enzym *XmnI* hat. Für die anderen Typstämme wurde ein einheitliches Schnittmuster vorhergesagt. Die erwarteten Ergebnisse wurden erhalten. Durch diese Differenzierung war es möglich, die getesteten Käseisolate der Spezies *C. casei* zuzuordnen (Daten nicht gezeigt).

Durch Restriktionsanalyse mit *HaeIII* (Abb. 32) war eine Abgrenzung der Spezies *C. variabile* und *C. mooreparkense* von den Spezies *C. ammoniagenes*, *C. casei* und *C. flavescens* möglich.



**Abb. 32:** ARDRA von *Corynebacterium* spp. mit *HaeIII* (1,5% Agarosegel): 1+12, 100 bp Leiter; 2, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 3, CA3; 4, 95209; 5, 95217; 6, *C. variabile*-T DSM 20132-T; 7, 955210; 8, 95216; 9, *C. flavescens* DSM 20296-T; 10, 95212; 11, *C. kutscheri* DSM 20755-T.

Die erwähnten Speziesgruppen zeigten untereinander ein identisches Schnittmuster was keine weitere Differenzierung zuließ. Die Spezies *C. kutscheri* zeigte ein speziestypisches Fragmentmuster welches eine Abgrenzung ermöglichte. Die erhaltenden Fragmentmuster der Restriktionsanalyse stimmten mit den kalkulierten Fragmenten überein. Für die Käseisolate 95210, 95216 und 95219 konnte mit *HaeIII* eine Zuordnung zu den Spezies *C. variabile* bzw. *C. mooreparkense* erfolgen. Das Käseisolat 95212 erbrachte mit den Enzymen *AvaI* und *HaeIII* ein übereinstimmendes Restriktionsverhalten mit der Spezies *C. flavescens*. Diese Ergebnisse wurden über partielle Sequenzierung bestätigt. Es war nicht möglich eine Trennung zwischen den Spezies *C. variabile* und *C. mooreparkense* zu erhalten.

### 3.6 Partielle Sequenzierung

Bei den Vorversuchen zu den unter 3.5 beschriebenen Gattungs-, und Speziesdifferenzierungen konnte für einige Stämme eine abweichende Länge des PCR-Produktes sowie ein anderes Restriktionsverhalten gegenüber den zugehörigen Typstämmen der Spezies gefunden werden. Eine Überprüfung dieser Stämme erfolgte durch partielle Sequenzierung der 16S rDNA (2.11).

Als Sequenzierungsprimer wurde der Universalprimer 68 (2.11.2) für die Vertreter der Gattungen *Arthrobacter*, *Microbacterium* und *Staphylococcus* eingesetzt. Zur Überprüfung der Sequenzierungsbedingungen wurden die Typstämmen der Spezies *A. nicotianae* und *S. succinus* subsp. *casei* mit sequenziert und mit der Datenbank verglichen. Es wurde eine sehr gute Übereinstimmung erhalten (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 17:** Partielle Sequenzierung der 16S rDNA

Isolate	Partielle Sequenzierung der 16S rDNA:		Vergleich Sequenzierung NIZO
	Phylogenetische Beziehung	in %	
SBI 627602	<i>A. nicotianae</i>	94% (578 bp)	<i>A. rhombi</i>
CA 12	<i>M. gubbeenense</i>	98% (407 bp)	<i>M. gubbeenense</i>
CA 13	<i>A. nicotianae</i>	94% (391 bp)	<i>A. nicotianae</i>
CA 14	<i>A. nicotianae</i>	96% (566 bp)	<i>A. nicotianae</i>
CA 15	<i>M. gubbeenense</i>	92% (536 bp)	<i>M. gubbeenense</i>
91126	<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>	95% (368 bp)	

Die Käseisolate CA12 und CA15 waren ursprünglich durch partielle Sequenzierung (NIZO) der Spezies *A. nicotianae* zugeordnet. Durch partielle Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass diese Isolate zur Spezies *M. gubbeenense* zuzuordnen waren (Tab. 17). Für die Käseisolate CA13 und CA14 wurde eine gute Sequenzübereinstimmung mit dem Typstamm der Spezies *A. nicotianae* erhalten. Bei dem Isolat SBI 627602 handelte es sich um einen vom Kulturenhersteller bezogenen *A. globiformis* Stamm. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass dieser Stamm zur Spezies *A. nicotianae* zu zählen war. Dieses Ergebnis konnte von NIZO nicht bestätigt werden. Das Isolat 91126 wurde über ID32 Staph (BioMérieux) mit einem zweifelhaften Profil der Spezies *S. xylosus* / *S. equorum* zugeordnet. Der Sequenzvergleich von SBI 627602 erbrachte eine Übereinstimmung zum Typstamm der Spezies *S. succinus* subsp. *casei*.



Bei den getesteten Stämmen der Spezies *B. linens* zeigte sich bei der Restriktionsanalyse mit *XmnI* (Abb. 27) eine Variabilität im Fragmentmuster, welche in keiner Übereinstimmung mit dem des Typstammes stand. Die Stämme, die ein abweichendes Schnittmuster zeigten, wurden über partielle Sequenzierung im Bereich der 16S rDNA überprüft (Tab. 18). Sequenziert wurde der Bereich um Position 278-706 als Doppelstrang. In diesem Bereich traten für die Isolate Br2, Br4, Br5, Br6, Br14, Br19, Br21 und BC220 eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für *XmnI* auf. Als Einzelstrang wurde die fehlende Restriktionsstelle um Position 911 bei den Stämmen Br8, Br1, Br15 und Br16 sequenziert.

**Tab. 18:** Partiiell sequenzierte Bereiche der 16S rDNA der Spezies *B. linens*

Isolate	Primer	Partielle Sequenzierung der 16S rDNA:	
		Phylogenetische Beziehung	in %
Br2	UP-278	<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	97% (572bp)
		<i>B. linens</i> NCDO739 (X76566)	96% (567 bp)
	UP-911	<i>B. linens</i> NCDO739 (X76566)	99% (522bp)
		<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	99% (522 bp)
	Rev- 706	<i>B. linens</i> WS 2910 (AY017081)	98% (507bp)
		<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	97% (516 bp)
Br5	UP-278	<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	98% (870 bp)
		<i>B. linens</i> NCDO739 (X76566)	97% (866 bp)
	UP-911	<i>B. linens</i> NCDO739 (X76566)	99% (528 bp)
		<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	99% (528 bp)
	Rev-706	<i>B. linens</i> NCDO739 (X76566)	97% (542bp)
		<i>B. linens</i> SB 1 (AJ315491)	96% (535 bp)
Br8	UP-278	<i>Arthrobacter casei</i> SB 30 (AJ535637)	99% (519bp)
		<i>Arthrobacter casei</i> SB 28 (AJ535636)	99% (519bp)
	UP-911	<i>Arthrobacter casei</i> SB 30 (AJ535637)	98% (480bp)
		<i>Arthrobacter casei</i> SB 28 (AJ535636)	98% (480bp)
	Rev-706	<i>Arthrobacter casei</i> SB 30 (AJ535637)	97% (552bp)
		<i>Arthrobacter casei</i> SB 28 (AJ535636)	97% (552bp)

Die sequenzierten Bereiche der Stämme Br2 und Br5 standen in Übereinstimmung mit den Stämmen SB1 und NCDO739 der Spezies *B. linens*. Mit dem Typstamm *B. linens* DSM 20425 konnten diese Bereiche nicht in Übereinstimmung gebracht werden. Für den

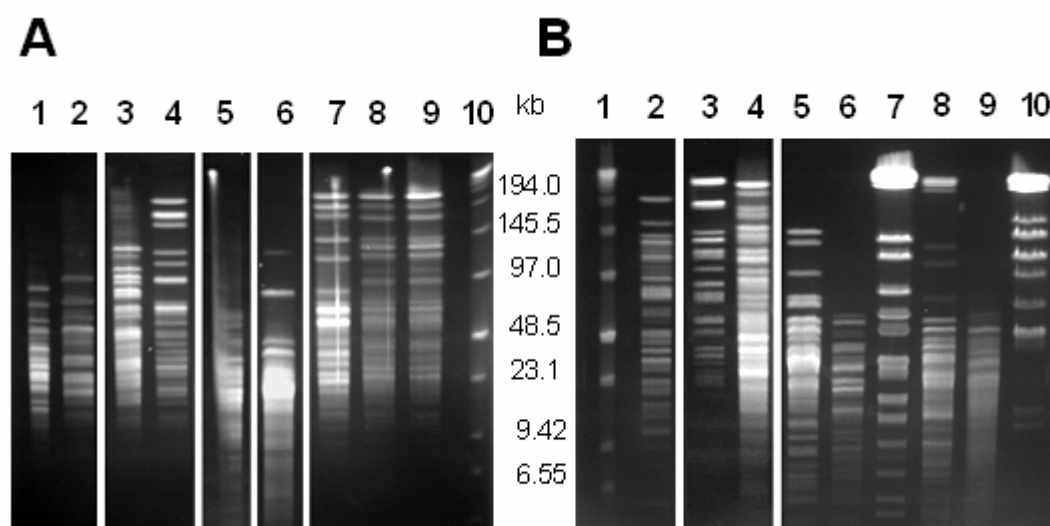
Stamm Br8 ergab sich über den Sequenzvergleich eine Zugehörigkeit zur Spezies *Arthrobacter casei*.

### 3.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Zum Nachweis des Wachstums der definierten Oberflächenstarterkulturen auf Versuchskäsen mussten die eingesetzten Stämme im Reifungsverlauf eindeutig identifiziert werden können. Die gewählte Methode zur Stammdifferenzierung war PFGE. Bei der konventionellen Gelelektrophorese können hochmolekulare Nucleinsäuren nicht mehr aufgetrennt werden. Um die DNA in relativ wenig große Fragmente zu schneiden, werden Restriktionsendonucleasen eingesetzt die selten schneiden (sog. „rare cutters“). Ob ein Enzym als „rare cutter“ geeignet ist, lässt sich anhand des GC-Gehaltes der jeweiligen DNA abschätzen.

#### 3.7.1 Actinomycetales

Für die Gattungen *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* und *Brevibacterium* wurden zur Genotypisierung der Stämme die sieben Enzyme *NotI*, *AscI*, *DraIII*, *EcoRV*, *SpeI*, *SmaI* und *XbaI* eingesetzt. Mit den getesteten Enzymen *AscI* und *SpeI* konnte für alle getesteten Stämme eine gute Differenzierung erhalten werden.

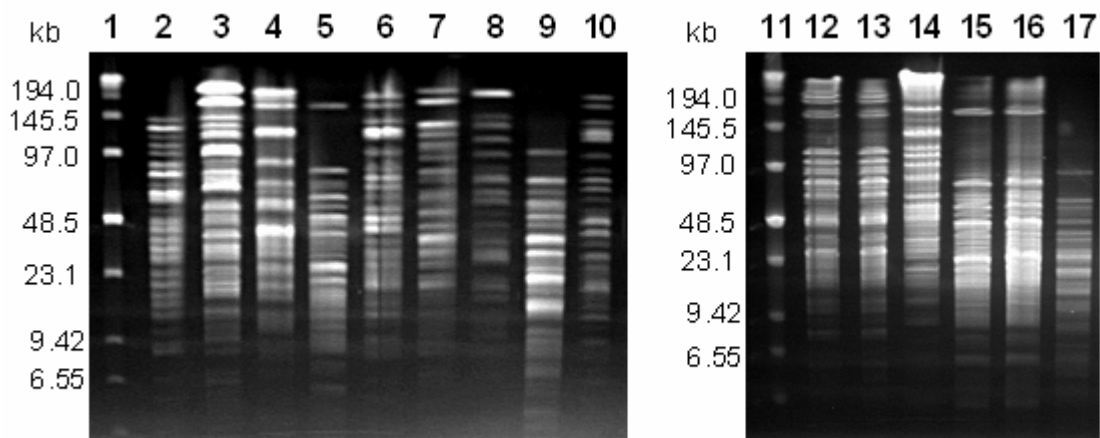


**Abb. 33:** PFGE-Muster der genomischen DNA von *Arthrobacter* spp. und *Microbacterium* spp. Stämmen (1,1% Agarosegel). **(A)** *AscI*: 1, *A. citreus* DSM 20133-T; 2, *A. sulfureus* DSM 20167-T; 3, *A. nicotianae* DSM 20123-T; 4, *A. nicotianae* MGE 10D; 5, *A. globiformis* DSM 20124-T; 6, *M. gubbeenense* CA12; 7, *A. nicotianae* CA13; 8, *A. nicotianae* CA14; 9, *A. nicotianae* CA14; 10, low range PFG-marker. **(B)** *SpeI*: 1, low range PFG-marker; 2, *A. sulfureus* DSM 20167-T; 3, *A. citreus* DSM 20133-T; 4, *A. globiformis* DSM 20124-T; 5, *A. nicotianae* DSM 20123-T; 6, *A. nicotianae* MGE 10D; 7, *M. gubbeenense* CA12; 8, *A. nicotianae* CA13; 9, *A. nicotianae* CA14; 10, *M. gubbeenense* CA15.

Die Käseisolate CA13, CA14, sowie der kommerzielle Stamm MGE 10D zeigten bei dem Restriktionsverdau mit *AscI* ein ähnliches Fragmentmuster untereinander, welches sich von dem des Typstammes *A. nicotianae* unterschied (Abb. 33A). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte der Verdau für CA14 aus zwei separat angezogenen Kulturen. Es zeigte sich, dass das Ergebnis reproduzierbar war. Der Stamm erbrachte ein übereinstimmendes Fragmentmuster. Die Stämme *A. citreus* und *A. sulfureus* ergaben mit diesem Enzym ein ähnliches, aber zu unterscheidendes Restriktionsmuster. Das *M. gubbeenense* Isolat CA12 zeigte ein deutlich zu unterscheidendes Restriktionsmuster zu den getesteten *A. nicotianae* Stämmen. Eine Ähnlichkeit im Muster konnte mit dem Stamm *A. globiformis* gezeigt werden. Mit *SpeI* (Abb. 33B) ergaben die Stämme *A. sulfureus* und *A. citreus* ein ähnliches Fragmentmuster. Deutlicher zu unterscheidende Restriktionsmuster wurden für die unterschiedlichen *A. nicotianae* Stämme erhalten. Die *M. gubbeenense* Stämme CA12 und CA15 ließen sich eindeutig von allen anderen getesteten Stämmen unterscheiden.

Das Enzym *XbaI* erbrachte bei den Stämmen der Gattung *Microbacterium* eine gute Unterscheidungsmöglichkeit, welche eine bessere Differenzierung untereinander und zu den anderen Gattungen ermöglichte.

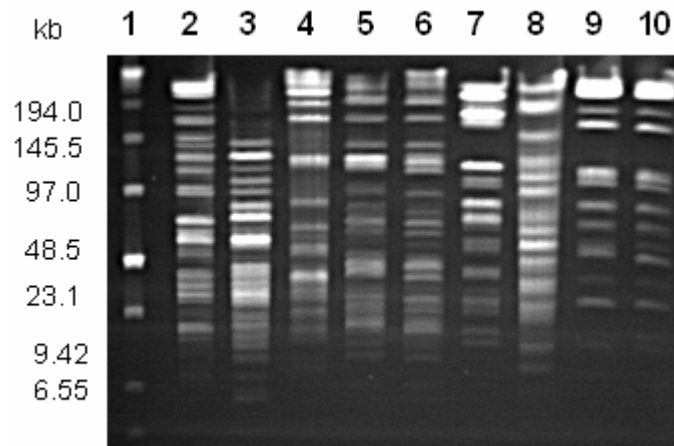
Die Stämme der Spezies *B. linens* ergaben mit *AscI* stammtypische Restriktionsmuster, welche eine Identifizierung der einzelnen Stämme ermöglichte.



**Abb. 34:** PFGE-Fragmentmuster von *Brevibacterium* spp. mit *AscI*: 1, 11, low range PFG-marker; 2, *B. linens* DSM 20657-T; 3, *B. linens* ES; 4, *B. linens* ATCC 9174; 5, BC220; 6, Br3; 7, Br4; 8, Br5; 9, Br8; 10, Br18; 12, *B. epidermidis* DSM 20660-T; 13, *B. epidermidis* DSM 20659; 14, *B. epidermidis* DSM 9586; 15, *B. casei* DSM 20657-T; 16, *B. casei* DSM 20658; 17, *B. casei* DSM 9657.

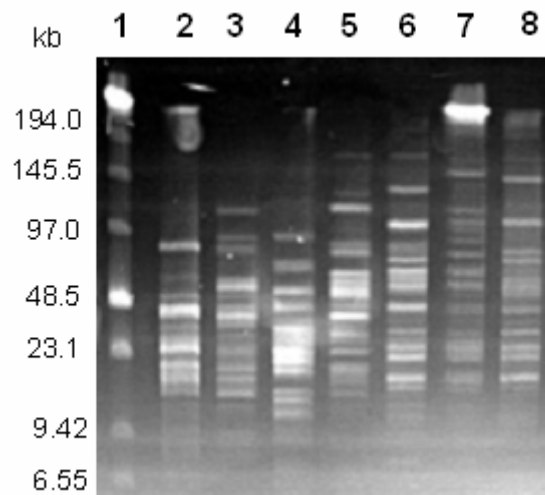
Bei den kommerziell erhältlichen *B. epidermidis* Stämmen DSM 20660-T und DSM 20659 ergab sich ein identisches stammspezifisches Restriktionsmuster (Abb. 34). Der Stamm *B. epidermidis* DSM 9586 erbrachte ein charakteristisches Fragmentmuster

welches eine eindeutige Identifizierung ermöglichte. Auch die Stämme *B. casei* DSM 20657-T und *B. casei* DSM 20658 zeigten ein identisches Fragmentmuster. Für den Stamm *B. epidermidis* DSM 9586 ließ sich ein eindeutig zuzuordnendes Fragmentmuster erhalten.



**Abb. 35:** PFGE-Fragmentmuster der gesamten genomischen DNA von *B. linens* Stämmen (1,1% Agarosegel): 1, low range PFG-marker; *AscI*: 2, *B. linens* Sr3 10D; 3, *B. linens* DSM 20657-T; 4, *B. linens* ATCC 9174; 5, Br3; 6, Br.18; *SpeI*: 7, *B. linens* DSM 20657-T; 8, *B. linens* ATCC 9174; 9, Br3; 10, Br18.

Mit dem Enzym *AscI* ergab der Typstamm *B. linens* ein stark abweichendes Fragmentmuster zu den anderen getesteten *B. linens* Stämmen. Die Stämme Br3 und Br18 zeigten mit *AscI* eine hohe Übereinstimmung im Fragmentmuster, nur im Bereich zwischen 97,0 und 145,5 kb zeigten sich Unterschiede. Alle anderen Bereiche standen in Übereinstimmung. Zur Überprüfung wurden die Stämme mit dem Enzym *SpeI* verdaut. Mit diesem Enzym trat eine Ähnlichkeit im Fragmentmuster zwischen *B. linens* DSM 20657-T und den Isolaten Br3 und Br18 auf. Die Stämme Br3 und Br18 zeigten mit diesem Enzym in allen Bereichen ein übereinstimmendes Fragmentmuster (Abb. 35).



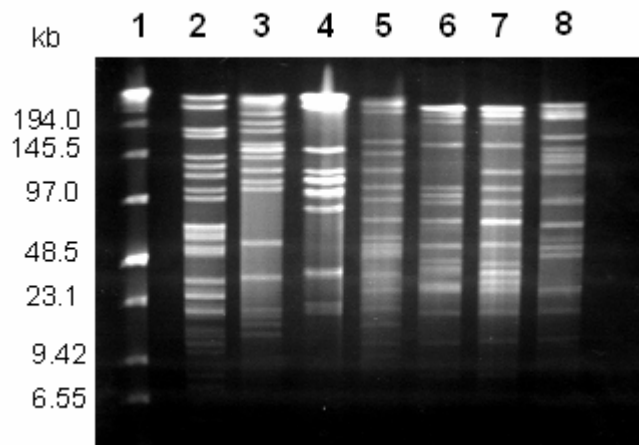
**Abb. 36:** 1,1% Agarosegel von *Corynebacterium* spp. mit *AscI*: 1, low range PFG-marker; 2, *C. variabile* MD 025.0165; 3, *C. variabile* DSM 20132-T; 4, *C. flavescens* DSM 20296-T; 5, *C. ammoniagenes* DSM 20306-T; 6, CA3; 7, CA8; 8, CA18.

Wie bei den anderen Gattungen war auch bei den Corynebakterien eine Stammdifferenzierung mit dem Enzym *AscI* möglich (Abb. 36). Es konnte jeder Stamm einzeln angesprochen werden, ohne dass eine große Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Stämmen auftrat.

### 3.7.2 Staphylokokken

Zur Genotypisierung der *Staphylococcus* spp. wurden die Enzyme *SmaI*, *SacI*, *AscI* und *XbaI* eingesetzt. Mit dem „rare cutter“ *AscI* wurde für alle getesteten Stämme der Gattung *Staphylococcus* spp. ein Restriktionsmuster der Gesamt-Chromosomalen DNA erhalten, welches nur zwei bis fünf Fragmente aufwies und eine Typisierung der Stämme nicht ermöglichte.

Das Restriktionsenzym *SmaI* zeigte für alle getesteten Stämme ein gutes Schnittverhalten. Es konnte eine sehr gute Trennung zwischen den einzelnen Stämmen erzielt werden.

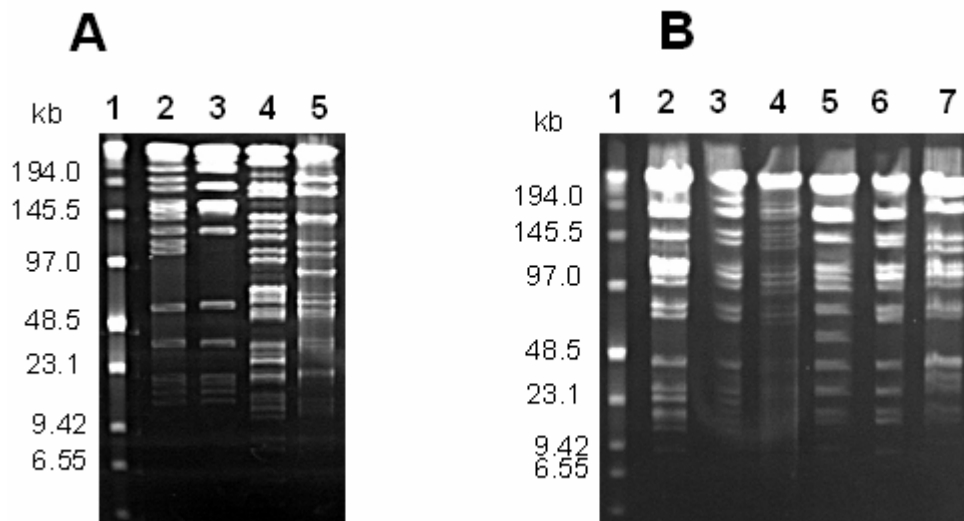


**Abb. 37:** Genotypisierung von *Staphylococcus* spp. mit *Sma*I (1,1% Agarosegel): 1, low range PFG-marker; 2, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 3, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 4, *S. xylosus* DSM 20266-T; 5, *S. kloosii* DSM 20676-T; 6, *S. equorum* DSM 20674-T; 7, *S. equorum* DSM 20675; 8, *S. equorum* Staph 3.

Die getesteten Typstämme der unterschiedlichen Spezies zeigten mit *Sma*I ein sehr gut zu unterscheidendes Fragmentmuster der gesamten DNA, was eine eindeutige Ansprache der einzelnen Stämme ermöglichte.

Für die Versuchskäseproduktion sollten die eingesetzten Stämme der Spezies *S. equorum* sicher identifiziert werden. Es wurden die über ARDRA getesteten Stämme für die Genotypisierung eingesetzt. Mit dem Enzym *Sma*I konnte bei der Spezies eine eindeutige Stammdifferenzierung durchgeführt werden. Die Käseisolate Staph2 und Staph5 ergaben ein identisches Restriktionsschnittmuster mit *Sma*I. Zur Kontrolle erfolgte eine Wiederholung des Versuches. In Abb. 37 wurden die Käseisolate Staph3, Staph2 und Staph5 zur besseren Überprüfung nebeneinander aufgetragen. Zusätzlich zum *Sma*I Verdau erfolgte ein Verdau mit *Sac*I und *Asc*I (Daten nicht gezeigt). Mit allen drei Enzymen ergaben die Käseisolate Staph2 und Staph5 ein übereinstimmendes Fragmentmuster. Es handelt sich bei diesen beiden Isolaten um den selben Stamm.

Die Genotypisierung wurde auch für die Spezies *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. sciuri* subsp. *lentus* und der lebensmittelunerwünschte Spezies *S. saprophyticus* durchgeführt.



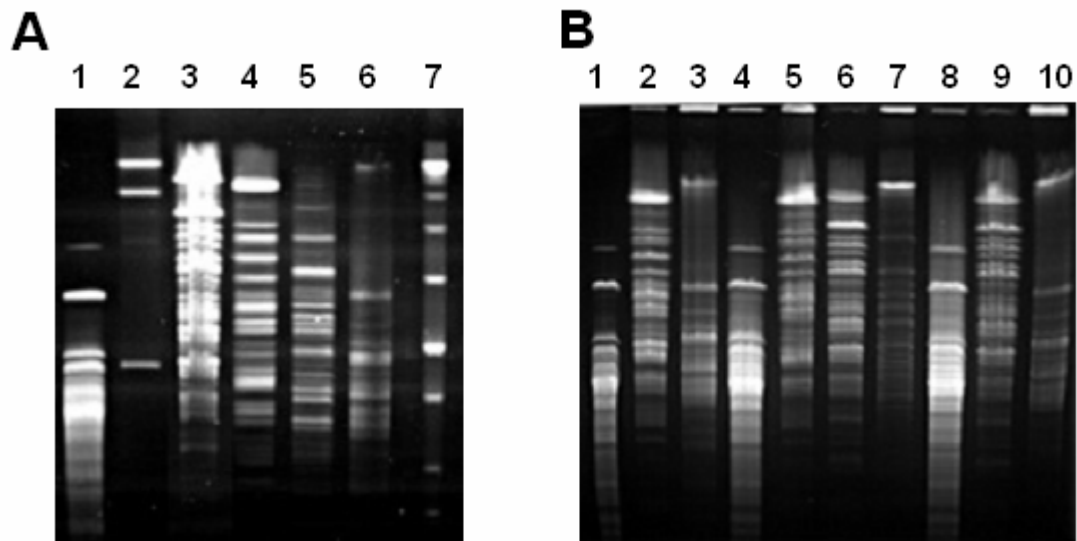
**Abb. 38:** PFGE-Muster der genomischen DNA von *Staphylococcus* spp. **(A)** Typstämme und Isolate mit *Sma*I: 1, low range PFG-marker; 2, *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345-T; 3, *S. sciuri* isolate Staph 4; 4, *S. sciuri* subsp. *lentus* DSM 20352-T; 5, *S. lentus* DSM 6672. **(B)** *S. saprophyticus* Stämme mit *Sma*I: 1, low range PFG-marker; 2, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* DSM 20229-T; 3, *S. saprophyticus* 91175; 4, 91176; 5, 91105; 6, Staph9; 7, 91125.

Ein Vergleich der Stämme *S. sciuri* subsp. *sciuri* mit dem Isolat Staph4 zeigte eine gute Trennung zwischen diesen beiden Stämmen. Das gleiche konnte auch für die beiden Stämme der Spezies *S. lentus* (DSM 20352-T, DSM 6672) gezeigt werden (Abb. 38A). Bei den getesteten Stämmen der Spezies *S. saprophyticus* (Abb. 38B) konnte mit dem Enzym *Sma*I eine Ähnlichkeit der Restriktionsmuster erkannt werden. Die Isolate 91175 und Staph9 erbrachten ein identisches Fragmentmuster. Für die anderen Stämme wurde ein zur Unterscheidung geeignetes Fragmentmuster erhalten.

### 3.7.3 Überprüfung definierter Oberflächenstarterkulturen

Im Reifungsverlauf erfolgte eine Überprüfung der zur Reifung eingesetzten Stämme. Es sollte kontrolliert werden, ob die verwendeten Stämme sich auf der Käseoberfläche etablieren können oder durch eine natürlich vorhandene Begleitflora unterdrückt werden. Nach 2, 4 und 8 Wochen erfolgte eine Isolierung unterschiedlicher Kolonien welche auf ihre Stammzugehörigkeit hin untersucht wurden.

Als Starterkulturen wurden die Stämme, welche unter 3.4.1 genannt wurden, eingesetzt.



**Abb. 39:** Restriktionsanalyse der gesamt chromosomalen DNA mit *AscI* (1.1% Agarosegel). **(A):** PFGE Auftrennung der eingesetzten Kulturstämme. 1, *M. gubbeenense* (CA12); 2, *S. equorum* (Staph2); 3, *B. linens* (047-0399); 4, *B. linens* (Br5); 5, *C.casei* (CA3); 6, *C. variabile* (MD 025.0165); 7, low range PFG-marker. **(B):** Bestimmung der Oberflächenisolate über. 1+4+8, CA12; 2+5, Br5; 3+10, *C. variabile*; 6+9, *B. casei*; 7, n.n.

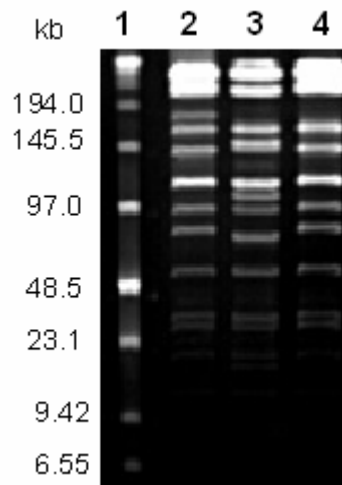
Zum besseren Vergleich erfolgte ein Parallelverdau der eingesetzten Starterstämme (Abb. 39A). Zur Überprüfung der Stämme wurde das Enzym *AscI* verwendet. Für Charge 3 und 4 (3.4.1) wurden insgesamt 20 Oberflächenisolate getestet (gezeigt zehn Isolate, Abb. 39B). Die sechs gelb-pigmentierten Stämme konnten als *M. gubbeenense* CA12 identifiziert werden. Bei den neun orangepigmentierten Stämmen wurden zwei aufgrund der Zellmorphologie der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet. Bei den verbleibenden konnten vier Stämme als *B. linens* Br5 und drei Stämme *B. linens* BC220 identifiziert werden. Von den fünf cremefarbenen Isolaten konnten drei als *C. variabile* MD 025.0165 und einer als *C. casei* CA3 angesprochen werden.

Ein cremefarbenes Corynebacterium ließ sich nicht zuordnen. Es handelte sich dabei um einen Fremdkeim aus der natürlich vorhandenen Begleitflora.

Aus dem Versuchsansatz Charge 3a und 6 wurden insgesamt 51 Isolate getestet. Es wurden 20 orangepigmentierte, acht gelbpigmentierte und 23 cremefarbene Isolate überprüft. Durch die Zellmorphologie konnte bei den orangefarbenen sechs und bei den cremefarbenen fünf Staphylokokkenisolate unterschieden werden. Von den 14 orangen Stämmen war einer *B. linens* (BC220), die restlichen Stämme zeigten ein identisches Restriktionsmuster zum eingesetzten *B. linens* Br5. Alle getesteten gelben Isolate zeigten eine Übereinstimmung zu Stamm CA12. Die 18 cremefarbenen Stämme teilten sich in zehn Stämmen *C. variabile* MD 025.0165 und acht Stämmen *C. casei* CA3 auf.



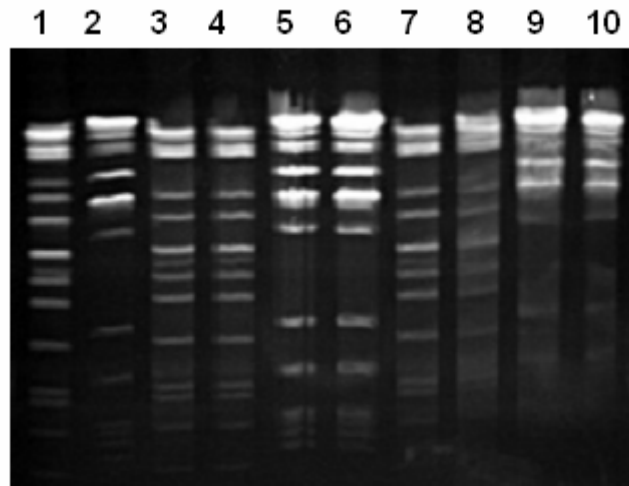
Die Überprüfung der Staphylokokken Isolate der Charge 3 und 4 erfolgte in einem separaten Ansatz mit einem geeigneten „rare cutter“.



**Abb. 40:** PFGE-Restriktionsanalyse von *S. equorum* Isolate aus Charge 3 und 4 mit *Sma*I (1,1% Agarosegel). 1, low range PFG-marker; 2, Staph2; 3, Käseisolat Charge 3; 4, Käseisolat Charge 4.

Die Typisierung zeigte, dass es sich bei den Isolaten um unterschiedliche Stämme handelte. Der eingesetzte Starterstamm (Staph2) zeigt eine zusätzliche Bande im Bereich zwischen 145,5 und 194,0 kb. Diese Bande fehlt bei den vom Käse isolierten Stämmen. Das Käseisolat von Charge 3 zeigte eine zusätzliche Bande im Fragmentbereich um 97,0 kb. Die größte Übereinstimmung zu dem eingesetzten Starterstamm zeigte das Isolat aus Charge 4 (Abb. 40). Die Überprüfungen dieser Isolate durch ARDRA zeigte die Zugehörigkeit zur Spezies *S. equorum*.

In Charge 3a wurde nur der Stamm *S. equorum* (Staph2) eingesetzt. Für Charge 6 erfolgte eine zusätzliche Zugabe von *S. sciuri* (Staph4).



**Abb. 41:** PFGE Restriktionsanalyse der eingesetzten Spezies *S. equorum* (Staph2) und *S. sciuri* (Staph4) aus Charge 3a und 6 mit *SmaI* (1.1% Agarosegel). 1-3 Kontrollstämme: 1, Staph2; 2, Staph4; 3, eingesetztes Lyophilisat Staph2; 4+7+8, Isolate Staph2; 5+6+9+10, Isolate Staph4.

Das Restriktionsmuster des Kulturstammes *S. equorum* (Staph2) ist nicht mit dem lyophilisierten Staph2, welcher für die Käseversuche eingesetzt wurde identisch (Abb. 41). Neben dem Stamm *S. equorum* Staph2 aus der Stammsammlung wurde auch die eingesetzten gefriergetrocknete Präparation mittels PFGE analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Restriktionsmuster der isolierten *S. equorum* Stämme mit dem eingesetzten Lyophilisat übereinstimmte. Die Stammidentifizierung zeigte, dass sich der lyophilisierte Staph2 auf der Käseoberfläche etablieren konnte. Der zusätzlich eingesetzte Kulturstamm Staph4 zeigte ein gut zu unterscheidendes Fragmentmuster zum Stamm *S. equorum* Staph2. Alle getesteten Staphylokokken konnten einem der Kulturstämme zugeordnet werden. Es wurden keine Fremdkeime auf der Oberfläche nachgewiesen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Hefen

Die milchwirtschaftliche Bedeutung der Hefen ist recht unterschiedlich. Sie reicht von technologisch erwünscht, wie bei der Kefirkultur, bis zu gefürchtet, als Erzeuger von Bombagen in Quarkbechern. Bei der Reifung von Rotschmierekäsen sind Hefen als technologisch erwünschte Keimflora anzusehen. Die Entwicklung der bakteriellen Schmiere steht in einer engen Abhängigkeit zur Etablierung einer Hefeflora auf der Käseoberfläche zu Beginn der Reifung (Bockelmann, 2003; Eliskases-Lechner u. Ginzinger, 1995b; Leclercq-Perlat et al., 1999; Petersen et al., 2002).

Hefen zählen zu den salz- und säuretoleranten Organismen. Sie besitzen die Fähigkeit, einen pH-Wert von  $\text{pH} < 5,0$ , und eine Salzkonzentration von 20-40 g/l zu tolerieren (Leclercq-Perlat et al., 1999, Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002). Dieses ermöglicht es den Hefen, auch extreme Habitate wie das Salzbad, zu besiedeln. Es wurden Zellzahlen von ca.  $10^5$  KBE/ml dokumentiert (Bockelmann et al., 1997a, 2000; Petersen et al., 2002). Durch ihre Fähigkeiten, Laktat zu assimilieren, und alkalische Stoffwechselprodukte freizusetzen, kommt es bei der Reifung zu einer Entsäuerung der Käseoberfläche (Bockelmann u. Hoppe-Seyler, 2001; Brennan et al., 2002; Busse, 1989; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b; Keller und Puhon, 1985; Mayr, 1990; Sauter, 1986). Diese Alkalisierung der Käseoberfläche ist für die Entwicklung einer Rotschmiereflora von entscheidender Bedeutung (Busse, 1989; Rattray und Fox, 1999; Seiler u Busse, 1990), da bis auf Staphylokokken die Rotschmierebakterien (*Brevibacterium linens*, *Arthrobacter* spp, *Corynebacterium* spp.) erst bei pH-Werten um pH 6,0 wachsen können. Die Hefeflora erreicht in der Regel innerhalb der ersten zwei Wochen der Reifung ihre maximalen Keimzahlen. Diese liegen zwischen  $10^4$  bis  $10^8$  KBE/cm<sup>2</sup> auf der Käseoberfläche (Accolas et al., 1978; Bockelmann et al., 2002; Grand, 1992; Keller und Puhon, 1985; Piton-Malleret und Gorrier, 1992). Eine verzögerte Entsäuerung verhindert das Anwachsen von Rotschmierebakterien, verzögert die Reifung, und führt im allgemeinen zu einer starken Kontamination vor allem mit Schimmelpilzen wie *Penicillium commune* (Busse, 1989; Sauter, 1986).

Da die Hefen zumeist aus der jeweiligen Hausflora stammen, die Kontamination also auf natürlichem Wege erfolgt, kann die Kombination der gefundenen Arten von Käse zu Käse variieren, was auch die Ergebnisse der Analyse der handelsüblichen Rotschmierekäse wiedergeben. In der Literatur wurde bereits über die Divergenzen der Hefeflora unterschiedlicher Käsesorten berichtet (Berger et al., 1999; Engel und Roesch, 1995; Jollivet et al., 1994; Marcellino et al., 2001; Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002).

Unter den Hefen, die in den Käseereien angetroffen werden, dominiert bei Schnittkäse (Tilsiter) *Debaryomyces hansenii* auf der Käseoberfläche, obwohl das Salzbad, welches als wichtigste Kontaminationsquelle für Hefen angesehen wird (Seiler und Busse, 1990), oft eine Vielzahl verschiedener Hefegattungen enthält (Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995b). Nach Leclercq-Perlat et al. (1999) wird die Anreicherung auf der Käseoberfläche zusätzlich durch Kulturzugabe zum Schmierwasser, als auch durch das „Alt-Jung-Schmierverfahren“ begünstigt. Für Weichkäse stellte neben *D. hansenii* die auch als Milchsimmel bezeichnete Hefe *Geotrichum candidum* den Hefeanteil. Bei Sauermilchkäse hingegen sind die dominanten Hefen *Candida krusei* und *Kluyveromyces marxianus* (Bockelmann et al., 2002; Engel und Roesch, 1995).

In früheren Untersuchungen erfolgte ein Vergleich der Alkalisierungseigenschaften kommerziell erhältlicher *D. hansenii* Kulturen gegen Isolate aus Rohmilch und Milchprodukten. Es zeigte sich, dass diese Isolate deutlich bessere Entsäuerungseigenschaften als die handelsüblichen Kulturen aufwiesen. Weitere Studien von Wyder und Puhan (1999) wie auch von Petersen et al. (2002) belegten, dass nicht alle Stämme der Spezies *D. hansenii* die Fähigkeiten besitzen, in Milch einen adäquaten Stoffwechsel durchzuführen. Diese Ergebnisse ließen sich auf die Stämme der Spezies *Geotrichum* spp., *Candida* spp. und *Kluyveromyces* spp. übertragen. Auch hier waren die Fähigkeiten zur Alkalisierung des Milchmediums bei den getesteten Isolaten sehr unterschiedlich ausgeprägt und von der Temperatur abhängig. Bei den getesteten Stämmen zeigte sich bei einer Erhöhung der Temperatur um 3°C, von 21 auf 25°C, eine deutliche Verkürzung der lag-Phase von einem Tag auf wenige Stunden. Untersuchungen von Bonaiti et al. (2004) belegen die Abhängigkeit der Stoffwechselleistungen der Hefen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit.

Für die weiteren Käsungsversuche wurden nur Stämme eingesetzt, welche bei den vorgegebenen Reifungstemperaturen gute Alkalisierungseigenschaften zeigten. Zusätzlich wurde bei den verwendeten Hefen auf die optischen und sensorischen Eigenschaften geachtet, welche der jeweiligen Käsesorte entsprechen sollte. Wie auch bei *D. hansenii* entstammten diese Stämme der Milch bzw. Produkten aus Milch.

Bei den Versuchen mit Schnittkäse zeigte sich eine schnelle Entsäuerung der Käseoberfläche. Innerhalb von 6 Tagen wurde ein pH-Wert von über 7,0 erreicht. Diese Entsäuerung ist vergleichbar mit den Ergebnissen beim „Alt-Jung-Schmierverfahren“ (Eliskases-Lechner, 1993). Obwohl niedrigere Zellzahlen in der Arbeitsschmiere gegenüber dem „Alt-Jung-Schmierverfahren“ eingesetzt worden waren, wurde eine vergleichbar schnellere Entsäuerung der Käseoberfläche beobachtet. Ebenso zeigten die verwendeten Isolate für Weich- und Sauermilchkäse eine gute und schnelle Entsäuerung. Der pH-Wert-Verlauf war mit dem von alt- jung geschmierten Käsen vergleichbar.

## 4.2 Einflüsse auf die Käsureifung

Wird von der Einflussnahme auf die Käsureifung gesprochen, steht im allgemeinen die Käsepflege im Mittelpunkt. Die Einflussnahme auf die Reifung beginnt jedoch bereits mit dem ersten Produktionsschritt. So kann bereits die verwendete Käseimilch mit entscheidend für das Endprodukt sein (Wessinger, 1981). Qualitätsmängel der Milch, sowohl sensorische wie der Geruch und Geschmack als auch eine hohe mikrobielle Belastung der Milch kann sich negativ auswirken.

Nicht nur die Qualität der Kesselmilch ist entscheidend für die Reifung, sondern auch die allgemeinen Reifungsbedingungen wie Art und Häufigkeit der Käsepflege, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Strömungsverlauf der Luft im Reifungsraum, Luftqualität, Belegung der Reifungsräume, als auch der Standort der Reifungsräume (Philipp, 1993), die Oberfläche der Käse und der Salzgehalt der Käsematrix (Keller und Puhan, 1985; Mayr, 1990). Die Bedeutung des Salzes bei der Reifung ist recht vielfältig. Während früher der Käse fast ausschließlich von Hand gesalzen wurde, wird heute wegen der Arbeitersparnis fast nur noch im Salzbad gesalzen. Das Salzbad entzieht dem Käse Molke und die darin enthaltene Laktose. So wird einerseits die Rindenbildung gefördert, als auch eine Entsäuerung des Käses erreicht. Die Dauer der Salzbehandlung variiert je nach Käsesorte zwischen weniger als einer Stunde bei Weichkäse, und mehreren Tagen bei Hartkäse (Wessinger, 1981). Zusätzlich wirkt das Salz regulierend und selektierend auf die Bakterienflora, lenkt somit die Reifung, und ist wichtig für die Haltbarkeit der Käse.

Durch den permanenten Gebrauch der Salzäder kommt es zu einer Anreicherung von Käsepartikeln und Molke in der Salzlake. Dieses erfordert eine regelmäßige Reinigung. In der Regel erfolgt eine teilweise Neutralisation der Salzlake. Eine vollständige Neutralisation, oder gar ein Neuansatz, wird weitestgehend umgangen. Da infolge solcher Maßnahmen es des öfteren zu Problemen bei der nachfolgenden Reifung kommt. Besonders empfindlich zeigt sich die Mikroflora von oberflächengereiften Käsen gegenüber derartigen Maßnahmen. Ein häufig dokumentiertes Problem ist das Auftreten von Schimmel zu Beginn der Reifung (Busse, 1989; Sauter, 1986). Inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen Salzbadpflege und auftretenden Reifungsstörungen besteht, wurde bisher noch nicht untersucht. Zur Klärung wurden Laborkäsungen durchgeführt.

Bei den durchgeführten Versuchen im Labormaßstab erfolgte zum einen die Salzung der Versuchskäse in einem sterilen Salzbad, welches den Bedingungen nach einer vollständigen Neutralisation bzw. einem Neu - Ansatz vergleichbar ist. In einer Parallelcharge wurden die Käse in einem Salzbad, welches mit  $10^6$  KbE/ ml *D. hansenii* und  $10^7$  KbE/ ml *S. equorum* angeimpft worden war, gesalzen. In den Arbeiten von Seiler und Busse (1990) und Eliskases-Lechner (1995b) wurde das Salzbad bereits als eine wichtige Anreicherungsquelle für Hefen beschrieben. So konnte Eliskases-Lechner und Ginzinger,

(1995b) aus österreichischen Salzbädern 14 unterschiedliche Hefen isolieren. Unabhängig von der Hefemischflora im Salzbad etabliert sich auf der Oberfläche von Schnittkäse hauptsächlich die Gattung *D. hansenii* (Hoppe-Seyler, 1998; Petersen et al., 2002). In Untersuchungen an der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, konnte zusätzlich der Nachweis über Koagulase negative Staphylokokken im Salzbad erbracht werden (Bockelmann und Hoppe-Seyler; 2001). Andere Autoren bestätigen das Vorkommen von Staphylokokken als natürliche Hausflora in den Käseereien (Burri, 1999; Place et al., 2002, 2003). Als eine Anreicherungsquelle für Listerien wurde das Salzbad noch nie beschrieben. Die Listeria- Keimzahlen in Salzbädern sind sehr gering, nach Asperger und Heistingner (1998) gelingt der Nachweis oftmals erst beim Ansatz von 100 ml Salzbadlösung.

Der Käse der Charge 1, welcher im sterilen Salzbad gesalzen wurde, und keiner weiteren Oberflächenbehandlung unterzogen worden war, zeigte bereits in den ersten Reifungstagen Schimmelbefall. Innerhalb von zwei Wochen überzog ein einheitlicher Schimmelrasen den gesamten Käse. Obgleich keine Mikroorganismen im Salzbad enthalten waren, konnten von der Oberfläche Hefen, *Staphylococcus* spp. und beigefarbene coryneforme Bakterien isoliert werden. Die Hefe-Konzentration lag mit  $10^8$  KbE/ cm<sup>2</sup> in einem Bereich, welcher für Rotschmierekäse in den ersten zwei Reifungswochen typisch ist (Grand, 1992; Piton-Malleret und Gorrier, 1992). Dennoch erfolgte keine Alkalisierung der Käsoberfläche. Dieses lässt sich durch die Studien von Leclercq-Perlat et al. (1999) und Martin et al. (2001) erklären. Leclercq-Perlat et al. (1999) untersuchte unterschiedliche Isolate der Spezies *D. hansenii* aus Milch bzw. Milchprodukten auf ihre Stoffwechselleistungen. Er konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass nicht alle Stämme dieser Spezies über einen alkalisierenden Stoffwechsel verfügen. Weitere Untersuchungen von unterschiedlichen Hefegattungen aus dem milchwirtschaftlichen Bereich zeigten das gleiche Ergebnis (Martin et al., 2001; Petersen, 2002).

Bei der vorgefundenen bakteriellen Mikroflora dominierten beigefarbene, coryneforme Bakterien. Zusätzlich zur beigefarbenen Flora konnten Staphylokokken der Spezies *S. saprophyticus*, *S. xylosum*, sowie der von Place et al. (2002) beschriebenen *S. succinus* subsp. *casei* und *Microbacterium* spp. isoliert werden. Chapman und Sharpe (1989) beschrieben als natürliche Quelle der Keime von Käsen hitzebeständige Mikroorganismen, die die Pasteurisierung überlebt haben. Nachträglich eingebrachte Kontaminanten stammen aus Milchleitungen, Wannen und Gebrauchsgegenständen zur Herstellung von Käsen, sowie Luft, Waschwasser und dem Fachpersonal. Da alle Gebrauchsgegenstände bei den Versuchskäsungen desinfiziert, bzw. sterile Lösungen zur Behandlung der Käse eingesetzt wurden, bleibt nur noch die Anreicherung von Luftkontaminanten bzw. hitzebeständiger Mikroorganismen aus der Milch zu nennen. Chapman und Sharpe (1989) erwähnten in diesem Zusammenhang einige Corynebakterien,

Staphylokokken, Enterokokken und Sporen von Bazillen und Clostridien. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei dieser Flora um aus der Milch stammende Kontaminanten handelte.

Die Salzung der Versuchscharge 2 erfolgte in einem Salzbad mit darin enthaltenen *D. hansenii* und *S. equorum*. Bei der nachfolgenden zweiwöchigen Reifung konnte auch ohne eine Oberflächenbehandlung eine fast vollständige Hemmung des Wachstums von Schimmelpilzen beobachtet werden. Welche Schutzfunktion die Salzbadflora übernahm wurde besonders deutlich, dass die Reifung beider Chargen in der gleichen Glasreifungskammer erfolgte. Die Sporenbelastung lag somit deutlich höher als in einem „normalen“ Reifungsraum. Aufgrund der nicht durchgeführten Oberflächenbehandlung mit Kultur bestand die bakterielle Oberflächenflora hauptsächlich aus *S. equorum*. Im Gegensatz zur Charge 1 konnten sich keine Fremdkontaminanten bzw. hitzeresistente Keime auf der Oberfläche durchsetzen. Die Salzbadflora bietet somit zu Beginn der Reifung einen effektiven Schutz gegen unerwünschte Fremdkontaminationen.

Für beide Versuchschargen zeigte sich ein einheitlich niedriger pH-Wert Verlauf. Obwohl für die Beimpfung des Salzbad eine Hefe mit guten Alkalisierungseigenschaften ausgewählt wurde. Innerhalb des ersten Reifungstages zeigte dieser Käse einen deutlich besseren pH-Wert-Anstieg als der Vergleichskäse aus dem sterilen Salzbad. Die Bedeutung der Hefen für die Entsäuerung der Käsoberfläche als Voraussetzung für die Entwicklung der bakteriellen Rotschmierflora wurde bereits öfter beschrieben (Busse, 1989; Eliskases- Lechner und Ginzinger, 1995b; Keller und Puhán, 1985; Petersen et al., 2002; Mayr, 1990; Reys, 1993; Sauter, 1986). Dass die Entsäuerung nicht weiter fortschritt, ist dadurch zu erklären, dass Staphylokokken organische Säuren bilden (Lenoir, 1984; Massa und Tutura, 1989) und somit der Entsäuerung entgegenwirken. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass es sich bei der Entsäuerung um ein Zusammenspiel zwischen Hefen und den aufgebrauchten Rotschmierbakterien handeln könnte. Hoppe-Seyler (1998) zeigte in seinen Untersuchungen, dass die Entsäuerung in Milchflüssigkulturen sowohl von *Brevibacterium linens* als auch von coryneformen Bakterien beeinflusst wurde. Oelsner (1983) konnte ebenfalls bei einigen coryneformen Bakterien entsäuernde Eigenschaften nachweisen. Die Alkalisierung durch *B. linens* schien maßgeblich durch die Freisetzung von Ammoniak (Geruch), oder biogener Amine verursacht zu werden (Hosono und Tokita, 1969; Tokita et al., 1966).

In weiteren Versuchen wurden Käse aus sterilen und beimpften Salzbadern mit definierten Starterkulturen geschmiert, wobei die Arbeitsschmiere für die Käse der Charge 2a, aus dem beimpften Salzbad, die Stämme *S. equorum* und *D. hansenii* nicht enthielt. Diese waren bereits dem Salzbad zugegeben worden. Bei den Käsen der Charge 1a wurden alle Stämme nach dem sterilen Salzbad auf den Käse aufgebracht. Durch die Dokumentation

des pH-Werte Verlaufes in der ersten Reifungswoche konnte innerhalb der ersten drei Reifungstage ein Unterschied bei der Entsäuerung der Oberfläche beobachtet werden. Bei der Versuchscharge aus dem beimpften Salzbad setzte die Entsäuerung ohne Verzögerung ein. Im Vergleich dazu konnte in der Parallelcharge aus dem sterilen Salzbad eine verzögerte Entsäuerung beobachtet werden. Hier zeigte sich deutlich der Adaptionsvorsprung der Hefen aus dem Salzbad, welcher zu einem unverzüglichen Anstieg des pH-Wertes führte. Der Adaptionsvorsprung wurde in der Parallelcharge nach drei Tagen aufgeholt, nach vier Tagen konnte bei beiden Versuchschargen ein pH-Wert von über 6,0 gemessen werden. Eine Analyse der Oberflächenflora ergab, dass die Hefekeimzahlen bei der Charge 1a um eine 10er Potenz höher lag als in der Vergleichscharge. Dieses bestätigt Ergebnisse aus früheren Untersuchungen, bei denen die Erhöhung der Hefekonzentration um Faktor  $10^3$ , von  $1 \times 10^7$  auf  $1 \times 10^{10}$  KBE/ml, nicht zu einer beschleunigten Entsäuerung der Käseoberfläche beitrugen (Hoppe-Seyler, 1998). Auch Eliskases-Lechner und Ginzinger (1995b) sowie Piton-Malleret und Gorrier (1992) konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem pH-Anstieg der Käseoberfläche und den Hefekeimzahlen beobachten.

Die Schmiereentwicklung setzte für beide Käse innerhalb der ersten Reifungswoche ein. Bei beiden Versuchschargen überzog sie gleichmäßig die gesamte Oberfläche. Während des gesamten Reifungsverlaufes kam es zu keiner Kontamination mit Fremdkeimen oder Schimmel. Es konnte im Labormaßstab gezeigt werden, dass durch Aufbringen einer definierten Starterkultur eine optimale Reifung ohne Reifungsstörungen erfolgen kann, selbst wenn die Voraussetzungen weniger optimal sind.

Die Salzbadflora ist nicht nur bei Schnittkäse von Bedeutung, sondern auch bei Weichkäse. Trotz einer deutlich kürzeren Verweildauer von weniger als einer Stunde konnte sich die Salzbadflora in den Versuchskäsungen auf der Oberfläche etablieren und sich über den gesamten Reifungsverlauf behaupten. Es ist davon auszugehen, dass die Mikroorganismen in einer deutlich aktiveren Phase sind, da die Salzbadtemperatur bei Weichkäse um die  $20^\circ\text{C}$  liegt, somit dem Temperaturoptimum der Mikroorganismen deutlich näher kommt als  $14^\circ\text{C}$  bei Schnittkäse.

Bei Weichkäsen war im Gegensatz zum Schnittkäse kein Unterschied in der Entsäuerung zwischen geschmierten und nicht geschmierten Kontrollkäsen festzustellen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Gegenwart der Hefe *Geotrichum candidum* sein. Welche zusätzlich zu *D. hansenii* einen alkalisierenden Stoffwechsel aufweist.



### 4.3 Reifungskulturen für Rotschmierekäse

Für die Reifung von Rotschmierekäse stehen den Käsereien Reinkulturen der Stämme *Brevibacterium linens* und *Debaryomyces hansenii* zur Verfügung, welche dem Schmierwasser zugesetzt werden können. Diese Stämme werden als universal Reifungskultur für alle Rotschmierekäse angeboten, ungeachtet der sortenspezifischen Eigenschaften von Tilsiter, Limburger oder Harzer. In früheren Versuchen mit immer wieder frisch aus Reinkulturen hergestelltem Schmierwasser konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der kommerziell erhältlichen Kulturstämme dem traditionellen Verfahren des „alt-jung-schmierens“ deutlich unterlegen ist (Hoppe-Seyler, 1998; Philipp, 1993). Zur Sicherstellung eines guten Reifungsverlaufes sind die Käsereien noch immer auf das traditionelle Verfahren des „Alt-Jung-Schmierens“ angewiesen. Dieses Verfahren sichert nicht nur, dass ausreichend hohe Keimzahlen der notwendigen Rotschmierebakterien von einer Charge zur nächsten übertragen werden, sondern ermöglicht auch die Verbreitung von unerwünschten Fremdkeimen in einer Käserei. Besonders das Auftreten von *Listeria monocytogenes* stellt hier ein immer wieder auftretendes Problem bei Rotschmierekäse dar (Breer, 1986, Maoz et al., 2003; VDM, 1999a, 1999b).

Als typisches Bakterium der Rotschmiere gilt *Brevibacterium linens*. Das Wachstum dieses Bakteriums auf der Käseoberfläche wird als notwendige Voraussetzung für die Entwicklung der charakteristischen Farbe, Aroma, Geschmack und Textur von Rotschmierekäsen angesehen (Burri, 1999; Dias und Weimer, 1998; El-Erian, 1969; Rattray und Fox, 1999). Genauere Studien der bakteriellen Oberflächenflora ergaben hingegen eine komplexe Zusammensetzung unterschiedlicher Mikroorganismen. Hauptsächlich konnten Stämme der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* und *Microbacterium* isoliert werden (Bockelmann et al., 1997a, 2000, 2002; Brennan et al., 2002; Carnio et al., 1999; Hoppe-Seyler, 1998). Zusätzlich beschrieb Carnio et al. (1999) das Vorkommen von Stämmen der Gattung *Micrococcus* auf deutschen und französischen Rotschmierekäse

In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass Stämme der Spezies *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Microbacterium* ähnliche Stoffwechselleistungen erbringen wie *B. linens*, und ebenfalls Anteil an der Aroma- und Texturbildung nehmen (Bonnarme et al., 2000; Dias und Weimer, 1998; Massa und Tutura, 1989; Smacchi et al., 1999a, b). Im Gegensatz zu den Arbeiten von El-Erian (1969) sowie Rattray und Fox (1999), zur Farbentwicklung oberflächengereifter Käse, konnte von Hoppe-Seyler (1998) und Bockelmann et al. (1997b) gezeigt werden, dass das typische Rotschmierebakterium *B. linens* eher eine untergeordnete Rolle einnimmt. Als für die Farbentwicklung entscheidenden Mikroorganismen wurden gelbpigmentierte *Arthrobacter* spp./ *Microbacterium* spp. als auch beigefarbene Corynebakterien beschrieben (Bockelmann et al., 1997a; Hoppe-Seyler, 1998). Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch kein direkter

Einfluss von Staphylokokken auf die Farbentwicklung beobachtet werden. Die Oberflächenanalysen verschiedener europäischer Rotschmierekäse zeigte, dass sich der Anteil der Staphylokokken an der bakteriellen Rotschmiereflora zwischen 0,1 und 5% bewegt (Hoppe-Seyler, 2000; Irlinger, 1997). Ihr Anteil an der Oberflächenflora ist somit gering, jedoch auf allen Käsen vorzufinden. Eine Analyse dieser Flora erbrachte, dass überwiegend die Spezies *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. vitulus* und *S. succinus* subsp. *casei* isoliert worden waren (Brennan et al., 2002; Hoppe-Seyler, 2000; Place et al., 2003).

Die beschriebene Komplexität der Oberflächenflora steht in keiner Übereinstimmung mit den angebotenen Starterkulturen. Es ist somit wenig überraschend, dass bei der Reifung von Rotschmierekäse Probleme mit Schimmel und Fremdkeimen auftreten können. Besonders gefürchtet ist die Kontaminationen mit *Listeria monocytogenes* (Breer, 1986; Bockelmann, 2002; Maoz et al., 2003; Reyser, 1999).

Eine Reihe von Studien berichten von einer antilisterielle Wirkung von coryneformer Bakterien (Beattie und Torrey, 1986; Carnio et al., 1999; Ennahar et al., 1996; Ennahar und Descamps., 2000; Lewis, 1981, 1982; Reyser et al., 1994; Valdes-Stauber et al., 1991). Von Valdes-Stauber et al., (1991) wurden 187 coryneforme Bakterien von Rotschmierekäse auf ihre hemmende Wirkung gegen Listerien untersucht. Hierbei wurde bei den Stämmen der Spezies *B. linens* und *Arthrobacter nicotianae* eine antilisterielle Aktivität festgestellt. Der dabei isolierte Stamm *B. linens* M 18 bildet das Bakteriocin Linocin M 18 (Valdes-Stauber und Scherer, 1994). Das Stukturgen für Linocin M 18 wurde kloniert, und seine Verbreitung innerhalb der coryneformen Bakterien nachgewiesen (Valdes-Stauber und Scherer, 1996, Loessner, 2000). Der ebenfalls von der Käseoberfläche isolierte Stamm *S. equorum* WS 2733 zeigte einen bakteriostatischen Effekt gegenüber einer Vielzahl von gram positiven Bakterien (Carnio et al., 2000). Bakteriocine wirken hauptsächlich gegen artverwandte Bakterien (Holzapfel et al., 1995). Inwieweit es sinnvoll ist, bakteriocin-bildene Stämme auf der Oberfläche anzureichern, ist somit fraglich, da die beschriebenen Bakteriocine ein weites Spektrum von Bakterien hemmen. Neben *Bacillus* spp. und *Listeria* spp. können auch Stämme der Gattung *Arthrobacter*, *Corynebacterium Brevibacterium* und *Micrococcus* gehemmt werden (Carnio et al., 2000). In Laborkäsungen wurden bereits Versuch mit Starterkulturen welche eine antilisterielle Wirkung aufwiesen, durchgeführt (Loessner, 2000; Maoz et al., 2003, Reyser et al., 1994). In der Arbeit von Loessner (2000) zeigte sich, dass der Einsatz von bakteriocin-bildenden Bakterien zu Störungen in der Entwicklung der Oberflächenflora führen kann. Es ist weiter fraglich inwieweit ein Schutz gegen Listerien durch bakteriocin-bildende Bakterien gegeben ist. In der Arbeit von Loessner (2000) konnte gezeigt werden, dass Listerien in der Lage sind gegen Bacteriocine Resistenzen auszubilden. Durch die Störung des ökologischen Gleichgewichtes könnte es zu einer verstärkten Etablierung von *Listeria* spp. in den Käseereien kommen.

Nicht nur das Auftreten von unerwünschten Bakterien stellt die Käseereien vor Probleme, sondern auch Reifungsstörungen auf Grund von Schimmelbefall. Hier sind kostenintensive Maßnahmen notwendig, um die Marktfähigkeit des Produktes zu sichern. Es wurde schon mehrfach eine schimmelhemmende Wirkung für *Brevibacterium linens* dokumentiert (Beattie und Torrey, 1986; Lewis, 1981, 1982). Dieser antagonistische Effekt steht in Verbindung mit der Synthese von Methylmercaptan. Jedoch zeigte sich in Laborversuchen das es trotz Einsatz diese Bakteriums zu massiven Verpilzungen kommen kann (Hoppe-Seyler, 1998).

Wie aus den unterschiedlichen Ergebnissen abzuleiten ist, handelt es sich bei der Rotschmiereflora um ein komplexes und sensibles Ökosystem. Um Probleme bei der Reifung zu vermeiden, sollte auf den Einsatz von stark bacteriocin-bildenden Stämme verzichtet werden. Durch eine schnelle Ausbildung einer komplexen Schmiere kann die Oberfläche ausreichend gegen Fremdkontaminationen geschützt werden. Dieses sollte durch den Einsatz einer definierten Reifungsmischkultur möglich sein.

#### 4.4 Versuchskäsungen

Die Oberflächenflora von Rotschmierekäse stellt ein komplexes Ökosystem dar. Seit langem ist die Bedeutung der Hefen für die Entsäuerung der Käseoberfläche als Voraussetzung für die Entwicklung der bakteriellen Rotschmiereflora bekannt (Busse, 1989; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995a,b; Keller und Puhán, 1985; Mayr, 1990; Petersen et al. 2002; Rejs, 1993; Sauter, 1986). In den vergangenen Jahren konnte die Komplexität der bakteriellen Rotschmiereflora mehrfach dokumentiert werden (Bockelmann et al., 1997a, 2002; Brennan et al., 2002; Carnio et al., 1999; Hoppe-Seyler, 1998; Irlinger, 1997; Petersen et al., 2002). Die Autoren beschrieben für unterschiedliche Käsesorten das Vorkommen der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Microbacterium* in der bakteriellen Rotschmiereflora. Für die Zusammensetzung von definierten Reifungskulturen reicht das Wissen über die vorkommenden Gattungen auf der Käseoberfläche alleine nicht aus. Bei der Herstellung der Schmierlake sollte idealerweise sowohl die spezifischen Eigenschaften der Stämme, als auch mögliche Interaktionen zwischen den Stämmen beachtet werden (Bockelmann et al., 1997a, 2001; Hoppe-Seyler, 1998; Petersen et al., 2002). Dazu müssten die Reifungsversuche unter möglichst praxisnahen Bedingungen erfolgen, um die Entwicklung der Rotschmiereflora überprüfen zu können.

Im Bereich der Oberflächenreifung von Tilsiterkäse erfolgte eine Übertragung der Erfahrungen aus den Laborkäsungen in einen industriellen Maßstab.

#### 4.4.1 Pilotkäsung im Bereich Schnittkäse

In den Pilotchargen 3 und 4 wurde eine fünf-Stamm Mischkultur verwendet, welche bei Käsungen im Labormaßstab einen in allen Kriterien typischen Tilsiterkäse heran reifen ließ. Bei den Laborkäsungen wurden zentrifugierte, aufkonzentrierte und lagerungsfähige Bakteriensuspensionen verwendet. Für den industriellen Einsatz war es jedoch notwendig, die Stämme als lyophilisierte Kulturen bereitzustellen. Diese Form der Kultur stellt die typische Starterkultur für den industriellen Gebrauch dar. In Vorversuchen wurde die Vergleichbarkeit von Bakteriensuspensionen und lyophilisierten Kulturen überprüft. Es zeigte sich keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Kulturformen.

Die Arbeitsschmiere der Charge 3 setzte sich ausschließlich aus lyophilisierten Reinkulturen der Stämme *Brevibacterium linens* Br5, *B. casei* MD 047.0399, *M. gubbeenense* CA12 und *S. equorum* Staph2 zusammen. Für die Charge 4 erfolgte ein Austausch des Stammes *C. casei* CA3 gegen den ebenfalls beigefarbenen *C. variabile* MD 025.0165. Dieser Stamm wurde als Flüssigkultur zugegeben. Es wurde vermutet, dass er eine ähnlich schimmelhemmende Wirkung wie *B. linens* haben könnte (Beattie und Torrey, 1986; Lewis, 1981, 1982). Die lyophilisierten Kulturen wurden vor jeder Oberflächenbehandlung frisch in sterilem Peptonwasser gelöst und vermischt. Um die Reifungsbedingungen zu überprüfen, wurde ein Kontrollansatz, Charge 5, mit einbezogen. In der Kontrollcharge fand eine Behandlung mit „Alt-Jung-Schmierwasser“ der Produktionsstätte statt. Für die Pilotkäsung standen pro Versuchscharge 65 Käse, für die Kontrollcharge 35 Käse, mit einem Gewicht von je 2,5 kg zur Verfügung. Die Versuchskäse und normale Produktionskäse reiften auf separaten Reifungsständen im gleichen Reifungsraum. Ein vollständiger Schutz vor Einflüssen der natürlichen „Hausflora“ konnte nicht ausgeschlossen werden, und war auch nicht unbedingt erwünscht.

In der Anfangsphase zeigte sich bei allen Versuchsansätzen eine gute Entsäuerung der Käseoberfläche. Eine sichtbare Entwicklung der Rotschmiere setzte bei den Versuchschargen 4 und 5 bereits nach wenigen Tagen ein. Obgleich die Charge 3 innerhalb von drei Tagen einen pH-Wert von 6,0 erreicht hatte, etablierte sich die aufgebrachte Rotschmiereflora nur sehr schwach auf der Käseoberfläche. Als Grund für das schwache Anwachsen der bakteriellen Flora kann die niedrige Animpfkonzentration der Arbeitsschmiere angesehen werden. Die Bakterienkeimzahl lag mit  $1,6 \times 10^6$  KBE/ml deutlich unter denen der Chargen 4 und 5. Bei diesen Chargen konnte eine Bakterienkeimzahl in der Arbeitsschmiere im Bereich von  $10^8$  KBE/ml nachgewiesen werden, welches einer Keimkonzentration des „Alt-Jung-Schmierverfahrens“ gleich zu setzen ist (Hoppe-Seyler, 1998).

Infolge der verzögerten Schmiere-Entwicklung kam es bereits in der ersten Woche bei den Käsen der Charge 3 zu Grünschimmel Kontaminationen. Die Oberflächenschmiere

erreichte erst in der vierten Woche eine Keimzahl von  $10^9$  KbE/cm<sup>2</sup>. Diese Keimzahlen wurden von dem Parallelansatz (Charge 4) sowie der Produktionscharge (Charge 5) innerhalb von zwei Wochen erreicht. Diese Bakterienkeimzahlen lagen in Übereinstimmung mit den Keimzahlen verschiedener anderer Rotschmierekäse (Accolas et al., 1978; El-Erian, 1969; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1995a; Keller und Puhán, 1985; Piton-Malleret und Gorriere, 1992;). Während der weiteren Reifung konnten immer wieder auftretende Schimmelkontaminationen bei allen Versuchsansätzen beobachtet werden. Dieses lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Probleme bei den Reifungsbedingungen zurückführen, welche dazu führte das sich kein ökologisches Gleichgewicht auf der Oberfläche ausbilden konnte. Wie von Reys (1993) und Maoz et al. (2003) bereits beschrieben wurde, übernimmt eine gut entwickelte Schmiere eine wichtige Schutzfunktion gegenüber Schimmel und unerwünschten Mikroorganismen.

Die Versuchskäse die, mit einem definierten Oberflächenstarter geschmiert wurden, zeigten eine abweichende Zusammensetzung der Oberflächenflora zu den Kontrollkäsen, welche nach dem traditionellen „Alt-Jung-Verfahren“ geschmiert worden waren. Ab der zweiten Reifungswoche war ein übermäßiges Anwachsen des gelbpigmentierten *M. gubbeenense* und des orangepigmentierten *B. linens* auf der Oberfläche festzustellen. In der vierten Reifungswoche stellte *B. linens* 35 bzw. 47% der Oberflächenflora. In den Analysen der handelsüblichen Käse ergaben sich Werte von 1-15% für diese Spezies. Diese Werte der aus dem Handel gezogenen Proben stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hoppe-Seyler (1998) und Bockelmann et al. (2002). Eine mögliche Erklärung für das hohe Anwachsen der Spezies *B. linens* auf der Käseoberfläche könnte in Zusammenhang mit den aufgetretenen Problem bei der Regulation der Luftfeuchtigkeit und einer mitunter zu hohen Reifungstemperatur gesehen werden. Untersuchungen von Hoppe-Seyler (1998) belegen, dass mit Erniedrigung der Inkubationstemperatur bis hin zur üblichen Reifungstemperatur für Tilsiter Käse von 15°C Wachstumsvorteile auf Seiten der Gattungen *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp. und Staphylokokken beobachtet werden konnten. Die mögliche Ursache für dieses Phänomen liegt in den durchschnittlich doppelt so langen Generationszeiten der *B. linens* Stämme bei niedrigen Temperaturen, wie Untersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen im Komplexmedium ergaben (Hoppe-Seyler, 1998). Ferner könnte hierdurch erklärt werden, warum *B. linens* bei Reifungstemperaturen um 15°C nur einen geringen Anteil an der Gesamtbakterienzahl der Rotschmiereflora ausmachten.

Ab der vierten Reifungswoche konnten auf den Käsen der Charge 4 u. 5 zusätzlich coliformen Keimen nachgewiesen werden. Der Nachweis von coliformen Keimen dient bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten als Hygieneindikator (Pichhardt, 1998). Diese Keime werden durch die Pasteurisierungsverfahren inaktiviert, so dass ihr Vorkommen Hinweise auf eine Rekontamination geben. Dieses zeigt, dass es nicht nur auf

eine gute Schmiereentwicklung ankommt, sondern auch der Betriebshygiene eine besondere Bedeutung zukommt (Gianotti, 1999).

Bei der Reifung der Kontrollcharge zeigten sich ebenfalls Abweichungen von einer „normalen“ Reifung. Im gesamten Reifungsverlauf war die beige-farbene coryneforme Bakterienflora vorherrschend. Stämme der Spezies *B. linens* und Staphylokokken nahmen eine deutlich untergeordnete Rolle ein. Es konnte kein Nachweis über die gelbpigmentierte Flora (*Arthrobacter* spp., *Microbacterium* spp.) erbracht werden. Diese Flora konnte von den Käsen der laufenden Produktion hingegen isoliert werden. Obwohl die Zusammensetzung der Oberflächenflora als nicht typisch angesehen werden konnte, wurde der Käse sensorisch als tilsitertypisch eingestuft. Auffällig war die Unempfindlichkeit gegenüber Schimmel zu Beginn der Reifung. Dieses könnte in dem angewandten „Alt-Jung-Schmierverfahren“ begründet sein. Es wurde bereits berichtet, dass mit dem Schmierwasser nicht nur physiologisch an die Käsoberfläche adaptierte Mikroorganismen, sondern auch Stoffwechselprodukte mit teilweise schimmelhemmender Wirkung auf die grünen Käse aufgebracht werden (Beattie und Torry, 1986; Lewis, 1981, 1982;).

Da das Auftreten von Keimen der Hausflora nicht ausgeschlossen werden konnte erfolgte eine Überprüfung der Zusammensetzung der Oberflächenflora der Versuchschargen im Reifungsverlauf mittels Stammdifferenzierung über PFGE. Wie die PFGE-Ergebnisse belegen, konnten alle eingesetzten coryneforme Stämme auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ein coryneformer Stamm der Hausflora isoliert werden. Bei der Überprüfung der Staphylokokken konnten zwei unterschiedliche Kontaminationsstämme bestätigt werden. Über ARDRA erfolgte eine weitere Identifizierung auf Speziesebene. Die getesteten Stämme konnten der Spezies *S. equorum* zugeordnet werden. Diese Spezies wurde bereits öfter als natürliche Hausflora von Käsereien beschrieben (Bockelmann et al., 2002; Place et al., 2003). Dass die ökologische Nische der Staphylokokken durch Stämme der Hausflora besetzt wurde, ist auf die niedrige Animpfkonzentration von  $10^4$  KBE/ml in der Arbeitsschmiere zurückzuführen. Vorgesehen war eine Keimzahl von  $10^8$  KBE/ml.

### **Farbentwicklung**

Bei den Versuchsansätzen zeigten sich erhebliche Unterschiede in den Erscheinungsbildern der Käse. Die Charge 3 zeigte zum Reifungsende eine dunkelbraunrote Färbung, wohingegen Charge 4 eher eine dunkel-rot-orange Färbung aufwies. Im Gegensatz dazu war der Farbton der Kontrollcharge dunkel-gelb-orange. Dieser Farbton wurde als eher tilsitertypisch angesehen.

Der deutlich rote Farbton der Charge 3 lässt sich auf die starke Präsenz von *M. gubbeenense* zurückführen. Nach Hoppe-Seyler (1998) und Bockelmann et al. (1997b) wird der Rotanteil von gelbpigmentierten *M. gubbeenense* Stämmen synthetisiert, hierzu werden schwefelhaltige Aminosäuren benötigt. Diese werden durch proteolytische Aktivitäten von *B. linens* Stämmen freigesetzt. Ferner führen zusätzlich alkalisierende Stoffwechselaktivitäten der *B. linens* Stämme zur Entwicklung des roten Farbstoffes (Hoppe-Seyler, 1998). Der bei der Charge 4 deutlich ausgeprägtere Orange-Farbton lässt sich durch die recht hohen Keimzahlen von *B. linens* erklären. Aufgrund der Bildung eines orangefarbenen Carotinoids nehmen sie mit Einfluss auf die Farbgebung der Käse (Busse, 1989; Rattray und Fox, 1999). Neuere Studien zeigten, dass Interaktionen zwischen *B. linens* und *D. hansenii* einen Anteil an der Intensität der Farbentwicklung nehmen können (Leclercq-Perlat et al., 2004). Dieses konnte für die Versuchskäsungen nicht bestätigt werden.

Ogleich in beiden Versuchschargen fast eine identische Kulturenzusammensetzung aufgebracht worden war, zeigten sich deutliche Abweichungen im Erscheinungsbild der Käse. Dieses deutet darauf hin, dass nicht nur die eingesetzten Stämme, sondern auch deren Konzentration auf der Oberfläche Einfluss auf die Farbentwicklung nehmen.

Bei der Kontrollcharge war im gesamten Reifungsverlauf die beigefarbene coryneforme Bakterienflora vorherrschend. Stämme der Spezies *B. linens* nahmen eine deutlich untergeordnete Rolle ein. Das Fehlen des rötlichen Farbtons bei der Kontrollcharge könnte auf die Abwesenheit von Mikrobakterien Spezies bzw. *Arthrobacter* spp. zurückzuführen sein. Durch welche Reaktionen die Farbbildung von den beigefarbenen coryneformen Bakterien beeinflusst wird, ist noch nicht geklärt. Dass sie einen Einfluss nehmen, wurde bereits mehrfach dokumentiert (Hoppe-Seyler, 1998; Seiler, 1986).

### **Aroma**

Die Versuchskäse wurden vom Hannah Research Institute, Schottland und NIZO Food Research, Niederlande, auf typische Aromakomponenten analysiert. Es zeigte sich, dass die definierten Starterkulturen ein ähnliches Spektrum von Aromakomponenten freisetzen, jedoch waren Verbindungen, die sich aus dem Aminosäureabbau ergaben in geringeren Konzentrationen vorhanden. Ein deutlicher Unterschied lag bei den aromatischen Schwefelverbindungen, vor allem von Methanthiol, vor. Diese für den Rotschmierekäse als entscheidende Aromakomponente beschriebene Verbindung (Rattray und Fox, 1999; Sharpe et al., 1977) konnte auf den Versuchskäsen gar nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Bildung von Methanthiol wurde lange Zeit hauptsächlich der Spezies *B. linens* zugeschrieben (Dumont und Adda, 1979; Sharpe et al., 1977). Neuere Studien konnten jedoch den Nachweis erbringen, dass auch andere Bakterien der Rotschmiereflora zur Bildung dieser Aromakomponente befähigt, und über

extrazelluläre Proteasen aktiv an Abbauprozessen beteiligt sind (Bonname et al., 2000; Smacchi et al., 1999a, b).

Bei der sensorischen Analyse (Geruch und Geschmack) wurden die Käse der Versuchschargen als tilsitertypisch bewertet. Vergleicht man dieses mit der Analyse der Aromakomponenten von Hannah Research Institute, Schottland und NIZO Food Research, Niederlande, wäre dieses nicht zu erwarten gewesen. Es stellt sich die Frage, in welcher Konzentration diese Komponenten tatsächlich auf der Oberfläche vorhanden sein müssen. Es ist davon auszugehen, dass die meisten Analysen von Oberflächenkomponenten an Käsen durchgeführt wurden, welche nach dem „Alt-Jung-Schmierverfahren“ gereift worden waren. Folglich werden zusätzlich Stoffwechselprodukte und flüchtige Aromakomponenten über das Schmierwasser aufgebracht (Beattie und Torry, 1986; Lewis, 1981; 1982). Dieses kann durch eine immer neu angesetzte Kultur nicht erfüllt werden. Wenn dieses jedoch entscheidend für einen typischen Tilsiter wäre, müssten über Alternativen, wie das Zusetzen von Methionin und Cystein, nachgedacht werden. Es wäre von Interesse zu wissen, inwieweit die Versuchskäse nach einer rein sensorischen Analyse von dem Standard eines „Alt-Jung-geschmierten“ abweichen.

### **Charge 3a**

Da infolge der Reifungsstörungen und der zu niedrigen Animpfkonzentration der Versuchsschmiere ein verzerrtes Bild der Praxistauglichkeit gegeben wurde, erfolgte eine Wiederholung der Käsungsversuche. Das Probevolumen entsprach dem des ersten Versuchsdurchlaufes. Wieder wurden zwei Starterkulturen getestet. In der Charge 3a kamen die gleichen Zusammensetzungen der Arbeitsschmiere in Anwendung wie in Charge 3. Es kam jedoch zu einer Erhöhung der Bakterienkeimzahl auf  $10^8$  Kbe/ml. In der Charge 6 wurde ein Mehrstammstarter getestet, der jedoch aufgrund seiner Komplexität für den industriellen Einsatz nicht vorgesehen war. Beide Käsechargen wurden im Reifungsverlauf nur zweimal geschmiert, einmal zu Beginn der Reifung nach dem Salzbad, und ein weiteres Mal nach 14 Tagen.

Wie auch im ersten Versuchsdurchlauf war nach vier Tagen ein pH-Wert um 6,0 auf der Oberfläche erreicht. Eine sichtbare Entwicklung der Schmiere setzte abermals verzögert ein. Es kam jedoch nicht zu einer Kontamination mit Grünschimmel. In der zweiten Woche überzog die Schmiere einheitlich die gesamte Käseoberfläche. Die Keimzahl lag mit  $10^9$  Kbe/cm<sup>2</sup> in einem für Rotschmierkäse typischen Bereich (Accolas et al., 1978; El-Erian, 1969; Eliskases-Lechner und Ginzing, 1995a; Keller und Puh, 1985; Piton-Malleret und Gorriere, 1992)

Nach zwei Wochen Reifung bildeten *B. linens* (43,0%) und die beigefarbene coryneforme Bakterienflora (40,1%) den Hauptanteil der bakteriellen Schmiere, mit in der beigefarbene



Flora enthalten war *B. casei*. Zwischen der zweiten und vierten Reifungswoche vollzog sich ein Dominanzwechsel innerhalb der Bakterienflora. Den größten Anteil stellten die beigefarbenen coryneformen Bakterien mit 87,9%. Aufgrund der deutlich höheren Animpfkonzentration der Staphylokokken konnten sich diese im gesamten Reifungsverlauf auf der Oberfläche etablieren. Die Reifung vollzog sich ohne äußere Störungen, so dass sich ein Gleichgewicht auf der Käseoberfläche einstellen konnte. Das Erscheinungsbild der Käse war gelb-bräunlich, unterschied sich somit vom dunkel-braunroten Farbton der Charge 3. Dieses lässt sich zum Teil auf die geringere Keimzahlen der Spezies *M. gubbeenense* zurückführen, welche maßgeblich den Rotanteil synthetisiert (Bockelmann et al., 1979b; Hoppe-Seyler, 1998).

Bei der Überprüfung der Stämme mittels PFGE konnte nachgewiesen werden, dass sich die aufgebrachte Kultur gegen die Hausflora durchsetzen konnte. Es waren keine Fremdkontaminanten nachzuweisen. Eine Besonderheit trat bei der Überprüfung der Staphylokokken auf. Der Stamm *S. equorum* Staph2 zeigte ein abweichendes Bandenmuster zu dem eingesetzten lyophilisierten Staph2. Die Interpretation der Bandenmuster muss unter Berücksichtigung von verschiedenen genetischen Ereignissen erfolgen. Die Interpretation von gleichen Bandenmustern der verschiedenen getesteten Stämme ist einfach. Unterscheiden sich die Fragmentmuster nur minimal, können Ereignisse wie Punktmutationen, Insertion und Deletion vorliegen (Tenover et al., 1995). Eine Gegentestung der Isolate zu dem von Rhodia-Food produzierten Lyophilisates ergab eine Übereinstimmung im Bandenmuster. Der Kulturstamm wurde ursprünglich von der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, zur Verfügung gestellt. Vermutlich wurde aufgrund der Trocknung eine genetische Veränderung hervorgerufen, welche zu einer Abänderung im Bandenmuster führte. Diese Stämme sind nicht mehr identisch, jedoch sehr eng verwandt (Tenover et al., 1995).

#### 4.4.2 Weichkäse

Charakteristisch für Weichkäse mit Schmierebildung ist eine schnelle Reifung, sowie eine starke Proteolyse und Lipolyse (Reps, 1993). Im Unterschied zu Schnittkäse erreicht Weichkäse innerhalb von 14 Tagen die Konsumreife. Im jungen Zustand sind sie oft fest und verlieren den „festen Kern“ erst allmählich. So zeigt sich häufig erst mit zunehmender, von außen beginnende Reifung, die weiche Konsistenz, der der Weichkäse seinen Namen verdankt. Weichkäse haben eine vergleichsweise niedrige Trockenmasse und einen NaCl-Gehalt bis 2,5% (Wessinger, 1981). Bedingt durch die rasche Reifung, die geringere Selektion durch hohe Temperaturen, also insgesamt günstigere Lebensbedingungen, können Kontaminationskeime leichter überleben.

Bei den Oberflächenanalysen kommerzieller Weichkäse zeigten sich Übereinstimmungen in der Zusammensetzung mit der Schmiere oberflächengereifter Schnittkäse (Bockelmann, 2003; Brennan et al., 2002; Eliskases-Lechner, 1995a, 1995b; Hoppe-Seyler, 1998), jedoch konnten unterschiedliche Mengenverhältnisse der einzelnen Gattungen festgestellt werden. So zeigten sich für die gelb-pigmentierte Flora deutlich höhere Anteile, bis zu 80% an der bakteriellen Gesamtkeimzahl. Für Schnittkäse macht diese Fraktion maximal 5% aus. Durch partielle Sequenzierung der 16S rDNA erfolgte eine Zuordnung zu der von Brennan et al. (2001a) beschriebenen Spezies *Microbacterium gubbeenense*, zusätzlich konnten zu einem geringeren Anteil *Arthrobacter* spp. nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für das starke Auftreten von *M. gubbeenense* auf Weichkäse könnte die industrielle Anwendung einer 10% NaCl-Konzentration im Schmierwasser sein. Von Brennan et al. (2002) wurde bereits die Salztoleranz dieser Spezies beschrieben, was ihnen einen Selektionsvorteil gegenüber *Arthrobacter* spp. verschafft. Der von Hoppe-Seyler (1998) und Bockelmann (2003) beschriebene dominante Anteil von beigefarbene *Corynebacterium* spp. für Schnittkäse konnte für Weichkäse nicht bestätigt werden. Ihr Anteil an der Oberflächenflora lag meistens unter 50%. Eine Übereinstimmung ergab sich bei der Spezies *B. linens*. Diese Spezies nahm nur zu einem geringen Maß Anteil an der Oberflächenflora. Für eine Käserei ergaben sich hohe Anteile (bis 35%) an beweglichen, hellorange-pigmentierten Stäbchen, die als *Halomonas* spp. identifiziert werden konnten. Ähnliche orangefarbene, bewegliche Bakterien wurden bei regelmäßigen Untersuchungen von Käsen des gleichen Herstellers über mehrere Jahre nachgewiesen. Das Vorkommen von *Halomonas* spp. wurde auch schon von Maoz et al. (2003) auf Weichkäse beschrieben. In sehr geringen Keimzahlen konnten zusätzlich noch Staphylokokken von der Oberfläche isoliert werden. Auf allen aus dem Handel gezogenen Proben konnten Verunreinigungen mit Enterokokken, Pseudomonaden und Enterobakterien nachgewiesen werden. Die mikrobiologischen Anforderungen, die an das verzehrfähige Produkt gestellt werden, konnten jedoch von allen untersuchten Proben eingehalten werden. Für die Hefeflora konnte neben der aus dem Schnittkäsebereich bekannten Hefe *Debaryomyces hansenii* zusätzlich der sogenannte Milchsimmel, *Geotrichum candidum*, nachgewiesen werden. Dieses steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Jollivet et al. (1994) und Martin et al. (2001).

#### 4.4.2.1 Versuchskäse

An der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel, wurden unterschiedliche Versuchsansätze zur Herstellung von limburg-ähnlichen Käse durchgeführt. Zum Ausschluss der käsereieigenen Hausflora erfolgte die Produktion der Versuchskäse in Kooperation mit dem Institut für Verfahrenstechnik, Kiel. In einem Produktionsdurchlauf konnten 16-17 Käse mit einem Gewicht von je 150 gr. in der typischen Backsteinform hergestellt werden. Zur besseren Überprüfung der Ergebnisse wurden zwischen drei und sechs Versuchskäse

pro Charge verwendet. Die Kulturen wurden vor dem Schmieren aus aufkonzentrierten und lagerungsfähigen Bakteriensuspensionen der einzelnen Stämme zusammengemischt. Auf die Zugabe von Staphylokokken und *Debaryomces hansenii* in der Arbeitsschmiere wurde verzichtet, da diese Spezies im Salzbad enthalten waren.

### Charge W1- W3

In den Käseversuchen der Charge W1-W3 wurden unterschiedliche Mischkulturen aus dem Schnittkäsebereich getestet. Für diese Versuche wurde auf die Zugabe von *Geotrichum candidum* verzichtet, welche zusammen mit *Debaryomces hansenii* als die typische Hefeflora für Weichkäse beschrieben wurde (Arfi et al., 2003a,b; Jollivet et al., 1994; Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002). Die Oberflächenkulturen setzten sich aus den Gattungen *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. und *Arthrobacter* spp. zusammen. In der Charge W2 wurde auf die Zugabe von *Arthrobacter* spp. verzichtet. Nach dem Salzbad, welches neben *D. hansenii* den kommerziell erhältlichen *Staphylococcus xylosus* enthielt, erfolgte das Beizen der Käse bei 20°C. Nachdem die Versuchskäse ca. einen Tag bei 20°C gereift wurden, zeigte sich eine schwache Gelbfärbung auf der Oberfläche. Der Geruch der Käse war deutlich hefig. Die erste Schmierebehandlung erfolgte nach dem Beizen, eine zweite drei Tage später. Die Entsäuerung der Käseoberfläche verlief bei allen Versuchskäsen sehr langsam. Im Vergleich zu Schnittkäse konnte eine Verzögerung von fünf Tagen festgestellt werden. Die aufgebrachten Rotschmierebakterien konnten sich auf der Käseoberfläche nur schwach entwickeln und keinen ausreichenden Schutz vor Fremdkontamination bilden, sodass sich, wie schon von Sauter (1986) und Busse (1989) beschrieben, Grünschimmel auf der Oberfläche entwickeln konnte.

Bei allen Versuchskäsen kam es zum Ende der ersten bzw. zu Beginn der zweiten Reifungswoche zu einer langsamen Ausbildung einer Oberflächenschmiere mit Farb- und Geruchsentwicklung. Die Käseoberfläche zeigte bei allen Versuchskäsen eine fleckige gelb-braune Färbung, wobei die Kanten eine deutlich fleischrote Verfärbung aufwiesen. Ein Abstrich aus dieser Region auf mMA-Agar erbrachte eine sehr hohe Keimzahl von *Corynebacterium* spp.. Hoppe-Seyler (1998) beschrieb bereits, dass in Gegenwart von *Corynebacterium* spp. es zu einer untypischen Rotfärbung vor allem der Kanten kommen kann. Dieses lässt sich auf Weichkäse übertragen. Die Kanten zeigten nicht nur eine untypische Verfärbung, sondern auch ein Abfließen. Dieses verstärkte sich im Verlauf der Reifung so, dass der Versuch abgebrochen werden musste. Es ist nicht genau zu klären, ob es an einer starken Proteolyse der Bakterien und/oder des Schimmels lag. Eine weitere Möglichkeit ist das Fehlen der Hefe *G. candidum*, welche nach Marcellino et al. (2001) einen entscheidenden Anteil an der Textur und Festigkeit der Käse hat. Zusätzlich kam es

zu einer untypischen und unangenehmen Geruchsentwicklung. Es waren eindeutig fruchtige sowie fischige und schimmelähnliche Komponenten enthalten.

### Charge W4-W5

Für die Versuchschargen W4 und W5 wurde eine Kombination der Hefen *D. hansenii* und *G. candidum* für die Reifung verwendet. Dieses entspricht den Ergebnissen der Oberflächenanalysen handelsüblicher Weichkäse. In der Literatur wird ebenfalls bestätigt, dass sich die Hefeflora bei Weichkäse aus den Spezies *D. hansenii* und *G. candidum* zusammensetzt (Jollivet et al., 1994; Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002). Auf Grund der Wachstumsrate, des Aussehens, des Geruchs und der Entsäuerungseigenschaften wurden die *G. candidum* Stämme 6215 und 6216, Isolate von Harzerkäse, eingesetzt. Im Verlauf der Versuche zeigte der Stamm 6216 vom Aussehen und Aroma das deutlich bessere Ergebnis.

In den Versuchschargen W4 und W5 erfolgte eine Animpfung der Kesselmilch mit *G. candidum*. In den Käseereien ist diese Maßnahme nicht notwendig, da sich der Milchsimmel als Hausflora in der Produktionsstätte etabliert hat.

Für die Starterkulturen wurden unterschiedliche Kombinationen von Rotschmierebakterien eingesetzt. Hierbei wurden für die Charge W4 ausschließlich drei orange pigmentierte *B. linens* Stämme verwendet, für die Charge W5 wurde eine Mehrstammkultur aufgebracht. Die Kultur setzte sich aus den gelbpigmentierten Stämmen *M. gubbeenense* und *A. rhombi*, den orangefarbenen *B. linens* und *Halomonas* spp. zusammen. Auf den Einsatz von Corynebakterien wurde in diesem Ansatz verzichtet. Um die Produktions- und Reifungsbedingungen zu überprüfen, wurde ein Kontrollansatz mit einbezogen. In der Kontrollcharge fand keine Behandlung mit einer Oberflächenkultur statt.

Nach dem Salzbad, welches eine Temperatur von 20°C hatte, erfolgte das Beizen. Die grünen Käse wurden für 24-26 h bei 20°C und 98% rLf „vorgereift“. In dieser Zeit konnte sich auf der Oberfläche aller Versuchskäse die Hefe *G. candidum* etablieren. Nach zwei Tagen überzog das Mycel dieser Hefe die gesamte Käseoberfläche. Hier zeigte sich, dass *G. candidum* im entscheidenden Maße die Textur und die Dicke der „Rinde“ bestimmte (Marcellino et al.; 2001; Martin et al., 2001). Die erste Oberflächenbehandlung fand nach dem Beizen und Abkühlen auf ca. 18°C statt. Nachfolgend wurden die Käse weitere dreimal einer Oberflächenbehandlung im Abstand von zwei Tagen unterzogen. Die Reifung wurde bei 16–17°C und >90% rLf für 14 Tage weitergeführt. Damit es zu keiner Verformung der Käsestücke kam, wurden diese am ersten, vierten und achten Tag gewendet.

Die Alkalisierung der Käseoberfläche verlief nahezu identisch zu der der Chargen W1-W3. Ein pH-Wert von 6,0 wurde erst nach neun Tagen erreicht. Im Gegensatz zu den Chargen W1-W3 konnte sich jedoch kein Schimmel auf der Käseoberfläche durchsetzen. Dieses ist wahrscheinlich auf die Präsenz des Milchsimmels *G. candidum* zurückzuführen, welcher den gesamten Käse bedeckte. Bei der Vergleichscharge zeigte sich der gleiche Schutz gegen Schimmel auch ohne Rotschmiereflora. Für Weichkäse scheint die Bedeutung der Hefen für die Entsäuerung entscheidender zu sein als bei Schnittkäse. Im Gegensatz zu Schnittkäse zeigte der Weichkäse ohne Oberflächenbehandlung eine Alkalisierung der Oberfläche über pH 6,0. Durch die intensive Oberflächenbehandlung mit immer wieder frisch angesetzter Reifungskultur kam es zum Ende der ersten Reifungswoche zu einem Anwachsen der Rotschmiereflora.

Für die Charge W4 konnte ein gutes Anwachsen der *Brevibacterium linens* Stämme dokumentiert werden. Zusätzlich zu *B. linens* konnte die Flora des Salzbadens auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Bis zum Verpacken der Käse wurden ausschließlich die Kolonietypen auf modifiziertem Milchagar gefunden, die den eingesetzten Stämmen identisch waren. Nach zwei Wochen wurden die Käse verpackt, und für weitere zwei Wochen bei 8°C gelagert. Bei der Abschlussanalyse zeigte sich, dass sich Fremdkontaminanten auf der Oberfläche befanden. Es ist davon auszugehen, dass diese Keime beim Verpackungsvorgang auf die Käse gelangt sind. Das Erscheinungsbild der Käse war deutlich orangerötlich, welches im Zusammenhang mit der Ausbildung des carotinoinden orangefarbenen Pigmentes aus der Zellwand von *B. linens* gesehen werden kann (Burri, 1999; Rattray und Fox, 1999). Der Geschmack und Geruch war sehr ausgeprägt, und konnte als eher untypisch angesehen werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Bockelmann et al. (2002) und Hoppe-Seyler (1998) welche ebenfalls durch den Einsatz einer Monokultur nicht die geforderten Kriterien eines Rotschmierekäses erfüllen konnten.

Bei der Charge W5 konnten ebenfalls alle eingesetzten Bakterien auf der Oberfläche nachgewiesen werden. In der ersten Reifungswoche stellte die gelbpigmentierte Flora bestehend aus *M. gubbeenense* und *A. rhombi* den Hauptanteil der Bakterienflora. Dieses änderte sich in der zweiten Reifungswoche. Es kam zu einem untypisch hohen Anwachsen von *B. linens*. Bis zum Versuchsende stellten sie den Hauptanteil der Oberflächenflora. Die Analyse nach vier Wochen zeigte ein ähnliches Erscheinungsbild wie bei der Charge W4, jedoch wurde der Geschmack und Geruch als bedeutend angenehmer und als typisch bewertet.

Im Gegensatz zu *D. hansenii* ist *G. candidum* nicht nur für die Entsäuerung der Oberfläche von Bedeutung, sondern nimmt zusätzlich Einfluss auf den Geruch und den Geschmack der Käse. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *G. candidum* verschiedene

Schwefelkomponenten bildet, welche mit denen von *B. linens* vergleichbar sind (Arfi et al., 2003a; Berger et al., 1999; Martin et al., 2001; Spinnler, 2001; Wyder und Puhan, 1999). Es ist wahrscheinlich, dass der sehr intensive Geschmack und Geruch der Charge W4 auf die übermäßige Bildung von schwefelhaltigen Aromakomponenten durch *G. candidum* und *B. linens* zurückzuführen ist. Obwohl in der Literatur ein aromatischer Einfluss von *D. hansenii* beschrieben wurde (Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002), erwiesen sich die getesteten Stämme als kaum aromatisch. Eine Besonderheit trat bei der Farbentwicklung auf. Es schien so, als hätte die aufgebrachte Kultur keinerlei Einfluss auf die Farbgebung. Alle Käse zeigten ein deutlich orangefarbenes Erscheinungsbild. Eine mögliche Erklärung könnte in der von Leclercq-Perlat et al. (1999, 2004) beschriebenen Interaktion zwischen *D. hansenii* und *B. linens* liegen. Durch diese Interaktion soll maßgeblich die Farbgebung der Weichkäse beeinflusst werden.

#### 4.4.3 Sauermilchkäse

Im Gegensatz zu Labkäse wird Sauermilchkäse aus einem aus Magermilch produzierten Sauermilchquark gefertigt. Die Dicklegung der Magermilch erfolgt hierbei durch Milchsäurebakterien. Nach der Käseverordnung (Käse VO §3 Abs.2b) ist es zwar gestattet Lab hinzuzugeben, jedoch wird im Allgemeinen auf die Zugabe verzichtet, da es aufgrund der Lagerungsfähigkeit von ca. zwei Monaten (pers. Mitteilung Sachsenmilch AG, Leppersdorf) durch das Lab zu einer unerwünschten Eiweißspaltungen kommen kann, wodurch die Qualität des Quarks herabgesetzt würde (Wessinger, 1981). In der Regel erfolgt eine Weiterverarbeitung innerhalb einer Woche. Da es sich bei den „Quarkereien“ zumeist um Zulieferfirmen handelt, wird für die Weiterverarbeitung der Quark zur jeweiligen Produktionsstätte unter Einhaltung der Kühlkette transportiert.

In den Käsereien wird die Quarkmasse mit Reifungssalzen und Kulturkäse (2-4%) versetzt und für 2-3 Tage gereift. Die Zugabe der Kulturkäse stellt eine etwas andere Form des „Alt-Jung-Schmierversfahrens“ dar. Als Kulturkäse werden Sauermilchkäse eingesetzt, welche bereits zwei Wochen gereift sind. Diese Käse stammen aus der eigenen Produktion. Durch den Einsatz dieser weit in der Reifung fortgeschrittenen Käse wird eine bereits etablierte Flora in die Quarkmasse eingebracht, und somit auf die jungen Käse übertragen. Dieses Verfahren ist dem Alt-Jung-Schmieren der bereits beschriebenen Käsen gleichzusetzen (Bockelmann et al., 1997a; 2002, 2003; Eliskases-Lechner, 1995b; Hoppe-Seyler, 1998). Im Verlauf der Arbeit wurde von fünf deutschen Sauermilchkäseherstellern Kulturkäse, die über zwei Wochen gereift waren, auf Hefen, Schimmel und Bakterien hin untersucht. Auffällig war bei den bakteriellen Keimzahlen eine große Varianz, sie lag zwischen  $10^6$  bis  $10^{10}$  KbE/cm<sup>2</sup>. Im Vergleich dazu wird die Keimzahl für Schnittkäse mit einer Schwankungsbreite von  $10^8$  bis  $10^{10}$  KbE/cm<sup>2</sup> angegeben (Accolas et al., 1978; El-Erian, 1969; Eliskases- Lechner und Ginzing, 1995a). Die Mikroflorazusammensetzung

der Oberfläche der Kulturkäse zeigte eine Übereinstimmung zu Schnittkäse in Bezug der beige-pigmentierte *Corynebacterium* Spezies, welche einen entscheidenden Anteil an der Oberflächenflora einnahmen (Bockelmann et al., 1997a, 2003). Für die Kulturkäse konnten gelbpigmentierte coryneforme Bakterien (*Arthrobacter*, *Microbacterium* Spezies) selten und nur in äußerst geringen Keimzahlen auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Im Unterschied zu Weich- und Schnittkäse konnte bei den Sauermilchkäsen hohe Keimzahlen an *Brevibacterium linens*, teilweise bis zu 50% der Gesamtkeimzahl, nachgewiesen werden. El-Erian (1969) und Eliskases-Lechner (1995a) beschrieben für Schnittkäse Maximalwerte von 30% für diese Spezies. In weiteren Untersuchungen konnte dieser Wert jedoch nicht bestätigt werden. Es konnten nur maximale Anteile bis zu 15% festgestellt werden (Bockelmann et al., 2000, 2003; Hoppe-Seyler, 1998). In ebenfalls hohen Keimzahlen traten Staphylokokken auf der Oberfläche auf. Diese Gattung bildete zwischen 5-87% der Gesamtflora. Eine genauere Analyse der isolierten Staphylokokken wurde mit dem ID32 Staph (BioMérieux) und der von Vaneechoutte et al. (1992) beschriebenen molekularbiologischen Methode (ARDRA) durchgeführt. Der verwendete physiologische Test Staph ID 32 zeigt sich für koagulase-negative Staphylokokken als ungenau (Irlinger et al., 1997; Renneberg et al., 1995; Rossi et al., 2001). Durch Anwendung beider Methoden konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass der Hauptteil der Staphylokokkenflora von *S. saprophyticus* gestellt wurde. Weiter konnten die Spezies *S. xylosus* und *S. equorum* nachgewiesen werden. Die Spezies *S. saprophyticus* wird bei den potentiell pathogenen Keimen (Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, 1992) eingestuft und ist deshalb nicht auf Lebensmitteln erwünscht. Der erste Verdacht, dass es sich bei diesen Kontaminanten durch unsauberes Arbeiten bei der Quarkherstellung handeln könnte, konnte durch Untersuchungen von Bockelmann et al. (2002) widerlegt werden. Der Quark der einzelnen Erzeuger war mikrobiologisch nicht zu beanstanden. Die Quelle der auftretenden *S. saprophyticus* Kontaminationen dürften saure und salzhaltige Oberflächen in den Produktionsanlagen sein, welche schwer zu reinigen sind (Mischer für Quark und Salz). Desweiteren konnten als Rekontaminationskeime Enterokokken und coliforme Bakterien nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Analyseergebnisse der Kulturkäse mit den aus dem Handel gezogenen Proben, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung in dem Keimspektrum. So konnten nicht nur die Rotschmierebakterien auf den Konsumproben vorgefunden werden, sondern auch der in Lebensmitteln unerwünschten *S. saprophyticus*, coliformen Bakterien und Enterokokken. Die Keimzahlen standen in guter Übereinstimmung zu denen der Kulturkäse. Hier wird deutlich, dass die Kontamination mit unerwünschten Keimen auf das Animpfen mit Kulturkäse zurückzuführen ist. Die vorgefundene Kontaminationsflora war fast identisch mit der von Feder (1981) beschriebenen. Dieses deutet auf ein bereits langanhaltendes Problem bei der Produktion von Sauermilchkäse hin.

#### 4.4.3.1 Käseversuche

Da sich Sauermilchkäse durch eine sehr kurze Reifungszeit von nur 2-3 Tagen auszeichnet, ist auf die Zugabe eines Kulturkäses nicht zu verzichten. Durch Untersuchungen konnte eine Übertragung von unerwünschten Bakterien durch Kulturkäse auf junge Käse nachgewiesen werden. Um den Kontaminationskreislauf zu unterbrechen ist es unerlässlich die Kulturkäse nicht mehr der Produktion zu entnehmen, sondern wie eine Starterkultur separat zu produzieren.

#### Charge S1–S2

Für die ersten Versuchskäsungen der Chargen S1 und S2 wurde ein keimarmer Sauermilchquark aus der laufenden Produktion der Sachsenmilch AG, Leppersdorf, verwandt. Zwischen der Produktion des Sauermilchquarkes und der Weiterverarbeitung verging mehr als eine Woche. Der Quark wurde in dieser Zeit bei 4°C gelagert.

Für die Charge S1 kam ein bereits erprobter Minimalstarter aus dem Bereich der Tilsiterkäserei in Anwendung. Die verwendete Sprühkultur enthielt das gesamte Keimspektrum, welches auch auf einem qualitativ gut gereiften Tilsiterkäse vorzufinden ist (Bockelmann et al., 1997a; Brennan et al., 2002; Eliskases-Lechner, 1995; Hoppe-Seyler, 1998). Für die Alkalisierung der Quarkmasse wurde die für Schnittkäse typische Hefe *D. hansenii* (DH 6004) verwendet. Bei der Charge S2 handelte es sich um eine Kontrolle zur Überprüfung der Reifungsbedingungen. Diese Versuchskäse wurden nach dem Prinzip der „Alt-Jung-Strategie“ beimpft und mit der in der Industrie gebräuchlichen *B. linens* Kultur besprüht. Der verwendete Kulturkäse wurde von einem Hersteller zur Verfügung gestellt.

Das Animpfen der Quarkmasse mit *D. hansenii* bzw. dem Kulturkäse erfolgte im gleichen Produktionsschritt wie die Zugabe der Reifungssalze. Bei dem nachfolgenden Mischen wird eine gleichmäßige Verteilung der Zutaten und Kultur sichergestellt. Nach der Ausformung wurden die Quarkkäse bei 30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 -100% im Schwitzraum für 24h gelagert. Es handelt sich bei diesem Schritt um ein Vorreifen der Quarkmasse. Wie bei allen oberflächengereiften Käsen stellt die Alkalisierung der Oberfläche eine wichtige Grundvoraussetzung für die Entwicklung der Rotschmiereflora dar (Busse, 1989, Rattray und Fox, 1999; Seiler u Busse, 1990). Der für die Herstellung von Sauermilchkäse verwandte Quark stellt ein saures Medium dar, mit einem pH-Wert von 3,7 bis 4,0. Zur Neutralisation eines Teils der Säure werden in der Sauermilchkäserei die Reifungssalze Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) und Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) verwendet. Durch die Zugabe dieser Salze wird eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0-5,2 in der Quarkmasse erreicht. Dieser pH-Wert entspricht dem der Käse nach dem Salzbad. Zusätzlich bewirken die Salze eine gleichmäßige speckige



Durchreifung des Sauermilchkäses und verhindern dessen Abfließen (Wessinger, 1981). Durch die recht hohen Temperaturen und Luftfeuchtigkeit wird das Anwachsen der Hefeflora im Schwitzraum begünstigt. In dieser Zeit entwickelt sich prinzipiell eine gut erkennbare, ca. 2 mm dicke Hefeschicht, welche aufgeklart ist und fettig glänzt. In Charge S1, welche nur mit *D. hansenii* angeimpft worden war, kam es zu keiner Ausbildung einer solchen Schicht. Eine Überprüfung des Oberflächen-pH-Wertes zeigte ebenfalls nur eine minimale Veränderung. Der gemessene Wert lag nach dem Schwitzraum bei pH 5,4. Zu erwarten wäre ein Wert von deutlich über pH 6,0 (mündliche Mitteilung Sachsenmilch AG, Leppersdorf). Dieser Wert wurde von der Kontrollcharge S2 erreicht. Es zeigte sich, dass die Hefe *D. hansenii* nicht zur schnellen Entsäuerung der Quarkmasse geeignet war. In diesem Versuchsansatz lässt sich die pH-Wert-Veränderung hauptsächlich auf die eingesetzten Reifungssalze zurückführen.

Nach dem Schwitzraum erfolgte eine einmalige Behandlung der Charge S1 mit der von Bockelmann et al. (1997a) beschriebene Rotschmierekultur. Nach dem Aufsprühen schloss sich ein 24stündiger Reifungsschritt bei 12°C (rLf 85%) an. Innerhalb dieser Zeit kam es zu einem langsamen Anwachsen der aufgetragenen Rotschmierebakterien. Die weitere Reifung vollzog sich bei 8°C bis zum Versuchsende. In dieser Zeit bildete sich eine für Harzer untypische Schmiere aus. Das Erscheinungsbild der Käse war fleckig und rötlich-braun mit abfließenden Rändern. In der industriellen Produktion ist das Abfließen der Ränder meistens auf das gemeinsame Auftreten von *Mycoderma*- und *Geotrichum*-Arten zurückzuführen, infolge des gesteigerten proteolytischen Abbaues kommt es zu dem genannten Reifungsfehler (Münch und Grillenberger 1989). Bei den Oberflächenanalysen konnten hohe Keimzahlen für die proteolytisch aktiven Stämme *M. gubbeenense* und *B. linens* nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass deren Stoffwechselaktivitäten zum Abfließen der Ränder geführt haben. Des Weiteren kam es zu einer untypischen Geruchsentwicklung. Ebenso war die Farbentwicklung für Harzer untypisch. Das Auftreten des rötlich-braunen Farbtons zeigte Parallelen zu der Charge 3 (Schnittkäse). Auch hier konnte eine untypische rote Färbung mit der starken Präsenz von *M. gubbeenense* in Verbindung gebracht werden. Untersuchungen von Hoppe-Seyler (1998) und Seiler (1986) zeigten, dass die Entwicklung der roten Farbe in Zusammenhang mit den gelbpigmentierten *M. gubbeenense* zu sehen ist. Auffällig bei den Käsen dieser Charge war, dass die coryneformen Bakterien auf der Oberfläche im gesamten Reifungsverlauf eine untergeordnete Rolle spielten. Die dominante Flora stellte die Spezies *B. linens*, mit einem Anteil von 60% an der Gesamtflora. Eine mögliche Erklärung sind die günstigen Temperaturbedingungen am Anfang der Reifung.

Neben dem untypischen Erscheinungsbild zeigte sich im gesamten Reifungsverlauf eine inhomogene Reifung mit massiven Quarkkern-Einschlüssen. Die Reifung der Kontrollcharge S2 vollzog sich wie auch von Feder (1981), beschrieben ohne Störungen von außen

nach innen. Nach drei Wochen war der Quarkkern fast vollständig durchgereift. Daher ist dieses Problem nicht auf die verwendete Quarkmasse zurückzuführen, obwohl auch ein zu feinkörniger Quark zu dem beschriebenen Problem führen kann (Wessinger, 1981). Eine Erklärung hierfür kann die mangelnde Stoffwechsellistung der Hefe *D. hansenii* sein.

Der Reifungsverlauf der Kontrollcharge S2 verlief wie auch in der Literatur beschrieben einheitlich von außen nach innen (Feder, 1981). Bereits nach dem Schwitzraum zeigte sich eine 2mm dicke Hefeschicht, welche klar vom Quarkkern abzugrenzen war. Bei den über den Kulturkäse eingebrachten Hefen handelte es sich um eine Hefemischflora, welche aus unterschiedlichen Spezien bestand. Gleich nach dem Schwitzraum, bevor eine Kultur aufgesprüht wurde, war der Geruch dieser Versuchskäse bereits harzertypisch. Dieses könnte auf die Stoffwechsellistungen der unterschiedlichen Hefen zurückzuführen sein, welche durch Lipolyse und Proteolyse mit Einfluss auf die Aromabildung nehmen (Berger et al., 1999; Marcellino et al., 2001; Martin et al., 2001). Nach dem Aufsprühen der *B. linens*-Kultur konnte sich innerhalb von 24h auf der Oberfläche eine Schmiere etablieren. Die Analysen der Oberflächenflora zeigten, dass sich das gesamte Keimspektrum, welche durch die Kulturkäse eingebracht bzw. aufgesprüht wurden, etablieren konnte. Zusätzlich konnten in der Kontrollcharge S2 *Microbacterium* spp. isoliert werden. Es war nicht möglich, Bakterien der Gattung *Microbacterium* spp. oder *Arthrobacter* spp. im Kulturkäse oder dem verwendeten Sauermilchquark nachzuweisen. Dieses könnte daran liegen, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze von  $10^2$  KBE/g lagen (Pichhardt, 1998). Als ein besonderes Problemfeld stellt bei den Sauermilchkäsen die Staphylokokkenflora dar. Deswegen erfolgte für die Charge S2 eine genauere Differenzierung der isolierten Staphylokokken. Es zeigte sich, in Übereinstimmung mit den vorherigen Untersuchungen, dass der Hauptanteil durch die Spezie *S. saprophyticus* gestellt wurde.

### **Charge S3 - S4**

Wie aus den Ergebnissen der Versuchschargen S1/S2 abgeleitet werden kann, nimmt die Hefeflora im starken Maße Anteil an der Reifung. Im Gegensatz zu Schnitt- und Weichkäse erfolgt die Produktion von Sauermilchkäse nicht im kontinuierlichen Verfahren. Der Produktionsablauf lässt sich in zwei Abschnitte teilen: der Quarkherstellung und deren Weiterverarbeitung. Der Sauermilchquark stellt ein Spezialprodukt dar, und wird nur von wenigen Molkereien produziert. Dieser Quark wird nicht an den Endverbraucher, sondern zur Weiterverarbeitung zu Koch- und Sauermilchkäse an unterschiedliche Käsereien abgegeben. Für die Sauermilchkäseherstellung ist es üblich, den Quark unterschiedlicher Hersteller aufzukaufen und vermischt für die Produktion einzusetzen. Zwar wird die Milch für die Quarkherstellung allgemein mit einer handelsüblichen thermophilen Säuerungskultur dickgelegt, aber neben

den Milchsäurebakterien beinhaltet der Quark eine Vielzahl verschiedener Hefen. Untersuchungen von Bockelmann et al. (2002) belegen, dass sich die Hefeflora von Hersteller zu Hersteller unterscheiden, ähnlich wie die „Hausflora“ bei verschiedenen Käseereien (Brennan et al., 2001; Eliskases-Lechner und Ginzinger, 1994; Marcellino et al., 2001; Valdes-Stauber et al., 1997). In der Quarkmasse der verschiedenen Hersteller konnten Hefen der Spezies *Candida robusta*, *C. valida*, *C. krusei*, *Torulopsis candida*, *Kluyveromyces marxianus* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde von Martin et al. (2001) das Vorkommen von *Kluyveromyces lactis* und *Geotrichum candidum* beschrieben. Trotz dieser Vielzahl von Hefen sind die Spezies *K. marxianus* und *C. krusei* als typische Hefen des Sauer Milchquarks anzusehen (Bockelmann et al., 2002; Engel und Roesch, 1995; Valdes-Stauber et al., 1997). Durch das Mischen der unterschiedlichen Quarkchargen wird somit eine ausgewogene Hefenflora sichergestellt, entscheidend sind dabei die Hefen *K. marxianus* und *C. krusei*.

Bei den Käseungsversuchen wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. In der Charge S3 wurde ein keimarmer Sauer Milchquark produziert, bei welchem die natürliche Hefe- und Bakterienkeimzahl unter der Nachweisgrenze von  $10^2$  KbE/g lag (Pichardt, 1998). In der Charge S4 wurde die Kesselmilch zusätzlich mit den typischen Hefen der Spezies *K. marxianus* und *C. krusei* angeimpft (je  $10^3$  KbE/ml). Das Animpfen der Kesselmilch kommt den Bedingungen in einer Molkerei recht nahe. Hier würde eine „natürliche“ Animpfung der Kesselmilch über die Luft und die verwendeten Geräte erfolgen. Nach der Produktion des Sauer Milchquarks schloss sich eine sechstägige Lagerung bei 8°C an.

Die Weiterverarbeitung entsprach für die Charge S4 den industriellen Bedingungen. Bei der Charge S3 erfolgte im gleichen Arbeitsschritt mit der Zugabe der Reifungssalze das Animpfen mit den Hefen *K. marxianus* und *C. krusei* (je  $10^3$  KbE/ml). Nach Fertigstellung wurden die Grundquarkmassen geteilt, und je eine Hälfte mit dem proteolytisch aktiven *S. sciuri* subsp. *sciuri* (Charge S3/S4), die andere mit dem proteasenegativen *S. equorum* (Charge S3a/S4a) in einer Konzentration von  $10^7$  KbE/ml angeimpft. Nach der Ausformung gelangten die Käse in den Schwitzraum (30°C; 98% rLf, 24h). Alle Versuchskäse zeigten eine sehr gute Entsäuerung der Oberfläche. Innerhalb von einem Tag erreichten alle Versuchskäse einen pH-Wert im Bereich von 7,0. Es konnte jedoch Unterschiede in der Ausbildung der Hefeschicht und in der Aromaentwicklung beobachtet werden. Für die Charge S4/S4a ergab sich eine deutliche Trennung zwischen Quarkkern und der ca. 2mm dicken aufgeklärten Hefeschicht. Der Geruch aller Versuchskäse dieser Charge hatte bereits harzertypische Komponenten. Bei den Chargen S3/S3a zeigte sich, wie auch schon in Charge S1, eine inhomogene Aufklarungsregion, die den gesamten Jungkäse durchzog; der Geruch hatte keine harzertypischen Komponenten. Deutlicher wurde der Einfluss zum Ende der Reifung nach zwei Wochen. Obwohl alle Chargen gleich

behandelt worden waren, konnten erhebliche Unterschiede im Erscheinungsbild sowie der Sensorik festgestellt werden. Die Sauermilchkäse, welche aus dem mit Hefen vorgereiften Quark produziert wurden, erfüllten alle Kriterien eines qualitativ guten Harzers. Im Gegensatz dazu zeigten die Käse, welche aus einem keimarmen Quark mit später Hefeanimpfung hergestellt wurden, eindeutige Mängel im Erscheinungsbild und Sensorik.

Die in die Quarkmasse eingebrachten Staphylokokken, als auch die aufgesprühte *B. linens* Kultur, nahmen nur im geringen Maß Einfluss auf das Erscheinungsbild der Käse. In beiden Versuchsansätzen zeigte sich, dass bei Einsatz des proteolytische aktive *S. sciuri* subsp. *sciuri* (Staph4) die Käsoberfläche schmierig und feucht erschien. Im Gegensatz dazu wurde bei Einsatz des proteasenegativen *S. equorum* (Staph2) eine trockene Oberfläche erhalten, was als ein erwünschtes Erscheinungsbild angesehen wird und Vorteile bei der Verpackung und Lagerung mit sich bringt. Für eine bessere Produkthygiene könnte es eine Lösung sein, die ökologische Nische des auf Lebensmitteln unerwünschten *S. saprophyticus* durch den unbedenklichen *S. equorum* zu besetzen.

Des weiteren konnte aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die „Vorreifung“ einen großen Einfluss sowohl auf den Reifungsverlauf, als auch auf die Aromaentwicklung der Sauermilchkäse hat. Durch die proteolytische Aktivität der Hefeflora wird wahrscheinlich erst das einheitliche Durchreifen der Käse von außen nach innen ermöglicht. Ebenso scheint der Hauptanteil der Aromabildung bei den Hefen zu liegen. Es ist hinreichend bekannt, dass Hefen unterschiedliche Ester, Alkohole und Aldehyde bilden, welche sensorisch nachweisbar sind (Martin et al., 2001; Petersen et al., 2002). Weitere Untersuchungen belegen, dass einige Hefen in der Lage sind, ähnliche schwefelhaltige Verbindungen zu bilden wie *B. linens* (Arfi et al., 2003a, b; Berger et al., 1999). Für die Produktion von Sauermilchkäse bedeutet dieses, dass bereits bei der Quarkherstellung eine gezielte Kontrolle der Hefeflora einsetzen sollte. Weiter ergibt sich die Frage, in wieweit es möglich sein wird, Sauermilchkäse im kontinuierlichem Verfahren herzustellen, da die „Vorreifung“ offensichtlich einen wichtigen Produktionsschritt darstellt. Ob es möglich ist, durch den Einsatz definierter Hefekulturen eine Abänderung zu schaffen, wäre zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit die „Vorreifung“ zu verkürzen oder gar zu umgehen könnte eine Anpassung der Starterkultur zu Dicklegung der Milch sein. Untersuchungen dazu liegen noch nicht vor.

#### 4.5 Molekulare Differenzierung und Identifizierung von Rotschmierebakterien

Die Entwicklung definierter Starterkulturen für oberflächengereifte Käse erfordert zum einen Kenntnisse über die mikrobielle Zusammensetzung der Bakterienflora gereifter Rotschmierekäse, zum anderen muss die Effizienz der eingesetzten Starterkultur im Reifungsverlauf überprüft werden können. Da die Käsereifung unter unsterilen Bedingungen erfolgt, mussten geeignete Methoden entwickelt werden, mit deren Hilfe eine sichere Identifizierung der bakteriellen Rotschmiereflora ermöglicht werden konnte.

Eine Differenzierung von Bakterien aufgrund von morphologischen und physiologischen Merkmalen ist meist nicht möglich. So bilden coryneforme Bakterien den Hauptanteil der Oberflächenflora (Hoppe-Seyler, 1998, Bockelmann, 2002, Brennan et al., 2002). Eine Identifizierung der eingesetzten Gattungen über die Pigmentierung erwies sich als unzuverlässig, da sowohl bei den *Corynebacterium* spp., als auch bei Brevibakterien und *Arthrobacter* spp. cremefarbene Stämme anzutreffen sind.

Ein in der Laborpraxis gebräuchliches Identifizierungssystem sind biochemische Analysen verschiedener Stoffwechselleistungen, angeboten in Testkits der Firma BioMérieux, Frankreich (API, ID). Die Untersuchungen von biochemischen Stoffwechselleistungen dienen primär der Charakterisierung der Bakterien auf Gattungs- und Speziesebene. Bei Anwendung dieser Methode ergaben sich insbesondere im Bereich der Klassifizierung von coryneformen Bakterien unzuverlässige, bis zweifelhafte Profile (Tenover et al., 1995, Turbett u. Sellner, 1996). Ebenfalls der bei Staphylokokken verwendete physiologische Test Staph ID32 zeigte sich für Koagulase-negative Staphylokokken als ungenau (Renneberg et al., 1995; Irlinger et al., 1997; Rossi et al., 2001). Der Grund dafür dürfte darin liegen, dass dieses System der Identifizierung nicht auf lebensmitteltechnologisch wichtige Keime abgestimmt, sondern auf klinisch relevante Mikroorganismen zugeschnitten wurde (Busse et al., 1996). Typisierungsmethoden, die phänotypische Unterschiede beurteilen, sind grundsätzlich durch die Fähigkeit von Mikroorganismen, die Expression von Genen zu verändern, limitiert. Sie weisen im allgemeinen eine niedrige Unterscheidungskraft auf. Genotypische Typisierungsmethoden nehmen, aufgrund ihrer hohen Unterscheidungskraft, an Bedeutung zu. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden zunehmend genotypisierende Methoden zur Identifizierung von epidemiologisch bedeutsamen Bakterien eingesetzt (Tenover et al., 1995). Dieses eröffnet auch neue Wege in der Typisierung für milchwirtschaftlich wichtige Bakterien aus Rohmilch, sowie den unterschiedlichen Milchprodukten (Bouton et al., 1998; Corroler et al., 1998; Giraffa et al., 1998; Mannu et al., 2000; Satokari et al., 2001). Zur Differenzierung und Identifizierung der bakteriellen Rotschmiereflora, welche sich hauptsächlich aus coryneforme Bakterien der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* und *Microbacterium* zusammensetzt, die mit phänotypischen Analysen nicht eindeutig zu identifizieren sind,

kamen bereits unterschiedliche Methoden der Molekularbiologie zur Anwendung. Es wurde über Kolonie-Hybridisierung, Sequenzierung der 16S rRNA (Kollöffel et al., 1997; Burri, 1999), sowie über RAPD-PCR (Brennan et al., 2002) versucht, eine möglichst sichere und schnelle Differenzierung zu erreichen. Die Anforderungen, die an Identifizierungsmethoden zu stellen sind, sind eine gute Reproduzierbarkeit, und eine einfache Auswertung der Ergebnisse. Einige Verfahren sind schwer durchzuführen, und zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit (Turbett u. Sellner, 1996).

In den durchgeführten Analysen erfolgte eine Differenzierung der Rotschmierebakterien auf Gattungs- und Speziesebene über die rRNA. Dieser Bereich eignet sich zur Taxonomie von Bakterien, wie schon von Grimont und Grimont (1986) beschrieben. Ursprünglich wurde die rRNA nur für die Taxonomie von Bakterien eingesetzt. Dieser Bereich wurde jedoch mehr und mehr zur Spezies-Identifizierung in Anwendung gebracht (Björkroth et al., 1999; Lee et al., 1997). Innerhalb der rRNA lassen sich abhängig von der Mutationsrate im Verlauf der Entwicklungsgeschichte konservierte, semikonservierte und variable Abschnitte unterscheiden, wobei sich die variablen Bereiche zur artspezifischen Identifizierung eignen. Semikonservierte Bereiche erlauben hingegen eine Unterscheidung von Gattung und Spezies.

Basierend auf der Arbeit von Vanechoutte et al. (1992) sollten die unterschiedlichen Bakterienarten der Rotschmiereflora mit den beschriebenen Universalprimern bestimmt werden. Diese Methode beruht auf Restriktionsanalysen amplifizierter rDNA-Bereiche verschiedener Bakterien (16S-, 16S-23S-Zwischenregion und Teile der 23S rDNA). Für die Gattungen *Brevibacterium* spp. und *Corynebacterium* spp. wurde kein Amplifikat für den beschriebenen Bereich erhalten. Bei diesen Gattungen erfolgte eine Amplifikation fast der gesamten 16S rDNA. Wie auch schon für andere Bakterien beschrieben, ist anhand von Restriktionsanalysen dieses kleineren Bereiches eine Differenzierung möglich (Brim et al., 1999; Carlotti und Funke, 1994; Giraffa et al., 1998; Ingianni et al., 1997; Lee et al., 1997; Matar et al., 1999; Satokari, 2001, 2003; Vanechoutte et al., 1995).

Auf Gattungsebene war eine Differenzierung zwischen coryneformen Bakterien und Staphylokokken mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* möglich. Die Analyse der in Datenbanken niedergelegten 16S rRNA Sequenzen, einer Vielzahl coryneformer Bakterien und Staphylokokken zeigte, dass alle coryneformen Bakterien eine *EcoRV* Schnittstelle innerhalb der 16S rRNA-Sequenz um Position 670bp aufweisen. Bei den Staphylokokken fehlt eine Base in der Erkennungssequenz dieses Restriktionsenzym.

Auf Gattungsebene konnte für Staphylokokken mit dem Enzym *SmaI* ein spezifisches Fragmentmuster erhalten werden. Eine Abgrenzung innerhalb der coryneformen Bakterien erfolgte einerseits durch die divergierenden Längen der amplifizierten Bereiche. Bei der Gattung *Arthrobacter* spp. ergab sich ein Amplifikat mit einer Länge von 2,7 kb, bei

*Microbacterium* spp. war dieses um 300 bp verkürzt. Mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* war für beide Gattungen ein jeweils typisches Restriktionsmuster zu erhalten. Die Gattungen *Brevibacterium* und *Corynebacterium* zeigten ein übereinstimmendes Fragment mit einer Länge von 1,5 kb. Für *Brevibacterium* konnte durch die Hydrolyse mit der *ApaI*, bei *Corynebacterium* spp. mit *AccI* und *EcoRI* ein gattungsspezifisches Fragmentmuster erhalten werden. Alle Befunde stehen mit denen aus den Sequenzdaten der EMBL-Datenbank (<http://www.dove.embl-heidelberg.de>) abgeleiteten Ergebnissen in Übereinstimmung.

Eine Differenzierung der Spezies *Arthrobacter sulfureus*, *A. citreus*, *A. globiformis*, *A. nicotianae* und *A. rhombi* war durch die Restriktion mit den Endonukleasen *DraIII* und *NciI* möglich. Bei den getesteten Oberflächenisolaten CA12 und CA13 handelte es sich um Stämme, die anhand partieller 16S rRNA-Sequenzierung (Bockelmann et al., 1997a) vorerst als *Arthrobacter* spp. und *A. globiformis* klassifiziert, und nach erneuter Überprüfung (G. Smit, NIZO; persönliche Mitteilung) der Spezies *A. nicotianae* zugeordnet wurden. Es wurde davon ausgegangen, dass alle gelbpigmentierten Kolonien auf der Käseoberfläche, Stämme der Spezies *A. nicotianae* sind (Bockelmann et al., 1997a). Durch die Restriktionsanalysen konnte eine Zuordnung der Käseisolate CA13 und CA14 zur Spezies *Arthrobacter nicotianae* bestätigt werden. Eine Zugehörigkeit der gelbpigmentierten Oberflächenisolate CA12 und CA15 zur Gattung *Arthrobacter* war hingegen nicht möglich. Bereits der von Vaneechoutte et al. (1992) beschriebene Bereich erbrachte in der PCR eine abweichende Amplifikatlänge von 2,4 kb, statt 2,7 kb. Durch Restriktionsanalysen konnte gezeigt werden, dass sich die genannten Stämme deutlich von den Spezies der Gattung *Arthrobacter* spp. unterschieden. Durch Sequenzierungen und Restriktionsanalysen konnte eine Zuordnung der Oberflächenisolate zu der von Brennan et al. (2001) beschriebenen neuen Spezies *Microbacterium gubbeenense* erfolgen. Weitere Restriktionsanalysen gelbpigmentierter Isolate von unterschiedlichen Rotschmirekäsens, welche kommerziell hergestellt worden waren, zeigten, dass sowohl *Arthrobacter* spp., als auch *Microbacterium* von der Oberfläche isoliert werden können. Aus der gelbpigmentierten Oberflächenfraktion isolierte Brennan et al. (2002) zusätzlich Stämme der Spezies *Corynebacterium flavescens*. In dieser Arbeit konnte kein Nachweis eines gelbpigmentierten *C. flavescens* Stammes erbracht werden.

Bei den untersuchten Staphylokokken Arten war auch eine Differenzierung auf Speziesebene möglich. Desweiteren konnten auf Subspeziesebene *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* und *S. sciuri* subsp. *lentus* unterschieden werden. In Übereinstimmung mit Vaneechoutte et al. (1992) und Giraffa et al. (1998) bestätigen diese Ergebnisse, dass mit ARDRA eine Identifizierung auf Spezies- und Subspeziesebene erreicht werden kann. Untersuchungen von Moschetti et al. (1997) zur Genotypisierung verschiedener *Lactobacillus delbrueckii* Subspezies ließen eine Differenzierung unterhalb der

Subspeziesebene über ARDRA nicht zu. Eine weitere Methode zur Differenzierung unterschiedlicher Spezies ist die Amplifikation der 16S – 23S Zwischenregion (Jenes et al.; 1993). Die Zwischenregion zeigt signifikante Längeunterschiede und Sequenzpolymorphismen sowohl auf Gattungs- als auch auf Speziesebene. Diese Methode wurde bereits für eine Vielzahl unterschiedlicher Gattungen in Anwendung gebracht (Chen et al., 2000; Barry et al., 1991; Couto et al., 2001). Eine Differenzierung anhand der 16S–23S rRNA Zwischenregion ermöglicht die Unterscheidung auf Speziesebene, unterhalb dieser Ebene ist keine weitere Unterscheidung möglich (Mendoza et al., 1998). Für die Differenzierung unterschiedlicher Staphylokokken Spezies gelangte diese Methode bereits in Anwendung (Jensen et al., 1993; Mendoza et al., 1998; Hauschild, 2001; Rossi et al., 2001). Die Amplifikate wiesen Längen zwischen 160bp und 1348bp auf (Hauschild, 2001). Diese Längenschwankungen innerhalb der Zwischenregionen konnten in dem nach Vaneechoute et al. (1992) beschriebenen Bereich nicht beobachtet werden. Bei den Untersuchungen anhand der internal-transcribed-spacer-Region (ITS-Region) zeigten sich nicht nur Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Spezies, sondern auch innerhalb einer Spezies (Barry et al., 1991; Hauschild, 2001; Mendoza, 1998). Intraspezifische Variationen der ITS Profile wurden für *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus* und *S. epidermidis* beschrieben (Couto et al., 2001; Hauschild, 2001). Diese Heterogenität innerhalb der Spezies *S. saprophyticus*, *S. xylosus* und *S. epidermidis* konnte durch die durchgeführten Analysen mittels ARDRA nicht bestätigt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen die Studien von Jensen et al. (1993) und Mendoza et al. (1998). Es zeigte sich, dass die Spezies mit der höchsten phänotypischen und genotypischen Übereinstimmung *S. xylosus* und *S. equorum* sind, dieses wird durch Ergebnisse verschiedener Autoren bestätigt (Bes et al., 2000; Mendoza et al., 1998; Schleifer et al., 1984).

Eine Differenzierung zwischen den Spezies *Brevibacterium linens*, *B. epidermidis* und *B. casei* ist zum Teil bereits über die Pigmentierung möglich. Die Stämme der Spezies *B. linens* sind durch ihre orangefarbene Pigmentierung gut von den nicht pigmentierten Stämmen der Spezies *B. epidermidis* sowie *B. casei* zu unterscheiden. Ein weiteres Kriterium der Eingruppierung zur Spezies *B. linens* ist der KOH-Test der die orangefarbenen Kolonien in violett erscheinen lässt (Jones et al., 1973; Burri; 1999). Durch die Hydrolyse der 16S rDNA mittels zweier Restriktionsenzyme, *AvaI* und *XmnI*, konnten alle getesteten Spezies über das Ausschlussverfahren unterschieden werden (Cai und Collins, 1994; Carlotti und Funke, 1994; Alves et al., 2002). Eine gute Trennung wurde auch zwischen den nicht pigmentierten Spezies erreicht.

Für *Corynebacterium* spp. erfolgte eine Differenzierung der Spezies *C. ammoniagenes*, *C. casei*, *C. mooreparkense*, *C. variabile*, *C. flavescens* und *C. kutscheri*. Für die Identifizierung verschiedener Spezies dieser Gattung wurden bereits unterschiedliche



Methoden in Anwendung gebracht. So arbeitete Aubel et al. (1997) mit der 16S-23S rRNA Zwischenregion, während Sjöden et al. (1998) eine Identifizierung anhand des Zellwandaufbaues durchführte. Spezies Identifizierungen innerhalb dieser Gattung erfolgten oft durch die Sequenzierung der gesamten 16S rRNA. Diese Gattung zeichnet sich durch eine große phylogenetische Variabilität innerhalb der 16S rRNA aus (Pascual et al., 1995; Ruimy et al., 1995). Für die Restriktionsanalyse wurde die bereits beschriebene Sequenzheterogenität innerhalb der 16S rDNA genutzt. Zur eindeutigen Unterscheidung der Spezies wurden, wie auch bei Vanechoutte (1995), drei unterschiedliche Restriktionsansätze benötigt. Zu Beginn der Arbeit standen die Spezies *C. casei* und *C. mooreparkense* nicht zur Verfügung. Über Restriktionsanalyse konnte für einige Käseisolate keine genaue Zuordnung erfolgen. Diese Isolate wurden ursprünglich der Spezies *C. ammoniagenes* zugeordnet. Es wurde bereits von Björkroth (1999) darauf hingewiesen, dass die Restriktionsanalyse der 16S rDNA die Möglichkeit zur Identifizierung potentiell neuer Spezies darstellt. Durch die Arbeit von Brennan et al. (2001) wurden zwei neue Spezies auf der Oberfläche von Rotschmierkäse beschrieben. Die Spezies *C. casei* (DPC-5298-T) steht phylogenetisch *C. ammoniagenes* nahe. Aufgrund von Restriktionsanalysen konnten die nicht übereinstimmenden Isolate dieser „neuen“ Spezies zugeordnet werden. Die zweite beschriebene Spezies *C. mooreparkense* soll in enger Verwandtschaft zur Spezies *C. variabile* stehen.

Durch eine *in silico*- Kalkulation, der für diese Spezies *C. mooreparkense* niedergelegten Sequenzdaten wurde festgestellt, dass eine Unterscheidung zu *C. variabile* anhand der Restriktionsenzyme *RsaI* und *BspHI* möglich sein sollte. Es zeigte sich jedoch, dass keines der eingesetzten Enzyme eine Erkennungssequenz in dem amplifizierten Bereich aufwies. Eine Vertauschung oder Verwechslung des Stammes *C. mooreparkense* kann ausgeschlossen werden. Der Versuchsstamm wurde direkt nach der Lieferung separat untersucht. Zur Überprüfung des Ergebnisses erfolgte eine Wiederholung der Restriktionsanalyse mit einem neubezogenen Stamm. Der erhaltene Stamm *C. mooreparkense* zeigt eine sehr große Homologie zu *C. variabile*. Inwieweit es sich bei dem erhaltenen Stämme um den von Brennan et al. (2001) beschriebenen handelt wäre noch zu untersuchen.

Zu Beginn der Arbeit konnten zwei Käseisolate der Gattung *Staphylococcus* spp. keiner der getesteten Spezies zugeordnet werden. Über partielle Sequenzierung der 16S rDNA wurde ein Stamm der Spezies *S. xylosus* zugeordnet (Burri,1999), ein weiterer über ID32 Staph (BioMérieux) der Spezies *S. equorum*. Diese Isolate zeigten untereinander in der Restriktionsanalyse ein übereinstimmendes Fragmentmuster. Durch partielle Sequenzierung der 16S rDNA und einem Sequenzabgleich mit der EMBL-Datenbank, erfolgte eine Zuordnung zu der von Place et al. (2002) beschriebenen Spezies *S. succinus* subsp. *casei*.

Das Käseisolat Br8 wurde aufgrund der Pigmentierung (hellorange), sowie durch den von Jones et al. (1973) beschriebenen KOH-Test der Spezies *B. linens* zugeordnet. Das erhaltene PCR-Produkt sowie das ARDRA-Fragmentmuster zeigten an, dass dieser Stamm einer anderen Gattung als auch einer anderen Spezies zugeordnet werden muss. Durch partielle Sequenzierung ergab sich eine hohe Homologie zur Spezies *Arthrobacter casei*. Die Stämme der Spezies *A. casei* sind gelbpigmentiert und KOH-negativ (Place, mündliche Mitteilung). Diese steht nicht in Übereinstimmung mit den getesteten Eigenschaften des Stammes Br8, der sich als KOH positiv erwies. Es sind daher noch genauere Untersuchungen notwendig, um die Zugehörigkeit von Br8 zu Spezies *A. casei* zu bestätigen.

Im Verlauf der Analysen konnten Unterschiede im Restriktionsmuster isolierter Stämme einer Spezies und dem Typstamm der Spezies festgestellt werden. Solche Unterschiede wurden bereits für einige Spezies beschrieben (Ingianni et al., 1997; Mora et al., 1998; Manachini et al., 1998; Alves et al., 2002). Bei den getesteten Gattungen *Brevibacterium* und *Arthrobacter* ließen sich bei verschiedenen Spezies ähnliche Divergenzen beobachten.

Für die Gattung *Brevibacterium* trat dieses Phänomen bei zwei Spezies auf. Die Spezies *B. linens*, welches als typisches Rotschmierebakterium bezeichnet wird, erbrachte bei der Hydrolyse der getesteten Stämme, mit *TaqI* zwei unterschiedliche Restriktionsmuster. Es zeigte sich, dass kein gemeinsamer Genotyp vorlag. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Arbeit von Alves et al. (2002). Das Vorhandensein von zwei Genotypen innerhalb dieser Spezies wurde bereits von Jones und Keddie (1986) beschrieben. Über DNA-DNA Homologie belegte Jones, dass zwei unterschiedliche Genotypen unter dieser Spezies zusammengefasst sind. Über Restriktionsanalyse sollte eine Trennung zwischen dem Genotyp, der ein identisches Fragmentmuster zur Spezies *B. casei* erbrachte, nach Alves et al. (2002) nicht möglich sein. Entgegen dieser Angabe konnte eine Differenzierung mit dem Enzym *AvaII* erreicht werden. Zu den bereits beschriebenen, unterschiedenen Genotypen konnten durch die Restriktionsanalyse mit *XmnI* (Abb.27) zwei zusätzliche Gruppen unterschieden werden. Untersuchungen von Brennan et al. (2002) bestätigen die Vermutung, dass noch zusätzliche Gruppen unter dieser Spezies zusammengefasst sind. Als Besonderheit bei einer Gruppe trat ein Restriktionsmuster auf, welches eine unvollständige Hydrolyse vermuten ließ. Dieses Ergebnis war jedoch reproduzierbar, und auch durch wiederholte Hydrolyse nicht zu verändern. Das Bandenmuster zeigte eine zusätzliche 1000bp Bande. Eine mögliche Erklärung wäre, dass zwei unterschiedliche Kopien des *rrnA* Operons amplifiziert wurden, welche unterschiedliche Sequenzen aufwiesen. Es ist bekannt, dass mehrere Kopien der *rrnA* Operone vorliegen können (Patra et al.; 2002; Acinas et al., 2004). Es wurden jedoch noch nicht unterschiedliche Sequenzen dokumentiert. Um Aussagen treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Für die Spezies *Gordnerella vaginalis*, sowie für

thermophile Bacillen, wurde bereits von Ingiani et al. (1997) und Mora et al. (1998) beschrieben, dass mehrere Genotypen zu einer Spezies zusammengefasst sind.

Die zweite Spezies der Gattung *Brevibacterium*, welche diese Abweichung zeigte, war *B. casei*. Bisher wurde diese Spezies als einheitlich beschrieben (Carlotti und Funke, 1994; Collins et al., 1983; Alves et al., 2002). Bei der Restriktionsanalyse mit den Enzymen *AvaII*, *PstI* und *DraIII* (Abb. 28) zeigten sich unterschiedliche Restriktionsmuster zwischen dem Stamm *B. casei* DSM 9657, der aus dem klinischen Bereich isoliert wurde, und dem Typstamm *B. casei* (DSM 20657-T), welcher aus dem milchwirtschaftlichen Bereich stammte. Da nur zwei Stämme dieser Spezies zur Verfügung standen, reicht es nicht aus, um weitere Aussagen treffen zu können. Desweiteren zeigte der Typstamm *B. casei* (DSM 20657-T) ein nicht mit der Datenbank übereinstimmendes Fragmentmuster. Eine Verwechslung des Stammes war ausgeschlossen, auch durch Neubezug des Typstammes war das Ergebnis reproduzierbar.

Weitaus deutlicher war die Divergenz bei der Spezies *Arthrobacter nicotianae*. Die Ergebnisse der Restriktionsanalysen mit *SmaI* und *NciI* (Abb. 13) erbrachten für alle getesteten Käseisolate, welche über API und partielle Sequenzierung als *A. nicotianae* klassifiziert wurden, ein eigenes Fragmentmuster welches untereinander identisch war. Dieses Bandenmuster stand in keiner Übereinstimmung mit dem des Typstammes *A. nicotianae* (DSM 20123) oder einer anderen getesteten Spezies dieser Gattung. Es deutet darauf hin, dass es sich bei den Isolaten um eine eigene Gruppe handelt.

### **Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Um eine zuverlässige Überprüfung der Funktionalität einer Starterkultur zu erhalten, ist eine zuverlässige Stammtypisierung notwendig. Genotypische Verfahren untersuchen die Ähnlichkeit des Genoms verschiedener Isolate, und können so identische, nahe verwandte, oder nicht in Beziehung stehende Stämme identifizieren. Eine besonders wichtige Methode stellt die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) dar. Dieses Verfahren wurde von Schwartz und Cantor (1984) entwickelt und seither verbessert. Von verschiedenen Autoren wurde die hohe Diskriminationsfähigkeit der Methode bei verschiedenen Infektionserregern hervorgehoben (Satokari et al., 2003; Singh et al., 1999). Die Pulsfeld-Gel-Elektrophorese wurde bereits für die Identifizierung von Lebensmittelkontaminanten (Cloak et al., 2002; Miriagou et al., 2002) und zur Identifizierung von technologisch wichtigen Bakterien verwendet (Moschetti et al. 1997; Johansson et al., 1994).

Um die präparierte DNA in relativ wenig große Fragmente zu schneiden, werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die selten schneiden, sogenannte „rare cutter“. Ob ein einzelnes Restriktionsenzym für eine bestimmte DNA als „rare cutter“ geeignet ist, lässt sich anhand des GC-Gehaltes der jeweiligen DNA abschätzen. Dieser liegt für

*Brevibacterium* spp. bei 60-64 Mol%, für *Arthrobacter* spp. bei 59-66 Mol%, für *Microbacterium* spp. zwischen 69-75 Mol%. Corynebakterien haben in der Gruppe mit 51-60 Mol% den niedrigsten GC-Gehalt. Bei diesen Gattungen schneiden Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz im wesentlichen aus A und T bestehen, besonders selten. Geeignete „rare cutter“ sind somit *AscI*, *SpeI* und *DraI*. Die zu typisierenden coryneformen Bakterien wurden durch die Enzyme *AscI* und *SpeI* typisiert. Für eine bessere Identifizierung sollten weitere Restriktionsenzyme getestet werden, welche zu einer geringeren Anzahl von Fragmenten führen. Bei den Staphylokokken liegt der G+C-Gehalt der DNA zwischen 30-39 Mol%. Bei dieser Gattung wurde bereits erfolgreich das Enzym *SmaI* zur Hydrolyse eingesetzt.

Die Stämme der Spezies *B. casei* wurden über PFGE typisiert. Der Typstamm *B. casei* DSM 20657-T und der Stamm DSM 20658 wurden von Collins et al. (1983) beschrieben. Der Typstamm war von der Oberfläche eines Chedders, der zweite beschriebene Stamm aus Rohmilch isoliert worden. Diese beiden Stämme zeigten in der PFGE ein identisches Fragmentmuster, womit es sich also um den selben Stamm handeln muss (Tenover et al., 1995). Der dritte getestete *B. casei* Stamm DSM 9657 wurde aus dem klinischen Bereich (Carlotti und Funke, 1994) isoliert. Er erbrachte in der PFGE ein eigenes Fragmentmuster. Zur Differenzierung und Einordnung dieser Spezies ist es notwendig, weitere Stämme dieser Spezies zu testen, um genauere Aussagen treffen zu können.

Bei der Stammdifferenzierung der Spezies *Arthrobacter nicotianae* mittels PFGE zeigten die Käseisolate größere Ähnlichkeit untereinander als zum Typstamm. Da diese Methode der Stammtypisierung keine Erkenntnisse in der Spezies-Diskriminierung bringt, aber eine Beziehung zwischen den einzelnen Stämmen in Bezug auf ihre Verwandtschaft darstellt (Descheemaeker et al., 1997), lässt sich vermuten, dass die Käseisolate untereinander näher verwandt sind, als mit dem Typstamm, welcher im Jahre 1956 von einer Tabakpflanze isoliert wurde. Die gleiche Beobachtung ist von Brennan et al. (2002) für *C. ammoniagenes* beschrieben worden. Mittels PFGE konnten sie zeigen, dass isolierte Stämme aus einem Habitat untereinander eine größere Ähnlichkeit aufwiesen als zum Typstamm. Diese führte schließlich zur Beschreibung der neuen Spezies *C. casei*. Es sollten daher zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden, inwieweit die Klassifizierung der Käseisolate zur Spezies *A. nicotianae* aufrechterhalten werden kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund immer wieder auftretender Reifungsprobleme bei Rotschmierekäse war es notwendig, die initiale Entsäuerung der Käseoberfläche, sowie die Reifungsbedingungen zu optimieren und neue Oberflächenstarterkulturen zu entwickeln. Um eine schnellstmögliche Entsäuerung der Käseoberfläche zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Hefeisolate aus Rohmilch und Milchprodukten auf ihre Fähigkeit zur Alkalisierung von Milchmedien bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Die Alkalisierungseigenschaften der Hefen, die für weitere Käseversuche eingesetzt wurden, waren deutlich besser als die der zur Zeit verfügbaren kommerziellen Hefen verschiedener Kulturenhersteller.

Salzbäder von Käsereien erwiesen sich als natürliche Anreicherungsquelle für Hefen und lebensmitteltaugliche Staphylokokken (*D. hansenii*, *S. equorum*). Die maximalen Konzentrationen für beide Mikroorganismen lag bei ca.  $10^6$  KBE/ml. Der gezielte Einsatz von *D. hansenii* und *S. equorum* im Salzbad bei Versuchskäseproduktionen zeigt, dass die Salzbad-Mikroflora in den ersten Tagen der Käsereifung eine Schutzfunktion gegenüber Schimmelkontaminationen erfüllte. Für den Reifungsstart erwies es sich von Vorteil, die Hefen und Staphylokokken bereits im Salzbad einzusetzen, da sich so eine verzögerte Entsäuerung der Käseoberfläche vermeiden ließ.

Bei Versuchskäseproduktionen im Labormaßstab, als auch bei der Übertragung in einen Pilotmaßstab konnte festgestellt werden, dass für eine typische Reifung von Tilsiter Käse eine definierte Oberflächen-Reifungskultur bestehend aus *D. hansenii*, *S. equorum*, *B. linens*, *C. casei* und *M. gubbeenense* erforderlich ist. Mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass sich die in der Käserei eingesetzten definierten Oberflächenkulturen gegenüber der Hausflora durchsetzen konnten. In weiteren Laborversuchen zur Oberflächenreifung von Weich- und Sauermilchkäse kamen definierte Starterkulturen aus dem Schnittkäsebereich in Anwendung. Die Reifung verlief für die Käsesorten untypisch. Die Ausbildung der sortenspezifischen Merkmale wie Farbe und Aroma unterblieben.

Eine Oberflächenreifungskultur für Weichkäse sollte die Hefen *D. hansenii* und *Geotrichum candidum* sowie verschiedene coryneforme Bakterien enthalten. Der Einsatz von *B. linens*, *M. gubbeenense*, *A. rhombi*, *Halomonas spp.* und *Corynebacterium casei* in verschiedenen Zusammensetzungen zeigte nur wenig Einfluss auf die Farb- und Aromaentwicklung. Alle Versuchskäse wiesen eine mehr oder weniger typische Orangefärbung mit den typischen, schwefligen Rotschmiere-Aromakomponenten auf. Der wesentliche Unterschied zu geschmierten Schnittkäsen war die Anwesenheit der Hefe

*G. candidum* und der hohe Anteil gelbpigmentierter *M. gubbeenense*-Stämme während der Käsereifung.

Für die Reifung von Sauermilchkäse (Gelbkäsen) stellte ein entscheidender Faktor die Hefeflora dar. Hier erwiesen sich *Kluyveromyces marxianus* und *Candida krusei* als essentiell für die Reifung. Diese mussten bereits der Kesselmilch zugegeben werden, um bei der nachfolgenden Lagerung des Quarks vor der Weiterverarbeitung zu hohen Konzentrationen heranwachsen zu können. Ein käseereitauglicher Sauermilchquark enthielt ca.  $10^7$  KBE/g für beide erwähnten Spezies. Die bakterielle Rotschmiereflora von Sauermilchkäsen entsprach mehr der von geschmierten Schnittkäsen mit hohen Konzentrationen an beige pigmentierten Corynebakterien-Spezies. Die sauermilchkäse-typische Verunreinigung von *Staphylococcus saprophyticus* konnte durch den Einsatz von *S. equorum* vermieden werden.

Eine Identifizierung der Rotschmierebakterien erfolgte über molekularbiologische Methoden. Über ARDRA wurde eine Identifizierung auf Speziesebene mittels PFGE auf Stammebene durchgeführt. ARDRA wurde für Spezies und Stämme der Gattung *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* und *Microbacterium* etabliert. Zur Differenzierung wurde für *Staphylococcus*, *Arthrobacter* und *Microbacterium* durch Verwendung von Universalprimern ein Bereich amplifiziert, welcher die 16S, 16S-23 Spacer Region, sowie einen Teil der 23S rRNA umfasste. Dabei wurde für *Staphylococcus* und *Microbacterium* ein 2,4 kb langes, für *Arthrobacter* ein 2,7 kb langes PCR-Fragment erhalten. Für die Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* wurde fast der gesamte Bereich der amplifizierten 16S rDNA zur Restriktionsanalyse herangezogen. Für beide Gattungen ergab sich eine Fragmentlänge von 1,5 kb.

Die Unterscheidung zwischen coryneformen Bakterien (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* und *Microbacterium*) und Staphylokokken war mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* und *SmaI* möglich. Mit *EcoRV* ergab sich für *Arthrobacter* und *Microbacterium* ein gattungsspezifisches Fragmentmuster, *ApaRI* ergab für *Brevibacterium*, *AccI* und *EcoRI* für *Corynebacterium* ein gattungsspezifisches Fragmentmuster.

Die Differenzierung von 12 Staphylokokken Spezies, davon zwei Spezies mit einer dazugehörigen Subspezies, war durch eine Kombination der Enzyme *HindIII* und *XmnI* möglich. Die Differenzierung von fünf *Arthrobacter*-Spezies war mit dem Restriktionsenzymen *DraIII* und *NciI* möglich. Dabei zeigten alle *A. nicotianae*-Stämme, die aus Käse isoliert worden waren, Unterschiede zum Typstamm *A. nicotianae* DSM 20123-T. Die Unterscheidung der gelbpigmentierten *Arthrobacter* von den gelbpigmentierten *Microbacterium*-Spezies war bereits über die Größe des PCR-Produktes möglich (2,4/2,7 kb). Weiterhin konnte durch den Einsatz des Restriktionsenzym die aus

Käse isolierten Stämme der neu beschriebenen Spezies *Microbacterium gubbeenense* zugeordnet werden. Für die Differenzierung von sechs *Corynebacterium*-Spezies mussten die Enzyme *AvaI*, *XmnI* und *HaeIII* eingesetzt werden. Die Spezies *C. variabile* und *C. mooreparkense* konnten nicht unterschieden werden.

*Brevibacterium* Spezies erwiesen sich als genetisch sehr heterogen. Die Differenzierung der getesteten Typstämme von drei *Brevibacterium*-Spezies war mit den Enzymen *AvaI* und *XmnI* möglich. Die Analyse einer großen Zahl von *B. linens*-Stämmen, isoliert aus Milchprodukten zeigte, dass mit Hilfe der Restriktionsanalyse durch *XmnI* mindestens zwei Genotypen und mehr als zwei rRNA Operons in dieser Spezies vorhanden sein müssten.

Zur Stammdifferenzierung wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, die die chromosomale DNA in möglichst wenig Fragmente schnitten. Es ergaben sich für alle eingesetzten Stämme der Spezies stammspezifische Restriktionsschnittmuster der chromosomalen DNA. Für *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* und *Microbacterium* wurde mit *AscI*, für *Staphylococcus* mit *SmaI* eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

## 6 SUMMARY

Due to recurring ripening problems in red mould cheeses it was necessary to optimise the conditions of ripening and the initial deacidification of the cheese surface, and to develop new surface starter cultures. In order to ensure the fastest possible deacidification of the cheese surface, various different yeast isolates from raw milk and milk products were tested for their ability to alkalise milk media at different temperatures. The alkalising properties of the yeasts, which were used for further tests on cheeses, were considerably better than those of the commercial yeasts currently available from various different culture manufacturers.

Cheese brine proved to be a natural source of enrichment for yeasts and staphylococci suitable for food (*D. hansenii*, *S. equorum*). The maximum concentrations for both microorganisms was approx.  $10^6$  KbE/ml. The targeted use of *D. hansenii* and *S. equorum* in the salt bath in cheese production tests revealed that the salt bath microflora performed a protective function in the first few days of cheese ripening compared to mould contamination. It proved advantageous for the beginning of the ripening process to place the yeasts and staphylococci in the salt bath, since this prevented the delayed deacidification of the cheese surface.

In both lab-scale cheese production tests and transferred to a pilot scale it was ascertained that a defined surface ripening culture consisting of *D. hansenii*, *S. equorum*, *B. linens*, *C. casei* and *M. gubbeenense* is required for typical ripening of Tilsiter cheese. With the assistance of pulsed field gel electrophoresis, it was proven that defined surface cultures used in cheese dairies were able to assert themselves against house flora. Defined starter cultures from the field of hard cheeses were also used in further lab tests on the surface ripening of soft and sour milk cheeses. The ripening for these sorts of cheese proceeded in an untypical manner. The formation of features specific to the cheese sorts, such as colour and aroma, did not occur.

The yeasts *D. hansenii* and *Geotrichum candidum*, as well as various different coryne-form bacteria, are purported to contain a surface ripening culture for soft cheese. The use of *B. linens*, *M. gubbeenense*, *A. rhomni*, *Halomonas sp.* and *Corynebacterium casei* in a variety of compositions had only a slight influence on the development of colour and aroma. All test cheeses revealed a more or less typical orange coloration with the typical, sulphurous red mould aroma components. The main difference to the smear cheeses was the presence of the yeast *G. candidum* and the high amount of yellow pigmented *M. gubbeenense* strains during cheese ripening.



The yeast flora was a decisive factor in the ripening of sour milk cheeses (yellow cheeses). *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* proved to be essential for the ripening of such cheeses. These had to be added to the tank milk to allow the growth of high concentrations in the subsequent storage of the curds prior to further processing. Sour milk curds suitable for a dairy contained approx.  $10^7$  KBE/g for both mentioned species. The bacterial red mould flora of sour milk cheeses corresponded more to that of smear cheeses with high concentrations of beige pigmented *Corynebacterium* species. The contamination of *Staphylococcus saprophyticus*, typical in sour milk cheeses, could be prevented by the use of *S. equorum*.

Identification of the red mould bacteria took place via molecular biological methods. ARDRA was used to identify the bacteria at a species level, whereas PFGE was used for the strain level. ARDRA was established for the species and strains of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* and *Micobacterium*. For differentiation purposes, an area was amplified using universal primers for *Staphylococcus*, *Arthrobacter* and *Micobacterium* which comprised the 16S, 16S-23 spacer region as well as part of 23S rRNA. A PCR fragment length of 2.4 kb and 2.7 kb was obtained for *Staphylococcus* and *Micobacterium*, and for *Arthrobacter*, respectively. For the genera *Corynebacterium* and *Brevibacterium* almost the whole area of the amplified 16S rDNA was used for the restriction analysis. A fragment length of 1.5 kb was obtained for both genera.

It was possible to differentiate between coryneform bacteria (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* and *Microbacterium*) and Staphylococci with the restriction enzyme *EcoRV* and *SmaI*. With *EcoRV*, a genus-specific fragment pattern was obtained for *Arthrobacter* and *Microbacterium*, whereas *ApaRI* revealed a genus-specific fragment pattern for *Brevibacterium*, and *AccI* and *EcoRV* for *Corynebacterium*.

The differentiation of twelve Staphylococci species, two of which with a subspecies, was possible using a combination of the enzymes *HindIII* and *XmnI*. The differentiation of five *Arthrobacter* species was possible with the restriction enzymes *DraIII* and *NciI*. All *A. nicotianae* strains that were isolated from cheese revealed differences to the type strain *A. nicotianae* DSM 20123-T. The differentiation of the yellow pigmented *Arthrobacter* from the yellow pigmented *Microbacterium* species was possible through the size of the PCR product (2,4/2,7 kb). Furthermore, through the use of the restriction enzyme, it was possible to classify the strains isolated from the cheese to the newly described species *Microbacterium gubbeenense*. The enzymes *AvaI*, *XmnI* and *HaeIII* had to be used for the differentiation of six *Corynebacterium* species. It was not possible to differentiate between the species *C. variabile* and *C. mooreparkense*.

*Brevibacterium* species proved to be genetically very heterogeneous. The differentiation of the tested type strains of three *Brevibacterium* species was possible with the enzymes *Ava*I and *Xmn*I. The analysis of a large number of *B. linens* strains isolated from milk products revealed that, with the assistance of restriction analysis by *Xmn*I, at least two genotypes and more than two rRNA operons must be available in these species.

Restriction enzymes were used for the strain differentiation that cut the chromosomal DNA into the smallest possible fragments. Strain-specific restriction patterns of the chromosomal DNA were yielded for all used strains of the species. A restriction analysis for *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* and *Microbacterium*, and for *Staphylococcus* were carried out with *Asc*I and *Sma*I, respectively.

## 7 AUSBLICK

Durch das Pilotprojekt konnte gezeigt werden, dass der Einsatz einer definierten Starterkultur für oberflächengereifte Käse durchaus eine Alternative zum traditionellen „Alt-Jung-Schmiervverfahren“ darstellen kann. Durch die im ersten Versuchsdurchlauf auftretenden Probleme wurde deutlich, dass noch Optimierungsarbeiten im Bereich der Kulturenherstellung erfolgen sollten. Aufgrund der positiven Ergebnisse im Pilotprojekt sollten weitere Mehrstamm- Reifungskulturen auf ihre Anwendbarkeit hin getestet werden. Bei den Versuchen wäre eine Kontrolle der gebildeten Aromakomponenten von Interesse. Falls eine deutlich geringere Konzentration der typischen schwefelhaltigen Komponenten nachzuweisen wäre, sollte über eine Zugabe der notwendigen Aminosäuren (Methionin und Cystein) zum Schmierwasser nachgedacht werden. Da dieses recht kostenintensiv ist, könnte versucht werden, durch eine Eiweißanreicherung im Schmierwasser z.B. durch Zugabe der aufgefangen Staubverluste beim Käsungsvorgang, einen ähnlichen Effekt zu erzielen.

Es zeigte sich bei den Versuchen, dass durch die Zusammenstellung der bakteriellen Arbeitsschmiere ein großer Einfluss auf das Erscheinungsbild und die Aromen der Käse genommen werden konnte. Inwieweit es möglich ist, durch die Zusammenstellung unterschiedlicher Stämme ein vorgegebenes Zielprodukt zu erreichen, müsste in weiteren Versuchen überprüft werden. Bei den Reifungsversuchen für Weich- und Sauermilchkäse ergab sich als zusätzlicher Einflussfaktor die Hefeflora. Die Aromakomponenten welche von *Geotrichum candidum* gebildet werden, sind mit denen von *Brevibacterium linens* zu vergleichen. Der charakteristische Geschmack der Weichkäse der einzelnen Käsereien wird stark von dieser „Hauseigenen“ Hefe beeinflusst. Hier wäre eine genaue Identifizierung der „Käsereieigenen“ *G. candidum* von Interesse. Ähnliches gilt auch für die Hefemischflora des Sauermilchquarks. Hier stellen die Hefen *K. marxianus* und *C. krusei* die entscheidende Hefeflora dar. Inwieweit die zusätzlich identifizierten Hefen mit Einfluss auf die Reifung nehmen, ist noch nicht genau geklärt.

Die Arbeit zur Erstellung einer definierten Reifungskultur für oberflächengereifte Käse sollte nicht die Vereinheitlichung dieser Produktgruppe zum Ziel haben. Es sollte vielmehr die Produktsicherheit und eine gleichbleibende Qualität gewährleistet werden. Um die Variationsbreite der einzelnen Käsesorten zu gewährleisten, bedarf es genauerer Analysen der einzelnen Stämme der Hausflora. Diese Bakterien und Hefen müssten gesichert, und bei Bedarf der Käserei wieder zur Verfügung gestellt werden.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen haben sich neue Fragestellungen im Bereich der Spezies *Arthrobacter nicotianae*, *A. casei*, *Brevibacterium linens* und *B. casei* ergeben.

Für die Spezies *A. nicotianae* und *B. casei* konnte in den molekularbiologischen Untersuchungen keine Übereinstimmung zwischen den getesteten Typstämmen und den Isolaten, bzw. bei *B. casei*, mit dem kommerziell erhältlichen Stamm erzielt werden. Bei der Spezies *A. nicotianae* zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den aus dem milchwirtschaftlichen Bereich stammenden Isolaten, und dem Typstamm, welcher von einer Tabakpflanze isoliert wurde. Es muss geklärt werden, in welcher Beziehung die Isolate zu dem Typstamm stehen und inwieweit die momentane Klassifizierung noch Gültigkeit hat. Für die Überprüfung der Spezies *B. casei* war die Anzahl der Vergleichsstämme nicht ausreichend um Aussagen über eine mögliche Varianz innerhalb dieser Spezies zu treffen. Um weitergehende Aussagen treffen zu können, muss die Anzahl der Vergleichsstämme erweitert werden.

Die Heterogenität der Spezies *B. linens* wurde bereits mehrfach beschrieben. Bisher wurde für diese Spezies der Nachweis für die Existenz zweier unterschiedlicher Genotypen erbracht. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine größere Divergenz innerhalb dieser Spezies vorliegt. Inwieweit es sich um unterschiedliche Genotypen handelt, bedarf weiterer Untersuchungen. Für eine Gruppe scheint es so zu sein, dass unterschiedliche Kopien der *rrnA* Operone vorliegen. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, um genauere Aussagen treffen zu können.

Unklarheit besteht noch bezüglich des Stammes Br8. Dieser Stamm zeigt eine hohe Homologie zur neubestimmten Spezies *Arthrobacter casei*. Untypisch für diese Spezies ist jedoch die abweichende Pigmentierung und das positive KOH-Verhalten. Hier müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

## 8 LITERATUR

- Accolas, J. P., Melcion, D. und Vassal, L.** (1978). Study of the surface microflora of Gruyere and Beaufort cheeses. 20. Intern.Milchwirtsch.-Kongreß, Paris, 824-825.
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M. F.** (2004). Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Geonomes with Multiple *rrn* Operons. *J. Bacteriol.*, **186** (9): 2629-2635
- Ades, G. L. und Cone, J. F.** (1969). Proteolytic activity of *Brevibacterium linens* during ripening of trappist-type chees. *J. Dairy Sci.*, **52**: 957-961.
- Alves, A., Santos, O., Henriques, I. und Correia, A.** (2002) Evaluation of methodes for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *Fems Microbiol. Lett.*, **213**: 205-211.
- Arif, K., Amarita, F., Spinnler, H. E. und Bonnarme, P.** (2003b). Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, tow microorganisms of the chees ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**(3): 245-253.
- Arif, K., Tache, R., Spinnler, H. E. und Bonnarme, P.** (2003a). Dual influence of the carbon source and L-methionine on the synthesis of sulphur compounds in the chees-ripening yeast *Geotrichum candidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61** (4): 359-365.
- Asperger, H., Heisting, H.** (1998). Zur Bedeutung des Salzbades für das Vorkommen von Listerien in Käse. *Dtsche. Milchwirtschaft*, **3**: 108-111.
- Aubel, D., Renaud, F.B.R und Freney, J.** (1997). Genomic diversity of several *Corynebacterium* species identified by amplification of the 16S-23SrRNA gene spacer regions. *Int J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 767-772.
- Ayse, D. C.** (2001). Beziehung zwischen polymorphen Milchproteinen und der Milchproteinleistung beim Rind. Dissertation, Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. und Gannon, F.** (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* **1**: 51-56.
- Beattie, S. E. und Torrey, G. S.** (1986). Toxicity of methanethiol produced by *Brevibacterium linens* toward *Penicillium expansum*. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 102-104.

- Becker, B. und Holzapfel, W.H.** (2000). Erhöhte Listeriose-Gefahr in Deutschland? Forschungsreport, **2**: 10-13.
- Berger, C., Khan, J.A., Molimard, P., Martin, N. und Spinnler, H.E.** (1999). Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. Appl. Environ. Microbiol., **65** (12): 5510-5514.
- Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.** (1992). Eingruppierung biologischer Agenzien. Merkblatt B006, Sichere Biotechnologie.
- Bes, M., Guerin-Faublee, V., Meugnier, H., Etienne und Freney, J.** (2000). Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. Vet. Microbiol., **71**: 287-294.
- Björkroth, J., Korkeala, H. und Funke, G.** (1999). rRNA gene RFLP as an identification tool for *Corynebacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol., **49**: 983-989.
- Bobe, G., Beitz, D.C., Freeman, A.E. und Lindberg, G.L.** (1999). Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. J. Dairy Sci., **82**: 2797-2804.
- Bockelmann, W.** (2002). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. Int. Dairy J., **12**: 123-131.
- Bockelmann, W.** (2003). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. Maximising quality, Eds. Smit, G. & Doddes, F., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, GB, 470-490.
- Bockelmann, W. und Hoppe-Seyler, T.** (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. Int. Dairy J., **11**: 307-314.
- Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B. und Heller, K. J.** (2000). Small scale cheese ripening of bacterial smear cheeses. Institute of Microbiology Kiel, **55** (11): 621-624.
- Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., Krusch, U., Hoffmann, W. und Heller, K. J.** (1997b). The microflora of Tilsit cheese. part 2. Development of a surface smear starter culture. Nahrung, **41**: 213-218.
- Bockelmann, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G. und Heller, K. J.** (1997a). The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. Nahrung, **41**: 208-212.

- Bockelmann, W., Willems, P., Jäger, B., Hoppe-Seyler, T., Engel, G., Heller, K. J.** (2002). Reifung von Harzer Käse. Kieler Milchwirtsch. Forschungsberichte, **54**: 317-335.
- Bonaiti, C., Leclercq-Perlat, M. N., Latrille, E. und Corrieu, G.** (2004). Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: relative humidity and temperature influences. Dairy Sci., **87** (11): 3976-3988.
- Bonnarme, P., Psoni, L., und Spinnler, H. E.** (2000). Diversity of l-Methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **66** (12): 5514-5517.
- Bouton, Y., Guyot, P. und Grappin, R.** (1998). Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. J. Appl. Microbiol., **85**: 123-131.
- Breer, C.** (1986). Das Vorkommen von Listerien in Käse. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> World congress foodborne infections and intoxication, Berlin. Vol. **1**: 230-233.
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Simpson, P. J., Fox, P. F. und Cogan, T. M.** (2001). *Corynebacterium mooreparkense* sp. Nov., and *Corynebacterium casei* sp. Nov. isolated from the surface of a smear-ripened cheese. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**: 843-852.
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Vancanneyt, M., Cogan, T. M. und Fox, P. F.** (2001a). *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**: 1969-1976.
- Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, Fox, P.F., Goodfellow, M. und Cogan, M.** (2002). Biodiversity of Bacterial Flor on the Surface of Smear Chees. Appl. Environ. Microbiol., **68**: 820-830.
- Brim, H., Heyndrickx, M., De Vos, P., Wilmotte, A., Sperigael, D., Schlegel, H. G. und Mergeay, M.** (1999). Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and facultative hydrogenotrophs. System. Appl. Microbiol., **22**: 258-268
- Burri, S.** (1999). Microbiology and Biochemistry of the Gram-positive microflora of the surface of typical Swiss cheeses. Dissertation. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- Busse, M.** (1989). Die Oberflächenflora von geschmiertem Käse. Milchw.Berichte, **99**: 137-141.

- Busse, M.-J., Denner, E.B.M. and Lubitz, W.** (1996). Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. *Int. Biotechnol. J. Biotechnol.*, **47**: 3-38
- Cai, J. and Collins, M.** (1994). Phylogenetic Analysis of Species of *meso* - Diaminopimelic Acid-Containing Genera *Brevibacterium* and *Dermabacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**: 583-585.
- Carlotti, A. and Funke, G.** (1994). Rapid distinction of *Brevibacterium* species by restriction analysis of rDNA generated by polymerase chain reaction. *Syst. Appl. Microbiol.*, **17**: 380-386.
- Carnio, M.C., Eppert, I., und Scherer, S.** (1999). Analysis of the bacterial surface ripening flora of german and French smeared cheese with respect to their anti-listerial potential. *Int. J. Food Microbiol.*, **47**: 89-97.
- Carnio, M.C., Höltzel, A., Rudolf, M., Henle, T., Jung, G. und Scherer, S.** (2000). The macrocyclic peptide antibiotic Microccin P<sub>1</sub> is secreted by the food-borne *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 2378-2384.
- Chapman, H.R. und Sharpe, M.E.** (1989). Microbiology of cheese. In: The microbiology of milk products. **2.Aufl**: 203-289. (Hrsg.: Robinson, R.K). Elsevier Applied Science. London, New York.
- Chen, H., Lim, C.K., Lee, Y.K. and Chan, Y.N.** (2000). Comparative analysis of the gens encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains. *J. Syst. Microbiol.*, **50**: 471-478.
- Clark, J. B.** (1972). Morphogenesis in *Arthrobacter*. *CRC Critical Reviewa in Microbiol.*, **1**: 521-544.
- Cloak, O.M. und Fratamico, P.M.** (2002). A Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of *Campylobacter coli* from an Swine Processing Facility and Characterization of Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Restistance Profiles. *J. Food Protection*, **65** (2): 266-273.
- Collins, M.D., Farrow, J A., Goodfellow, E., and Minnikin, D E.** (1983). *Brevibacterium casei* sp.nov. and *Brevibacterium epidermidis* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.*, **4**: 388-395.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N. und Gueguen, M.** (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese Registered Designation of Origin area. *Appl. Eenviron. Microbiol.*, **64**: 4729-4735.



- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I-S. and De Lencastre, H.** (2001). Identification of clinical Staphylococcal Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **39**: 3099-3103.
- Crombach, W. H. J.** (1972). DNA Base composition of soil arthobacters and other coryneforms from cheese and sea fish. *Antonie van Leeuwenhoek*, **38**: 105-120.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P and Goossens, H.** (1997). Evaluation of Arbitrarily Primed PCR Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Large Genomic DNA Fragments for Identification of Enterococci Important in Human Medicine. *Int. J. System. Bacteriol.*, **47** (2): 555-561.
- Dias, B. und Weimer, B.** (1998). Conversion of Methionine to Thiols by Lactococci, Lactobacilli, and Brevibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3320-3326.
- Dumont, J. P. und Adda J.** (1979). Flavour information in diary products. In: Progress in flavour research, 245-262. (Hrsg.: Land, D. G. and Nursten, H. E.). Applied Science Publisher Ltd. London.
- Eggen, A. und Fries, R.** (1995). An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genom. *Anim. Genet.*, **26**: 215-236.
- El-Erian, A. F.** (1969). Bacteriological studies on Limburger cheese. Dissertation. Agricultural University, Wageningen.
- Eliskases-Lechner, F.** (1993). Die Oberflächenflora von Tilsiter Käse - Keimzahlentwicklung und Florazusammensetzung, Käsungsversuche mit Folienreifung. Dissertation. Institut für Milchforschung und Bakteriologie der Universität für Bodenkultur, Wien.
- Eliskases-Lechner, F. und Ginzinger, W.** (1994). Tilsit cheese without smear? *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, **115**: 174-177.
- Eliskases-Lechner, F. und Ginzinger, W.** (1995a). The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait*, **75**: 571-583.
- Eliskases-Lechner, F. und Ginzinger, W.** (1995b). The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwissenschaft*, **50**: 458-462.
- Engel, G. und Roesch, N.** (1995). Development of yeasts during production and ripening of Harz Cheeses (yellow cheese type)). *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **47** (2): 97-112

- Ennahar, S. und Deschamps, N.** (2000). Anti- Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **88**: 449-457.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., Bringel, F. Hubert, J.-C. und Hasselmann, C.** (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.*, **61**: 4381-4387.
- Feder, H.** (1981). Zum Keimprofil des Sauermilchkäses und des Ausgangsproduktes Sauermilchquark. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **88**: 30-31.
- Gianotti, S. M.** (1999). Microbiology and Biochemistry of the *Enterobacteriaceae* Flora of the surface of typical Swiss cheeses. Dissertation. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- Giraffa, G., De Vecchi, P. and Rossetti, L.** (1998). Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.*, **85**: 918-924.
- Golecki, S.** (1998). Reifung von Gouda Käse mit gentechnisch veränderten Starterkulturen. Diplomarbeit, Flensburg.
- Grand, M.** (1992). Evolution de la flore d'affinage sur des fromages de Gruyere. *Schweiz. Milchw. Forsch.*, **21**: 3-5.
- Grimont, F. and Grimont, P. A. D.** (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol.*, **137B**: 165-175.
- Hahn, G. und Hammer, P.** (1990) Listerien-freie Käse – höhere Sicherheit für den Verbraucher. *Dtsch. Milchwirtsch.*, **33**: 1120-1125.
- Hahn, G. und Hammer, P.** (1993). Die Analyse kritischer Punkte (HACCP-Konzept) als Werkzeug der Sicherung von Qualität und gesundheitlicher Unbedenklichkeit. *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, **36**: 1040-1048.
- Hammer, P., Hahn, G. und Heeschen, W.** (1989). Comparative studies on the detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Kieler Michwirtschaftliche Forschungsberichte*, **41**: 175-210.
- Hauschild, T.** (2001). Phenotypic and Genotypic Identification of Staphylococci Isolated from Wild Small Mammals, **24**: 411-416.

- Hemme, D. und Richard, J.** (1986). Utilization of L-methionien and production of methanethiol by bacteria isolated from raw milk Camembert cheese. *Lait*, **66**: 135-142.
- Holzappel, W.H., Geisen, R. und Schillinger, U.** (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-gradeenzymes, *Int. J. Food. Microbiol.*, **24**: 343-362.
- Hoppe-Seyler, T. S., Jaeger, B., Bockelmann W., Heller K.J.** (2000). Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **52** (4): 294-305.
- Hoppe-Seyler, T.S.** (1998). Tilsiter Käse: Entwicklung einer definierten Oberflächen-Starterkultur. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Hosono, A. und Tokita, F.** (1969). Studies on the decarboxylation of amino acids by *Brevibacterium linens*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **40**: 544-550.
- Ingianni, A., Petruzzelli, S., Morandotti, G., Pompei, R.** (1997). Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **18**: 61-66.
- Irlinger, F., Morvan, A. El Solh, N. und Bergere, J.L.** (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative *Staphylococci* in ripening flora from traditional French cheeses. *System. Appl. Microbiol.*, **20**: 319-328.
- Jensen, M. A., Webster, J. A., and Straus, N.** (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (4): 945-952.
- Johansson, G., Berdaguè, J.-L., Larsson, M., Tran, N. and Borch, E.** (1994) Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*, **38**: 203-218.
- Jollivet, N., Chataud, J., Vayssier, Y., Bensoussan, M., und Belin, 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.
- Jones, D., Keddie, R.** (1986). Genus *Brevibacterium*, In: Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Band 2, 8. Aufl. Williams and Wikins, Baltimore, USA. S. 1301-1313.

- Jones, D., Watkins, J. und Erickson, S. K.** (1973). Taxonomically significant color changes in *Brevibacterium linens* probably associated with a carotenoid-like pigment. J. Gen. Microbiol., **77**: 145-150.
- Kadota, H. und Ishida, Y.** (1972). Production of volatile sulfur compounds by microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., **26**: 127-131.
- Kammerlehner, J.** (1995). Einflüsse der Lagerung und Behandlung von Labkäse mit Rotschmiere im Reifungsraum auf die Qualität. Deutsch. Milchwirtschaft, **46**: 1084-1086.
- Keddie, R. M.** (1978). What do we mean by coryneforme bacteria. In: Coryneform Bacteria. (Hrsg.: Bousfield, I. J. and Calley, A. G.). Academic Press. London.
- Keller, S. und Puhán, Z.** (1985). Entsäuerung der Käse mit Schmiere am Beispiel des Tilsiters. Schweizerische Milchwirtschaftliche Forschung, **14**: 3-11.
- Kollöffel, B., Burri, S., Meile, L., and Teuber, M.** (1997). Development of 16S rRNA Oligonucleotide Probes for *Brevibacterium*, *Micrococcus/Arthrobacter* and *Microbacterium/Aureobacterium* Used in Dairy Starter Cultures. System. Appl. Microbiol., **20**: 409-417.
- Krämer, J.** (1992). Lebensmittel-Mikrobiologie. 2. Auflage. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Corrieu, G., Bergere, J.-L. und Spinnler, H.-E.** (2004). The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese deacidification. J. Dairy Res., **87** (5): 1536-1544.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E. und Corrieu, G.** (1999). Growth of *Debaryomyces hansenii* on bacterial surface-ripened soft cheese. J. Dairy Res., **66**: 271-281.
- Lee, I.-M., Baratoszyk, I.M., Gundersen-Rindal, D. E, and Davis, R. E.** (1997). Phylogeny and Classification of Bacteria in the Genera *Clavibacter* and *Rathyibacter* on the Basis of 16S rRNA Gene Sequence Analyses. Appl. Microbiol., **63**: 2631-2636.
- Leehouts, K. J., Kok, J. und Venema, G.** (1990). Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol., **56**: 1541-1546.
- Lefortier-Medvey, M.** (1993). Unsere praktischen Erfahrungen in der Anwendung von Mikroorganismen für die Käseoberfläche. Milchwirtschaftliche Berichte, **114**: 35-38.

- Lenoir, J.** (1984). The surface flora and its role in the ripening of cheese. *IDF Bulletin*, **171**: 3-20.
- Lewis, B. A.** (1981). A study of the antifungal agent(s) produced by four strains of *Brevibacterium linens*. *Dissert. Abstr. Intern.*, **41**: 1655-1656.
- Lewis, B. A.** (1982). Correlation between thiol production and antifungal activity by *Brevibacterium linens*. *Microbiol. Lett.*, **21**: 75-78.
- Loessner, M.** (2000). *Listeria monocytogenes*: Vorkommen in oberflächengereiften Weichkäsen und Entwicklung antagonistischer Reifungskulturen. Dissertation, Technische Universität München.
- Manachini, P. L., Fortina, M. G., Levati, L. und Parini, C.** (1998). Contribution to Phenotypic and Genotypic Characterization of *Bacillus licheniformis* and Description of new Genomovars. *System. Appl. Microbiol.*, **20**: 520-529.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M. and Scintu, M. F.** (2000). Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **89**: 191-197.
- Maoz, A., Mayr, R. und Scherer, S.** (2003). Temporal Stability and Biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (7): 4012-4018.
- Marcellino, M, Beuvier, E., Grappin, R., Guéguen, M. und Benson, D. R.** (2001). Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (10): 4752-4759.
- Martin, N., Berger, C., Le Du, C. und Spinnir, H.E.** (2001). Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. *J. Dairy Sci.*, **84**: 2125-2135.
- Massa, S. und Turtura, G. C.** (1989). Identification of Staphylococci and Micrococci isolated from hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft*, **44**: 219-221.
- Matar, M. G., Koehler, J. E, Malcolm, G., Lambert-Fair, M. A., Tappero, J., Hunter, S. B. und Swaminathan, B.** (1999). Identification of *Bartonella* Species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene Fragment. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 4045-4047.

- Mayr, W.** (1990). Einflussfaktoren auf die Oberflächenflora von Rotschmiere- Käse. Jahresbroschüre - Landesverband bayerischer Molkereifachleute und Milchwirtschaftler e.V., 19-26.
- Mendoza, M., Meugnier, H., Bes, M., Etienne, J. und Freney, J.** (1998). Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *J. Syst. Bacteriol.*, **48**: 1049-1055.
- Miriagou, V., Filip, R., Coman, G. und Tzouvelekis, L. S.** (2002). Expanded-spectrum cephalosporin-resistant salmonella strains in Romania. *J. Clin. Microbiol.*, **40** (11):4334-4336.
- Mora, D., Fortina, M. G., Nicastro, G., Parini, C. und Manichini, P. L.** (1998). Genotypic characterization of thermophilic bacilli: a study on new soil isolates and several reference strains. *Res. Microbiol.*, **149**: 711-722.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauriello, F. und Coppola, S.** (1997). Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and determination of the number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies. *Res. Microbiol.*, **148**: 501-510.
- Mulder, E. G., Adamse, A. D., Antheunisse, J., Deinema, M. H., Woldendorp, J. W. und Zevenhuizen, L. P. T. M.** (1966). The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of the genus *Arthrobacter*. *J. Appl. Bacteriol.*, **29**: 44-71.
- Münch und Grillenberger** (1989). Mikrobiologie für Milchwirtschaft. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer.
- Murray, V.** (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic. Acids Res.*, **17**: 88-89
- Ng-Kwai-Hang, K.F, Zadworny, D., Hayes, J.F. und Kuhnlein, U.** (1991). Identification of kappa-casein genotyp in Holstein sires: a comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.*, **74** (8): 2410-2500.
- Oelsner, W.** (1983). Untersuchungen zum Entsäuerungsverhalten von Oberflächenkeimen der Rotschmierekäse. Diplomarbeit Technische Universität München.
- Ojala, M., Famula, T.R und Medrano, J.F.** (1997). Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. *J. Dairy Sci.*, **80**: 1776-1785.

- Olo-Edimo, M. L.** (2002). Herstellung und Einsatz gefriergetrockneter Kulturen für die Reifung von Rotschmierekäse. Diplomarbeit, Kiel.
- Pascual, A., Clavijo, M.J., Garcia-Perea, M.D. und Martines- Martines, L.** (1995). Phylogenetic analysis of genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45** (4): 724-728.
- Patra, G., Fouet, A., Vaissaire, J., Guesdon, J. L. und Mock, M.** (2002). Variation in rRNA operon number as revealed by ribotyping of *Bacillus anthracis* strains. *Res. Microbiol.*, **153** (3):139-48.
- Petersen, K. M., Westall, S und Jespersen, L.** (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J. Dairy Sci.*, **85**: 478-486.
- Philipp, S.** (1993). Einsatz von Reinkulturen bei der Reifung von Rotschmierekäsen. *Milchwirtsch.Berichte*, **114**: 33-35.
- Pichhard, K.** (1998). *Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis*. 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Piton-Malleret, C. und Gorrieri, M.** (1992). Nature et variabilité de la flore microbienne dans la morge des fromages de Comté et de Beaufort. *Lait*, **72**: 143-164.
- Place, R. B., Hiestand, D., Burri, S. und Teuber, M.** (2002). *Staphylococcus succinus* subsp. *casei*, subsp. nov., a dominant isolate from a surf ripened chees. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**: 353-359.
- Place, R. B., Hiestand, D., Gallmann, H. R. und Teuber, M.** (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *Linens*, subsp. Nov., a Starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**: 30-37.
- Purko, M., Nelson, W. O. und Wood, W. A.** (1951a). The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens*. *J. Dairy Sci.*, **34**: 699-705.
- Purko, M., Nelson, W. O. und Wood, W. A.** (1951b). The equivalence of pantothenic acid and *p*-aminobenzoic acid for growth of *Bacterium linens*. *J. Dairy Sci.*, **34**: 699-705.
- Rattray, F.P., und Fox, P.F.** (1999). Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to chees ripening. *J. Dairy Sci.*, **82**: 891-909.

- Renneberg, J., Rieneck, K. und Rgutschik, E.** (1995). Evaluation of Staph ID32 System and Staph-Zym System for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, **33**: 1150-1153.
- Renner, E.** (1989). Milk and Milk- Based Food Products. *J. Dairy Sci.*, **82**: 891-909.
- Reps, A.** (1993). Bacterial surface-ripened cheeses. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **2. Aufl.**: 137-172. (Hrsg.: Fox, P. F.). Chapman and Hall, London.
- Reyser, E. T., Maisnier-Patin, S., Graradoux, J. J. und Richard, J.** (1994). Isolation and identification of cheese- smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp., *Int. J. Food Microbiol.*, **21**: 237-246.
- Reyser, E.T** (1999). Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, Macel Dekker, New York: 411-503.
- Rheinbaben von, K. V. und Hadlok, R.** (1981). Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. *Antonie van Leeuwenhoek*, **47**: 41-51.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani und Suzzi, G.** (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *J. Appl. Microbiol.*, **90**: 365-371.
- Rudolf, M. und Scherer, S.** (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int.J. Food Microbiol.*, **63**: 91-98.
- Ruimy, R., Riegel, P., Boiron, P., Monteil, H. und Christen, R.** (1995). Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45** (4): 740-760.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor University Press, **2. Aufl.**, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 5463-5467.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M und de Vos, W. M.** (2001). Bifidobacterium diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 504-513.



- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Matto, J. und de Vos, W. M.** (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, **26** (4): 572-584.
- Sauter, H.** (1986). Die Oberflächenflora von Weinkäse - Reifungsfehler und ihre Ursachen. Dissertation. Technische Universität München.
- Schlegel, H. G.** (1992). Allgemeine Mikrobiologie. **7. Aufl.** Georg Thime Verlag Stuttgart.
- Schleifer, K. H.** (1986). Family I. *Micrococcaceae* (Prevot, 1961). In: Sneath, P. H. A. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 1003-1035.
- Schleifer, K. H. und Krämer, E.** (1980). Selective medium for isolating staphylococci. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.C 1*, **1**: 270-280.
- Schleifer, K. H., Klipper-Bälz, R. und Devriese, L. A.** (1984). *Staphylococcus arlettae* sp. Nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. Nov.: Three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst. Appl. Microbiol.*, **5**: 501-509.
- Schlimme, E.** (1990a). Kompendium zur milchwirtschaftlichen Chemie. Volkswirtschaftlicher Verlag München.
- Schwartz, D. C., Cantor, C. R.** (1984). Separation of yeast chromosom-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**: 67-75.
- Seeliger, H. P. R., Jones, D.** (1986). Genus *Listeria*, In: Sneath, P.H., N.S. Mair M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Band 2, **8. Aufl.** Williams and Wikins, Baltimore, USA, S. 1235-1237.
- Seiler, H.** (1986). Identification of chesse-smear coryneform bacteria. *J. Dairy Res.*, **53**: 439-449.
- Seiler, H. und Busse, M.** (1990). The yeasts of cheese brines. *Int. J. Food Microbiol.*, **11**: 289-304.
- Sharpe, M. E., Law, B. A., Phillips, B. A. und Pitcher, D. G.** (1977). Metahnetiol production by coryneform bacteria: Strains from dairy and human skin sources and *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.*, **101**: 345-349.

- Singh, S. P., Salamon, H, Lahti, C. J., Farid-Moyer, M. und Small, P. M.** (1999). Use of Pulsed-Field Gel Elektrophoresis for Molecular Epidemiologic and Population Genetic Studies of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol., **35**: 1927-1931.
- Sjödén, B., Funke, G., Izquierdo, A., Akervall, E. und Collins, M. D.** (1998). Description of some coryneform bacteria isolated from human clinical specimens as *Corynebacterium falsenii* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol., **48**: 69-74.
- Smacchi, E., Fox, P.F. und Gobbetti, M.** (1999a). Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS Microbiology Letters. **170**: 327-333.
- Smacchi, E., Gobbetti, M und Fox, P.F.** (1999b). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS Microbiology Letters. **170**: 327-333.
- Smacchi, E., Gobbetti, M., Panciotti, R. und Fox, P.R.** (1999). Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS Microbiology Letters. **178**: 191-197.
- Spinnler, H. E., Berger, C., Lapadatescu, C. und Bonnarne, P.** (2001). Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. Int. Dairy J., **11**: 245-252.
- Stackebrandt, E., Fowler, V. J., Fiedler, F. und Seiler, H.** (1983). Taxonomic Studies on *Arthrobacter nicotianae* and related taxa: Description of *Arthrobacter uratoxydans* sp. Nov. and *Arthrobacter sulfureus* sp. Nov. and reclassification of *Brevibacterium protophormia* as *Arthrobacter protophormiae* comb. nov.. System. Appl. Microbiol., **4**: 470-486.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. und Ward-Rainey, N. L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int. J. System. Bacteriol., **47**: 479-491.
- Stadhouders, J. und Langeveld, L. P. M.** (1966). The Microflora of the Surface of Cheese Factors Affecting its Composition. 17. Intern. Milchwirtsch.-Kongreß, München, Sect. D: 577-584.
- Tenover, F. C., Arbeit, R., Goering, R. V, Mickelsen, P: A., Murray, B. E., Persing, D. H. und Swaminathan, B.** (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Elektrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol., **33**: 2233-2239

- Terplan, G., Schoen, R., Springmeyer, W., Degle, I. Und Becker, H.** (1986). *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten. *dmz*, **107**: 1358-1368.
- Teuber, M.** (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**: 755-763.
- Teuber, M. und Perreten, V.** (2000). Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant bacteria. *Acta. Vet. Scand.*, 75-87.
- Threadigill, D.W und Womack, E.** (1990). Genomic analysis of the major bovin milk protein genes. *Nucl. Acids. Res.*, **18**: 6935-6942.
- Tokita, F. und Hosono, A., Gojo, T. und Nakamura, M.** (1966). Primary observation on the production of volatile substances by *Brevibacterium linens*. *J. Fac. Agric. Shinshu Univ.*, **4**: 105-120.
- Turbett, G. R. und Sellner, L. N.** (1996). Digestion of PCR and RT-PCR products with restriction endonucleases without prior purification or precipitation. *Promega Notes Magazine*, **60**: 23.
- Vaiman, D., Eggen, A., Mercier, D., Bahri-Darwicch, I., Grohes, C., Bruneau, D., Laurent, P., Chaput, B., Oustry, A, und Frelat, G.** (1995). A genetic and physical map of bovine chromosome 3. *AnimGenet.*, **26** (1): 21-25.
- Valdes-Stauber, N.** (1991). Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 119-130.
- Valdes-Stauber, N. und Scherer, S.** (1994). Isolation and characterization of linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3809-3814.
- Valdes-Stauber, N. und Scherer, S.** (1996). Nucleotide Sequence and Taxonomical Distribution of the Bacteriocin Gene *lin* Cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1283-1286.
- Valdes-Stauber, N., Scherer, S. & Seiler, H.** (1997). Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface mikroflora of brick cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, **34**: 115-129.
- Vaneechoutte, M., Riegel, P., de Briel, D., Monteil, H., Verschraegen, De Rouck, A. and Clays, G.** (1995). Evaluation of the applicability of with amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to indification of species of the genus *Corynebacterium*. *Res. Microbiol.*, **146**: 633-641.

- Vanechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., und Kersters, K.** (1992). Rapid identification of *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis. FEMS Microbiology Letters, **93**: 227-234.
- VDM** – Verband der deutschen Milchwirtschaft (1999a). Nachweis von *Listeria monocytogenes*. VDM Schnellmitteilung, **24/99**,4.
- VDM** – Verband der deutschen Milchwirtschaft (1999b). Nachweis von *Listeria monocytogenes* jetzt auch in deutschem Käse. VDM Schnellmitteilung, **51/99**, 10.
- Wessinger, L.** (1981). Fachkunde für Lebensmitteltechnologie, Milchverarbeitung. Volkswirtschaftlicher Verlag München.
- Wyder, M.-T., Puhán, Z.** (1999). Investigation of yeast flora in smear ripened cheeses. Milchwissenschaft, **54**: (6), 330-333.
- Zipfel, W. und Rathke, K.-D.** (2001). Lebensmittelrecht. Kommentar der gesamten lebensmittel- und weinrechtlichen Vorschriften sowie des Arzneimittelrechtes. Verlag C. H. Beck Münch.

## **9 DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. K. J. Heller möchte ich für die Vergabe eines sehr interessanten Themas danken. Zusätzlich möchte ich noch einen ganz herzlichen Dank aussprechen für die Unterstützung, die mir gewährt wurde. Ich bin sehr dankbar, Sie als Doktorvater gehabt zu haben, und als Mensch kennen lernen durfte.

Herrn Prof. Dr. P. Schönheit möchte ich für seine Bereitschaft danken, das Korreferat für diese Arbeit angenommen zu haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Bockelmann, der es mir ermöglicht hat, in seiner Abteilung eine Vielzahl von Möglichkeiten auszuprobieren und die nette Betreuung und Geduld, die er aufgebracht hat.

Herrn Dr. A. Geis danke ich ganz herzlich für die freundliche Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich Herrn Dr. T. S. Hoppe-Seyler danken, der mir in den Jahren mit fachkundigen Gesprächen und guter Betreuung zur Seite stand.

Dank gilt auch Frau Meiners und Frau Wind für die kooperative und freundliche Unterstützung im Labor.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie, insbesondere an Frau Dr. C. Möller, Frau Dr. A. Wittke, Herrn Dipl. Ing. .P. Willems und Herrn N. Roesch, für die stetige Hilfsbereitschaft, Geduld und moralische Unterstützung.

Besonders möchte ich meiner Mutter, Frau Brigitte Jäger, danken. Sie unterstützte mich darin meine Ziele zu verfolgen und war jeder Zeit für mich da. Danke, das Du mich all die Jahre so unterstützt hast.

Auf diesem Wege möchte ich mich bei meinem Lebenspartner, Herrn Jürgen Ackermann, bedanken, der stets geholfen hat als die Not am größten war.

Abschließend möchte ich mich noch für die sehr lehrreiche und schöne Zeit in der Bundesanstalt für Milchforschung bedanken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Teile dieser Arbeit wurden in den Zeitschriften:

Milchwissenschaft (2002), 57 (11/12): 645-648

Syst. Appl. Microbiol. (2003), 26 (3): 438-444 und

Syst. Appl. Microbiol. (2004), 27 (2): 211-218

veröffentlicht.

Eine weitere Veröffentlichung ist bis Ende 2005 zu erwarten.

Osnabrück, den 19.08.2005

(Beate Jäger)

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 20. Juli 1967  
Geburtsort: Harderberg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulische Ausbildung**

1974 - 1978 Grundsschule Schölerberg  
1978 - 1980 Orientierungsstufe Schölerberg  
1980 - 1984 Realschule  
1984 - 1985 Hauswirtschaftsschule  
1985 - 1989 Graf - Stauffenberg - Gymnasium  
Abschluss: Abitur

### **Berufsausbildung**

1989 - 1990 Praktika im Lebensmittelbereich  
1989 - 1990 Ausbildung zur Molkereifachfrau  
Abschluss: 30.06.1993

### **Studium**

1993 - 1999 Studium an der Universität Osnabrück  
Fachbereich Biologie / Chemie  
1999 - 2000 Diplomarbeit an der Bundesanstalt für  
Milchforschung, Kiel  
„Entwicklung und Einsatz einer definierten  
Rotschmierekultur zur Oberflächenreifung von  
Tilsiter Käse“  
Feb. 2000 Studienabschluss als Diplom Biologin  
März 2000 Promotionsstudentin der  
Christian - Albrechts - Universität zu Kiel, im  
Institut für Mikrobiologie der  
Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel.

### **Beruf**

August 2003 - Dez.2004 Leiterin der Abteilung Lebensmittel-  
überwachung und Trinkwasseranalytik,  
Institut für Hygiene und Infektionsschutz im  
Landesuntersuchungsamt Koblenz

Kiel, den 19.08.2005

(Beate Jäger)

