



Kleinste Helfer bei der KÄSE herstellung

Abb. 1: Beispiele für Rotschmiere-Käse: Limburger, St. Albray, Harzer, Münsterkäse, Tilsiter

Untersuchungen zur Vielfalt der Rotschmiere-Flora

Wilhelm Bockelmann, Jochen Dietrich und Knut J. Heller (Kiel)

Käse, Joghurt, Kefir: Grundstoff für alle diese Lebensmittel ist die Milch. Bei der Herstellung der verschiedenen Milchprodukte spielen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Doch trotz der Vielfalt der Produkte – man denke nur an die vielen verschiedenen Käsespezialitäten – ist die Vielfalt der mikrobiellen Helfer begrenzt. Meist werden definierte Säuerungskulturen eingesetzt, denn sie bieten zwei Vorteile: Hohe Sicherheit für den Verbraucher und konstante sensorische Eigenschaften des Lebensmittels. Einen Sonderfall stellen Rotschmierekäse dar. Neben der Reifung durch Milchsäurebakterien in Käseinnern erfolgt auch eine Reifung an der Käsoberfläche, verursacht durch verschiedene Hefen und Bakterien. Diese stammen normalerweise nicht aus zugesetzten Kulturen, sondern aus der natürlichen „Hausmikroflora“ der Käsereien und sind entsprechend komplex zusammengesetzt.

Quellen für die „Hausmikroflora“ sind die Raumluft, schwer zu reinigende Maschinenteile, Holzbretter für die Reifung, vor allem aber die Salzbaden der Käsereien, die eine käseähnliche Mikroflora aufweisen. Auch wenn der Begriff Rotschmiere nicht gerade Appetit anregend klingt, gehören zu den Rotschmierekäsen viele beliebte Sorten (Abb. 1), angefangen bei Weichkäsen wie Limburger, Münsterkäse und Chaumes, über Schnittkäse wie Tilsiter bis zu den lang gereiften Hartkäsen wie Parmigiano Reggiano oder Grana Padano.

Die mikrobielle Zusammensetzung der Rotschmiere bei verschiedenen Käsesorten ist unterschiedlich, ändert sich im Reifungsverlauf, von Charge zu Charge und ist jahreszeitabhängig. Trotzdem gibt es Gemeinsamkeiten für alle Rotschmierekäse: Zu Reifungsbeginn treten vermehrt salz- und säuretolerante Hefen (*Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*) und Staphylokokken (*Staphylococcus equorum*, Abb. 2) auf, gefolgt von coryneformen Bakterien (z. B. *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*, *Microbacterium gubbeense* und *Arthrobacter arilaitensis*). Neben diesen häufig dominie-

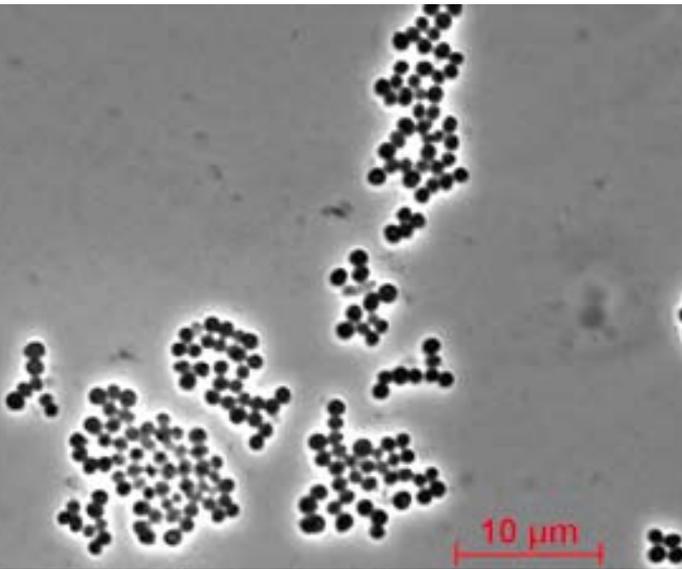


Abb. 2: Typisches Bild von Staphylokokken (hier *S. equorum*) im Phasenkontrast-Mikroskop

renden Spezies sind auch viele andere Spezies von Käseoberflächen beschrieben worden.

Natur oder Kultur?

Traditionell verzichtet man bei Rotschmierekäse auf einen Kultureneinsatz für die Oberfläche, weil die Befürchtung besteht, dass die Einzigartigkeit der Käse unter einer verringerten Biodiversität leidet. Nach verschiedenen wissenschaftlichen Publikationen sollen natürliche, undefinierte Oberflächenfloren auch einen guten Schutz vor Verschimmeln oder Kontamination mit dem pathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* geben. So werden Rotschmierekäse entweder mit verdünntem Salzbad oder traditionell alt-jung geschmiert, das heißt in den zur Oberflächenbehandlung verwendeten Bürstenautomaten werden zunächst gereifte Käse behandelt und danach junge Käse, die noch keine Rotschmiere aufweisen. Die Problematik dieses Ansatzes liegt auf der Hand: Nicht nur die Rotschmiere, sondern auch etwaig vorhandene unerwünschte Mikroorganismen werden auf diese Weise im Betrieb etabliert (Kontaminationskreislauf). Deshalb sind Störungen der Hausmikroflora, zum Beispiel durch erforderliche Reinigungs- oder Desinfektionsmaßnahmen, bei Käseereien gefürchtet. Ohne ein ausgefeiltes Kulturenkonzept hängt die Rotschmiereentwicklung sehr stark von äußeren Umwelteinflüssen ab. Bis vor wenigen Jahren waren nur die Hefe *D. hansenii* und das Bakterium *B. linens* als kommerzielle Oberflächenkulturen verfügbar. Inzwischen sind zwar auch die anderen oben genannten Spezies kommerziell erhältlich, werden bislang aber kaum eingesetzt. Im Max Rubner-Institut (MRI) am Standort Kiel untersuchten wir gemeinsam mit Industriepartnern in einem von der EU geförderten Demonstrationsprojekt (CT02-0486, 2003-2005) den Nutzen und die Risiken des Einsatzes von Oberflächenkulturen. Für drei Schnittkäsesorten konnten wir zeigen, dass die eingesetzten Kul-

turen (unter Verzicht auf alt-jung-Schmierer) nach zwei bis fünfzehn Wochen Reifung auf der Käseoberfläche nachweisbar waren. Je nach Versuchsansatz waren auch unterschiedliche Anteile der Hausmikroflora auf der Käseoberfläche nachweisbar. Die Versuche gaben keine Hinweise darauf, dass sich die unterschiedlichen Oberflächenfloren auf das typische Aroma oder das Aussehen auswirken: Das Ausgangsmaterial, der so genannte Grünkäse, hatte einen viel größeren Einfluss auf die endgültigen Eigenschaften. Aus den Projektergebnissen konnte erfreulicherweise gefolgert werden, dass bei der Entscheidung für einen Kultureneinsatz Sicherheitsaspekte im Vordergrund stehen können, weil nicht jede Käsesorte seine eigene, speziell zusammengesetzte Kultur erfordert. Der Kultureneinsatz soll sicherstellen, dass alle für die Reifung wesentlichen Komponenten, die für ein schnelles Anwachsen auf dem Käse nötig sind, zu Beginn der Reifung vorhanden sind – auch wenn die Hausmikroflora in ihrer Zusammensetzung gestört ist. Vor allem aber lässt sich durch den Einsatz von Oberflächenkulturen das problematische alt-jung-Schmierer unterbrechen.

Staphylokokken der Hausmikroflora

Für den vorliegenden Artikel zur Vielfalt der Rotschmiere wurde die Gruppe der Staphylokokken ausgewählt, zu der einige neuere Untersuchungen zur Biodiversität vorliegen.

Am Max Rubner-Institut haben wir 48 Salzräder von norddeutschen Käseereien untersucht (konventionelle und Bio-Betriebe, Produktion von Käse aus pasteurisierter Milch und aus Rohmilch). Dabei stellten wir fest, dass bei mehr als 2000 analysierten kokkoiden Isolaten die Spezies *Staphylococcus equorum* absolut dominierte, was ihre universelle Bedeutung für den Käsebereich unterstreicht. Dies entspricht auch zahlreichen Flora-Analysen von Rotschmierekäsen aus Deutschland, Dänemark, den Niederlanden, der Schweiz und Frankreich, die über Jahre vom MRI Kiel durchgeführt wurden. Staphylokokken sind durch ihre Säuretoleranz „frühe“ Reifungsorganismen, die auf dem Käse innerhalb weniger Tage zu hohen Keimzahlen heranwachsen. Es ist bekannt, dass *S. equorum* bei der Käsereifung das Wachstum von Schimmelpilzen hemmt (Abb. 3). Ein Tilsiter Versuchskäse aus einem sterilen Salzbad verpilzte erwartungsgemäß im Reifungsraum (13 °C, >95% relative Feuchte) innerhalb weniger Tage. Ein Salzbad mit hohen Konzentrationen an *S. equorum* und der Hefe *Debaryomyces hansenii* bot bei einer parallel angesetzten Charge im gleichen Zeitraum einen guten Schutz vor Verschimmeln, vermutlich durch frühzeitiges und schnelles Wachstum, vielleicht auch durch Ausscheidung pilzhemmender Substanzen. Andere Effekte von *S. equorum* auf die Käsereifung, zum Beispiel bei der Aromatisierung, konnten bislang nicht gefunden werden. *S. equorum* ist seit kurzem auch als Kultur verfügbar.

Französische Rohmilch-Weichkäse

Aus Rohmilch hergestellte französische Weichkäse gelten als besonders natürlich und ursprünglich. Für französische Käse wurde in der wissenschaftlichen Literatur häufig *Staphylococcus xylosum* als typischer Bestandteil der Rotschmiereflora beschrieben. Kulturen dieser

Spezies wurden für die Wurstreifung entwickelt und sind seit langem kommerziell erhältlich. Am MRI untersuchten wir drei französische Weichkäse verschiedener Hersteller auf ihre Staphylokokken-Flora, um festzustellen, ob es wirklich Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen gab (siehe oben, Tab. 1). Jeweils 100 kokkoide Isolate wurden bis zur Spezies klassifiziert. Bei Käse 1 dominierte tatsächlich *S. xylosus* (bei einem 15-prozentigen Anteil an *S. equorum*); bei Käse 2 und 3 dominierte *S. equorum*. Die Art *S. xylosus* wurde ebenfalls nachgewiesen, dazu kam ein Anteil von *Staphylococcus sciuri*, eine ebenfalls lebensmitteltaugliche Spezies. Die Analyse dieser 300 zufällig ausgewählten Isolate zeigte also auf Speziesebene eine geringe Diversität mit 1–2 dominierenden Spezies.

Um genauere Informationen über die Vielfalt innerhalb dieser Bakterienarten zu erhalten, differenzierten wir die Isolate auf Stammebene (Abb. 4a–c). Das Verfahren der Wahl ist die sogenannte Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), bei der die gesamte DNA eines Stammes mit Restriktionsenzymen verdaut wird und die DNA-Fragmente im elektrischen Feld nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt wer-



Abb. 3: Tilsiter Versuchskäse verpilzte in einem sterilen Salzbad im Käsereifungsraum innerhalb weniger Tage (oben), während hohe Konzentrationen von *S. equorum* und *D. hansenii* im Salzbad den Käse weitgehend vor Verpilzungen schützten (unten). Die Zahl der gewachsenen Schimmel (s. Pfeile) und der Durchmesser der Schimmelpots war deutlich reduziert. Eine Rotschmiere bildete sich nicht, da die Käseoberfläche nicht weiter behandelt wurde.

Tab. 1: Zugehörigkeit von *Staphylococcus*-Isolaten von drei französischen Weichkäsen zu den Arten *xylosus*, *equorum* und *sciuri*.

	Anzahl Isolate	<i>S. xylosus</i>	<i>S. equorum</i>	<i>S. sciuri</i>
Käse 1	100	85	15	0
Käse 2	100	10	88	2
Käse 3	100	20	61	19

den. Bei einer Ähnlichkeit von über 95% geht man von Stammgleichheit aus. Bei den *S. equorum*-Isolaten zeigte Käse 3 die größte Vielfalt (Abb. 4a): Von den elf ausgewählten Isolaten waren nur zwei identisch (Mo9 + Mo35). Bei Käse 2 ließen sich die elf ausgewählten *S. equorum*-Isolate lediglich zwei Stämmen zuordnen (Abb. 4b). Die Diversität der *S. equorum*-Isolate von Käse 1 lag zwischen den Werten für Käse 2 und 3; die Flora ließ sich in zwei Gruppen mit >95% Ähnlichkeit (9 + 3 Stämme) einteilen sowie in drei weitere unterschiedliche Stämme (nicht gezeigt). Die Bandenmuster aller *S. equorum*-Isolate entsprachen nicht der seit kurzem kommerziell verfügbaren *S. equorum*-Kultur, die gefundenen Stämme scheinen also der natürlich vorhandenen Hausflora zu entstammen.

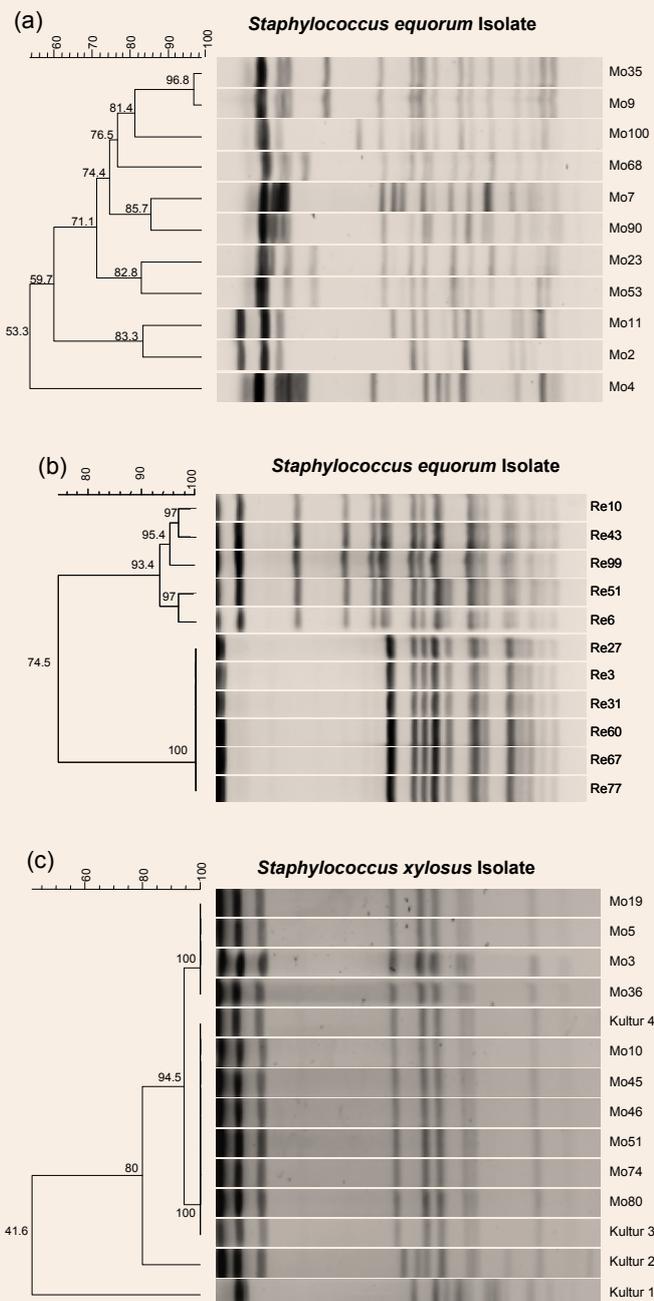
Im Gegensatz zu *S. equorum* konnten die *S. xylosus*-Isolate von Käse 3 der vermutlich eingesetzten *S. xylosus*-Kultur zugeordnet werden (Abb. 4c), da das Muster der DNA-Fragmente typisch für zwei kommerziell erhältliche Kulturstämme war (Kultur 3 + 4). Die beiden Kulturstämme 3 + 4 werden unter verschiedenen Bezeichnungen von zwei Kulturenhersteller angeboten, wobei es sich allerdings um den gleichen Stamm zu handeln scheint. Bei Käse 1 wurden nur zwei *S. xylosus*-Stämme gefunden, bei Käse 2 unterschieden sich alle sieben analysierten *S. xylosus*-Isolate; die Isolate beider Käse konnten in der PFGE keinem kommerziellen Kulturstamm zugeordnet werden, gehörten also vermutlich zur natürlichen Hausflora.

Vielfalt der Staphylokokken auf Rotschmierenkäse

Die **Speziesvielfalt** scheint auch bei sehr naturbelassenen Käsen, die aus Rohmilch hergestellt werden, auf wenige Arten beschränkt zu sein – am häufigsten wurden *S. equorum* und *S. xylosus* nachgewiesen. Für beide Spezies konnten Stämme identifiziert werden, die keiner bekannten kommerziellen Kultur entsprachen: Beide Spezies scheinen also für Rotschmierenkäse typisch zu sein. Es ergab sich nicht die erwartete Dominanz von natürlich vorkommenden *S. equorum*-Stämmen, was langjährige Untersuchungen des MRI an Käsen aus meist pasteurisierter Milch nahe gelegt hätten.

Die **Stammvielfalt** war bei beiden Spezies auf den untersuchten Käsen unterschiedlich. Mittels PFGE konnte bei Käse 3 eine Vielzahl von *S. equorum*-Stämmen, bei Käse 1 eine Vielzahl von *S. xylosus*-Stämmen nachgewiesen werden. In einem anderen Fall (Käse 2) dominierten zwei *S. equorum*-Stämme, bei einem Käse entsprachen die analysierten *S. xylosus*-Isolate bekannten Kulturstämmen. Auch im letzteren Fall verdrängte der Einsatz der Kultur die natürlich vorhandene *S. equorum*-Population nicht vollständig.

Abb. 4: Differenzierung isolierter Staphylokokken auf Stammebene mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese. Chromosomale DNA wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI geschnitten. Die Ähnlichkeiten der entstandenen DNA-Muster sind in einem Dendrogramm dargestellt. Die Zahlenwerte geben die Ähnlichkeit zwischen Stämmen in Prozent an. 5a+c: Isolate von Käse 3, 5b: Isolate von Käse 2. Kultur 1-4 entsprechen Restriktionsmustern kommerzieller *S. xylosus* Kulturen.



Konsequenzen für den Einsatz

Staphylokokken sind typische Vertreter der Rotschmiereflora mit großer Bedeutung in den ersten Reifungstagen für die störungsfreie Entwicklung (Pilzhemmung) der nachfolgend wachsenden coryneformen Bakterien. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Flora auf Speziesebene und unterschiedliche Vielfalt auf Stammebene schienen keine Konsequenzen für das Aroma der untersuchten Käse zu haben: Es handelte sich bei allen untersuchten Käsen um sehr aromatische Rohmilchkäse. Die vermutete Verwendung einer *S. xylosus*-Kultur bei Käse 3 führte ebenfalls weder zu einer Verdrängung der natürlichen Flora noch zu einem flachen Aroma.

Der Wert eingesetzter, definierter Kulturen liegt in einer größeren Unabhängigkeit von negativen Umwelteinflüssen, zum Beispiel bei Desinfektionsmaßnahmen in der Käserei oder bei jahreszeitlich bedingter erhöhter Schimmelbelastung in der Raumluft. Definierte Kulturen tragen damit zu höherer Lebensmittelsicherheit bei. Im Zusammenhang mit anderen Mikroorganismen (Hefen, coryneforme Bakterien) ermöglichen zugesetzte Kulturen die Unterbrechung, wenn nicht den Verzicht auf Kontaminationskreisläufe, wie sie das alt-jung-Schmierens darstellt.

Bisher sind nur wenige Funktionen der Staphylokokken für die Reifung von Rotschmierekäsen bekannt. Die Erhaltung der Vielfalt dieser Bakterienstämme ist eine wichtige Voraussetzung, um nach Identifizierung technologisch wichtiger Eigenschaften geeignete Kulturen isolieren und einsetzen zu können. So wurden zum Beispiel in einem FEI-Forschungsprojekt (FV14786, 2006-2008) aus norddeutschen Salzbädern *S. equorum*-Stämme isoliert, die spezifisch *Listeria monocytogenes* hemmen und somit eventuell als natürliche Schutzkultur eingesetzt werden können. Durch die weltweite, universelle Verbreitung von Bakterien, ihre schnelle Vermehrung und durch die natürliche Anreicherung bestimmter Bakteriengruppen in speziellen Lebensräumen (wie z. B. in Salzbädern von Käsereien) ist – anders als bei Pflanzen und Tieren – nicht von einer Einschränkung der Biodiversität durch Anwendung bestimmter Lebensmittelherstellungstechniken auszugehen. In den einzelnen Betrieben dürfte allerdings eine Änderung der Technologie, wie der Verzicht auf Salzbäder durch Trockensalzen, einen viel größeren Einfluss auf die Biodiversität haben als der Einsatz von Kulturen zum Schmierens der Käse. So fehlt beim Trockensalzen ein natürliches Reservoir für Reifungsmikroorganismen, und zwar sowohl für Staphylokokken und Hefen als auch für coryneforme Bakterien.

Aus Gründen der Lebensmittelsicherheit wird sich künftig ein vermehrter Kultureneinsatz nicht vermeiden lassen. Eine absolute Verdrängung der natürlichen Vielfalt ist durch diesen Kultureneinsatz weder beabsichtigt noch sinnvoll, da die Vielfalt Garant für die Bereitstellung zukünftiger Stämme mit neuen technologischen Eigenschaften ist. ■



Dr. Wilhelm Bockelmann, Dr. Jochen Dietrich und Prof. Dr. Knut J. Heller, Max Rubner-Institut, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Postfach 60 69, 24121 Kiel. E-Mail: wilhelm.bockelmann@mri.bund.de