

## Entwicklung einer anti-listeriellen, frühen Oberflächenreifungskultur für geschmierte Käse

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. S. Scherer/S. Goerges
<b>Forschungsstelle II:</b>	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel Prof. Dr. K. J. Heller/Dr. W. Bockelmann
<b>Industriegruppe:</b>	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: B. Fiedler Goldsteig Käsereien Bayerwald GmbH, Vilshofen
<b>Laufzeit:</b>	2006 – 2008
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 530.700,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Oberflächengereifte Käse weisen eine vergleichsweise hohe Kontaminationshäufigkeit mit *Listeria monocytogenes* (LM) auf. Der Verzehr kontaminierter Lebensmittel gilt als häufige Ursache für Listeriose-Ausbrüche. Listeriosefälle in Deutschland und Europa zeigen seit Jahren eine steigende Tendenz, die Mortalitätsrate liegt zwischen 20 % und 50 %. Neben der Gefährdung der Verbraucher führen notwendige Rückrufaktionen von Listerien-kontaminierten Käsen zu erheblichen finanziellen Einbußen bis hin zur Gefährdung von kleinen, mittelständischen Unternehmen und deren Arbeitsplätzen. Nicht zu unterschätzen sind auch Imageschäden betroffener bzw. verwandter Käsesorten sowie der gesamten Käse-produzierenden Branche.

Trotz verbesserter Technik bei Bürsten-/Sprühautomaten für diese Käse kommt es immer wieder zu Listerienkontaminationen. Dies dürfte an dem immer noch verbreiteten klassischen Alt-Jung-Schmierem (für Harzer: Verwendung von "Kulturkäse") liegen, einem Kontaminationskreislauf, der neben der erwünschten Flora auch sporadisch auftretende Listerien effizient im

Betrieb etabliert. Neben einer weiteren Verbesserung der Hygienebedingungen in Betrieben wären definierte anti-listerielle Reifungskulturen, insbesondere Hefen und Staphylokokken, wünschenswert, sind aber derzeit nicht verfügbar.

Neben der Etablierung definierter Oberflächenkulturen (Thema der vorangegangenen FEI-Projekte AiF 12780 N und AiF 13018 N) ist der Einsatz von Schutzkulturen ein vielversprechender Ansatz im Rahmen der biologischen Konservierung, da die Lebensmittelsicherheit erhöht werden kann, ohne die sensorische Qualität eines Produktes zu beeinflussen oder gar Lebensmittelzusatzstoffe zu verwenden. Die Verwendung von anti-bakteriellen Substanzen (z.B. Nisin) erwies sich bereits in verschiedenen Lebensmittelsystemen als erfolgreich. Aufgrund des frühen Wachstums in der Käsureifung wäre der Einsatz anti-listerieller Hefen und Staphylokokken ideal, da Listerienkontaminationen zu Beginn der Reifung bekämpft werden können. Allerdings liegen kaum anwendungsorientierte Forschungsergebnisse zu diesen Organismengruppen vor.

Ziel des Forschungsvorhabens war deshalb die Entwicklung einer definierten Reifungskultur mit anti-listeriellen Eigenschaften, um das Risikopotential bei der Produktion von Rotschmierekäse und Harzer Käse zu reduzieren und dadurch die Sicherheit für die Verbraucher zu erhöhen.

#### Forschungsergebnis:

**Screening:** Von 175 projektrelevanten Hefen waren nur wenige deutlich anti-listeriell. Das Hemmpotential schien z.T. speziesspezifisch zu sein. Für die Versuche wurde die Hefe *P. norvegensis* G 3047 eingesetzt, die 7 Listerienstämme auch bei hohen eingesetzten Titern ( $10^5$  bis  $10^6$  KbE/cm<sup>2</sup>) bis unter die Nachweisgrenze abtöten konnte. Die 2.000 aus 11 Salzbädern und 48 Käsesorten isolierten Staphylokokken Stämme wiesen nur vereinzelt anti-listerielle Eigenschaften auf. Der im Projekt verwendete Stamm *S. equorum* 91032 hemmte mehrere *L. monocytogenes*-Stämme ähnlich stark wie die Hefe *P. norvegensis*. Die Wirkung erstreckte sich über einen weiten Konzentrationsbereich der Listerien und war bei 5 verschiedenen Listerien-Stämmen verschiedener Serotypen ähnlich. Die Listerienhemmung der Hefen und Staphylokokken erfolgte auch in Mischkultur mit anderen Rotschmierebakterien, die nicht (Staphylokokken) oder nur gering (Hefen) gehemmt wurden; dies sind die Voraussetzungen für einen Einsatz als Kultur in der Käsureifung.

**Hemmung in Käsemodellen:** Listerien wurden im Modell "gereifter Käse" (mod. Milchagar) nur durch *S. equorum*, nicht aber durch *P. norvegensis* gehemmt, im Modell "Grünkäse" (Milchagar) wurden Listerien weder durch Staphylokokken noch durch Hefen gehemmt. Modifikationen der Zusammensetzung des Milchagars zeigten, dass hohe Konzentrationen von Aminosäuren und Peptiden die Listerienhemmung förderten. Entsprechende Konzentrationen konnten jedoch nicht oberflächlich mit der Kulturflüssigkeit appliziert werden.

**Reifung kontaminierter Käse:** Bei der Reifung von kontaminierten Versuchskäsen (Tilsiter, Limburger, Harzer) vermochten weder Staphylokokken noch Hefen *L. monocytogenes* deutlich zu hemmen. Als realistischeres Käsemodell erwies sich einfacher Milchagar, der sich hinsichtlich Listerienhemmung Käse-ähnlicher verhielt als modifizierter Milch-Plate-Count-Agar.

**Charakterisierung der Hemmwirkung (Hefen):** Die Hemmwirkung der Hefen blieb auch nach häufigem Überimpfen und Einfrieren unverändert. Auch in Flüssigmedium konnte eine vergleichbare Listerienhemmung festgestellt werden. Die zellfreien Hefenüberstände zeigten in diversen Experimenten keine Hemmung der Listerien. Für die *P. norvegensis* G 3047 konnte die Ausübung ihrer Hemmfähigkeit gegen Listerien in die stationäre Wachstumsphase eingeordnet werden. Eine Stoffwechselaktivität der Hefen könnte für die Ausübung der Hemmaktivität erforderlich sein. In Anwesenheit geringster Konzentrationen einiger Detergenzien wurde die Hemmung partiell aufgehoben. Das Hemmprinzip könnte durch Zell-Zell-Kontakt unabhängig durch eine oder mehrere voneinander abhängige, diffundierbare Substanzen ausgelöst werden, die *P. norvegensis* G 3047 produziert. Aufgrund der Komplexität und Neuartigkeit des vorliegenden Hemmprinzips konnte die aktive Substanz bisher nicht isoliert werden, woran aber weiterhin gearbeitet wird.

Die im Labor erzielte, ausgezeichnete Hemmwirkung von *P. norvegensis* konnte auf Versuchskäsen nicht bestätigt werden. Folgendes ergab sich bei der Ursachensuche: Käse-übliche Salzkonzentrationen haben keinen negativen Einfluss. Für eine sichere Listerienhemmung sollten mind.  $10^5$  Hefen/cm<sup>2</sup> eingesetzt werden. Bei Käsureifungstemperatur (14 °C) war die Listerienhemmung gegenüber den Standardbedingungen etwas verzögert, aber selbst bei hohen Titern zu 100 % gewährleistet. Einzelne Reifungsbakterien beeinträchtigten das Hemmpotential der Hefe im Käsemodell, was den gemeinsamen Einsatz in einer Kultur problematisch machen könnte. Die antilisterielle Wirkung beruht nicht auf einem pH-Effekt und ist nicht von bestimmten pH-Verhältnissen abhängig. Glucose spielt eine wichtige Rolle, die aber noch nicht ganz geklärt werden konnte. Eine Nutzbarmachung nach vollständiger Aufklärung des Hemmprinzips ist denkbar.

**Charakterisierung der Hemmwirkung (Staphylokokken):** *S. equorum* 91032 produziert eine gegenüber Hitze und proteolytischen Enzymen stabile Substanz, auf die verschiedene Listerien-Indikatorstämme unterschiedlich sensitiv reagieren. Hinweise auf einen hydrophoben Charakter der Substanz, sowie die Synthese dieser durch eine Peptidsynthetase, welche auf eine Ähnlichkeit zu dem bereits bekannten Peptidantibiotikum Micrococcin P<sub>1</sub> deuten, werden durch weitere Arbeiten an Forschungsstelle 1 noch

endgültig bestätigt. Resistenzmutantenbildung konnte beim Hemmstoff des *S. equorum* SE3 bis dato nicht beobachtet und bei den anti-listeriell wirksamen Hefen aus oben erwähnten Gründen noch nicht untersucht werden.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Deutschland ist eines der wichtigsten Produktionsländer für Rotschmierekäse. Wegen geringer Automation werden diese Käsesorten meist von kleineren Unternehmen produziert. Produkte aus Rohmilch und pasteurisierter Milch sind häufig mit Listerien kontaminiert. Durch Rückrufaktionen zum Schutz der Verbraucher entstehen erhebliche finanzielle Einbußen für die betroffenen Betriebe, was die Existenz der kleinen und mittelständischen Unternehmen bedroht.

Nach einer Produktionsunterbrechung bedarf es eines erheblichen kostenintensiven Aufwands (Dekontamination, Neueta-blierung der Flora etc.), bis die Produktqualität wiederhergestellt ist. Neben dem vordringlichen Verzicht auf das Alt-Jung-Schmier in Verbindung mit der Nutzung von Oberflächenkulturen (siehe FEI-Projekte AiF 12780 N und 13018 N) sind anti-listerielle Kulturen eine hilfreiche Ergänzung bei der Qualitätssicherung. Auch bei vermehrtem Einsatz von Oberflächenkulturen bleibt ein Restrisiko, das mit anti-listeriellen Kulturen minimiert werden kann. Die in diesem Projekt untersuchten Kulturen werden über die Forschungsstellen und alle interessierten Kulturenhersteller für alle (Rotschmiere/Harzer) Käse-produzierenden Betriebe verfügbar sein.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2009.
2. Bockelmann, W., Dietrich, J. und Heller, K. J.: Kleinste Helfer bei der Käseherstellung – Untersuchungen zur Vielfalt der Rotschmiere-Flora. ForschungsReport 1, 27-30 (2010).

3. Bockelmann, W.: Secondary cheese cultures. In: Technology of cheese making. (eds. Law, B.A. und Tamime, A.). Wiley-VCH, 2. Auflage ISBN-10: 1-4051-8298-9 (2010).
4. Wenning, M., Büchl, N. und Scherer, S.: Identifizierung von Milchsäurebakterien mit FTIR-Septroskopie und Künstlichen Neuralen Netzen. (Posterabstract) Tagungsband 65. FEI-Jahrestagung 2007, 94-96 (2008).
5. Georges, S., M., Borst, N. und Scherer, S.: Anti-listerial activity of cheese relevant yeast. (Posterabstract) Tagungsband 65. FEI-Jahrestagung 2007, 97-98 (2008).
6. Bockelmann, W., Koslowsky, M., Hammer, P. und Heller, K.J.: Isolierung antilisterieller Staphylokokken aus Salzbadern und von Käseoberflächen, Kieler Milchwirt. Forschungsberichte, 58 (4), 187-202 (2006).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und  
Lebensmittelforschung, Abt. Mikrobiologie  
Weihenstephaner Berg 3  
85354 Freising-Weihenstephan  
Tel.: 08161/71-3516, Fax: 08161/71-4492  
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Max-Rubner-Institut (MRI)  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und  
Lebensmittel  
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie  
Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel  
Tel.: 0431/959-2340, Fax: 0431/609-2306  
E-Mail: mikrobiologie.kiel@mri.bund.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

