



## Doctoral Thesis

# Effect of fermentation conditions on viability, physiological and technological characteristics of autolytic dried direct vat set lactic starter cultures

**Author(s):**

Koch, Stefanie

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005294159> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH Nr. 16909

**Effects of fermentation conditions on viability, physiological and  
technological characteristics of autolytic dried direct vat set lactic starter  
cultures**

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

For the degree of

Doctor of Science

Presented by

**Stefanie Renate Koch**

Dipl. Ing. Univ., TU München

born November 27, 1978

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Prof. Dr. Leo Meile, coexaminer

Dr. Elisabeth Eugster-Meier, coexaminer

2006

**Abstract**

This work examined the correlation between two important physiological properties of lactic acid bacteria for cheese manufacture, specifically for *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, an important bacterium for emmental production. Autolytic activity is important for cheese ripening as autolysis results in the leakage of intracellular proteolytic enzymes in the cheese curd which contribute to flavor and texture formation. On the other hand, autolytic bacteria are believed to exhibit low survival to lyophilization, an important characteristic for production of direct vat set starter cultures which are increasingly substituted to liquid cultures that require several culture steps before inoculation into cheese vat.

In the first experimental approach (chapter 2) the measurement of these two parameters for more than 50 strains of *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from Swiss semi-hard or hard cheeses was performed. No correlation was found ( $p > 0.05$ ) between autolytic activities and survival rates after lyophilization and the strain *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* FAM-10991 which was high autolytic and sensitive to lyophilization was selected as working culture for further studies. In a biochemical approach, autolysins from this strain were characterized using renaturing SDS- and native PAGE and one autolytic activity at approximately 40 kDa was partially purified using various chromatographic steps (chapter 3). The 40 kDa activity was associated with the cell division protein *ftsZ* found in various lactic acid bacteria. Finally, sublethal stress treatments during growth of the selected strain were investigated (chapter 4). We showed that sublethal osmotic stress (2.5% salt) significantly increased survival rates after lyophilization (125-fold) and autolytic properties (2.5 fold) but decreased viable cell counts (5.5-fold) after production compared to non-stressed cells. Sublethal acid (pH 4.5) and heat treatments (53.5°C) even decreased

autolytic activity (2-fold and 4-fold, respectively) but increased survival after lyophilization (31-fold and 37-fold, respectively) compared to unstressed cells (37°C, pH 5.5). Continuous fermentation in a two-stage system with immobilized cells increased viable cells after production and lyophilization of the strain (66-fold) after 17-days, whereas decreased autolytic activity (3-fold) after 17 days of continuous fermentation compared to control batch fermentation. Reversibility studies showed that physiological changes during continuous fermentation were reversible within 3 successive batch cultures.

As a result, it was shown that cross resistance can be triggered by osmotic, temperature and acid stress or by immobilized cell technology which increased survival rate after lyophilization of an even high autolytic strain. The finding, that even sensitive high autolytic strains can be produced as dried cultures, helps to maintain the starter culture diversity and the uniqueness of cheese varieties.

The application of the autolytic culture, which was produced conventionally as liquid culture, in cheese manufacturing (chapter 6) showed increased proteolysis during ripening of swiss type cheese compared to cheeses made with low autolytic culture, whereas no culture effect was found during lipolysis.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit prüft die Beziehung zwischen zwei physiologischen Eigenschaften von Milchsäurebakterien, im speziellen der Spezies *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, ein wichtiges Bakterium für den Emmentalerkäse. Die eine Eigenschaft, die autolytische Aktivität, ist wichtig in Bezug auf die Käsureifung, da durch die Autolyse intrazelluläre proteolytische Enzyme in die Käsematrix gelangen, die auf die Aroma- und Texturbildung Einfluss nehmen. Die Überlebensfähigkeit während eines Gefriertrocknungsvorgangs ist die andere wichtige Eigenschaft in Hinblick auf die Produktion von Direktstartern, die zunehmend herkömmliche Flüssigkulturen ersetzen, die mehrere Überimpfungen benötigen.

In einem ersten experimentellen Ansatz (2. Kapitel), wurde die Verteilung dieser zwei Eigenschaften in über 50 Stämmen der Spezies *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* untersucht, aber es konnte keine Korrelation ( $p > 0.05$ ) gefunden werden. Der autolytische und sensitive Stamm *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* FAM-10991 wurde als Arbeitskult für weitere Studien ausgewählt. In einem biochemischen Ansatz, wurden autolytische Enzyme mit Hilfe von SDS PAGE unter renaturierten und nativen Bedingungen charakterisiert und eine 40 kDa-grosse Aktivität wurde anhand von mehreren chromatographischen Schritten gereinigt (Kapitel 3). Die Aktivität bei 40kDa wurde in Verbindung gebracht mit einem Zellteilungsprotein *ftsZ*, welches in vielen Milchsäurebakterien vorkommt. Weiterhin haben Stressbehandlungen während des Wachstums des ausgewählten Stammes gezeigt, dass sublethaler osmotischer Stress (2.5% Salz) die Überlebensrate nach dem Gefriertrocknen (125-fach) und die autolytische Aktivität (2.5-fach) signifikant erhöht, aber die Lebendkeimzahl nach der Produktion (5.5-fach) reduziert. Sublethale Säure- (pH 4.5) und Hitzebehandlungen (37°C) schwächten sogar die autolytische Aktivität des Stammes (2- und 4-fach), aber erhöhten die Resistenz gegenüber dem Gefriertrocknen (31-

und 37-fach). Die Lebendkeimzahl nach der Produktion und Gefriertrocknung wurde 66-fach erhöht, nachdem der Stamm immobilisiert und in einem 2-Stufen System kontinuierlich 17 Tage lang fermentiert wurde, wobei die autolytische Aktivität 3-fach reduziert war nach 17 Tagen im Vergleich zur einer Kontroll-Batch- Fermentation (Kapitel 5). Anschliessend konnte in Reversibilitätsstudien gezeigt werden, dass die untersuchten physiologische Veränderungen reversibel waren.

Zusammenfassend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die Stressantwort durch Salz, Säure und Temperatur sowie durch Immobilisierung induziert wird. Dadurch wird die Überlebensfähigkeit während des Gefriertrocknens eines hoch autolytischen sensitiven Stammes erhöht und der Stamm kann als Trockenkulturen produziert werden. Diese Erkenntnis trägt zu der möglichen Erhaltung der Kulturreichhaltigkeit und der Einzigartigkeit der verschiedenen Käsesorten bei.

Bei der Anwendung der autolytischen Kultur in Käseversuchen, die konventionell als Flüssigkultur eingesetzt wurde, konnte eine erhöhte Proteolyse während der Käsereifung im Vergleich zu einer nicht autolytischen Kultur gezeigt werden, dagegen konnte kein Einfluss der Kultur bei der Lipolyse gefunden werden (Kapitel 6).