



Doctoral Thesis

Characterization of propionibacteria in Swiss raw milk by biochemical and molecular-biological methods

Author(s):

Fessler, Denise Sophie

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001855109> →

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 No. 12328

**Characterisation of propionibacteria
in Swiss raw milk by biochemical
and molecular-biological methods**

A thesis submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich
for the degree of
Doctor of Technical Sciences

presented by

DENISE SOPHIE FESSLER

Dipl. Lm.-Ing. ETH
born September 25th, 1969
citizen of Walzenhausen (AR)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Z. Puhan, examiner
Dr. M. G. Casey, co-examiner
Dr. S. Lortal, co-examiner

Zurich 1997

Summary

Characterisation of propionibacteria in Swiss raw milk by biochemical and molecular-biological methods

For the manufacture of Emmental cheese in Switzerland raw milk is used. The formation of eyes, however, is achieved by addition of culture with selected strains of propionibacteria. The wild propionibacteria in raw milk and cheese have until now not been systematically analysed. However, it is known that they are responsible for defects such as brown spots and split defect in various hard or semi-hard raw milk cheeses and that technological factors during cheese manufacture may influence the occurrence of these defects. The commercially available *P-culture*, a mixture of *P. freudenreichii* strains, has been used for many years and a new culture, *Prop 96*, is also commercially available since 1996. The strains included in these cultures have until now not been analysed by molecular-biological methods.

In the present study the propionibacterial flora in Swiss raw milk was investigated and propionibacteria were classified by protein profile analysis, restriction profile analysis of the 23S rRNA gene, plasmid content and RAPD profiles. Propionibacteria isolated from various cheese types with defects were differentiated and classified, and compared with the propionibacteria strains isolated from raw milk.

The propionibacterial flora in Swiss raw milk was found to be extraordinarily rich. All four dairy *Propionibacterium* sp. were found in lowland raw milk, 71% were *P. freudenreichii*, 19% *P. jensenii*, 8% *P. acidipropionici* and 2% *P. thoenii*. In alpine raw milk *P. acidipropionici* was not found, *P. freudenreichii* made up 55%, *P. jensenii* 15% and *P. thoenii* 30% of the total. Among the 278 *P. freudenreichii* strains 219 (79%) different strains were identified by RAPD at the strain level. For the other species strain diversity was even higher. Only 30% of all analysed strains carried plasmids.

Commercial cultures were analysed by RAPD and the presence of the strains making up the *P-culture* was looked for in Emmental cheese, in order to see, if all the strains grew in the cheese. Of the six strains comprised in the *P-culture*, four strains were found to be identical, meaning that this culture contains only three different strains. One of these strains

could not be detected in commercially available premium grade Emmental and one was only occasionally present. Consequently, it is possible that only one of the *P-culture* strains is responsible for the good cheese quality. The two strains in *Prop 96* were found to be identical, but different from the *P-culture* strains.

In brown spots of Emmental and Sbrinz cheeses various strains of *P. freudenreichii* were detected by RAPD. The brown spots of Appenzell cheese also contained *P. jensenii* and *P. acidipropionici*. In Gruyere and Sbrinz cheeses with split defects, different *P. freudenreichii* strains were detected. Only one of the *P. freudenreichii* strains of Appenzell, Gruyere and Sbrinz with defects was identical with strains isolated from raw milk.

Model Emmental cheeses were produced with selected wild *P. freudenreichii* strains. Cheeses manufactured two or three times with the same strain were of identical quality. Chemical, microbiological and molecular-biological methods detected no differences between cheeses of favourable quality and cheeses with tendency towards split defect. Some chemical and microbiological differences, however, were detected between cheeses of favourable quality and cheeses with brown spot formation. The most striking difference was between the growth curves of strains producing good quality cheeses and strains producing cheeses with brown spots. The latter showed slower growth in model Emmental. Raster electronic microscope photos of cheese samples taken at magnifications between 6000 and 75000 showed, that in cheeses with brown spots propionibacteria were only found in the spots and not in the spot free zones. It could also be shown, that model Emmental cheese of good sensory and overall quality can be produced with various single wild *P. freudenreichii* strains. This was confirmed with three wild strains by manufacturing commercial Emmental cheeses.

Zusammenfassung

Charakterisierung von Propionsäurebakterien in Schweizer Rohmilch mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden

Zur Herstellung von Emmentaler Käse in der Schweiz wird Rohmilch verwendet. Die Lochbildung wird jedoch erreicht durch den Zusatz von Kulturen ausgewählter Propionsäurebakterien. Die wilden Propionsäurebakterien in Rohmilch und Käse wurden bis heute nicht systematisch untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass diese für Fehler wie braune Tupfen und Nachgärung in verschiedenen Hart- und Halbhartkäsen verantwortlich sind, sowie dass technologische Faktoren bei der Käseherstellung das Auftreten dieser Fehler beeinflussen können. Die *P-Kultur*, eine Mischung von sechs *P. freudenreichii*-Stämmen, wird seit vielen Jahren für die Herstellung von Emmentaler Käse eingesetzt, und eine neue Kultur, *Prop 96*, ist seit 1996 erhältlich. Die Stämme dieser beiden Kulturen wurden bis jetzt nicht mit molekularbiologischen Methoden untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Propionsäurebakterien-Flora in Schweizer Rohmilch untersucht und die Propionsäurebakterien klassifiziert anhand der Analyse von Proteinprofilen, Restriktionsprofilen der 23S rRNA, des Plasmidgehalts und RAPD-Profilen. Aus verschiedenen Käsesorten mit Fehlern isolierte Propionsäurebakterien wurden ebenfalls differenziert, klassifiziert und mit den Stämmen aus der Rohmilch verglichen.

Die Propionsäurebakterien-Flora in Schweizer Rohmilch wurde als äusserst reich befunden. Alle vier milchwirtschaftlich relevanten *Propionibacterium* sp. wurden in Rohmilch aus dem Flachland nachgewiesen, 71% waren *P. freudenreichii*, 19% *P. jensenii*, 8% *P. acidipropionici* und 2% *P. thoenii*. In Alp-Rohmilch wurden keine *P. acidipropionici* gefunden, 55% waren *P. freudenreichii*, 15% *P. jensenii* und der *P. thoenii*-Anteil erreichte 30%. Auf Stamm-Niveau wurden unter den 278 *P. freudenreichii* mittels RAPD 219 (79%) verschiedene Stämme identifiziert. Die Vielfalt der Stämme war bei den anderen Spezies sogar noch grösser. Von allen analysierten Stämmen enthielten nur 30% Plasmide.

Die Propionsäurebakterien-Stämme aus *P-Kultur* und *Prop 96* wurden mittels RAPD analysiert und das Vorhandensein der Stämme der *P-*

Kultur wurde im Emmentaler nachgewiesen, um festzustellen, welche der Stämme im reifen Käse vorkommen. Von den sechs in der *P-Kultur* eingesetzten Stämmen wurden vier für identisch befunden, und folglich besteht diese Kultur nur aus drei verschiedenen Stämmen. Einer dieser Stämme konnte nicht in käuflichem Emmentaler von erster Qualität nachgewiesen werden, und einer war nur gelegentlich vorhanden. Folglich könnte möglicherweise nur einer der *P-Kultur*-Stämme für die Käsequalität verantwortlich sein. Die zwei Stämme der *Prop 96*-Kultur wurden als identisch identifiziert, aber sie waren verschieden von den Stämmen der *P-Kultur*.

In den braunen Tupfen von Emmentaler und Sbrinz Käsen wurden mittels RAPD verschiedene *P. freudenreichii*-Stämme nachgewiesen. Die braunen Tupfen in Appenzeller enthielten auch *P. jensenii* und *P. acidipropionici*. In Greyerzer und Sbrinz Käsen mit Nachgärung wurden verschiedene *P. freudenreichii*-Stämme nachgewiesen. Nur einer der *P. freudenreichii*-Stämme aus Appenzeller, Greyerzer und Sbrinz mit Fehlern war identisch mit einem der Stämme, die aus Rohmilch isoliert wurden.

Mit ausgewählten wilden *P. freudenreichii*-Stämmen wurden Modell-Emmentaler Käse produziert. Käse, die zwei- beziehungsweise dreimal mit demselben Stamm hergestellt wurden, waren von identischer Qualität. Chemische, mikrobiologische und molekularbiologische Methoden stellten keine Unterschiede fest zwischen Käsen von guter Qualität und solchen mit einer Tendenz zur Nachgärung. Einige chemische und mikrobiologische Unterschiede wurden jedoch zwischen Käsen von vorteilhafter Qualität und solchen mit braunen Tupfen gefunden. Der auffälligste Unterschied bestand zwischen den Wachstumskurven der Stämme, die Käse von guter Qualität und denen, die Käse mit braunen Tupfen lieferten, indem die letzteren in Modell-Emmentalern ein langsames Wachstum aufwiesen. Raster-elektronenmikroskopische Fotos von Käseproben zeigten bei einer Vergrößerung zwischen 6000 und 75000, dass Propionsäurebakterien in Käsen mit Tupfen nur in den braunen Tupfen selbst, nicht aber in den tupfenfreien Zonen anwesend waren. Es wurde zudem gezeigt, dass Modell-Emmentaler von guter sensorischer und Gesamt-Qualität mit verschiedenen wilden *P. freudenreichii*-Einzelstämmen hergestellt werden kann. Dies wurde auch mit der Herstellung von Emmentaler Käse mit drei Wildstämmen in einer gewerblichen Käserei bestätigt.

Résumé

Caractérisation des bactéries propioniques dans le lait cru suisse avec des méthodes de biochimie et de biologie moléculaire

Le lait cru est utilisé pour la fabrication du fromage d'Emmental, mais la formation des yeux est atteinte par l'addition de cultures de souches de bactéries propioniques sélectionnées. Les bactéries propioniques sauvages n'ont pas été analysées systématiquement jusqu'à présent dans le lait cru et le fromage suisse. Il est toutefois connu, que ces bactéries sont responsables de défauts, tels que les points bruns et la fermentation secondaire, qui se manifestent dans différents fromages durs et mi-durs et que des facteurs technologiques dus à la fabrication du fromage, peuvent influencer l'apparition de ces défauts. La *P-culture* est un mélange de six souches de *P. freudenreichii*. Elle est utilisée depuis longtemps pour la fabrication du fromage d'Emmental. Une nouvelle culture, nommée „Prop 96“, est commercialisée depuis 1996. Les souches de ces deux cultures n'ont pas été analysées par des méthodes de biochimie et de biologie moléculaire.

Le présent travail a consisté à étudier la flore propionique dans le lait cru suisse et à classer les bactéries propioniques grâce à l'analyse des profils protéiniques, des profils de restriction du gène rARN 23S, du contenu plasmidique et des profils du RAPD. Des bactéries propioniques, isolées de différents types de fromages présentant des défauts ont été différenciées, classifiées et comparées avec des souches du lait cru.

La flore propionique dans le lait cru de Suisse s'est avérée être extraordinairement riche. Les quatre espèces de *Propionibacterium* ont été trouvées dans le lait cru de plaine, 71% d'entre elles étaient des *P. freudenreichii*, 19% des *P. jensenii*, 8% des *P. acidipropionici* et 2% des *P. thoenii*. Dans le lait cru d'alpage, aucune souche de *P. acidipropionici* n'a été trouvée, et la proportion des *P. freudenreichii* a atteint 55%, celle des *P. jensenii* 15% et celle des *P. thoenii* 30% de toutes les bactéries propioniques. 219 souches différentes (79%) ont été identifiées par RAPD parmi les 278 *P. freudenreichii*. La diversité des souches a été encore plus grande dans les autres espèces. Parmi toutes les souches analysées, seules 30% contenaient des plasmides.

La *P-culture* et la culture *Prop 96* ont été analysées par RAPD et la présence des différentes souches de la *P-culture* a été vérifiée par cette méthode dans le fromage d'Emmental, afin d'établir, si toutes les souches s'étaient effectivement multipliées dans le fromage. Des analyses ont permis de déterminer que quatre des six souches de la *P-culture* sont identiques, et que par conséquent, cette culture ne consiste effectivement qu'en trois souches différentes. L'une de ces trois souches n'a pas été détectée dans l'Emmental commercial de première qualité, et une autre n'a été que parfois présente. Ainsi, il est possible que la qualité du fromage ne soit influencée que par une seule souche de la *P-culture*. Quant aux deux souches de la culture *Prop 96*, elles se sont avérées être les mêmes, mais cependant différentes des souches de la *P-culture*.

Diverses souches de *P. freudenreichii* ont été détectées par RAPD dans les points bruns de l'Emmental et du Sbrinz. Dans l'Appenzell, les points bruns contenaient en plus des *P. jensenii* et des *P. acidipropionici*. Dans les fromages Gruyère, Sbrinz et Appenzell avec fermentation secondaire, des souches différentes de *P. freudenreichii* ont été détectées. Mais seule une d'elles était identique avec une souche isolée du lait cru.

Des fromages d'Emmental modèles ont été fabriqués avec quelques souches sauvages de *P. freudenreichii*. Les fromages, fabriqués plusieurs fois avec la même souche, ont été tous de même qualité. Les méthodes chimiques, microbiologiques et de biologie moléculaire n'ont décelé aucune différence entre les fromages de bonne qualité et les fromages ayant une légère fermentation secondaire. Cependant quelques différences chimiques et microbiologiques ont été trouvées entre les fromages de bonne qualité et les fromages contenant des points bruns. La différence la plus nette a été perçue au niveau des courbes de croissance entre les souches qui fournissaient du fromage de bonne qualité et les autres. Dans les Emmental modèles, la croissance des souches isolées des fromages contenant des points bruns a été plus lente que celle des souches isolées des fromages de bonne qualité. Des photos obtenues par microscopie électronique à balayage d'échantillons de fromage contenant des points bruns ont montré, à un agrandissement de 6000 à 75000 fois, que les bactéries propioniques ne se trouvaient que dans les point bruns. Ce travail a permis également de montrer qu'une seule souche sauvage de *P. freudenreichii* était nécessaire pour fabri-