ETH zürich

ETH Library

Microbiology and biochemistry of the Gram-positive microflora of the surface of typical Swiss cheeses

Doctoral Thesis

Author(s):
Burri, Sandra

Publication date:
1999

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-003890506

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. 13498

MICROBIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF THE GRAM-POSITIVE MICROFLORA OF THE SURFACE OF TYPICAL SWISS CHEESES

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH (ETHZ)

for the degree of
DOCTOR OF TECHNICAL SCIENCES

presented by
SANDRA BURRI, dipl. Lm.-Ing. ETH
born March 28, 1968, citizen of Rüschegg (BE)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. Teuber, examiner
Dr. W. Bockelmann, co-examiner

Zurich 1999

Summary

Several traditional Swiss red smear cheese varieties depend on the presence and functioning of a specific surface microflora with regard to their organoleptic properties. During cheese ripening a complex succession of different microorganisms within the microflora takes place. The limited knowledge of the composition of the smear and of its functions including e.g., production of aroma and flavour notes by proteolysis and lipolysis, typical appearance and competitive displacement of undesirable microbes demanded explanation. The aim of this thesis was to elucidate the basic microbiology and biochemistry of the Gram-positive surface microflora of a selection of typical Swiss red smear cheeses.

About 70 Gram-positive bacterial strains from the surface of 12 different types of mature red smear cheeses (Bündner Bergkäse, Appenzeller, Tilsiter, Gruyère, a Swiss soft cheese, Küssnachter, Limburger, Châume[1], St. Paulin, Tête de Moine, Farmer and Arenenberger) were isolated. Then a surface ripened Swiss soft cheese was focused on. From this cheese another 50 strains were isolated over a period of about 50 days during ripening. Thus the succession of its Gram-positive microflora was determined. The isolates were collected for further investigations. First, they were identified with traditional and modern molecular methods down to genus and partly to species levels. Identification of the *Micrococcineae*-isolates was realised by colony-hybridisation with three genus- or group-specific oligonucleotide probes targeting the 16S rDNA regions of the genera or genus-group, *Brevibacterium*, *Microbacterium* and *Arthrobacter/Micrococcus* respectively. For confirmation, the polymerase chain reaction (PCR) technique with two group/genus specific oligonucleotides each was used. The rest of the isolates was identified by sequencing part of their 16S rDNA. Enterococci, lactococci, staphylococci, corynebacteria and one *Brachybacterium* were found and the former three were confirmed by API 20 Strep and API Staph identification. Most isolates were assigned to the genus or genus-group, *Brevibacterium* and *Arthrobacter/Micrococcus*, followed by staphylococci, corynebacteria, enterococci and lactococci.

Brevibacterium linens-strains were differentiated by genome comparison using PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). Twenty-six *B.linens*-isolates showed 9 different restriction patterns indicating a great genetic variety within this well-known orange cheese surface species.

Antibiotic resistances to 14 different antibiotics of most isolates and starter cultures were determined by disc-test procedure. In general, only few or no antibiotic resistances were found in the *Micrococcineae*-isolates and -starter cultures.

[1] French cheese

Most of the brevibacteria exhibited methicillin resistance which is probably intrinsic. In contrast, the *Lactococcus*- and *Enterococcus*-isolates showed several multiple antibiotic resistances.

The *Brevibacterium linens*-isolates were additionally subjected to a preliminary test for their ability to produce antibacterial agents against undesirable microorganisms such as e.g. *Listeria*. However, none of the tested isolates inhibited growth of the indicator strain *Listeria innocua* LME L17.

A first biochemical characterisation yielded insights into the distribution of proteolytic and lipolytic strains. At a temperature of 16°C about 55% of the tested Gram-positive isolates showed proteolytic activity and about 30% showed lipolytic activity indicating potential important contribution to cheese ripening.

Specificities of proteolytic activity were determined by SDS-PAGE and the zymogram-technique using bovine caseins as substrates. The proteolytic activities of *Brevibacterium linens*-strains was focused on. Breakdown products from α-, β- and κ-caseins were produced by all tested strains but at different velocities. Most strains showed preference for β-casein degradation. Zymograms revealed that most brevibacteria possess one or two heat stable proteases or peptidases at molecular weights of about 30 and 50 kDa, respectively and several (from about 2 to 8) heat sensitive proteases or peptidases as well.

Parallel to the investigations summarised above, two different types of Swiss semi-hard cheeses (2 Tête de Moines and 2 Gruyères from different cheese producers) were investigated in a longitudinal study observing the development of their surface microflora over a ripening period of 80 days. The smear composition of the 4 cheeses was monitored by *in situ* hybridisation after 5, 14, 25 and 80 days of ripening. The percentages of brevibacteria and bacteria with high DNA G+C content were analysed with the corresponding fluorescent labelled probes. Brevibacteria were detected within a range of about 7 to 23% in mature cheese which is a generally well known value.

With the gained knowledge from this study and the results from the other 2 parts of the «Swiss Priority Programme Biotechnology» project analysing Gram-negative bacteria and yeasts and moulds of the cheese surface, the development of a suitable surface starter culture with reliable functions for a safe cheese production on pilot scale could be started. But before testing a starter culture mixture it might be advisable to acquire more detailed information on enzymes of the smear microorganisms and their genetic aspects as well as to identify all isolates to species level.

Zusammenfassung

Das Vorhandensein und die Funktion einer spezifischen Oberflächenmikroflora sind für die organoleptischen Eigenschaften verschiedener traditioneller Schweizer Rotschmierekäse von Bedeutung. Im Verlaufe der Käsereifung kommt es zu einer komplexen Folge verschiedener Mikroorganismen. Die genauen Vorgänge und die Identifizierung der Oberflächenflora einschliesslich deren biochemischen und technologischen Funktionen sind für Schweizer Rotschmierekäse noch weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war die taxonomische Zuordnung der Gram-positiven Bakterien und die Aufklärung biochemischer Vorgänge, welche massgeblich zur Reifung und somit zum Erscheinungsbild und Geschmack der Rotschmierekäse beitragen.

Es wurden zunächst etwa 70 Gram-positive Stämme aus 12 verschiedenen reifen Käsesorten (Bündner Bergkäse, Appenzeller, Tilsiter, Gruyère, ein Schweizer Weichkäse, Küssnachter, Limburger, Châume[1], St. Paulin, Tête de Moine, Farmer und Arenenberger) isoliert und oberflächlich charakterisiert. Dann wurden während der Reifung eines Schweizer Weichkäses täglich Bakterien isoliert und es wurde beobachtet, wie sich die Rindenflora über die Zeit von ca. 50 Tagen veränderte. Die Isolate aus den 12 verschiedenen Käsen und diejenigen aus dem Schweizer Weichkäse wurden gemeinsam weiteren Untersuchungen unterworfen. Zunächst wurden sie mittels moderner molekularbiologischer und klassischer Methoden identifiziert. Die *Micrococcineae*-Isolate wurden mittels Koloniehybridisierung mit spezifischen Sonden für Brevibakterien, Arthrobacter/Mikrokokken und Mikrobakterien bestimmt. Eine Bestätigung dieser Identifikation erfolgte mittels PCR-Technik mit je zwei spezifischen Oligonukleotiden. Der Rest der Mikroflora, welche etwa die Hälfte aller Isolate ausmachte, wurde mittels 16S rDNS-Teilsequenzierung identifiziert. Es wurden Enterokokken, Laktokokken, Staphylokokken, Corynebakterien und ein *Brachybacterium* gefunden. Die Identifizierung der Enterokokken, Laktokokken und Staphylokokken wurde mittels API 20 Strep respektive API Staph bestätigt.

Brevibacterium linens-Stämme wurden am häufigsten isoliert und deshalb einer Speziesuntscheidung mittels WFGE (Wechselfeldgelektrophorese) unterworfen. Die Genome von 26 untersuchten *Brevibacterium linens*-Isolate zeigten 9 verschiedene Restriktionsmuster, was auf eine grosse genetisch klonale Vielfalt innerhalb des am besten beschriebenen Käseoberflächenbakterium hinweist.

Des weiteren wurden einige Isolate und Starterkulturen auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Es wurden 14 verschiedene Antibiotika eingesetzt. Im allgemeinen zeigten

[1] Französischer Käse

die *Micrococcineae*-Isolate und -Starterkulturen keine bis wenige Resistenzen gegen die verwendeten Antibiotika. Viele Brevibakterien wiesen eine vermutlich intrinsische Methicillin-Resistenz auf. Im Gegensatz dazu fanden sich in den Laktokokken und Enterokokken einige Mehrfachresistenzen.

Die *Brevibacterium linens*-Isolate wurden mittels einer einfachen Testmethode auf ihre Fähigkeit, antimikrobielle Substanzen (Bacteriozine etc.) gegen unerwünschte Begleitfloren z.B. Listerien zu produzieren, geprüft. Keines der getesteten Isolate vermochte jedoch das Wachstum des Indikatorstammes *Listeria innocua* LME L17 zu beeinflussen.

Erste biochemische Untersuchungen gaben Aufschluss über die Verbreitung proteolytischer und lipolytischer Aktivitäten unter den Isolaten und Starterkulturen. Bei Temperaturen von 16°C zeigten etwa 55% aller getesteter Stämme proteolytische und etwa 30% lipolytische Aktivität, was darauf hinweist, dass diese Stämme massgeblich zur Reifung eines Käses beitragen können.

Die proteolytisch aktiven *Brevibacterium linens*-Stämme und ein paar wenige andere proteolytisch aktive Stämme wurden danach auf ihre Fähigkeit, α-, β- und κ-Casein abzubauen getestet. Es stellte sich heraus, dass sämtliche Stämme alle drei Caseine abbauen konnten aber verschieden schnell und zu verschiedenen Abbauprodukten. Mit Zymogrammen konnte gezeigt werden, dass verschiedene *Brevibacterium linens*-Stämme eine oder zwei hitzestabile Proteasen von ca. 30 bzw. 50 kDa aufweisen.

Anhand von Oberflächenmikrofloren von 4 Käsen, je zwei Gruyère und 2 Tête de Moine, wurden noch einmal Reifungsverlaufe beobachtet. Die Reifungsverlaufe wurden während einer Zeit von 80 Tagen beobachtet, nach 5, 14 und 25 Tagen wurden Stämme isoliert und teilweise identifiziert. Der Anteil an Brevibakterien und Bakterien mit hohem G+C Gehalt in der DNS wurde mittels *in situ* Hybridisierung ermittelt. In den reifen Käsen konnte ein Brevibakterienanteil von 7 bis 23% ausgemacht werden, was etwa den Werten in anderen v.a. ausländischer Käsesorten entspricht.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen und zusammen mit den Resultaten der anderen 2 Arbeiten, welche zum selben SPP-Projekt gehören, könnte man nun damit beginnen, Starterkulturen zu definieren und damit Testkäse zu produzieren. Vorher oder parallel dazu wäre es sicherlich angebracht, sich mehr Erkenntnisse über die Enzyme der Schmiereflora und deren genetischen Aspekte anzueignen, und alle Isolate auf Spezies-Ebene zu identifizieren.