

Herstellung von Betriebskulturen



Info Kulturenversand

- Die Flüssigkulturen der Liebefeld Kulturen AG werden wöchentlich frisch produziert.
- Nach Qualitätskontrolle und Freigabe erfolgt der reguläre Versand am Mittwoch und Donnerstag.
- Der Postversand stellt einen Unterbruch in der Kühlkette und ist somit ein leichter „Stressfaktor“ für die Mikroorganismen. Die Erfahrung und sorgfältige Abklärungen haben aber gezeigt, dass die normale Aktivität der Kultur bei reibungslosem Versandablauf dennoch bis zum Haltbarkeitsdatum gewährleistet ist.

Wichtig:

- ✓ **Wenn die Kultur eintrifft** sofort gekühlt lagern (Kühlschrank, <math><5^{\circ}\text{C}</math>)
- ✓ **Wenn die Kultur am üblichen Auslieferungstag nicht eintrifft**, Meldung an den Kulturenbestelldienst - nötigenfalls wird umgehend Ersatz geliefert.

Grundregeln

Hygiene, Bakteriophagen- Prophylaxe

- Grundregel: Kompromisslose Sauberkeit im Umgang mit Kulturen (Material, Personal, Umgebung)
- Beimpfung und Bebrütung optimalerweise abseits der Fabrikationsräume in sauberen, trockenen und gut durchlüfteten Räumen
- Impfen idealerweise zeitlich getrennt vor oder nach der Käseproduktion
- Desinfektion der Hände und des «Impfumfeldes» mit Ethanol oder Isopropanol geeigneter Qualität.
- Bunsenbrenner-Flamme neben geöffneten Impffläschen (Luftstrom ↑)

1. Empfohlene Nährmedien

- frisch **zentrifugierte Magermilch*** (Magermilch immer frisch hitzebehandeln, denn frische Milch = tiefere Keimbelastung = besserer Erhaltungserfolg)
- oder **Pulvermagermilch*** (9 Liter Wasser und 1 kg Instant- Magermilchpulver)
- oder Direktbeimpfung fixfertiger **UHT-Magermilch** in Tetra-Paks. Erfahrungsgemäss ist die Säureentwicklung der Kulturen in UHT-Magermilch schneller als in sterilisierter Magermilch (weniger Maillardprodukte). Nachteil: Die nicht transparente Verpackung ermöglicht keine visuelle Kontrolle während der Bebrütung.

UHT-Vollmilch oder UHT-Milchdrink sind wegen des homogenisierten Fettes ungeeignet (Gefahr der Ranzigkeit im Käse);

* erfordert eine Hitzebehandlung des Mediums

2. Gefässe für die Betriebskulturen-Herstellung

- In der gewerblichen Käserei hat sich die Betriebskulturenherstellung in Glasflaschen bzw. in UHT-Tetra-Paks sehr gut bewährt. Teils werden auch Inox-Behälter verwendet.
- Mit steigender Betriebsgrösse werden die kleinen Flaschen zunehmend unpraktisch. Eine Alternative stellt die Verwendung grosser Laborflaschen («Schott-Flaschen») oder von Fermentern dar.



Abb.: Schottflaschen (bis 10 L)



Abb.: UHT-Briks mit Schraubverschluss

- Hinweis zu Grossgebinden: längere Verweilzeit des Mediums bei Temperaturen über 80°C, da die Wärmeaustauschfläche im Verhältnis zum Volumen abnimmt → insgesamt höhere Hitzebelastung der Milch → Auswirkung vor allem auf die chemischen Veränderungen in der Milch (meist stärkere Bräunung), weniger auf den Sterilisationseffekt (Sporenabtötung erfolgt hauptsächlich ab Kochpunkt, chemische Reaktionen laufen bereits darunter ab). Deshalb:
 - Erhitzungsbedingungen sorgfältig austesten
 - Auf geringe Keimbelastung des Ausgangsmaterials (Milch, Pulver) achten
 - «Sterilisiertes» Medium rasch verwenden. Eine längere Verweilzeit bei Temperaturen zwischen 10°C und 60 °C ermöglicht das Auskeimen überlebender Sporen. Gewisse Sporenbildner sind zudem psychrotroph.
- *Flaschen sofort nach Gebrauch spülen – in Lauge legen – mit Flaschenbürste (Kratzer vermeiden) reinigen – spülen – in Säure legen (nicht in Wickelbad oder Presswanne) – gut spülen*
- *Ersetzen von beschädigten und korrodierten Deckeln, Flaschen periodisch ersetzen*
- *keine Reinigungsmittel mit Netzmitteln oder quaternären Ammonium-verbindungen (QAV) verwenden*

Tipp
 Reinigung von
 Glasflaschen

3. Erhitzen bzw. Sterilisieren der Nährmedien

- «Sterilisation» im Autoklav oder Dampfkochtopf
- in verschiedenen Käseereien wird auf eine «Sterilisation» im eigentlichen Sinn verzichtet. Die Milch wird während 90–120 Minuten drucklos bei 95–98 °C erhitzt (z.B. „Bertschinger“-Kochtopf, siehe Abb.). Versuche bei Agroscope haben gezeigt, dass auch dieses Verfahren eine sichere Kulturenherstellung erlaubt, obwohl die Milch nicht absolut steril ist. Bedingung ist aber, dass
 - Magermilch bzw. Milchpulver mit geringer Sporenbelastung eingesetzt wird
 - das Medium nach der «Sterilisation» gut gekühlt und rasch verwendet wird (Gefahr auskeimender, evtl. psychrotropher Sporen)
 - nur im Wasserbad bebrütet wird (während des länger dauernden Temperierens im Brutschrank vor der Beimpfung könnten sich überlebende Kontaminanten vermehren)



Abbildung: Druckloser „Bertschinger“-Kochtopf

- Sowohl beim «Sterilisieren» im Dampfkochtopf als auch im Autoklav sind unbedingt die Sicherheitsvorschriften einzuhalten, wie z.B. Wasserstand prüfen und vor dem Öffnen genügend abkühlen lassen.
- Idealerweise wird die erhitzte Magermilch für längere Lagerung im Kühlraum aufbewahrt! Aber Achtung: nach Entnahme aus dem Kühlraum bildet sich bei Raumtemperatur Kondensat an den Flaschen (Rekontaminationsgefahr beim Impfen). Deshalb vor dem Impfen genügend lange temperieren.

Ein guter Indikator für korrekte «Sterilisation» der Milch ist der optische Bräunungsgrad (Maillard-Reaktion): sie soll nur leicht gebräunt sein.

Stresstest für «Sterilität»: Standprobe unbeimpft 72h/38°C sollte flüssig sein.

Tipp
Medienerhitzung

4. Impfen und Bebrüten

In der Praxis kommen 3 Methoden zur Anwendung:

Methode 1 (mit Brutschrank, nur für UHT- und Sterilmilch empfohlen!)

- Bei Bebrütung im Brutschrank **vorwärmen** der Milch während 12 Stunden
- Versandkultur vor Gebrauch aufschütteln, **beimpfen** gemäss Kulturspezifikation
- **Bebrütung** der beimpften Milch gemäss den betriebsinternen Vorgaben
- Kulturen **verwenden** oder gekühlt **lagern**

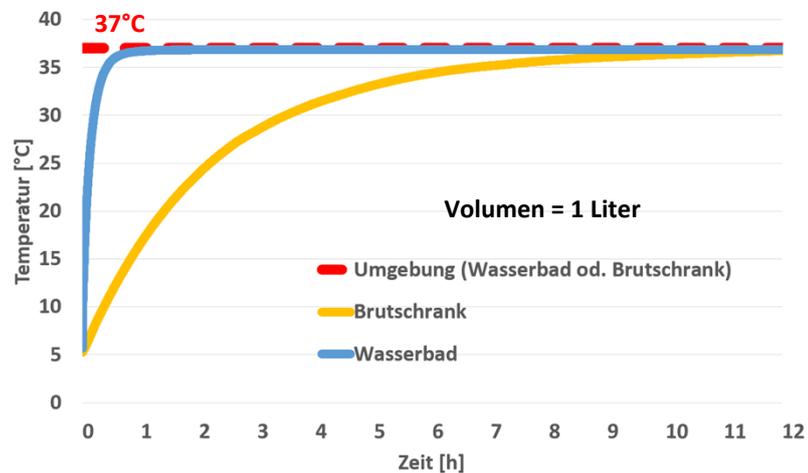


Abb.: unterschiedliche Temperaturentwicklung (Kerntemperatur) in 1 Liter Milch im Wasserbad bzw. im Brutschrank bei 37°C. Achtung: je nach Bedingungen im Wasserbad oder Brutschrank sind Abweichungen möglich!

Methode 2 (mit Wasserbad)

Aufgrund der raschen Wärmeübertragung im Wasserbad ist es möglich, beimpfte Milch ohne vorheriges Temperieren zu bebrüten. Allerdings kann die Wärmeübertragung je nach Volumen der Kulturen, Volumen des Wassers, Leistung des Wasserbades etc. schwanken.

- Versandkultur vor Gebrauch aufschütteln, **beimpfen** der kalten Milch gemäss Kulturspezifikation
- **Bebrütung** der beimpften Milch gemäss den betriebsinternen Vorgaben im Wasserbad
- Kulturen **verwenden** oder gekühlt **lagern**

Methode 3 (Beimpfen auf Vorrat)

Es ist auch möglich, die Milch für die Betriebskulturen-Produktion mehrerer Tage oder sogar einer Woche «kalt» zu beimpfen und bis zur Bebrütung im Kühlraum zu lagern.

- Versandkultur vor Gebrauch aufschütteln, Kultur in die kalte Milch **impfen** gemäss Kulturspezifikation
- Beimpfte Milch bei max. 5°C **lagern**
- **Bebrüten** im Wasserbad gemäss den betriebsinternen Vorgaben
- Kulturen **verwenden** oder gekühlt **lagern**

Vorteile

- Das Fläschli mit der Versandkultur muss nur einmal geöffnet werden.
- Die Aktivität der Milchsäurebakterien bleibt beim neutralen pH in Milch besser erhalten als beim tiefen pH der Versandkultur.

Kritische Punkte

- Die Beimpfung muss mit grösster Sorgfalt erfolgen (Gefahr einer Infektion mit psychrotrophen Keimen).
- Höhere Anforderungen an die Sterilität des Nährmediums (psychrotrophe Sporenbildner).

Hinweis: UHT-Milch-Briks

- Die Verwendung von UHT-Magermilch-Briks mit Schraubverschluss ist einfach und praktisch. Die Beimpfung muss zügig und unter Beachtung der Hygieneregeln (siehe oben) erfolgen, um Kontaminationen auszuschliessen. Alternativ kann die Versandkultur mit sterilen Einwegspritzen und sterilen Einwegnadeln in die Packung geimpft werden. Die Einstichstelle ist vorgängig zu desinfizieren und nach der Beimpfung mit Klebstreifen oder Wachs zu verschliessen.

- Für die Bebrütung wird ein Brutschrank empfohlen. Die Packungen müssen mindestens 12 Stunden bei Bebrütungstemperatur vor-temperiert werden. Im Wasserbad neigen UHT-Packungen zum «Wandern» und Umfallen. Die Packungen sollten deshalb in einer Haltevorrichtung (Stativ) fixiert werden. Der Wasserspiegel muss unbedingt unterhalb der Einstichstelle bzw. der Verschraubung liegen.



5. Bebrütungsverfahren

- a) **Thermophile Kulturen (RMK, MK)**
 - bebrüten bei 38°+/- 0.5°C (bzw. siehe Spezifikationen) im Wasserbad oder im Brutschrank
 - „junge“ Kultur: Bebrütung während 6 -10 h → Säuregrad von 30 - 40°SH
 - „alte“ Kultur: Bebrütung während 12 -18 h → Säuregrad von 48 - 55°SH
- b) **Mesophile Kulturen**
 - bebrüten bei 20-32°+/- 0.5°C (bzw. siehe Spezifikationen) im Wasserbad oder im Brutschrank
 - Durch die Wahl tieferer Bebrütungstemperaturen (20-25°C) können die Aroma- und Gasbildner in mesophilen Mischkulturen gefördert werden
- c) **Thermo-/mesophile Mischkulturen**
 - können sowohl mesophil (32°C) als auch thermophil (38°C) bebrütet werden, je nachdem, welcher Anteil in der Betriebskultur dominieren soll.
- d) **fak-het-Kulturen (fakultativ heterofermentative Lactobazillen)**
 - benötigen eine genügend lange Bebrütungszeit, da sie vergleichsweise langsam wachsen.
 - Einzelzüchtung: Bebrütung bei 32 °C oder 38°C während 20-24 h → Säuregrad 17-22°SH. Höhere Werte deuten auf Kontaminationen mit Fremdkeimen hin.
 - werden sie in der Praxis oft zusammen mit der Säuerungskultur in die „alte“ Kultur geimpft (38°C/14-18 h)

Tipps

- *Es ist entscheidend, dass während der ganzen Bebrütungszeit die gewünschte Temperatur eingehalten wird. Je nach Standort im Wasserbad oder Brutschrank und Belegung können die Temperaturunterschiede innerhalb einer Kulturencharge beträchtlich sein.*
- *Zwischen den einzelnen Flaschen oder Packungen muss unbedingt genügend Zwischenraum gelassen werden, damit das Heizmedium zirkulieren kann.*
- *Eine normal («voll») aufgezogene Pipette enthält ~0.7 ml*



6. Kühlen und Aufbewahren der Betriebskultur

- Nach der Bebrütung die Betriebskultur entweder sofort verwenden oder zur Aufbewahrung in den Kühlraum/Kühlschrank <5°C stellen. Flaschen oder Inoxbehälter können allenfalls im Wasserbad mit kaltem Wasser vorgekühlt werden.
- Bei Aufbewahrung: In jedem Fall auf genügend Raum zwischen den Behältern achten, sodass eine rasche Kühlung erreicht wird.
- Lagerung im Kühlschrank bei max. 5°C, Verbrauch innert 5 Tagen

7. Kontrollen der Betriebskultur

- In der Käserei sind die Betriebskulturen regelmässig zu prüfen. Erreicht die Betriebskultur nicht die vom Betrieb vorgegebenen und gewohnten Sollwerte, sollte sie nicht verwendet werden.
- Standard-Kontrollen:
 - Bestimmung des Säuregrades
 - Sensorische Kontrolle (Aussehen, Geruch...)
 - mikroskopisches Bild
 - Reinheit

Weitere Kontrollen

- Kühlschrank-, Sterilisations- und Bebrütungstemperaturen (regelmässig!)
- Bestimmung des Säuregrades der Abflusssirte nach 2 Stunden oder pH-Messung im Käse
- Milchsäuregehalt im 1 Tag alten Käse
- fak-het-Kulturen: Citratgehalt im Käse

Flussdiagramm der Kulturen-Herstellung

Sterilmilch vorbereiten
 Siehe Kapitel 1 bis 3

Impfen und Bebrüten
 Siehe Kapitel 4 und 5

Lagern und Prüfen
 siehe Kapitel 6 und 7

