



Adaptation von Laktobazillen aus Sauerteig an das Wachstum in Milch

Diplomarbeit

Unter der Leitung von
Prof. Dr. W.P. Hammes

Ausgeführt am
Institut für Lebensmitteltechnologie
Fachgebiet: Allgemeine Lebensmitteltechnologie und –mikrobiologie
der Universität Hohenheim

vorgelegt von
Selda Bulca

Februar 2000

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---------------------------------------|-----------|
| 1. | EINLEITUNG..... | 1 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN..... | 6 |
| 2.1. | Mikroorganismen..... | 6 |
| 2.2. | Nährmedien und Reagenzien..... | 8 |
| 2.2.1.1. | mMRS4 - Medium..... | 8 |
| 2.2.1.2. | Vitaminstammlösung..... | 9 |
| 2.2.2. | Homohiochii - Medium..... | 9 |
| 2.2.3. | M17 - Medium..... | 10 |
| 2.2.4. | Tomatensaft..... | 10 |
| 2.2.5. | Lactozym 3000 L..... | 10 |
| 2.2.6. | Vitaminlösung..... | 11 |
| 2.2.7. | Mangansulfatlösung..... | 11 |
| 2.2.8. | Eisensulfat-Heptahydratlösung..... | 11 |
| 2.2.9. | Trypsin – Stammlösung..... | 11 |
| 2.2.10. | Hefeextrakt – Stammlösung..... | 11 |
| 2.2.11. | Fleischextrakt – Stammlösung..... | 11 |
| 2.2.12. | Fermentationsbeschleuniger..... | 12 |
| 2.2.13. | Kochsalz-Trypton-Lösung..... | 12 |
| 2.2.14. | Wasserstoffperoxidlösung..... | 12 |
| 2.3. | Methoden..... | 13 |
| 2.3.1. | Züchtung..... | 13 |
| 2.3.2. | Stammhaltung..... | 13 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.3.3. | Überprüfung der Reinheit der Dauerkulturen..... | 13 |
| 2.3.4. | Messung der optischen Dichte..... | 13 |
| 2.3.5. | Bestimmung der Lebendkeimzahl..... | 14 |
| 2.3.6. | Enzymatische Bestimmung der Milchsäurekonfiguration..... | 14 |
| 2.3.7. | Bestimmung der Proteinaseaktivität..... | 15 |
| 2.3.8. | Herstellung der Sauermilchprodukten..... | 16 |
| 3. | ERGEBNISSE..... | 17 |
| 3.1. | Überprüfung von <i>L. sanfranciscensis</i> und <i>L. pontis</i> Stämmen an Lactoseverwertung..... | 17 |
| 3.2. | Adaptation der Stämme an die Verwertung von Glucose und Galactose..... | 19 |
| 3.3. | Wachstumskinetik glucosepositiver Stämme in mMRS4 – Medium..... | 21 |
| 3.4. | Supplementierung der Milch zur Optimierung des Wachstums..... | 24 |
| 3.4.1. | Einsatz von Hefeextrakt..... | 24 |
| 3.4.2. | Bedarf an Vitaminen..... | 28 |
| 3.4.3. | Bedarf an Fettsäuren..... | 30 |
| 3.4.4. | Bedarf an Mineralien..... | 32 |
| 3.4.5. | Zugabe von Tomatensaft..... | 35 |
| 3.4.6. | Zugabe von Fleischextrakt..... | 38 |
| 3.4.7. | Einsatz von Trypsin..... | 42 |
| 3.4.8. | Untersuchung mit Fermentationsbeschleunigern..... | 47 |
| 3.5. | Kokultivierung von <i>Lactococcus lactis</i> und <i>Lactobacillus pontis</i> in Milch..... | 50 |
| 3.6. | Herstellung von Sauermilchprodukten..... | 52 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.6.1. | Bestimmung der Milchsäurekonfiguration..... | 52 |
| 3.6.2. | Verkostung der Produkte..... | 52 |
| 4. | DISKUSSION..... | 54 |
| 4.1. | Adaptation an C - Quellen..... | 54 |
| 4.2. | Bedarf an Aminosäuren und Peptiden..... | 56 |
| 4.3. | Supplementierung mit weiteren Supplinen..... | 60 |
| 4.4. | Anwendung in der Praxis..... | 62 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 65 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 66 |

1. Einleitung

In den Leitsätzen für Brot und Kleingebäck wurde Sauerteig (1994) wie folgt definiert: "Sauerteig ist ein Teig, dessen Mikroorganismen (Milchsäurebakterien und Hefen) aus Sauerteig oder Sauerteigstartern sich im aktiven Zustand befinden oder reaktivierbar sind". Das Ziel der Sauerteigfermentation ist die Absenkung des pH - Wertes und Verbesserung von Textur, Aroma, Geschmack und Farbe des Brotes (Böcker et al., 1995). Die Fermentation von Sauerteig erfolgt entweder spontan oder mit Hilfe von Starterkulturen. Die Mikroflora von Spontansauerteigen wird in erster Linie durch die Mikroflora des Mehles bzw. Getreides geprägt. Bei der Spontangärung herrschen die homofermentative Laktobazillen wie *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* und *Pediococcus pentosaceus* vor (Lönner, 1985; Spicher, 1987). Die Mikroflora von kontinuierlich propagierten Sauerteigen wird von heterofermentativen Laktobazillen dominiert (Kline und Sugihara, 1971; Spicher und Lönner, 1985; Spicher, 1987; Hammes und Gänzle, 1997), und es wurden als häufigste Vertreter heterofermentative Laktobazillen wie *L. fermentum*, *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis* und *L.reuteri* beschrieben (Nout und Cremers-Molenar, 1987; Schleifer et al., 1993). Einige der ursprünglich der Spezies *L. brevis* zugeordneten Stämme wurden Spezies *L. pontis* zugeordnet (Vogel et al., 1994).

Beschreibung von *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*

Lactobacillus sanfranciscensis wurde erstmals von Kline und Sugihara (1971) in kalifornischen Weizensauerteigen, die über einen langen Zeitraum kontinuierlich geführt wurden, isoliert. *Lactobacillus sanfranciscensis* wurde später von Ottogalli (1996) auch in italienischen Weizensauerteigen für die Panettone Herstellung gefunden. Spicher et al., (1978) haben *Lactobacillus brevis* ssp. *lindneri* in traditionell geführten Reinzuchtsauerteigen gefunden und diese Stämme wurden durch DNA-DNA Homologiestudien (Weiss und Schillinger, 1984) der Spezies *Lactobacillus sanfranciscensis* zugeordnet (Kandler und Weiss, 1986).

1. Einleitung

Der Name kommt von pon'tis (pons, die Brücke) und verweist auf den Namen BRIDGE (Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe), eine Abkürzung der "Commission of European Communities" für ein Forschungsprogramm (Böcker, et al., 1995). *L. pontis* kann physiologisch von *L. reuteri* und anderen Laktobazillen über das Spektrum der fermentierbaren Zucker, den hohen G+C der DNA und den Peptidoglycantyp unterschieden werden (Vogel et al., 1994).

Die Sauerteiglaktobazillen bzw. die Spezies *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis* sind Gram-positiv, nicht sporenbildend, mikroaerophil und heterofermentativ. Die Organismen besitzen das Enzym Phosphoketolase. Hexosen werden über den Phosphogluconatweg zu Milchsäure, Ethanol oder Essigsäure und CO₂ in äquimolaren Mengen vergoren. Sauerteig ist reich an Stärke und Polyfructosanen, die während des Fermentationsprozesses enzymatisch in die vergärbaren Zucker Maltose, Fructose und Glucose gespalten werden. Die Sauerteigmikroorganismen sind an das Ökosystem angepasst und an die Verwertung von Maltose adaptiert. Sie verwenden als C-Quelle hauptsächlich die in Getreide vorhandene Maltose und als Elektronenakzeptor Fructose. Der Metabolismus in *Lactobacillus sanfranciscensis* und *L. pontis* wird durch die Spaltung von Maltose über Maltose-Phosphorylase zu Glucose und Glucose-1-Phosphat eingeleitet. Glucose-1-Phosphat wird weitermetabolisiert, während die Glucose, die aus der Maltose stammt, zunächst ins Medium freigesetzt wird und nachfolgend wieder verwertet werden kann (Neubauer et al., 1994).

Wenn Maltose in sehr großen Menge vorhanden ist, verwenden *L. sanfranciscensis* und *L. pontis* bevorzugt Fructose als Elektronenakzeptor (Stolz et al., 1995), wobei Mannit entsteht. Die Verwertung von Fructose ist abhängig von der Anwesenheit von Maltose (Gobbetti et al., 1995). Fructose liegt im Mehl in einer Konzentration von 0,02 - 0,08 % vor. (Belitz, Grosch, 1992). Durch die Reduzierung von Fructose zu Mannitol gewinnen die Sauerteigorganismen zusätzlich ein ATP über die Acetat Kinase Reaktion. In Abwesenheit von Elektronenakzeptor werden 3 mol ATP pro mol Maltose erzeugt, jedoch bei der Anwesenheit von Elektronenakzeptoren werden 5 mol ATP pro mol Maltose gewonnen. Citrat, Fumarat und Malat werden auch als Elektronenakzeptor verwendet (Hammes et al., 1996).

Im Vergleich zu *L. sanfranciscensis* bevorzugt *L. pontis* anaerobe Bedingungen, zeigt bei der Anwesenheit von Sauerstoff schwaches Wachstum und hat eine größere Toleranz gegenüber niedrigeren pH (Hammes et al., 1997).

1. Einleitung

Lactobacillus sanfranciscensis braucht lange Adaptationsphasen für die Glucoseverwertung. Wenn Maltose und Glucose im Medium vorhanden sind, werden diese gleichzeitig metabolisiert (Hammes et al., 1996). Stolz et al. (1993) berichten auch, daß in maltosehaltigem Medium vorgezüchtete Zellen von *Lactobacillus sanfranciscensis* mindestens 150 h Adaptationszeit brauchen, um in glucosehaltigem Medium wachsen zu können.

Das proteolytische System von *L. sanfranciscensis* wurde von Gobbetti et al. (1996) untersucht und es konnten Proteasen, Dipeptidasen und Aminopeptidasen nachgewiesen werden.

Für das Wachstum im künstlichen Medium braucht *L. sanfranciscensis* Frischhefeextrakt, (Kline und Sugihara, 1971) welcher ein kleines Peptid enthält, das wachstumsfördernde Wirkung besitzt (Berg et al., 1981). Der Organismus hat einen hohen Bedarf an ungesättigten Fettsäuren (hauptsächlich Ölsäure), die von Lipiden durch Lipaseaktivität von Mikroorganismen freigesetzt werden (Sriranganthan et al., 1973 und Okada et al., 1992).

Milch als Fermentationssubstrat

Sauermilcherzeugnisse entstehen durch Milchsäuregärung und weitere Stoffwechselfvorgänge (Proteolyse, Bildung von Aromastoffen, Kohlendioxid u.a.) verschiedener Milchsäurebakterien und Hefen. Zu den Milchsäurebakterien für die Herstellung von Sauermilchprodukten gehören Stämme der Gattungen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* und *Leuconostoc*.

Sauermilchprodukte haben zahlreiche ernährungsphysiologisch günstige Eigenschaften. Als Ursache für den höheren Nährwert werden angeführt: eine leichtere Proteinverdaulichkeit, ein höherer Vitamingehalt, eine gesteigerte Calcium und Spurenelementresorption wegen des Milchsäuregehaltes (Vrese, de M., 1994). Da nur die rein L(+) - Milchsäure im menschlichen Körper physiologisch metabolisierbar ist, ist es erwünscht, die Sauermilchprodukte mit einem hohen Anteil an L(+)-Milchsäure herzustellen.

Die Sauermilchprodukte werden sowohl durch Einsatz von milchspezifischen Milchsäurebakterien als auch durch den Einsatz von milchfremden Keime hergestellt. Unter den 200 Arten der Darmflora, sind die Laktobazillen und Bifidobakterien wegen ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften von besonderem Interesse, wenn der förderliche Effekt

1. Einleitung

nachgewiesen wurde, und werden als Probiotika bezeichnet. Die wichtigsten probiotischen Wirkungen sind; Regulation des Darmstoffwechsels, Abbau von unverdauten Kohlenhydrate, Barriere gegen enteropathogene Bakterien, Verbesserung der Laktoseintoleranz (Pfeifer et al., 1996).

Zielsetzung und Problemstellung

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit Sauerteigorganismen an das Wachstum in Milch adaptiert werden können. Laktobazillen stellen sehr hohe Ansprüche an das Nährmedium. Sie benötigen für das Wachstum eine Reihe von Supplinen wie Vitamine, Aminosäuren und Nucleotide. Es kann angenommen werden, daß im Laufe der Evolution die Befähigung zur Synthese dieser Suppline verloren gegangen ist. Jedoch konnte in Mutationsstudien gezeigt werden, daß das genetische Potential der Laktobazillen wesentlich größer ist als die physiologische Leistungen vermuten lassen. So konnte Morishita et al. (1974 und 1981) zeigen, daß von *L. casei*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* auxotrophe Mutanten für Supplinen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Prototrophie revertieren können. Durch die Arbeit von Batt (1986) konnte gezeigt werden, daß es sogenannte stille Gene in Laktobazillen gibt, die für die Fähigkeit zur Synthese von Enzymen für Stoffwechselwege von Supplinen kodieren. Es ist vorstellbar, daß durch Reaktivierung stiller Gene und durch das hohe genetische Potential der Laktobazillen, eine Adaptation eines Organismus an unterschiedlicher Fermentationssubstrate möglich ist. Bei solchen Adaptationsvorgängen erhalten in einer Population immer diejenigen Zellen einen selektiven Vorteil, bei denen eine entsprechende Mutation stattgefunden hat und somit eine Anpassung an das neue Habitat begünstigen.

Als ein weiteres Ziel sollte untersucht werden, ob Stämme von *L. sanfranciscensis* und *L. pontis* eventuell für die Herstellung von Sauermilchprodukten eingesetzt werden können. Der Vorteil der Verwendung dieser Organismen liegt darin, daß sie zum Teil in der Lage sind, L(+) - Milchsäure zu bilden und durch die CO₂ - Bildung zu einem prickelnden Mundgefühl beitragen können. Letztlich kann durch Verwendung schleimbildender Stämme die Konsistenz und Textur von Sauermilchprodukt verbessert werden. *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis* sind sehr stark an Sauerteig bzw. an

1. Einleitung

fermentierendes Getreide angepaßt, und ihr Vorkommen ist somit auf diese Substrate beschränkt.

Bei einem Vergleich der Fermentationssubstrate Getreide und Milch sind im Hinblick auf das Wachstum der Sauerteigorganismen Unterschiede zu erkennen. Die endogenen Faktoren (Kohlenhydrate, Stickstoffe, Vitamine, Mineralien, a_w - Wert, pH, Redoxpotential) sind in der Milch im Vergleich zum Sauerteig in wesentlichen Eigenschaften anders. Als Kohlenhydratquelle stellt Sauerteig Maltose und Fructose zur Verfügung. In Milch ist dagegen als einzigstes Kohlenhydrat nur die Lactose vorhanden. Für die Fermentation von Milch müssten die Sauerteiglaktobazillen die Fähigkeit haben, die Lactose in die Zelle zu transportieren und hydrolysieren. Weiterhin ist für ein gutes Wachstum der Mikroorganismen eine ausreichende Versorgung mit Aminosäuren und Peptide notwendig. Zwischen den Proteinen der Milch und des Getreides bestehen jedoch grundsätzliche Unterschiede, die sich auf die Ausbildung der proteolytische Systeme auswirken können. Auch hinsichtlich des Vorkommens von sonstigen Supplinen, wie z.B. Vitaminen (besonders der B - Gruppe), Mineralien (Mangan, Eisen) und Fettsäuren unterscheiden sich diese Fermentationssubstrate, was bei den Untersuchungen zu berücksichtigen sind.

Bei der Herstellung von fermentierten Milchprodukten mit Keimen aus anderen Substraten stellt sich die Frage, inwieweit die spezifischen Eigenschaften der Keime durch den Rohstoff und die äußeren Bedingungen der Fermentation bestimmt werden. Im Fall einer Adaptation der Sauerteigisolate an die neuen Bedingungen einer Milchfermentation muß diese Frage geklärt werden. Zur Lösung dieses Problems muß auch geprüft werden, ob die Adaptation auf dem Erwerb neuer Eigenschaften basiert oder durch die Übertragung bereits vorhandener Fähigkeiten möglich ist. Da die Sauerteigisolate stammspezifische Eigenschaften besitzen, läßt auch ihre Wirkung bei der Adaptation in einem neuen Habitat eine große Variabilität vermuten.

2. Material und Methoden

2.1. Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Mikroorganismen

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|---------------------------------|----------|---|
| <i>L. pontis</i> | LTH 3572 | SEW (Sauer Extrakt Weizen) |
| <i>L. spec.</i> | LTH 3573 | Bäcker Süd |
| <i>L. pontis</i> | LTH 3574 | Bäcker, Süd (Böcker, Stolz) |
| <i>L. pontis</i> | LTH 3878 | BRS (Böcker Reinzucht Sauer) |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4414 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. spec.</i> | LTH 4419 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4426 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4432 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> | LTH 4433 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4438 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4443 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4446 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4447 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4449 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4453 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4454 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4455 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4456 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4457 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4460 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> ^(*) | LTH 4463 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> | LTH 4467 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4469 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |

2. Material und Methoden

| Spezies | Stamm | Herkunft |
|----------------------------|----------|---|
| <i>L. pontis</i> (*) | LTH 4470 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> | LTH 4471 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4474 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. pontis</i> | LTH 4764 | Panettonevorteig / Weizensauer, Italien |
| <i>L. parapontis</i> | LTH 4914 | TUM, TMW, M. Ehrmann |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4945 | Nestle |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4946 | Nestle |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4979 | Nestle |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4982 | Nestle |
| <i>L. sanfranciscensis</i> | LTH 4988 | Nestle |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 2148 | MG 1820 (pMG 820) Lac ⁺ |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 4667 | Sanoghurt |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 4668 | Sanoghurt |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 4669 | Sanoghurt |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 4670 | Sanoghurt |
| <i>Lc. lactis ssp.</i> | LTH 4805 | Sanoghurt |

L. : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

LTH : Lebensmitteltechnologie Hohenheim, Stuttgart, Deutschland

(*): Bestimmung der Spezies nach RAPD-Technik (ausgeführt von S. Herr).

2. Material und Methoden

2.2. Nährmedien und Reagenzien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 N HCl bzw. 0,1 N KOH. Die Nährmedien wurden bei 121 ° C 20 min autoklaviert. Für die Herstellung fester Nährmedien wurde 1,5 % Agar-Agar zugesetzt.

2.2.1.1. mMRS4-Medium

(De Man et al., 1960, modifiziert)

| | |
|---|----------|
| Trypton (Oxoid)..... | 10,0 g |
| Lab-Lemco-Powder (Oxoid)..... | 5,0 g |
| Hefeextrakt..... | 5,0 g |
| Maltose (*)..... | 10,0 g |
| Fructose (*)..... | 10,0 g |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat- Trihydrat..... | 2,6 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat..... | 4,0 g |
| Ammoniumchlorid..... | 3,0 g |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat..... | 100,0 mg |
| Mangansulfat-Tetrahydrat..... | 50,0 mg |
| Cystein-HCl..... | 0,5 g |
| Vitaminstammlösung..... | 1,0 ml |
| Tween 80® (Sigma)..... | 1,0 ml |
| Aqua dest. | ad 1,0 l |

pH 6,2

(*) : Als C-Quelle wurde anstatt Maltose und Fructose auch Lactose, Glucose oder Galactose verwendet.

2. Material und Methoden

2.2.1.2. Vitaminstammlösung

| | |
|-------------------------------|------------|
| Cobalamin (Sigma)..... | 10,0 mg |
| Folsäure..... | 10,0 mg |
| Niacin..... | 10,0 mg |
| Pyridoxal (Sigma)..... | 10,0 mg |
| Pantothensäure (Sigma)..... | 10,0 mg |
| Thiamin (Sigma)..... | 10,0 mg |
| Aqua dest. | ad 50,0 ml |

pH 6,2

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50° C zugegeben.

2.2.2. Homohiochii-Medium (Kitahara, 1957), modifiziert, mHH

| | |
|---|----------|
| Trypton..... | 10,0 g |
| Lab Lemco Powder (Fleischextrakt)..... | 2,0 g |
| Hefeextrakt..... | 2,0 g |
| Glucose..... | 7,0 g |
| Fructose..... | 7,0 g |
| Maltose..... | 7,0 g |
| Na-Gluconat (D-Gluconic Acid Sigma 4500)..... | 2,0 g |
| Na-Acetat × 3 H ₂ O..... | 5,0 g |
| Diammoniumcitrat..... | 5,0 g |
| KH ₂ PO ₄ × 3 H ₂ O..... | 2,5 g |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O..... | 200,0 mg |
| MnSO ₄ × 4 H ₂ O..... | 100,0 mg |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ O..... | 50,0 mg |
| Cystein-HCl..... | 0,5 g |

2. Material und Methoden

| | |
|-----------------|--------|
| Tween 80..... | 1,0 ml |
| Aqua dest. | 1,0 l |

Das pH wurde vor dem Autoklavieren mit 3 N KOH auf 5,4 eingestellt.

2.2.3. M 17 - Medium (Terzaghi und Sandine, 1975)

| | |
|--|----------|
| Pepton aus Sojamehl..... | 5,0 g |
| Pepton aus Fleisch..... | 2,5 g |
| Pepton aus Casein, tryp. verdaut..... | 2,5 g |
| Hefeextrakt (Oxoid)..... | 2,5 g |
| Fleischextrakt..... | 5,0 g |
| α -Lactose (Sigma)..... | 5,0 g |
| L-Ascorbinsäure (Sigma)..... | 0,5 g |
| Natrium- β -Glycerophosphat..... | 19,0 g |
| MgSO ₄ \times 7 H ₂ O..... | 51,0 mg |
| Aqua dest. | ad 1,0 l |

pH 7,2 \pm 0,1

2.2.4. Tomatensaft (Oxoid)

Wachstumssupplement zur Isolierung von Laktobazillen. Es ist steril und weist einen pH-Wert von ca. 4,1 auf. 100 ml Tomatensaft entsprechen 227 g Tomaten. Bei der Untersuchungen wurde 20% der Milch durch dieses Supplement ersetzt.

2.2.5. Lactozym 3000 L

Lactozym 3000 L HP - G (High Purity in Glycerol) ist eine wässrige klare braune Enzympräparation der Firma Novo Nordisk, und enthält β -Galactosidase von *Kluyveromyces lactis*.

2. Material und Methoden

2.2.6. Vitaminlösung

Multibionta® (Tropfen) von Merck.

2.2.7. Mangansulfat-Stammlösung

Mangansulfat-Tetrahydrat.....0,25 g
Aqua dest.50,0 ml

2.2.8. Eisensulfat-Heptahydrat Stammlösung

Eisensulfat – Heptahydrat.....0,5 g
Aqua dest.10,0 ml

2.2.9. Trypsin-Stammlösung

Von Sigma ; Porcine Pancreas

Trypsin.....10,0 mg
Aqua dest.5,0 ml

2.2.10. Hefeextrakt –Stammlösung (Oxid)

Hefeextrakt.....25,0 g
Aqua dest. 100,0 ml

2.2.11. Fleischextrakt- Stammlösung (Oxid)

Fleischextrakt.....25,0 g
Aqua dest.100,0 ml

2. Material und Methoden

2.2.12. Fermentationsbeschleuniger

Es wurden vier verschiedene Fermentationsbeschleuniger von der Firma DMV International verwendet. Die sind FE 120, 135, 160 und 170. Die werden durch Hydrolyse von Milchproteinen (aus Casein oder Molkenproteinen) hergestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung von den angewendeten FE Produkte

| | FE 120 | FE 135 | FE 160 | FE 170 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Gesamt Protein (%) | 86,8 | 78 | 83,6 | 87,3 |
| Asche (%) | < 5 | 2,6 | < 5 | < 5 |
| pH (6% ige Lösung) | 6,8 | 6,9 | 7 | 6,8 |

2.2.13. Kochsalz-Trypton-Lösung (Verdünnungslösung)

Natriumchlorid.....8,5 g
Trypton (Oxid).....1,0 g
Aqua dest.ad 1,0 l

2.2.14. Wasserstoffperoxidlösung

H₂O₂3 % (v / v)

2. Material und Methoden

2.3. Methoden

2.3.1. Züchtung

Die Laktobazillen wurden in mMRS4 - und die Laktokokken in M17 - Medium bei 30° C gezüchtet. Vorkulturen in flüssigem Medium wurden nach 48 h Inkubation bei 2 000×g für 15 min zentrifugiert und das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert. Auf festen Nährböden wurden die Stämme in einem begasbaren Brutschrank in einer Atmosphäre aus 90 % N₂ und 10 % CO₂ gezüchtet.

2.3.2. Stammhaltung

Für die Aufbewahrung der Stämme wurden Glycerindauerpräparate angelegt. Die Zellen wurden in 10 ml Flüssigmedium gezüchtet und durch Zentrifugation (2 000×g, 15min) geerntet. Das Pellet wurde in frischem mMRS4 - bzw. M17 - Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in sterilen Schraubröhrchen mit 0,5 ml sterilem 100 % igen Glycerin vermischt und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.3. Überprüfung der Reinheit der Dauerkulturen

Es wurden Verdünnungsausstriche der Dauerpräparate auf den entsprechenden Nährböden angefertigt. Nach anaerober Inkubation bei 30°C der Kolonien wurden die Platten mit dem Binokular auf Einheitlichkeit geprüft.

2.3.4. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1 cm. Als Leerwert diente das jeweilige unbeimpfte Medium. Bei Extinktionswerten > 0,4 wurden die Proben mit unbeimpften Medium verdünnt.

2. Material und Methoden

2.3.5. Bestimmung der Lebendkeimzahl

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde ausgehend von 1 ml Probe eine Verdünnungsreihe in Kochsalz-Trypton-Lösung angelegt. Mittels Spiral-Plater wurden 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe auf dem entsprechenden Nährboden verteilt. Es wurde mit der höchsten Verdünnung pro Verdünnungsstufe auf zwei Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C anaerob (Anaerobierbrutschrank mit ca. 10 % CO₂ und ca. 90 % N₂) bebrütet. Ausschließlich wurden die Platten, deren Koloniezahl sich zwischen 30 und 300 bewegte, ausgewertet. Die Angabe der Lebendkeimzahl erfolgte in koloniebildende Einheiten pro ml (KbE / ml).

2.3.6. Enzymatische Bestimmung der Milchsäurekonfiguration

(nach Boehringer, Mannheim)

Zur Bestimmung der Milchsäurekonfiguration wurde 1g Sauer Milchprodukt mit 49 ml Wasser gemischt und filtriert. Das 0,05 ml Filtrat wurde zum Test eingesetzt.

Tabelle 3: Pipettierschema zur enzymatischen Milchsäurekonfiguration

| Lösung | Leerwert | Standard | Probe |
|---|----------|-----------|----------|
| Lösung 1 | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| Lösung 2 | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Suspension 3 | 0,01 ml | 0,01 ml | 0,01 ml |
| Probelösung | – | * 0,05 ml | 0,05 ml |
| H ₂ O _{dest.} | 0,5 ml | 0,450 ml | 0,450 ml |
| Nach ca. 5 min. Extinktion E ₁ bei 340 nm messen | | | |
| Lösung 4 oder 5 | 0,01 ml | 0,01 ml | 0,01 ml |
| Nach 30 min. Extinktion bei 340 nm bestimmen | | | |

(*) : Anstatt Probelösung werden die Standardlösungen zur Bestimmung eingesetzt.

2. Material und Methoden

Reagenzien:

- ◆ Lösung 1: GlutamatGlycylglycin-Puffer pH 10,0
- ◆ Lösung 2: NAD⁺ - Lyophilisat
- ◆ Suspension 3: Glutamat-Pyruvat- Transaminase
- ◆ D-Laktat- Dehydrogenase
- ◆ L-Laktat-Dehydrogenase

2.3.7. Bestimmung der Proteinaseaktivität

(Haandrikman et al., 1989)

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch Messung der Menge an hydrolysierten Milchproteinen einer in Milch inkubierten Kultur oder Enzympräparation. Das Prinzip basiert auf der spektrophotometrischen Bestimmung freier Aminogruppen mit o-Phtaldialdehyd.

Lösungen:

- ◆ Trichloressigsäure:0,68 N
- ◆ OPA-Reagenz: 1 ml o-Phtaldialdehyd (40 mg/ ml in Methanol)
50 ml : 50 mM di-Natriumtetraborat-Puffer, pH 9,3
1 % SDS (Sodium Deocyl Sulphat)
0,2 % 2-Mercaptoethanol

Durchführung :

- ◆ 1 ml einer Übernachtskultur oder 1 ml Enzympräparation, die bei 30⁰C in Milch bebrütet wurde, mit 2,2 ml Trichloressigsäure versetzen und mischen
- ◆ 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- ◆ Suspension mit einem Sterilfilter filtrieren oder bei 6000×g 5 min. abzentrifugieren
- ◆ 50 µl Filtrat in einer Quarzküvette mit 1 ml OPA-Reagenz mischen
- ◆ Nach 2 min. bei 340 nm messen

2. Material und Methoden

2.3.8. Herstellung der Sauermilchprodukten

Für die Herstellung der Sauermilchprodukte wurde H-Milch (1,5 % Fett) verwendet. Die Stämme wurden bei 30°C in glucosehaltigem mMRS4 - Medium ca. 36-48 h vorgezchtet und bei 2 000×g für 10 min abzentrifugiert. Die Milch wurde mit 300 µl Lactozym (Lactase) / l behandelt und so beimpft, daß die Lebendkeimzahl von ca. 10⁸ KBE / ml erreicht wurde. Anschließend wurde bei 30°C 12-17 h bebrütet.

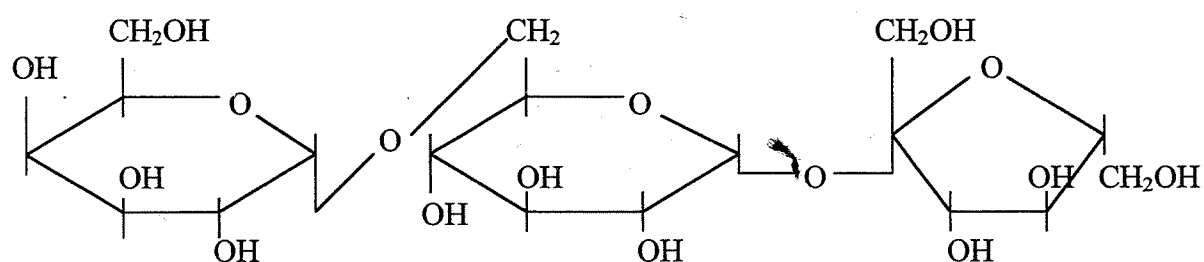
3. Ergebnisse

3.1. Überprüfung von *Lactobacillus sanfranciscensis* und *L. pontis* Stämmen an Lactoseverwertung

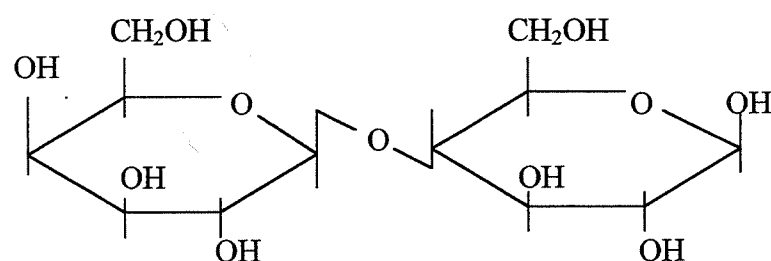
Auf der Grundlage der auf dem Zuckerspektrum beruhenden Gruppierungen (Reich, 1998) wurden 12 Stämme von der Gruppen 13, 14 und 15 ausgewählt, da diese Stämme mittels API-Test als raffinosepositiv beurteilt wurden. Raffinose (Struktur 1) ist ein aus Glucose, Galactose und Fructose bestehendes Trisaccharid. Als weitere Kriterien wurden die Bildung von Schleim und die Milchsäurekonfiguration (bevorzugt wurden Stämme mit einem Anteil des gebildeten Isomers > 90%) gewählt.

Im Vergleich zu Raffinose besteht Lactose (Struktur 2), das Hauptkohlenhydrat in Milch, aus den Bausteinen Glucose und Galactose. Wenn ein Stamm in der Lage ist, Raffinose als C-Quelle aufzunehmen und zu spalten, besteht die Wahrscheinlichkeit, daß er nach einer Adaptationsphase auch Lactose verwerten kann, da die Grundkomponenten Glucose und Galactose ebenfalls in der Raffinose vorkommen.

Struktur 1 (α -D-Galactopyranosyl-(1-6)- α -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranosid)



Struktur 2 (4-O- β -D-Galactopyranosyl-D-glucose)



In der Tab. 3 sind die ausgewählten Stämme, nach den Auswahlkriterien geordnet, aufgelistet.

3. Ergebnisse

Tabelle 3: Auswahl von Stämmen aus Sauerteigen, die der Gruppen 13, 14, 15 nach Reich, (1998) zugeordnet sind.

| Gruppe (*) | LTH – Nummer | Spezies | Milchsäure- Konfiguration | Schleimbildung |
|---------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|----------------|
| 13 | • 4443 | <i>L. pontis</i> | DL | + |
| | • 4449 | <i>L. pontis</i> | DL | + |
| | • 4474 | <i>L. sanfranciscensis</i> | L ⁺ (*) | - |
| 14 | • 4471 | <i>L. pontis</i> | L ⁺ | + |
| 15 | • 4447 | <i>L. pontis</i> | L ⁺ | + |
| | • 4453 | <i>L. sanfranciscensis</i> | L ⁺ | - |
| | • 4454 | <i>L. pontis</i> | DL | + |
| | • 4455 | <i>L. sanfranciscensis</i> | L ⁺⁺ | + |
| | • 4456 | <i>L. pontis</i> | DL | + |
| | • 4457 | <i>L. pontis</i> | DL | + |
| | • 4460 | <i>L. pontis</i> | L ⁺ | + |
| | • 4463 | <i>L. pontis</i> | L ⁺ | + |

(*): L⁺ Anteil des gebildeten Isomers > 60% , L⁺⁺ Anteil des gebildeten Isomers > 90 %

Alle in Tabelle 3 aufgeführten Stämme wurden nach dem Zuckerspektrum von Reich (1998) maltose-, glucose-, fructose-, saccharose-, raffinose-, und galactosepositiv beurteilt. Nur der Stamm LTH 4471 wurde als glucosenegativ eingestuft.

3. Ergebnisse

Die Stämme wurden in mMRS4-Medium mit Maltose und Fructose bei 30° C vorgezchtet. Nach 36 h Inkubation wurden die Stämme in mMRS4 - Medium, mit Lactose (10 g/l) als einzige C-Quelle, angeimpft. Nach 13-tägiger Bebrütung wurde bei den Stämmen LTH 4447, 4453, 4454, 4455, 4460, 4463, 4471, 4474 eine OD von ca. 0,4 - 0,5 gemessen. Bei den restlichen Stämmen wurde kein Wachstum festgestellt.

Die gewachsenen Kulturen wurden erneut in lactosehaltiges Medium überimpft. Ein Wachstum konnte allerdings innerhalb von 6 Tagen nicht festgestellt werden. Da die als raffinosepositiv beurteilten Stämme Lactose nicht verwerten konnten, wurden neue Stämme, die von *Georg Böcker* (1993) als lactosepositiv beschrieben wurden, ausgewählt. Es handelte sich um die Isolate: LTH 3878, 3572 und 3574 . Die Vorkultur der oben genannten Stämme wurde in mMRS4 - Medium mit Maltose und Fructose durchgeführt. Danach wurde die Vorkultur in mMRS4 - Medium mit Lactose angeimpft. Nach neuntägiger Bebrütung wurde kein Wachstum beobachtet.

3.2. Adaptation der Stämme an die Verwertung von Glucose und Galactose

Da die ausgewählten Stämme in lactosehaltigem mMRS4 - Medium nicht gewachsen waren, blieb nur die Möglichkeit, den Milchzucker durch ein extern zugesetztes Enzym (Lactase) in Glucose und Galactose zu spalten und die Stämme an die Verwertung von Glucose und Galactose zu adaptieren. Zur Adaptation wurden die Stämme in mMRS4 - Medium (Maltose, Fructose) vorgezchtet. Mit den Vorkulturen wurde jeweils mMRS4 - Medium, das mit Glucose (10 g / l) oder Galactose (10 g / l) bzw. Glucose + Galactose (10g Glu + 10 g Gal / l) versetzt wurde, beimpft.

Die gewachsenen Kulturen, deren OD > 1 war, wurden in das gleiche Medium überimpft. Nach mehrmaligen Überimpfen, wurde festgestellt, daß die Stämme in mMRS4 mit Glucose besser wuchsen. Aus diesem Grund wurden alle Stämme mit Glucose gezogen. Weil das Wachstum mit Galactose für ein weiteres Überimpfen nicht ausreichend war, wurde der Überimpfungsversuch abgeschlossen.

3. Ergebnisse

Da die Adaptation der Stämme an Glucose sehr lange (ca. 4 - 5 Wochen) gedauert hat, wurden in der Zwischenzeit weitere Stämme, die nach dem API- Testergebnis als glucose- oder galactosepositiv eingestuft wurden, in die Untersuchung einbezogen.

Die in Tabelle 4 aufgelisteten und die unten aufgeführten fünf Stämme wurden an die Verwertung von Glucose und Galactose untersucht. Dafür wurden die Stämme in mMRS4 - Medium mit Maltose und Fructose vorgezchtet und das glucose- oder galactosehaltige mMRS4 - Medium mit der Vorkultur angeimpft. Nach Messung der OD wurden die gewachsenen Kulturen erneut in das gleiche Medium überimpft und dieses wurde mehrmals wiederholt. Dadurch konnte ein ausreichend gutes Wachstum erreicht werden.

Tabelle 4: Nach dem API-Test als glucose- und / oder galactosepositiv beurteilten Stämme

| LTH- Nummer | Glucoseverwertung | Galactoseverwertung |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| 3573 | + | - |
| 4419 | + | + |
| 4426 | + | + |
| 4432 | - | + |
| 4433 | - | + |
| 4438 | - | + |
| 4446 | + | + |
| 4467 | + | + |
| 4470 | - | + |
| 4469 | + | + |
| 4764 | - | + |
| 4414 | + | - |

3. Ergebnisse

- ◆ NCC 2620 (LTH 4979)
- ◆ NCC 2634 (LTH 4982)
- ◆ NCC 2661 (LTH 4988)
- ◆ NCC 2736 (LTH 4945)
- ◆ NCC 2740 (LTH 4949)

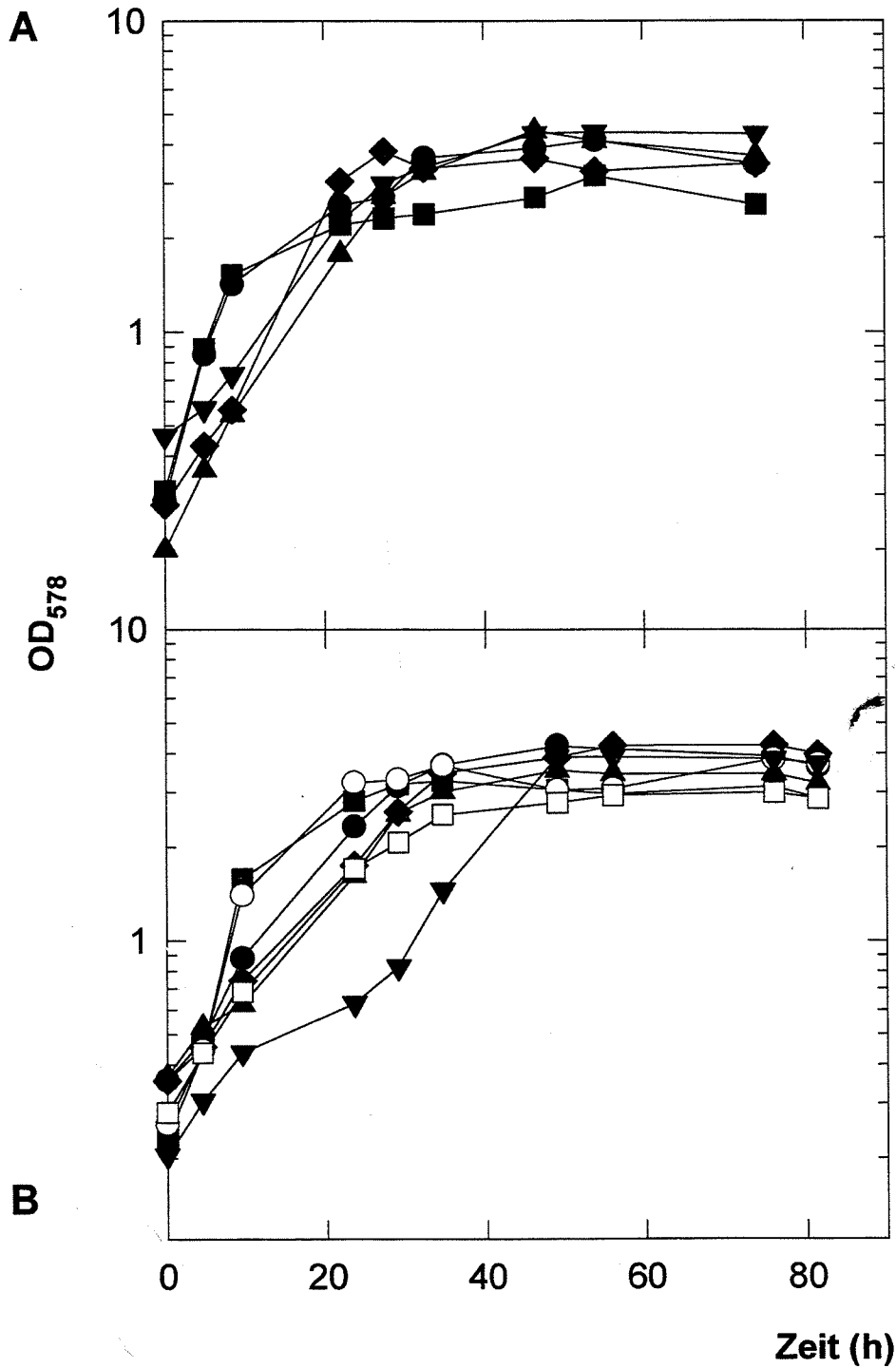
Von allen Stämmen konnten folgende Stämme an glucosehaltiges Medium adaptiert werden:

LTH 3573, 3574, 3878, 4414, 4419, 4432, 4446, 4449, 4453, 4454, 4456, 4457, 4460,
4463, 4469, 4471, 4474, 4914, 4945, 4982

3.3. Wachstumskinetik glucosepositiver Stämme in mMRS4 - Medium

Es wurden Wachstumskurven von den an Glucoseverwertung (10 g/l) adaptierten Stämme erstellt. Zu diesem Zweck wurden die glucosepositiven Stämme in mMRS4 - Medium vorgezchtet. Die Vorkulturen wurden bei 30° C inkubiert und mit ihnen wurde frisches Medium angeimpft, sodaß die optische Dichte bei 578 nm zwischen 0,1 - 0,4 lag und bei 30°C inkubiert. Um das Wachstum verfolgen zu können , wurden alle 4 oder 5 h Proben gezogen und die OD gemessen. Bei einer OD > 0,5 wurden die Proben mit Medium verdünnt. Wie aus Abb. 1 zu entnehmen ist, wachsen alle glucosepositiven Stämme bis zu einer End-OD von > 2. Dies zeigt, daß die Stämme Glucose verwerten können, wobei durchaus unterschiedliche Wachstumskurven zu beobachten sind. Es trat im glucosehaltigen mMRS4-Medium keine lag - Phase auf.

3. Ergebnisse



Fortsetzung nächster Seite

3. Ergebnisse

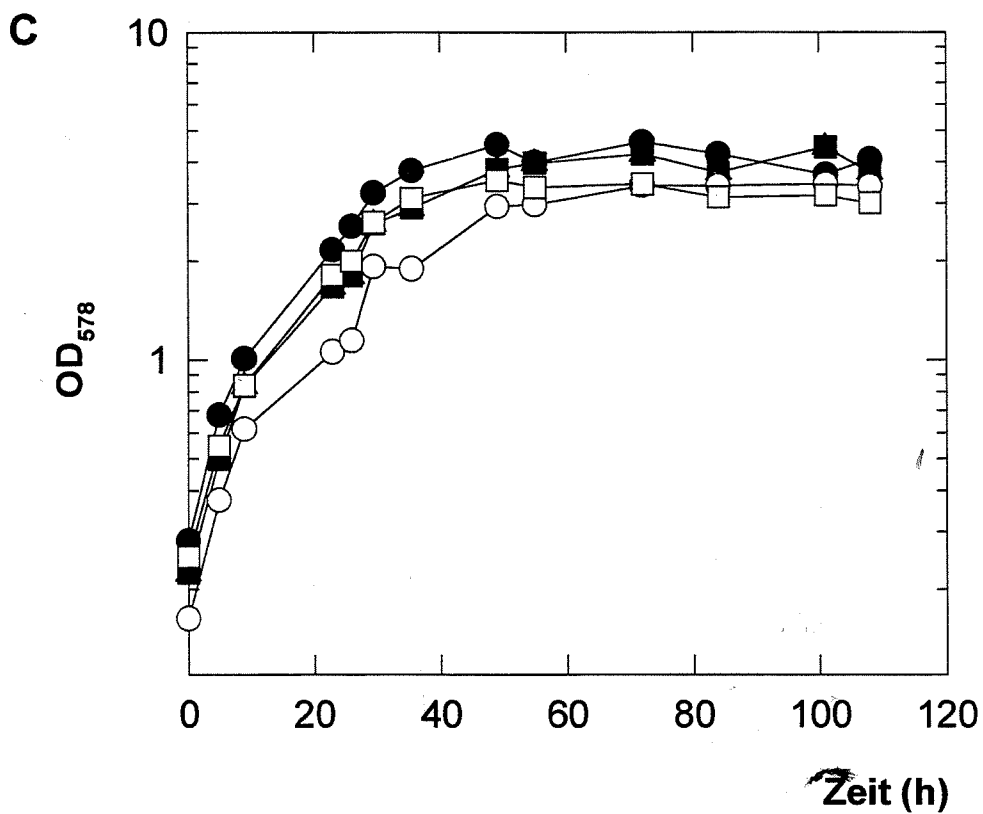


Abb 1: Wachstumskinetik der glucoseadaptierten Stämme in mMRS4 - Medium mit 10 g Glucose / l

A: LTH 3878 (●), LTH 3573 (■), LTH 4419 (▲), LTH 4463 (▼), LTH 4453 (◆)

B: LTH 4454 (●), LTH 4469 (■), LTH 4471 (▲), LTH 4457 (◆), LTH 4945 (▼),
LTH 4414 (○), LTH 4914 (□)

C: LTH 4456 (■), LTH 3574 (●), LTH 4474 (▲), LTH 4449 (○), LTH 4460 (□)

3.4. Supplementierung der Milch zur Optimierung des Wachstums

Die Milchsäurebakterien stellen im Hinblick auf ihre Versorgung mit Stickstoffverbindungen besondere Ansprüche; hierin machen auch die Milchsäurebakterien des Sauerteiges keine Ausnahme. Orla-Jensen (1936) zeigten auf, daß die Milchsäurebakterien eine Reihe von Aminosäuren nicht selbst zu synthetisieren vermögen und diese daher im Kultursubstrat vorliegen müssen. Als Stickstoffquelle werden für die Milchsäurebakterien vor allem Aminosäuren und eventuell Peptide in Betracht gezogen.

Die Milch enthält zwar 3,5 - 3,8 % Protein, aber es fehlt ihr an freien Aminosäuren und Peptiden. In 100 ml Milch liegen nur 4 mg Stickstoff in Form von freien Aminosäuren und 3 mg Stickstoff in Form von Peptiden vor (Schlimme, 1990). Es sollte untersucht werden, wie wichtig der Bedarf von *L. sanfranciscensis* und *L. pontis* Stämmen an freien Aminosäuren oder Peptiden ist, da diese ein limitierender Faktor beim Wachstum in Milch sein kann. mMRS4 - bzw. Homohiochii - Medium, in denen die Stämme gutes Wachstum zeigten, enthält als Stickstoffquellen Hefeextrakt und Fleischextrakt.

3.4.1. Einsatz von Hefeextrakt

Kline und Sugihara (1971) haben beschrieben, daß der Zusatz von Frischhefeextrakt für ein optimales Wachstum von Sauerteigorganismen notwendig ist. Weiterhin haben Berg et al. (1981) aus Frischhefeextrakt die wachstumsfördernde Substanz für *L. sanfranciscensis* charakterisiert. Es handelt sich hierbei um ein kleines Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 1065, das Asparagin, Cystein, Glutamin, Glycin und Lysin enthält.

Hefeextrakt ist neben vielen Vitaminen und Mineralien auch reich an freien Aminosäuren und Peptiden. Daher wurde untersucht, ob eine Zugabe von Hefeextrakt förderlich für das Wachstum ist. Zur Durchführung wurde die bei 30°C in glucosehaltigem mMRS4 - Medium vorgezüchtete Kultur bei 2000×g für 10 min abzentrifugiert und damit die Milch so beimpft, daß eine Lebendkeimzahl von ca. 10^7 - 10^8 Kbe / ml Milch erreicht wurde.

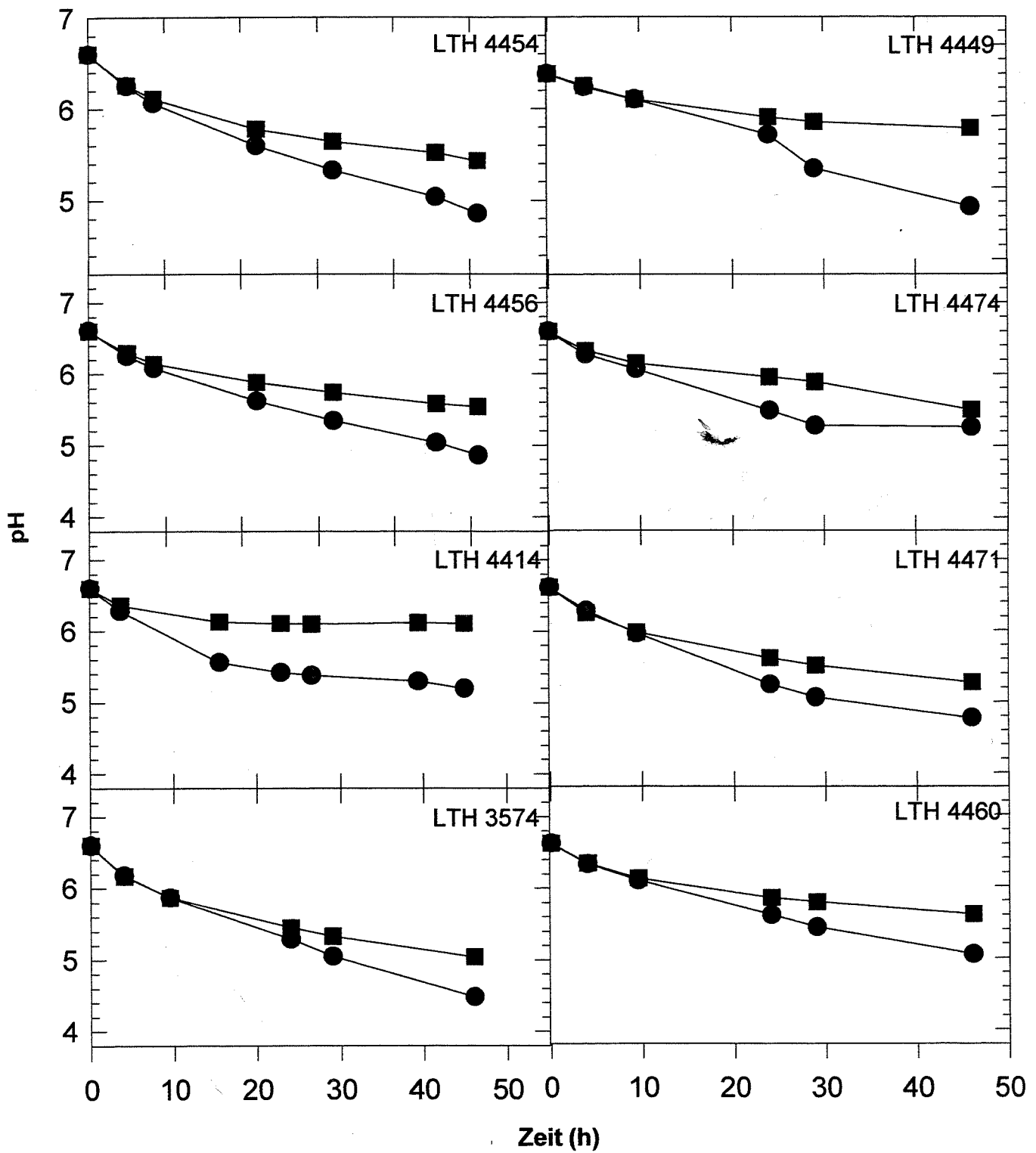
3. Ergebnisse

Der Hefeextrakt wurde separat autoklaviert und in einer Konzentration von 0,5 % der Milch zugesetzt. Da die untersuchten Stämme nicht in der Lage sind Lactose zu spalten, wurde 1 % autoklavierte Glucoselösung zugegeben (die optimale Konzentration von Lactozymzusatz war noch nicht eingestellt). Die Stoffwechselaktivität wurde durch Messung des pH - Wertes verfolgt.

Wie aus Abb. 2 zu entnehmen ist, nimmt der pH - Wert der Milch bei allen untersuchten Stämmen durch Zugabe von 0,5 % Hefeextrakt schneller ab als bei der Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Hefeextrakt auf das Wachstum einen fördernden Effekt hat.

3. Ergebnisse

A



Fortsetzung nächster Seite

3. Ergebnisse

B

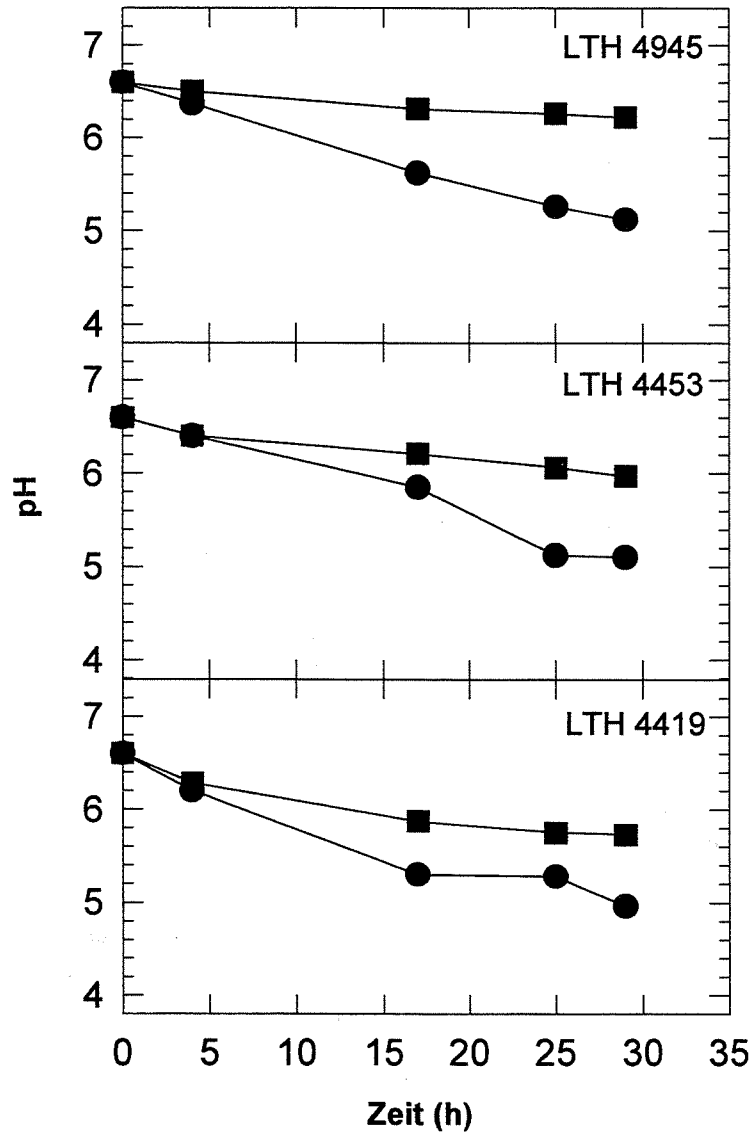


Abb. 2: Einfluß von Hefeextraktzusatz auf den pH - Verlauf von Stämmen in Milch;
0,5% Hefeextrakt- und 1% Glucosezusatz (●), 1% Glucosezusatz (■) (Kontrolle)

A: Stämme LTH 4454, 4456, 4414, 3574, 4449, 4474, 4471, 4460

B: Stämme LTH 4945, 4453, 4419

3. Ergebnisse

3.4.2. Bedarf an Vitaminen

Da der wachstumsfördernde Hefeextrakt neben vielen Aminosäuren bzw. Peptiden und Mineralien auch reich an Vitaminen (besonders Vitaminen der B - Gruppe) ist, wurde der Einfluß der Vitamine näher untersucht. Vitamine sind essentiell für das Wachstum von Milchsäurebakterien. Die Laktobazillen benötigen Pantothersäure, Niacin und andere Vitamine der B - Gruppe. Milch enthält alle Vitamine in sehr unterschiedlicher Menge. Die Vitamine B₁, B₁₂ und C sind besonders hitzeempfindlich. Pasteurisieren, Hoch- und Kurzzeiterhitzen führen zu etwa 5 bis 50 % Vitaminverlusten (Schlimme, 1990).

Da der wachstumsfördernde Effekt des Hefeextraktes auf Vitamine zurückzuführen ist, wurde zur Überprüfung der Milch Multibionta Vitamingemisch (1 ml / l) zugesetzt. Multibionta enthält Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin B₁, Vitamin B₂ und Vitamin B₆. Damit wurde die Wirkung von Vitaminen auf das Wachstum getestet. Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben.

Wie aus Abb. 3 zu entnehmen ist, hat der Multibiontazusatz auf die pH - Absenkung nur einen sehr geringen Effekt. Bei den Stämmen LTH 4454, 4456, 4457, 4419 ist kein Unterschied feststellbar. Bei den LTH 4453, 4463, 3878 und 3573 sinkt der pH - Wert mit Multibionta etwas schneller ab als bei der Kontrolle.

3. Ergebnisse

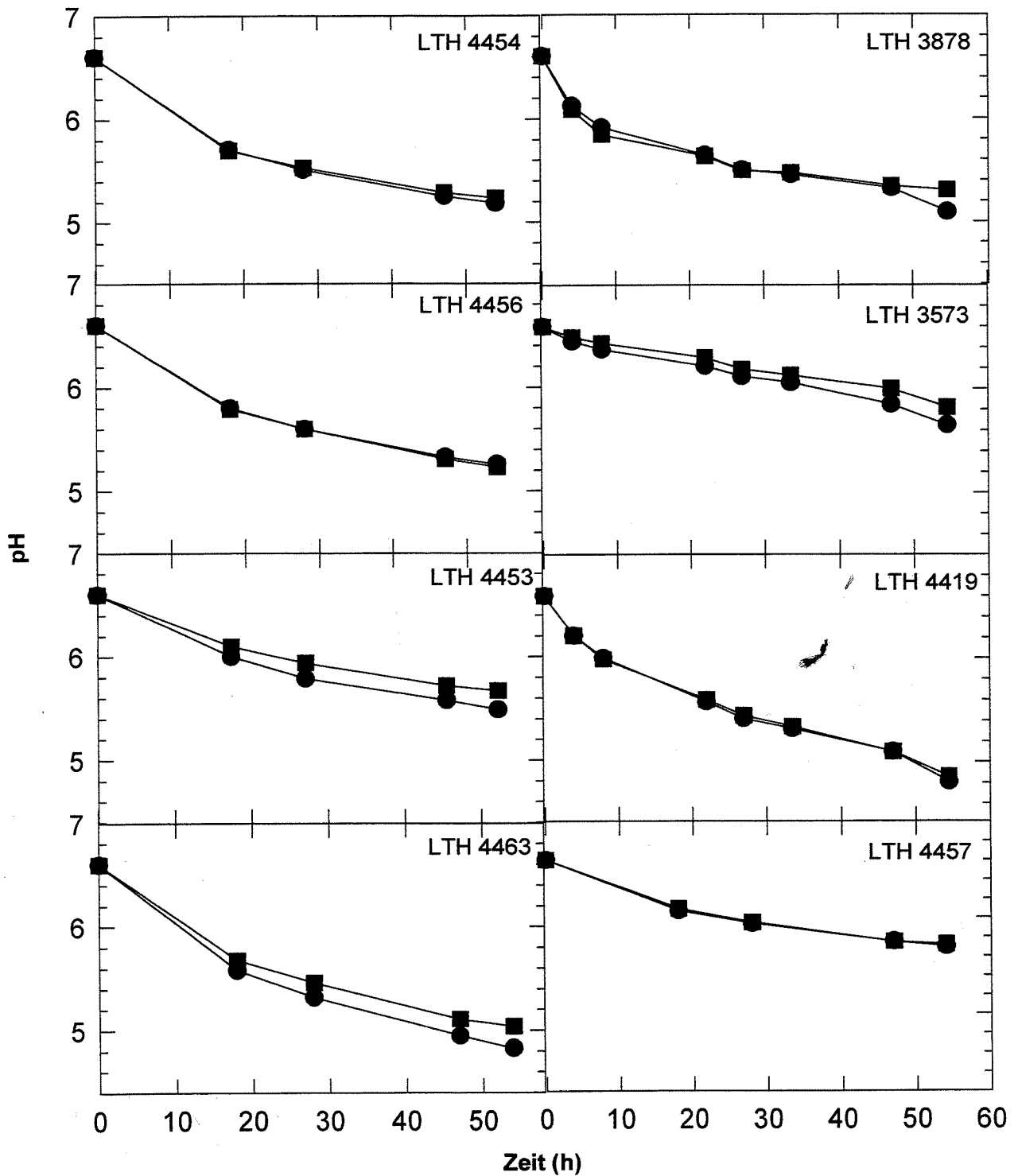


Abb. 3: Einfluß von Multibiontazusatz auf den pH - Verlauf der Stämme LTH 4454, 4456, 4453, 4463, 3878, 3573, 4419 und 4457; 1 ml / l Multibionta- und 1% Glucosezusatz (●), 1% Glucosezusatz (■) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

3.4.3. Bedarf an Fettsäuren

Bei einer Untersuchung der Eigenschaften von Milchsäurebakterien aus Sauerteig wurde festgestellt, daß *L. brevis*, *L. sanfranciscensis*, *L. reuteri*, *L. curvatus* und *L. hilgardii* für das Wachstum eine gewisse Menge an bestimmten Fettsäuren brauchen (Okada et al., 1992). Mit Ausnahme von *L. reuteri* ist für alle oben genannten Spezies Ölsäure, die ein Bestandteil von Tween 80 ist, für das Wachstum essentiell. Der Fettsäurebedarf wurde bei 5 verschiedenen Stämmen untersucht. Es wurde Tween 80 (1 ml / l) der Milch zugesetzt, die Inokulation wie unter 3.4.1. beschrieben durchgeführt, aber statt 1%-iger Glucoselösung wurden 30µl Lactozym / 100 ml Milch zugegeben. Aus der Abbildung 4 ist zu entnehmen, daß der Tween 80 - Zusatz auf den pH -Verlauf keine Auswirkung zeigt.

3. Ergebnisse

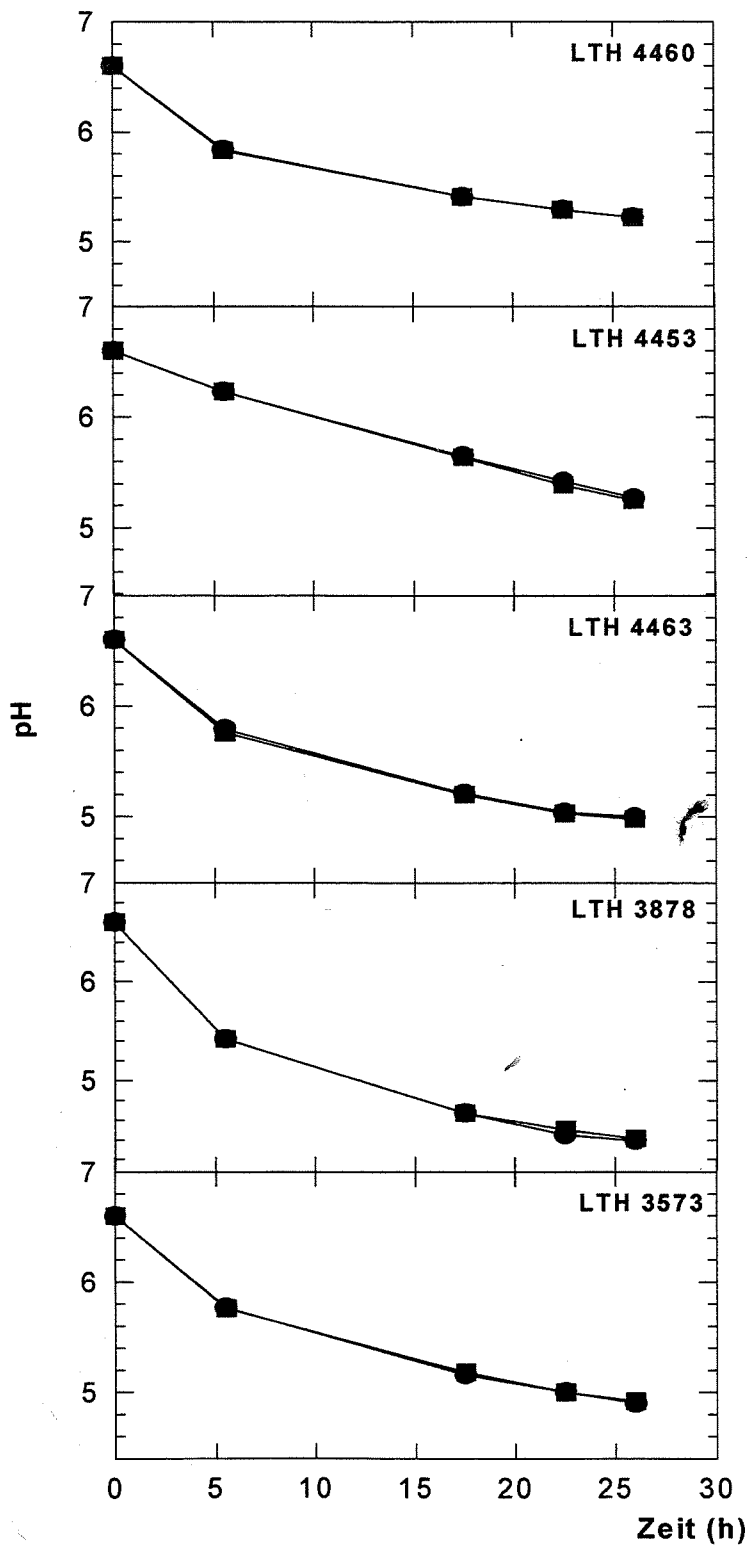


Abb. 4: Einfluß von Tween 80 auf den pH - Verlauf der Stämme LTH 4460, 4453, 4463, 3878 und 3573; 1ml / l Tween 80- und 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (●), 300µl Lactozymzusatz / l Milch (■) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

3.4.4. Bedarf an Mineralien (Mangan und Eisen)

Nach der Feststellung, daß die im Hefeextrakt vorhandenen Vitamine auf das Wachstum keinen Einfluß haben, wurde nun der Effekt von Mineralien untersucht.

Die Milchsäurebakterien benötigen neben vielen Spurenelementen und einigen Anionen, wie PO_4^{3-} und SO_4^{2-} , sowie die Kationen K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mn^{2+} .

Der Hefeextrakt enthält neben Aminosäuren und Vitaminen auch viele Metalle, insbesondere Kalzium, Magnesium, Eisen, Kupfer, Blei, Mangan, Zinn, Zink und Kobalt. Milch enthält ca. 7,3 g Mineralsalze / l, die hauptsächlich aus Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Phosphor und Magnesium bestehen. Mangan und Eisen sind in Milch nur gering vorhandene Mineralien. Laktobazillen benötigen jedoch ausreichend Mangan zum Wachstum (Kandler und Weiss, 1986). Aus diesem Grund wurde von einer sterilfiltrierten MnSO_4 - Lösung 50 mg / l der Milch zugesetzt. Die Inokulation und die Behandlung wurden, wie unter 3.4.3. beschrieben, durchgeführt und das Wachstum über die pH - Absenkung verfolgt.

Für die Untersuchung des Eisenbedarfs wurden sterilfiltrierte FeSO_4 - Lösung 50 mg / l Milch und 30 μl Lactozym / 100 ml Milch zugesetzt. Die Milch wurde so beimpft, daß eine Lebendkeimzahl von ca. 10^8 Kbe / ml erreicht wurde. Das Wachstum wurde über den pH - Verlauf und die Lebendkeimzahl verfolgt.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, wird das Wachstum durch Mn^{2+} - Zusatz nicht beeinflusst. Der Abb. 6 ist zu entnehmen, daß der Eisenzusatz auf das Wachstum bzw. die Erhöhung der Lebendkeimzahl keinen Effekt hat.

3. Ergebnisse

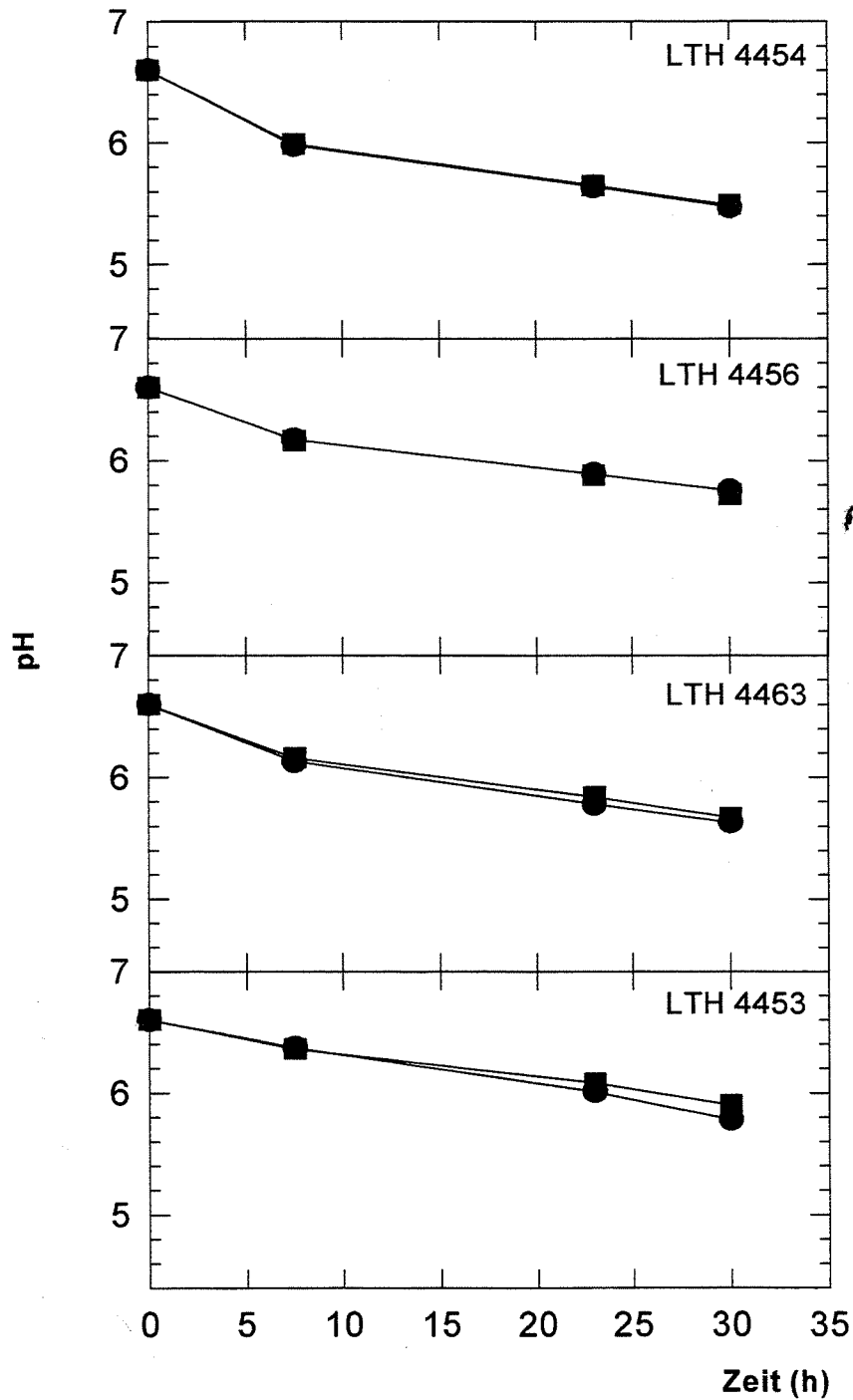


Abb. 5: Einfluß von Mn^{2+} auf den pH - Verlauf der Stämme LTH 4454, 4456, 4463 und 4453; 50 mg Mangansulfat-/l und 300 μ l Lactozymzusatz/l Milch (●), 300 μ l Lactozymzusatz/l Milch (■) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

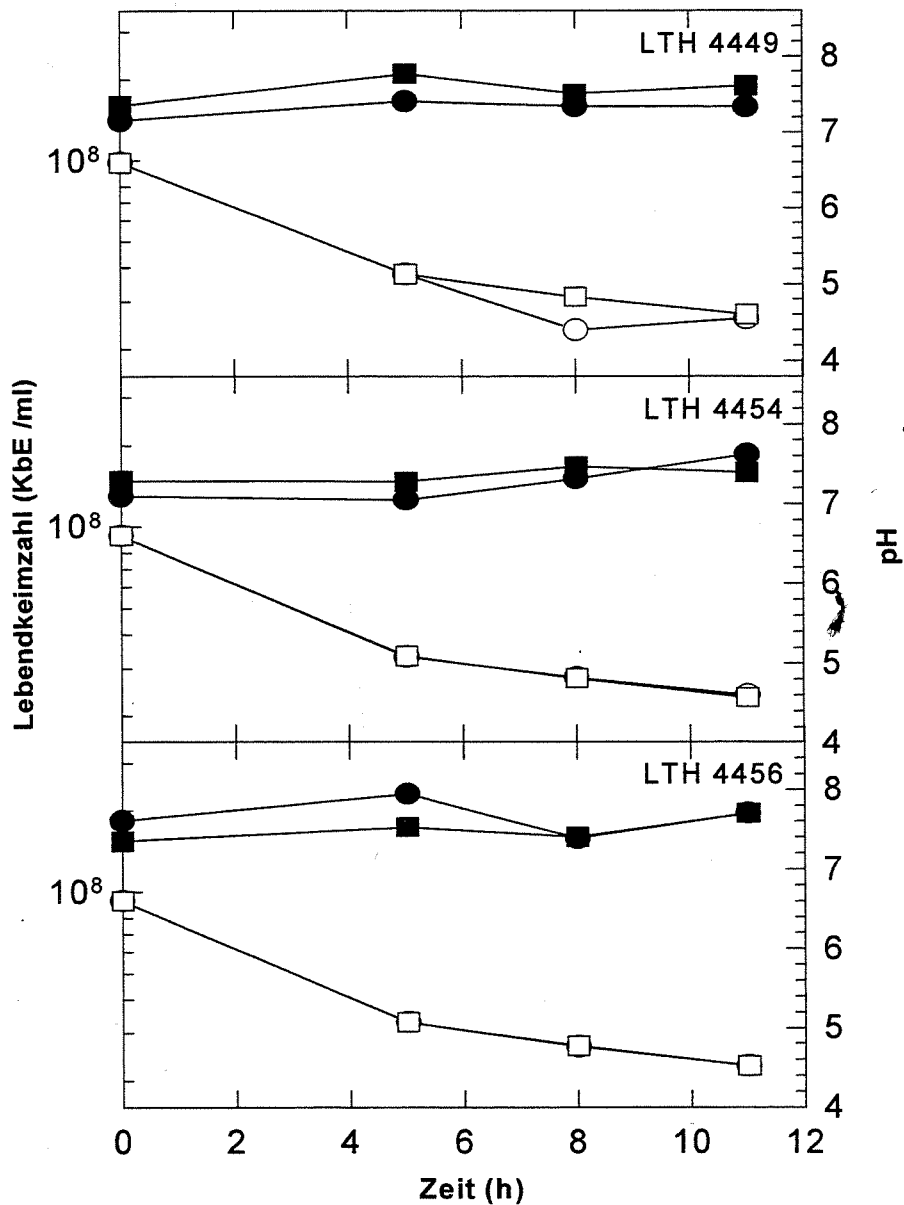


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH-Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4449, 4454, 4456 in Milch; 50 mg FeSO_4 /l Milch und 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (●), 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (■) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

3.4.5. Zugabe von Tomatensaft

Kandler und Weiss (1986) beschrieben, daß eine Supplementierung von Medien mit Tomatensaft, Mangan, Acetat und Tween 80 für viele Spezies von Milchsäurebakterien einen stimulierenden Effekt hat. Tomatensaft ist reich an Zuckern, Mineralien und Vitaminen der B - Gruppe (Badran et al., 1993). Babu et al., (1992) haben festgestellt, daß der Zusatz von Tomatensaft zu Magermilch das Wachstum von *Lactobacillus acidophilus* stimuliert. Es wurde damit eine höhere Keimzahl, kürzere Generationszeit und eine verbesserte Zuckerverwertung, sowie eine hohe Säureproduktion und ein niedriger pH - Wert erreicht. Bei der Untersuchung mit Tomatensaft wurde 20% der Milch durch Tomatensaft ersetzt. Die Inokulation und Behandlung mit Lactozym wurden, wie unter 3.4.3. beschrieben, durchgeführt. Während der Fermentation wurden die Lebendkeimzahl und der pH - Verlauf aufgenommen.

Wie aus den Abb. 7 und 8 zu entnehmen ist, zeigen die untersuchten Stämme unterschiedliche Wachstumskurven. In keinem Fall hatte der Zusatz von Tomatensaft einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Stämme.

3. Ergebnisse

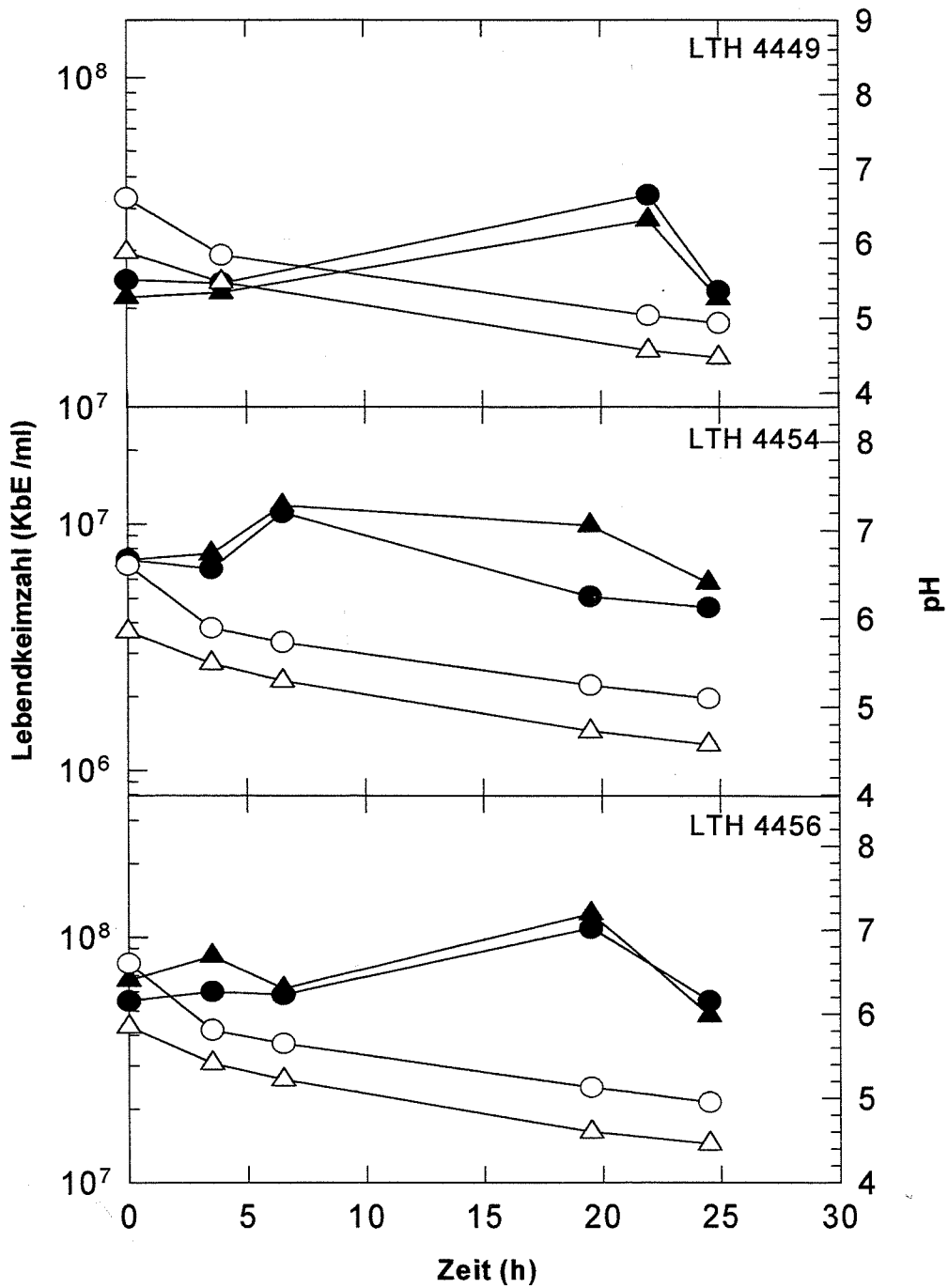


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4449, 4454, 4456 in Milch; Tomatensaft- (20%) und 300 μ l Lactozymzusatz / l Milch (\blacktriangle); 300 μ l Lactozymzusatz / l Milch (\bullet) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

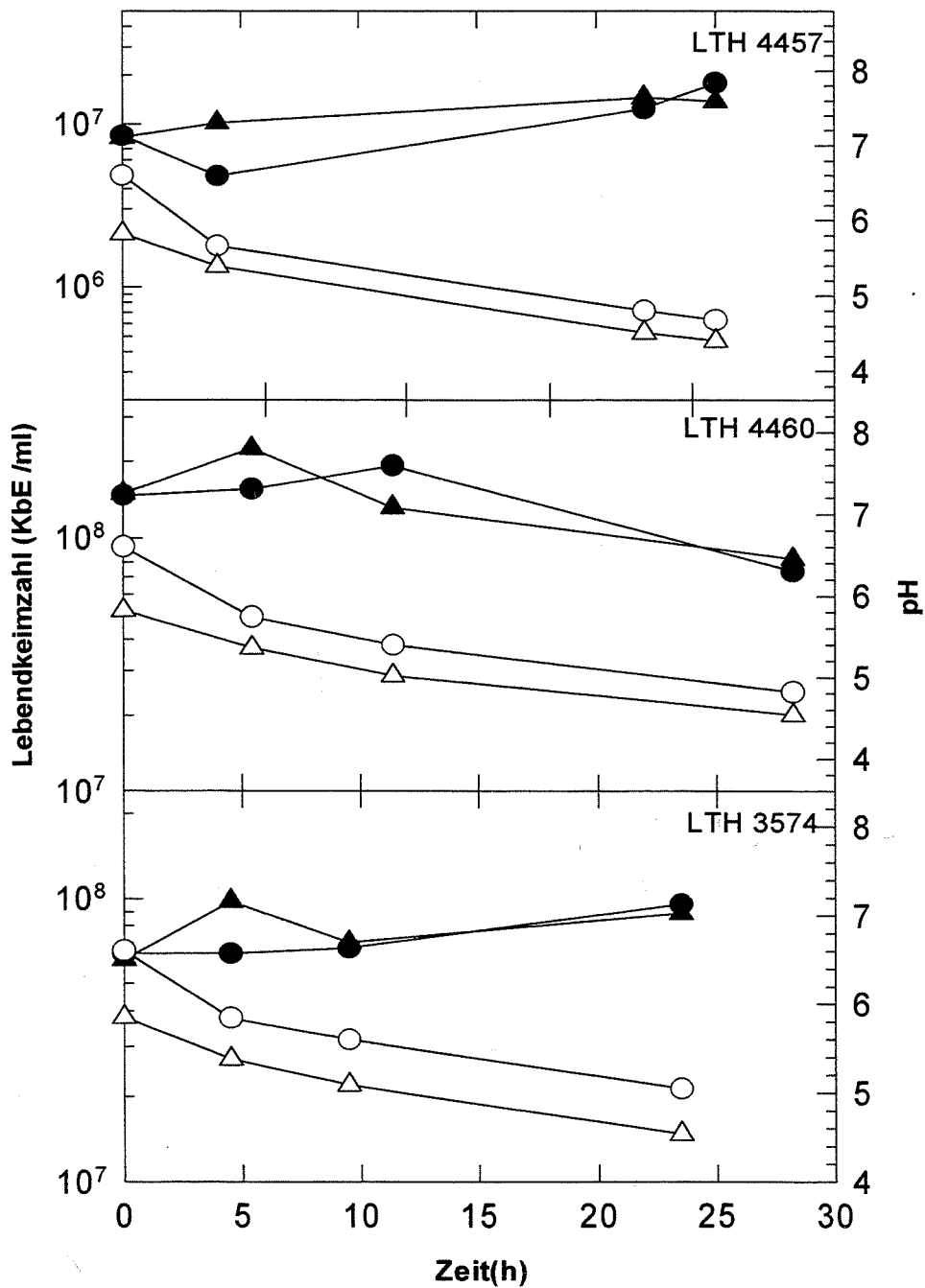


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH-Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4457, 4460, 3574 in Milch; Tomatensaft- (20%) und 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (▲); 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (●) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

3.4.6. Zugabe von Fleischextrakt

Als weiteres Supplement wurde Fleischextrakt untersucht. Wie Hefeextrakt enthält Fleischextrakt viele Aminosäuren, Vitamine und Mineralien.

Es wurde der Milch 0,5% (wie in mMRS4 - Medium vorliegt) autoklavierter Fleischextrakt zugesetzt. Die Behandlung mit Lactozym und Inokulation wurde ebenfalls, wie unter 3.4.3. beschrieben, durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 9 und Abb. 10 dargestellt.

Wie aus Abb. 9 und 10 ersichtlich ist, hat die Zugabe von Fleischextrakt einen deutlichen Effekt auf das Wachstum der Stämme LTH 4449 und 4456.

3. Ergebnisse

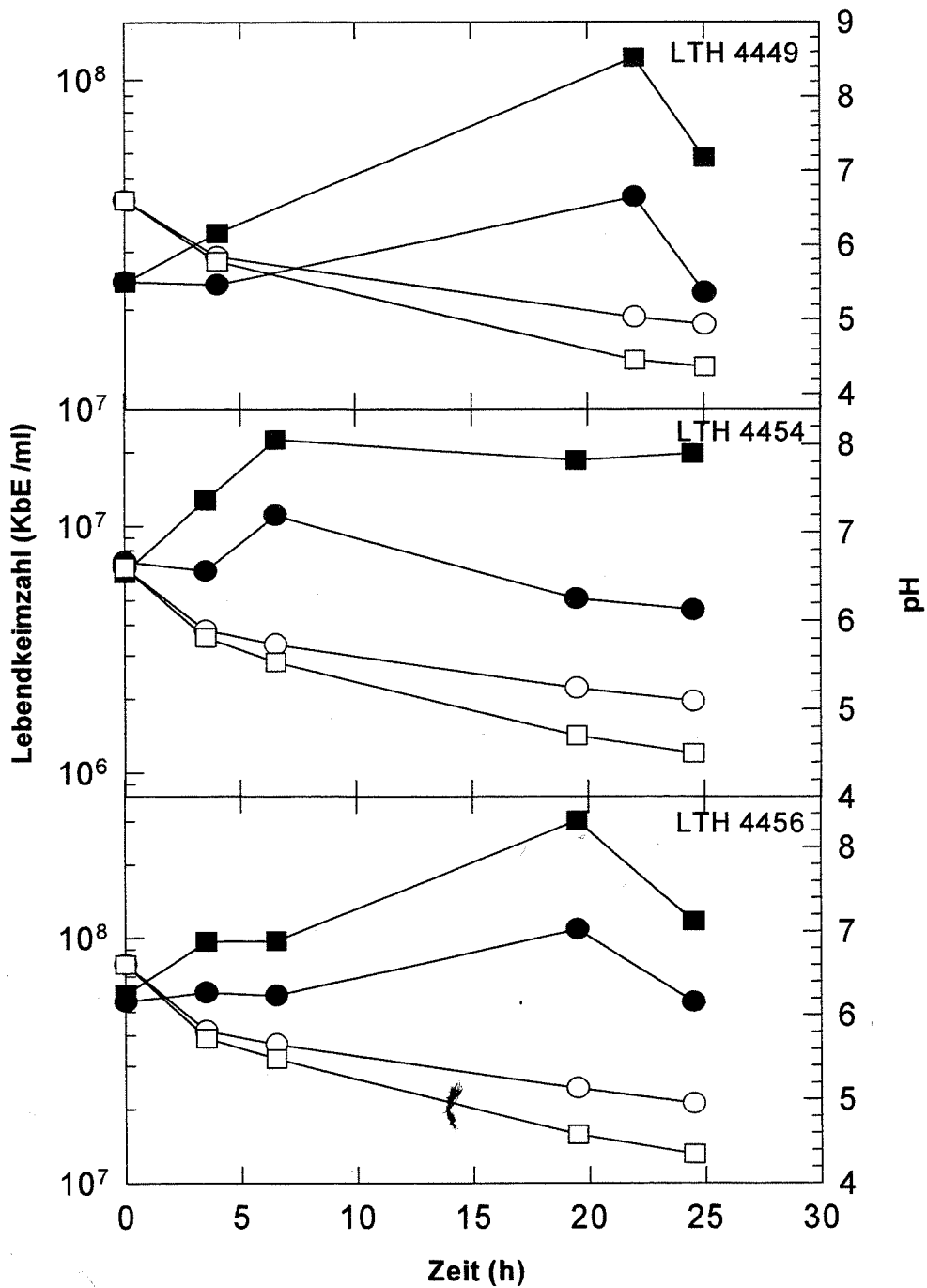


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH-Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4449, 4454, 4456 in Milch ; Fleischextrakt (0,5%) und 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (■); 300 µl Lactozymzusatz / l Milch (●) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

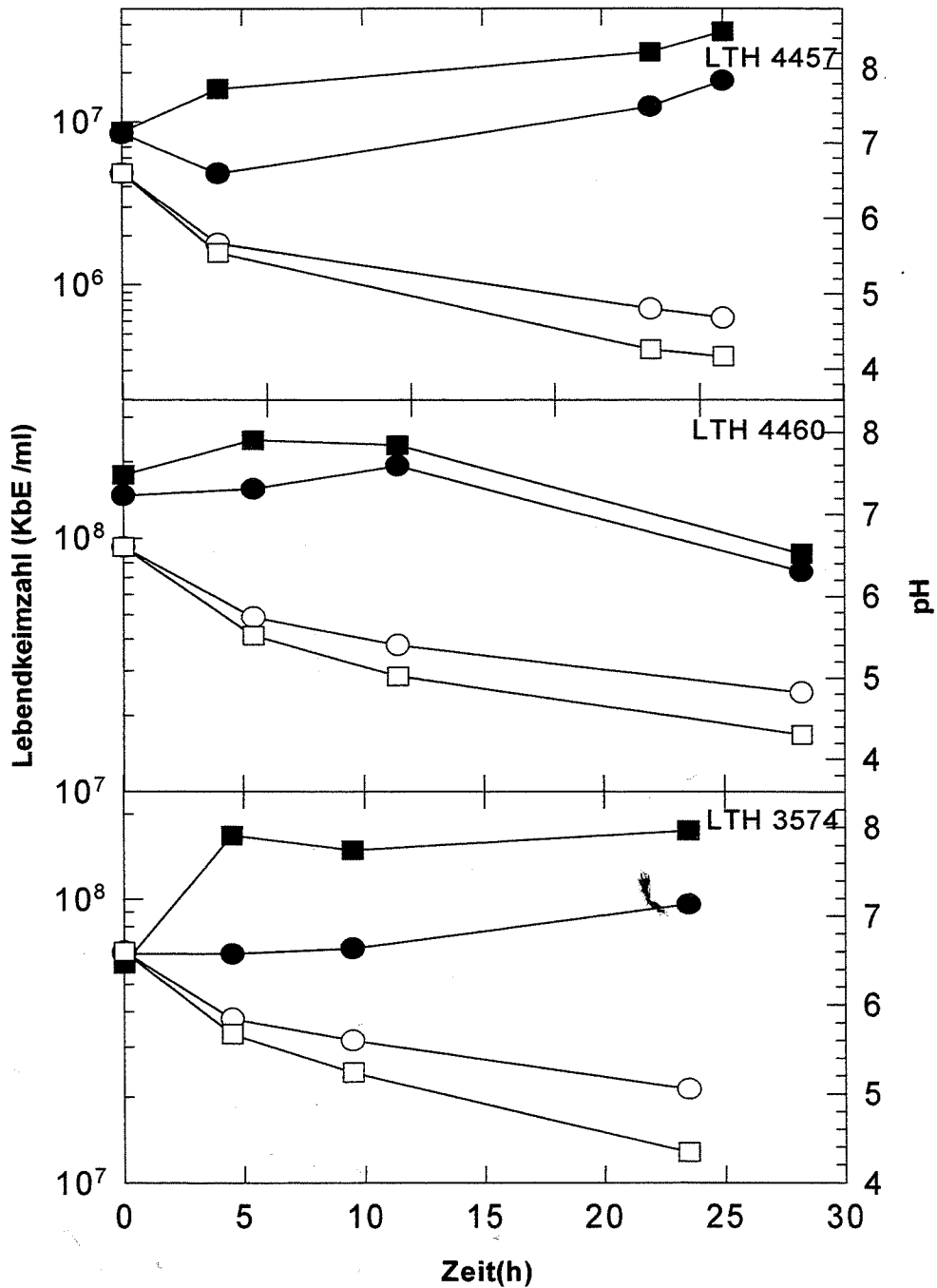


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH-Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4457, 4460, 3574 in Milch ; Fleischextrakt (0,5%) und 300 µl Lactozymzusatz / 1 Milch (■); 300 µl Lactozymzusatz / 1 Milch (●) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

Wie Hefeextrakt ist Fleischextrakt reich an Aminosäuren und Mineralien. Um zu vergleichen, ob die Stämme mit Hefeextrakt oder Fleischextrakt besser wachsen, wurde diese Untersuchung durchgeführt. Steriler Hefe- oder Fleischextrakt wurden in einer Konzentration von 0,5 % der Milch zugesetzt und die Untersuchung, wie unter 3.4.3. beschrieben, durchgeführt.

Wie aus Abb. 11 zu ersehen ist, wuchs der Stamm mit Hefeextrakt schneller als mit Fleischextrakt.

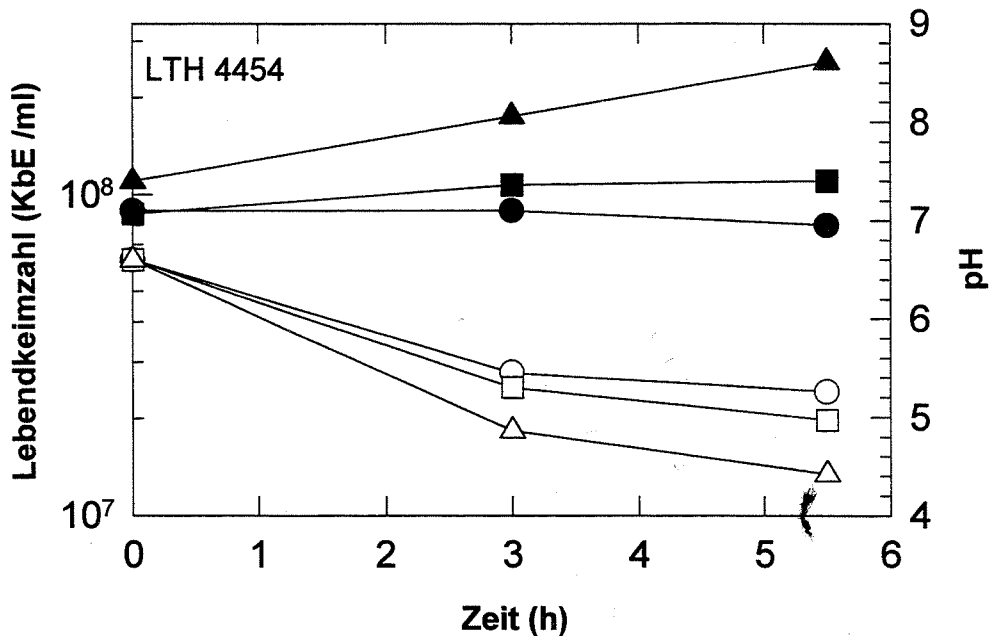


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) von dem Stamm LTH 4454 in Milch ; Fleischextrakt- (0,5%) und Lactozymsatz (■), Hefeextrakt- (0,5%) und Lactozymsatz (▲), Lactozymsatz (●) (Kontrolle)

3. Ergebnisse

3.4.7. Einsatz von Trypsin

Trypsin ist eine Endopeptidase, deren Wirksamkeit im Bereich von pH = 7 - 11 liegt und zur Gruppe der alkalischen Proteinasen gehört. Die Spaltung findet jeweils am Carboxylende der Aminosäuren Lysin und Arginin statt (Belitz und Grosch, 1992).

Trypsin ist eine der wichtigsten Proteasen für die Eiweißverdauung im Säugetierkörper (Baltes et al., 1995). Ibrahim (1994) hat beschrieben, daß durch den Trypsinzusatz zur Milch von κ -Casein ein Peptid abgespalten wird, daß das Wachstum von *Bifidobacterium longum* (ATCC 15708) fördert. Das Ziel dieser Untersuchung war, durch den Einsatz von Trypsin zur Milch eine gewisse Menge an Peptiden bzw. Aminosäuren aus Casein freizusetzen und somit das Wachstum der Laktobazillen zu fördern.

Zur Untersuchung wurden 2 g Trypsin / l bzw. 4 g Trypsin / l Milch zugegeben und bei 30°C bebrütet. Nach 2 und 4 - stündiger Inkubation wurde die freigesetzte Aminosäuremenge mit OPA - Reagenz (Haandrikman et al., 1989) bei 340 nm bestimmt und die Extinktionen wurden in Tab. 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Bestimmung der freigesetzte Aminosäuremenge der Milch durch OPA-Reagenz

| | <i>Extinktion nach 2 h</i> | <i>Extinktion nach 4 h</i> |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Milch (ohne Trypsin) | 0,1166 | 0,1227 |
| 2 g Trypsin / l Milch | 0,1909 | 0,2395 |
| 4 g Trypsin / l Milch | 0,2364 | 0,3695 |

Nach 4 h waren die gemessenen Werte in einem Bereich, der mit einem proteolytisch aktiven Stamm von *Lactococcus lactis* nach 12 h erreicht worden war (persönliche Mitteilung von C. Hertel). Damit kann von einer ausreichenden proteolytischen Aktivität ausgegangen werden.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung wurde die mit Lactozym versetzte Milch, mit Trypsin (4 g / l) und Vitaminlösung (Multibionta) (1 ml / l) supplementiert und mit einer Vorkultur angeimpft. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Lebendkeimzahl und den pH - Wert verfolgt.

Wie aus Abb. 12 ersichtlich ist, hat der Trypsinzusatz einen eindeutigen Effekt auf die Entwicklung der Lebendkeimzahl, während die zusätzliche Zugabe von Vitaminen das Wachstum nicht mehr steigerte.

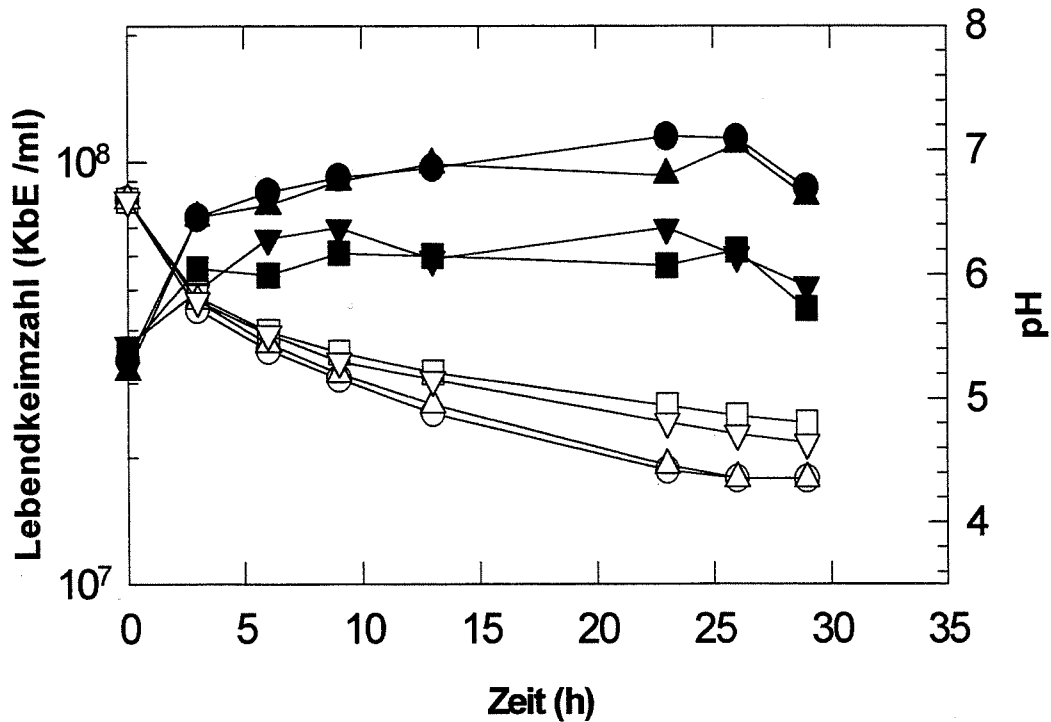


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) von Stamm *L. pontis* LTH 3878 in Milch ; Trypsin (4 g / l Milch) und Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (●), Trypsin (4 g / l Milch) (▲), Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (▼), Kontrolle (■)

3. Ergebnisse

Wie in Abb. 13 dargestellt ist, wuchs der Stamm LTH 4449 in Milch mit Zusatz von Trypsin nur unwesentlich besser als in der Kontrolle. Nach 25 h trat eine Absterbephase ein.

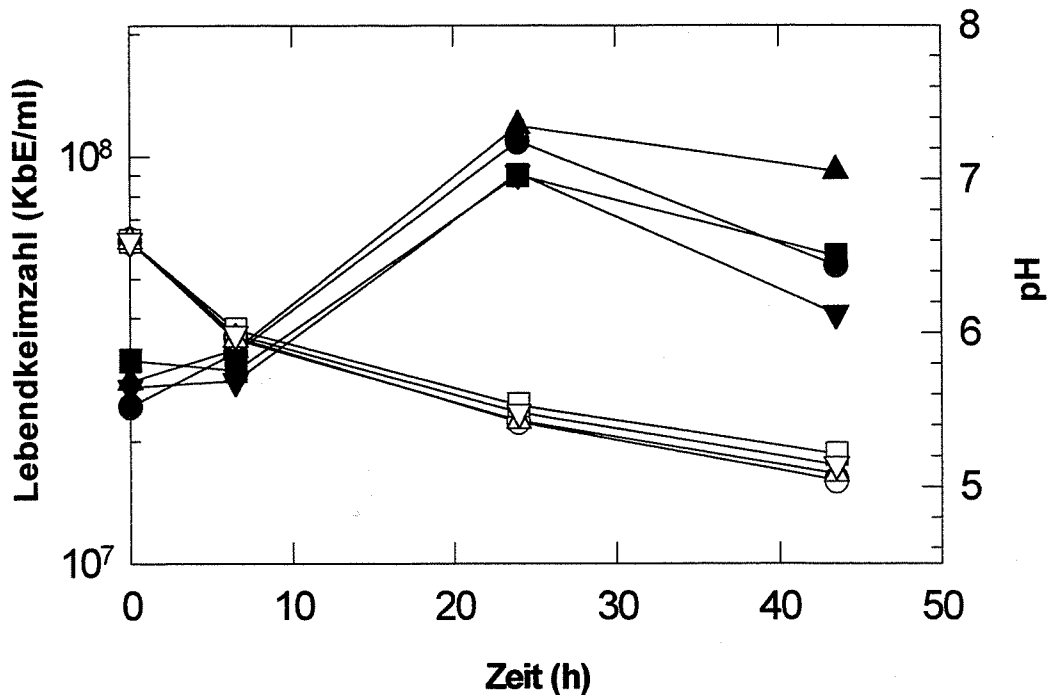


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) von Stamm *L. pontis* LTH 4449 in Milch ; Trypsin (4 g / l Milch) und Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (●), Trypsin (4 g / l Milch) (▲), Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (▼), Kontrolle (■)

Wie den Abb. 14 und 15 zu entnehmen ist, hatte der Trypsinzusatz keinen oder einen sehr unwesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Stämme. Nach 20 h fing der Stamm LTH 4471 an abzusterben. Bei dem Stamm LTH 4456 wurde nach 12 h nur ein sehr geringer Anstieg des Wachstums bei Trypsinzugabe beobachtet. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch Trypsinzusatz zur Milch das Wachstum der untersuchten Stämme nicht stimuliert werden konnte.

3. Ergebnisse

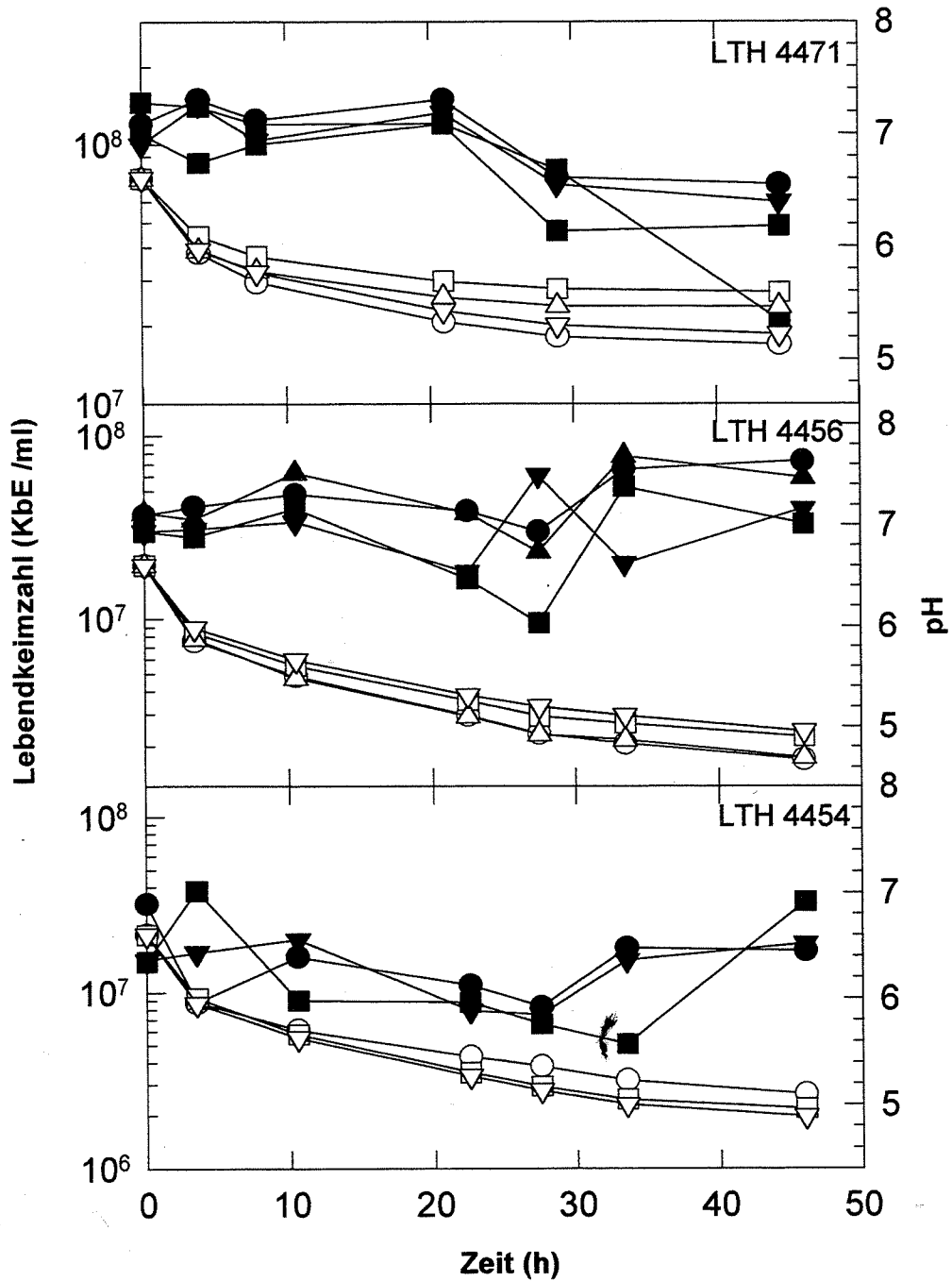


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4471, 4456 und 4454 in Milch ; Trypsin (4 g / l Milch) und Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (●), Trypsin (4 g / l Milch) (▲), Vitaminlösung (1 ml / l Milch) (▼), Kontrolle (■)

3. Ergebnisse

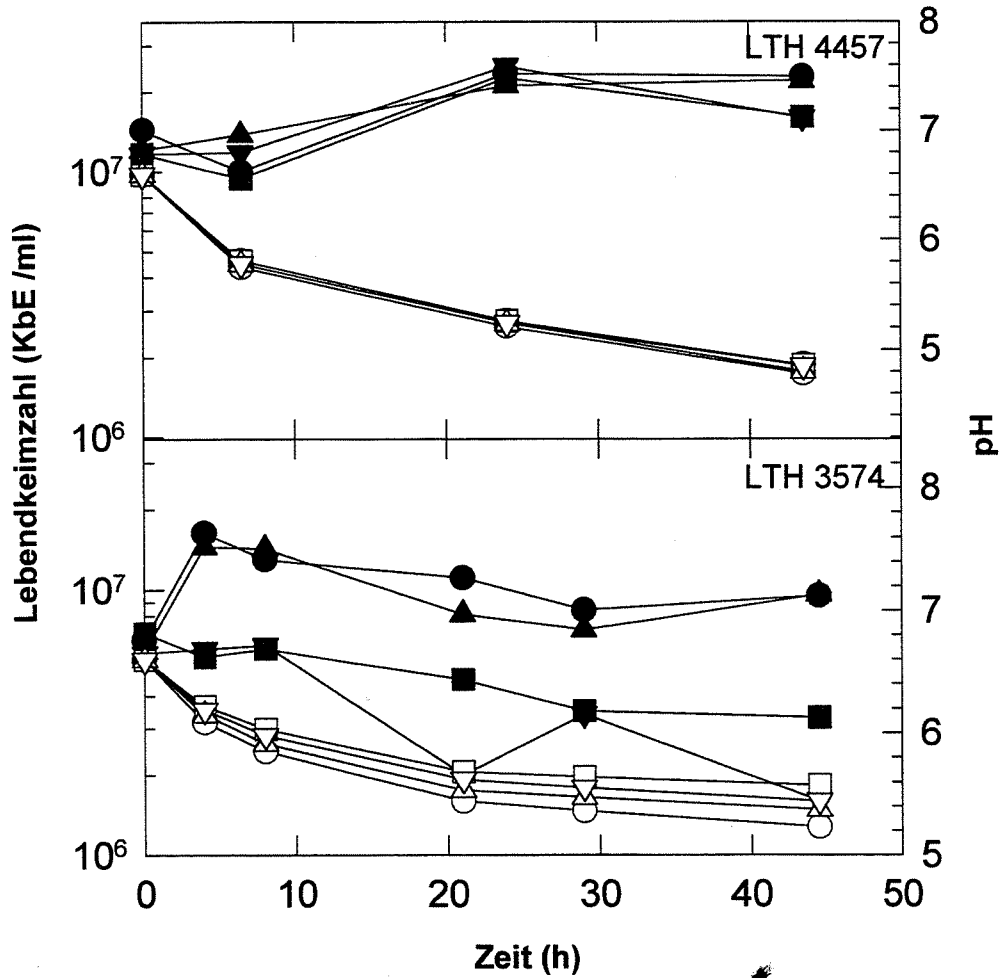


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Stämme LTH 4457, 3574 in Milch ; Trypsin (4 g / 1 Milch) und Vitaminlösung (1 ml / 1 Milch) (●), Trypsin (4 g / 1 Milch) (▲), Vitaminlösung (1 ml / 1 Milch) (▼), Kontrolle (■)

3. Ergebnisse

3.4.8. Untersuchung mit Fermentationsbeschleunigern

Unter Fermentationsbeschleunigern sind hier von der Firma DMV - International bezogene Isolate aus Milchproteinen zu verstehen. Sie werden grundsätzlich bei der Joghurtherstellung verwendet, um den Fermentationsprozeß zu optimieren. Weiterhin werden diese Fermentationsbeschleuniger zur Herstellung von speziellen bzw. probiotischen Milchprodukten eingesetzt. Die Fermentationsbeschleuniger wurden entwickelt, um notwendige Wachstumsfaktoren für die traditionellen, probiotischen Produkte und Mischkulturen zur Verfügung zu stellen.

Die empfohlene Menge liegt für Stammkulturen zwischen 0,2 und 1,0 % , für Mischkulturen zwischen 0,05 und 0,2%. Es wurden bei dieser Untersuchung vier verschiedene Fermentationsbeschleuniger (fermentation enhancer, FE) nämlich FE 120, FE 135, FE 160 und FE 170 verwendet. FE 120 ist eine aus Casein, FE 135 ist eine aus Molkenprotein hergestellte Substanz. FE 160 und 170 sind ebenfalls auch aus Milchprotein hergestellte Produkte.

Zur Untersuchung wurde der Milch Lactozym zugesetzt und die vorgezüchtete Kultur beimpft. Es wurden jeweils 0,2 % autoklavierte FE in die Milch gegeben und das Wachstum über die Lebendkeimzahl und den pH - Wert verfolgt.

Wie in den Abb. 16 und 17 zu sehen ist, hat der Zusatz von Fermentationsbeschleunigern auf das Wachstum der untersuchten vier Stämme keinen Einfluß.

3. Ergebnisse

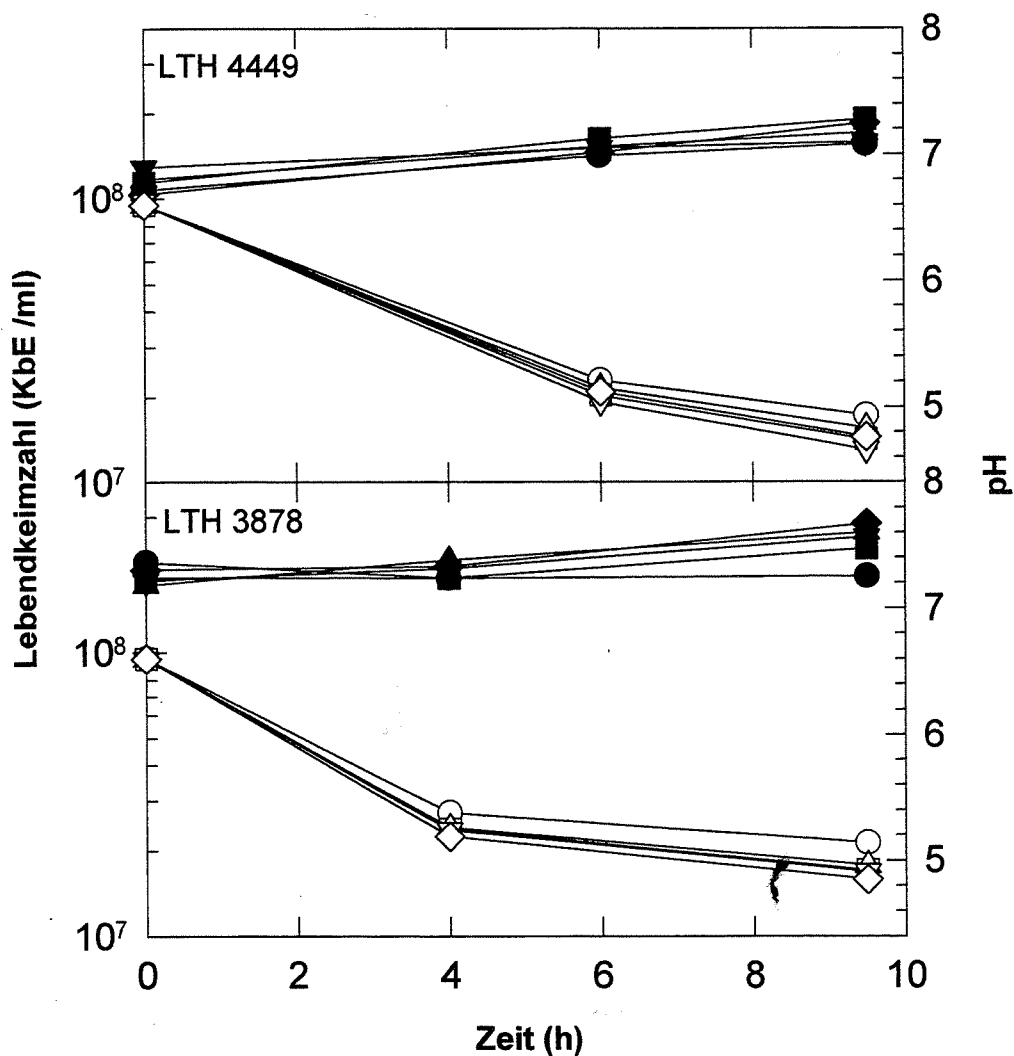


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Stämme von *L. pontis* LTH 4449 und LTH 3878 in Milch; FE 120 (■), FE 135 (▲), FE 160 (▼), FE 170 (◆), Kontrolle (●)

3. Ergebnisse

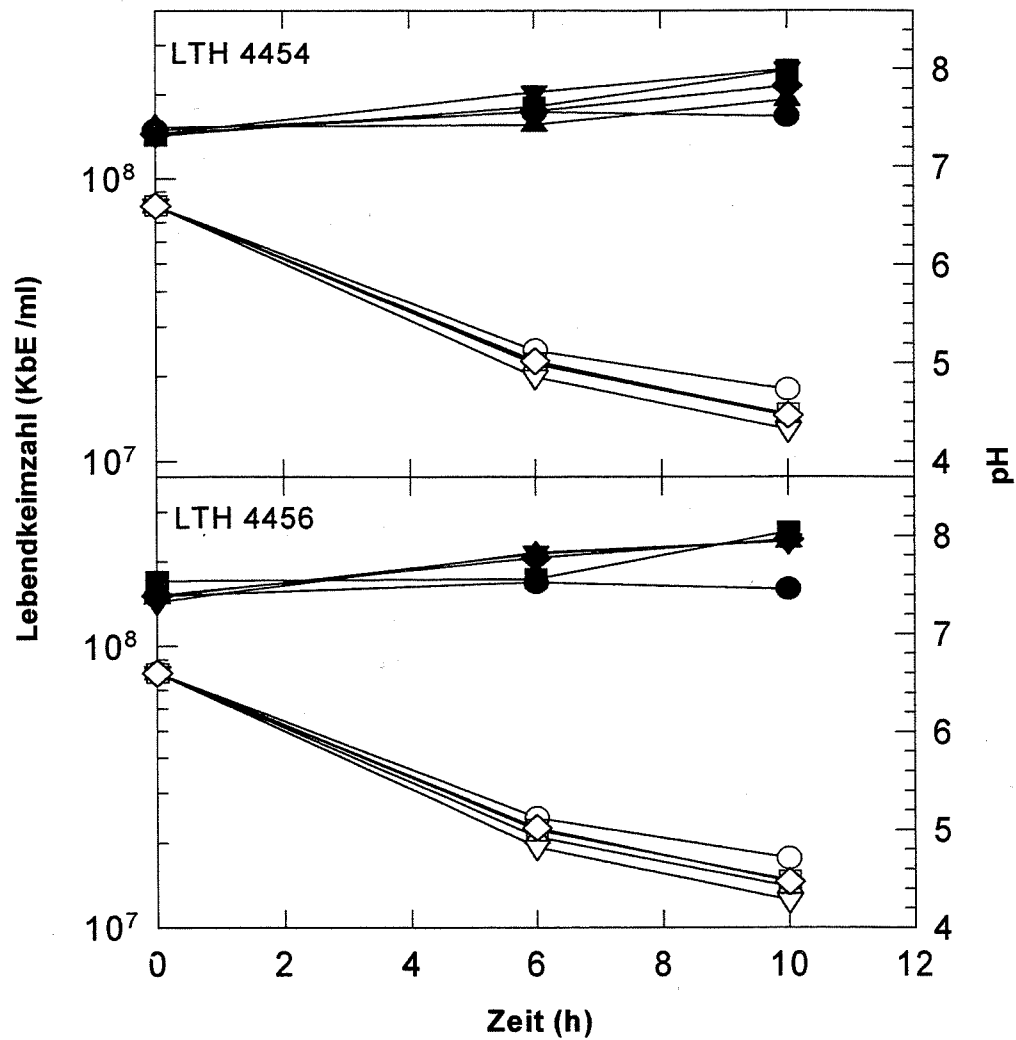


Abb. 17: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Stämme von *L. pontis* LTH 4454 und LTH 4456 in Milch; FE 120 (■), FE 135 (▲), FE 160 (▼), FE 170 (◆), Kontrolle (●)

3. Ergebnisse

3.5. Kokultivierung von *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus pontis* in Milch

Sauerteiglaktobazillen haben für ein optimales Wachstum einen großen Bedarf an Aminosäuren bzw. Peptiden. Um diesen Bedarf zu decken wurde untersucht, ob die Kokultivierung mit Stämmen, die Milchproteine abbauen können, zur Stimulierung des Wachstums von *L. pontis* LTH 3878 beitragen kann.

Es wurden fünf proteolytische *Lactococcus lactis* - Stämme ausgewählt. Die proteolytische Aktivität von den Stämmen wurde in Milch mit OPA - Reagenz bestimmt (nach Haandrikman et al., 1989).

Tabelle 6 : Bestimmung der proteolytischen Aktivität

| LTH- Nummer | Extinktion (340 nm) |
|----------------------------|---------------------|
| 2148 (MG 1820, neg Kontr.) | 0,1004 |
| 4667 | 0,2240 |
| 4668 | 0,2340 |
| 4669 | 0,3205 |
| 4670 | 0,3714 |
| 4805 | 0,2102 |

Als proteolytisch positiver Stamm wurde Stamm LTH 4670 ausgewählt und mit Stamm LTH 3878 in Milch kokultiviert. Die Milch wurde, wie unter 3.4.3. beschrieben, mit Lactozym behandelt. Das Wachstum wurde über den pH - Wert und die Lebendkeimzahl verfolgt.

3. Ergebnisse

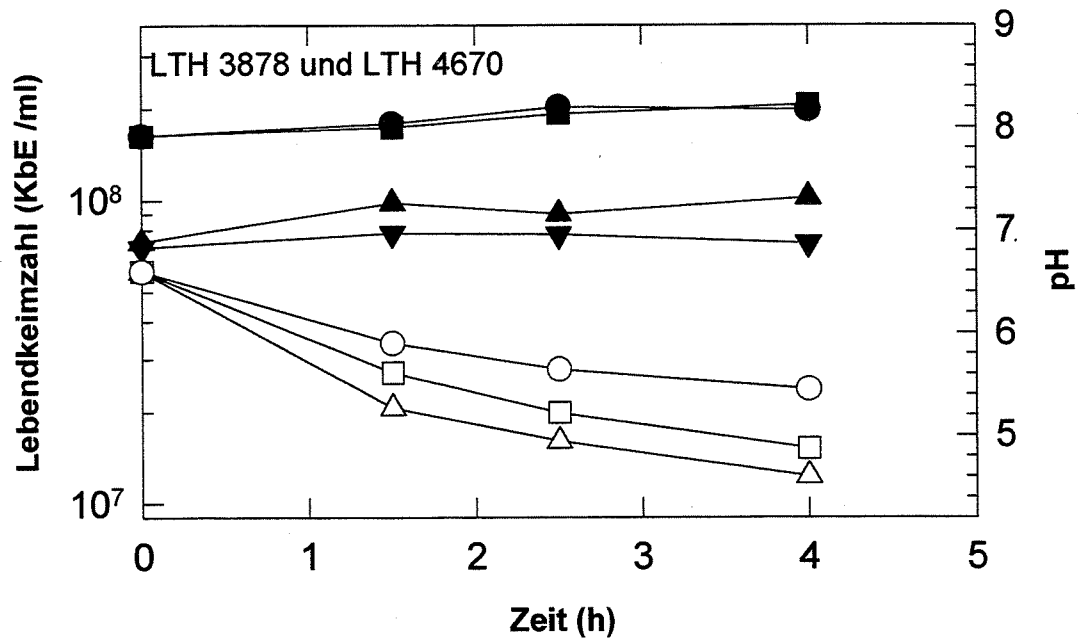


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Lebendkeimzahl (geschlossene Symbole) und des pH - Wertes (offene Symbole) der Kokultivierung von *L. pontis* LTH 3878 und *Lactococcus lactis* LTH 4670 in Milch; Einzelkultur KbE von *L. pontis* LTH 3878 (●), Kokultur KbE von *L. pontis* LTH 3878 (■), Einzelkultur KbE von *Lc. lactis* LTH 4670 (▲), Kokultur KbE von *Lc. lactis* LTH 4670 (▼), Einzelkultur pH - Verlauf von *L. pontis* LTH 3878 (○), Einzelkultur pH - Verlauf von *Lc. lactis* LTH 4670 (□), Kokultur pH - Verlauf (△)

Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, hat *Lactococcus lactis* LTH 4670 auf *L. pontis* LTH 3878 keinen stimulierenden Effekt, obwohl die proteolytische Aktivität von LTH 4670 nach der Messung optimal war.

3. Ergebnisse

3.6. Herstellung von Sauermilchprodukten

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen wurden Stämme ausgewählt, die Milch schnell säuern können. Mit den Stämmen von *L. pontis* LTH 3878, 4449, 4454, 4456 und 4457 wurden Sauermilchprodukte hergestellt. Bei der Herstellung wurde die Milch mit Lactozym versetzt. Die Milchsäurekonfigurationen wurden bestimmt und die Produkte verkostet.

3.6.1. Bestimmung der Milchsäurekonfiguration

Die Milchsäure wurde enzymatisch bestimmt.

Tabelle 7 : Konfiguration der Milchsäure - Isomere

| LTH-Nummer | L (+) % : D(-) % |
|------------|------------------|
| 3878 | 47,6 : 52,4 |
| 4449 | 46,0 : 54,0 |
| 4454 | 49,5 : 50,5 |
| 4456 | 56,4 : 43,6 |
| 4457 | 50,5 : 49,5 |

3.6.2. Verkostung der Produkte

Die hergestellten Sauermilchprodukte wurden verkostet und nach Geruch, Geschmack und Textur beurteilt.

3. Ergebnisse

Tabelle 8: Beurteilung der Sauermilchprodukte nach Geruch, Geschmack und Aussehen.

| LTH -Nummer | Beurteilung |
|-------------|---|
| 3878 | geschmacklich malzig und brandig, eventuell ist der Stamm schleimbildend, dickflüssige Konsistenz |
| 4449 | mild und süßlich, vermutlich durch Lactozym |
| 4454 | leicht malziges Aroma |
| 4456 | salzig, in der Säure angenehm , milchfremder Ton wahrnehmbar |
| 4457 | fremdes Aroma ist am stärksten, beim Abschlucken bitteren Geschmack |

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Befähigung von Laktobazillen, deren natürliches Habitat Sauerteig ist, zur Adaptation an das Substrat Milch untersucht. Bevor die Anpassung der ausgewählten Stämme an das Fermentationssubstrat Milch diskutiert wird, sollen einige allgemeine Anmerkungen über die Wechselwirkung zwischen Substrat und Fermentationsorganismus gemacht werden. Fermentationssubstrate werden durch die verfügbaren Nährstoffe, Wasseraktivität, das Redoxpotential, den pH - Wert, die Temperatur, Bakteriophagen und durch antagonistisch wirkende Bestandteile charakterisiert (Hammes, 1991). Das Substrat reguliert den Metabolismus des fermentierenden Mikroorganismus bezüglich des Abbaus von Nährstoffen und den daraus gebildeten Produkten (Hammes, 1991). Da die Sauerteiglaktobazillen hohe Ansprüche an die Verfügbarkeit von bestimmten Nährstoffen stellen, wurde die chemische Zusammensetzung der Milch und des Sauerteigs verglichen und die Unterschiede bei der Untersuchungen zur Anpassungsfähigkeit der Sauerteigorganismen berücksichtigt. Als erstes wurde die C - Quelle in Betracht gezogen. Weiterhin wurde untersucht, ob der Bedarf der Organismen an freien Aminosäuren bzw. Peptiden durch die Zugabe von Stickstoffquellen wie Hefeextrakt, Fleischextrakt, Fermentationsbeschleunigern und Anwendung von Trypsin zur Milchproteinverdauung, zu decken war. Letztlich wurde der Bedarf an weiteren Supplinen wie Mineralien, Vitaminen und Fettsäuren untersucht.

4.1. Adaptation an C - Quellen

Sauerteig ist reich an Stärke und Polyfructosanen. Der Stärkegehalt von Weizen und Roggen liegt bei etwa 70% (Rohrlich et al., 1966). In einer Mehl / Wasser - Suspension wird ein Teil der Stärke durch mehleigene α - und β - Amylasen gespalten. Bezogen auf die Mehltrockensubstanz entstehen dabei fast 5,5% Maltose, die Zuckermenge im Mehl steigt dadurch von 1,82% auf 7,19% an (Saunders et al., 1972). Fructose ist ein weiterer Rohstoffbestandteil des Mehls. Es wird während der Sauerteigfermentation aus Polyfructosanen freigesetzt und kann von den Sauerteiglaktobazillen als C - Quelle oder Elektronenakzeptor genutzt werden, indem Mannit gebildet wird (Hammes et al., 1996).

4. Diskussion

Durch die Anpassung der Sauerteigeorganismen an getreidehaltige Substrate sind diese insbesondere an die Verwertung von Maltose in Kombination mit Fructose angepaßt. Diese Kohlenhydrate stehen den Organismen jedoch in der Milch, in der fast ausschließlich Lactose (4,7 %) vorkommt, nicht zur Verfügung. Im Weizen kommt neben Maltose und Fructose das Trisaccharid Raffinose mit einem Gehalt von 0,05 - 0,17 % vor (Belitz und Grosch, 1992).

In einer Studie über die Verwertung verschiedener Zucker konnte gezeigt werden, daß ca. $\frac{1}{4}$ der untersuchten 86 Stämme von *Lactobacillus sanfranciscensis* Raffinose verwerten kann (Aicher, 1997). Falls ein Stamm Raffinose verwerten kann, ist er eventuell nach einer Adaptationsphase in der Lage, auch Lactose zu verwerten, da ihre Grundkomponenten Glucose und Galactose ebenfalls in der Raffinose vorkommen. Die Untersuchungsergebnisse zeigen jedoch, daß diejenigen Stämme, die nach API - Testsystem Raffinose verwerten können, nicht in der Lage sind, mit Lactose als einziger C - Quelle zu wachsen. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß diesen Organismen ein Transportsystem für Lactose in die Zelle fehlt, vorausgesetzt, daß die Raffinose extrazellulär gespalten wird. Weiterhin ist denkbar, daß sie keine β - Galactosidaseaktivität haben.

Bemerkenswerterweise wurden bei der Anwendung eines API - Testsystems Lactose - verwertende Stämme von *L. pontis* gefunden (Böcker, 1993). Das Einbeziehen dieser Stämme in die Untersuchungen zeigte jedoch, daß auch diese Stämme nicht über das Vermögen verfügten mit Lactose als einziger C - Quelle zu wachsen. Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß die angewandte Untersuchungsmethode einen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis zur Zuckerverwertung hat. Beim API - Test wird die vorgezüchtete, abzentrifugierte und gewaschene Zellsuspension in die Probenkammern ziemlich dicht angeimpft und 48 h bebrütet. Bei der Verwertung des entsprechenden Zuckers schlägt der im API 50 CHL - Medium enthaltene Indikator Bromkresolpurpur durch die gebildete Säure von violett über gelbgrün nach gelb um. Die Maßeinheit für die Verwertung des Zuckers ist somit der Umschlag des Indikators. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit das Wachstum als Maß für die Verwertung eines Zuckers herangezogen. Das Wachstum wurde photometrisch bestimmt, unabhängig von der gebildeten Säure. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich nur dadurch erklären, daß es durch die sehr dichte Animpfung in dem API - Testsystem und den ungenügenden Waschgang der Zellen zur Puffergärung kommt und die geringe Säurebildung schon ausreicht, um einen Farbumschlag zu erhalten. Somit wird die Verwertung des Zuckers nur vorgetäuscht. Es kann davon ausgegangen werden, daß die

4. Diskussion

Verwertung eines Zuckers nur über Verfolgung des Wachstums, also der Zunahme der Biomasse, bestimmt werden kann. Dieses Verfahren wurde auch hier angewandt.

Nachdem keiner der untersuchten Stämme zur Lactoseverwertung befähigt war, blieb nur die Möglichkeit, den Milchzucker durch ein extern zugesetztes Enzym (Lactase) in Glucose und Galactose zu spalten und die Organismen an die Verwertung dieser Zucker zu adaptieren. Die Untersuchungsergebnisse zeigen jedoch, daß nur wenige Mikroorganismen an die Verwertung von Glucose adaptiert werden konnten. Eine Adaptation an die Verwertung von Galactose fand trotz mehrmaligen Überimpfens bei keinem Organismus statt. Auch bei diesem Experiment zeigte sich, daß das API - Testsystem unzuverlässig ist, da die Mehrheit der ausgewählten Stämme zuvor mit Hilfe des API - Testsystems als glucose- bzw. galactosepositiv eingestuft wurden. Es wurde bei der Adaptation an die Verwertung von Glucose beobachtet, daß mehrere Überimpfungsschritte für das Erreichen eines ausreichenden Wachstum durchgeführt werden mußten. Nach der Vorzucht in maltose- und glucosehaltigem Medium erfolgte das Überimpfen in glucosehaltiges Medium. Durch mehrmaliges Überimpfen in glucosehaltiges Medium konnten einige Organismen nach langer Zeit (je nach Stamm 8 bis 30 Tage) an die Verwertung von Glucose adaptiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von Stolz et al. (1993), die eine lange Adaptationsphase an die Glucoseverwertung bei Sauerteiglaktobazillen beobachtet haben. Nach ihren Untersuchungen konnten in Maltose vorgezüchtete Organismen nach 150 h Adaptationszeit Glucose verwerten.

4.2. Bedarf an Aminosäuren und Peptiden

Der Proteingehalt, sowie die Anteile einzelner Proteinfractionen schwanken in den unterschiedlichen Getreidearten. Weizen enthält 10 – 16 % und Roggen 8 – 13 % Rohprotein (Klingler, 1995). Nach der Löslichkeit lassen sich die Weizenproteine in 4 Fraktionen, sogenannte *Osborne* - Fraktionen, einteilen. Dies sind Gluteline (45,7 %), Prolamine (32,6 %), Albumine (14,7 %) und Globuline (7 %). Die Osborne - Fraktionen haben eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung. Albumine und Globuline enthalten im Vergleich zu den unlöslichen Prolaminen und Glutelinen mehr Lysin, Arginin, Leucin, sowie Cystin. Die kleberbildenden Proteine zeichnen sich durch einen besonders hohen Gehalt an

4. Diskussion

Glutamin und Prolin aus (Klingler, 1995). Auch die Milch hat ihre spezifische Proteinzusammensetzung. Die Milchproteine bestehen aus Caseinen (Bestandteil von über 80 % der Milchproteine), die in die Fraktionen α_s -, β - und κ - Casein eingeteilt werden und Molkenproteine (20 %), wie α - Lactalbumin, β - Lactoglobulin, Serumalbumin und Immunglobuline. Die Milchproteine zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an essentiellen, d.h. für den Körperaufbau unentbehrlichen Aminosäuren aus (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Cystein, Methionin, Tryptophan, Lysin, Threonin) (Schlimme, 1990).

Die Milchsäurebakterien stellen an das Kultursubstrat besondere Ansprüche hinsichtlich des Vorhandenseins einer Reihe von Aminosäuren. Der Bedarf der Milchsäurebakterien an Aminosäuren ist von Art zu Art unterschiedlich. Während einige in der Lage sind, ihre Ansprüche durch Proteolyse zu befriedigen, sind andere auf die Anwendbarkeit der Aminosäuren bzw. Peptide angewiesen (Spicher et al., 1979). Das proteolytische System der Sauerteigbakterien spielt ebenfalls eine große Rolle. Durch diese Aktivität ist es den Organismen möglich, Aminosäuren und kleine Peptide aus den Proteinen freizusetzen und dadurch während der Fermentation das Wachstum und die Säurebildung zu erhöhen und die Aromaentwicklung von Brot zu verbessern (Gobbetti et al., 1996). In einer Studie haben Gobbetti et al. (1997) das Peptidhydrolase - und Proteinasesystem bei *L. sanfranciscensis* charakterisiert und festgestellt, daß im Vergleich zu anderen Sauerteigorganismen ein Stamm von *L. sanfranciscensis* höchste Amino-, Di-, Tri- und Imino-peptidaseaktivität zeigte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Proteinase von *L. sanfranciscensis* CB1 auf Gliadin sehr gut wirkt (Gobbetti et al., 1996). Es wurde auch eine gewisse Aktivität der Proteinase bei Casein beobachtet. Dadurch besteht prinzipiell die Möglichkeit, daß das proteolytische System von *L. sanfranciscensis* zur Versorgung von Aminosäuren und Peptiden in der Milch beitragen kann. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da die Milch nur sehr geringe Mengen an freien Aminosäuren für das Wachstum der Organismen zur Verfügung stellt. Sauerteigbakterien, die in der Milch gutes Wachstum zeigen, müssen somit in der Lage sein, Aminosäuren und Peptide aus Milchproteinen mit Hilfe ihrer eigenen proteolytischen Enzyme freizusetzen und somit ihre Versorgung selbst zu decken.

Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich, daß die Laktobazillen aus dem Sauerteig, für das Wachstum in Milch, auf die Supplementierung mit Hefeextrakt (siehe 3.4.1.) angewiesen waren. Dies zeigt, daß die Sauerteiglaktobazillen Bestandteile des Hefeextraktes

4. Diskussion

für ihr Wachstum benötigen. Auch Sugihara und Kline (1975) haben festgestellt, daß Frischhefeextrakt im mikrobiologischen Medium für das Wachstum von *L. sanfranciscensis* notwendig ist. Die Bedeutung des Frischhefeextraktes für das Wachstum der Laktobazillen wurde von Berg und Sandine (1981) näher charakterisiert. Die von diesen Autoren durchgeführte Aminosäureanalyse eines Frischhefeextraktes zeigte, daß im wesentlichen acht Aminosäuren anwesend sind. Weiterhin konnte ein aktives Peptid isoliert werden, das hauptsächlich aus Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glycin und Lysin bestand und als maßgeblich wachstumsfördernder Faktor von den Autoren diskutiert wurde.

Um den Einfluß von Hefeextrakt auf das Wachstum von Laktobazillen zu verdeutlichen, wurden Studien mit anderen Organismen (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* und *Lactobacillus casei*) durchgeführt und es wurde festgestellt, daß im Vergleich zu Pepton-, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und Sojamehlzusatz zur Molke das Wachstum bei Supplementierung mit Hefeextrakt am besten war (Arasatnam et al., 1996).

Die Untersuchungsergebnisse zeigten, daß Hefeextrakt einen wachstumsfördernden Effekt auf die Organismen des Sauerteiges hat. Dieses könnte an, im Hefeextrakt vorhandenen, Aminosäuren / Peptiden, Vitaminen oder Mineralien liegen. Zur Versorgung mit Aminosäuren und Peptiden wurden andere Möglichkeiten wie Fleischextrakt, Anwendung von Trypsin zur Milchproteinverdauung und Fermentationsbeschleuniger in Betracht gezogen. Dadurch konnte untersucht werden, ob der Bedarf an Aminosäuren bzw. Peptiden durch diese Substrate zu decken war.

Fleischextrakt hat eine andere Zusammensetzung an freien Aminosäuren und Peptiden. Hier stellt sich die Frage, ob der Zusatz von Fleischextrakt im Vergleich zu Hefeextrakt eine bessere Wirkung hat. Um dieses herauszufinden, wurde der Stamm LTH 4454 (Abb. 11) mit Zusatz von Hefeextrakt und von Fleischextrakt untersucht. Das Ergebnis zeigte, daß das Wachstum mit Hefeextraktzusatz besser als mit Fleischextraktzusatz war.

Eine weitere Möglichkeit Aminosäuren und Peptide in der Milch für das Wachstum von Sauerteigorganismen zur Verfügung zu stellen, ist der Zusatz von Enzymen wie z.B. Trypsin. Die durch Trypsin freigesetzten Peptide sind i.d.R. nicht aus Molkenproteinen, sondern Caseinmizellen hergeleitet (Diaz et al., 1996). Caseinmizellen bestehen aus Submizellen, sie haben eine bestimmte Form durch die Bindung von Calciumphosphat an die Phosphorylgruppe. Wenn die Caseinmizelle mit Trypsin verdaut wird, entstehen α_{s1} -

4. Diskussion

Casein -Phosphopeptid und β - Casein - Phosphopeptid (Sequenz: Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu) als wichtigste Komponenten des Casein - Phosphopeptids (Adamson et al., 1995, Ono et al., 1998). Bei Trypsin der Firma Novo wurden bei Hydrolyse folgende Peptide gefunden: β - Casein (CN)f(1-25), α_{s1} - CNf(59-79), α_{s2} - CNf(1-21), α_{s2} - CNf(46-70) (Adamson et al., 1995, 1997). Diese freigesetzte Peptide und Aminosäuren können wachstumsfördernde Effekte besitzen. So wurde für Bifidobakterien in einer Untersuchung gezeigt, daß durch die Trypsinbehandlung aus κ - Casein hydrolysierte Peptide das Wachstum von Bifidobakterien fördern (Ibrahim, 1994).

In dieser Arbeit wurde bei sieben verschiedenen Sauerteigorganismen der Effekt eines Zusatzes von Trypsin auf das Wachstum in Milch untersucht. Bei den Stämmen LTH 4471, 4456, 4457, 4454 und 3574 wurde kein Wachstum festgestellt, obwohl durch Trypsinzusatz aus Milchproteinen Aminosäuren bzw. Peptide freigesetzt wurden. Nur bei zwei Stämmen konnte ein deutlicher wachstumsfördernder Effekt beobachtet werden. Besonders stark fand die Wachstumsstimulierung bei dem Stamm LTH 3878 (siehe Abb. 12) statt. Es kann davon ausgegangen werden, daß durch die Trypsinzugabe Peptide bzw. Aminosäuren freigesetzt wurden, die das Wachstum ermöglicht haben. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse, daß der Bedarf an speziellen Peptiden oder Aminosäuren nicht generell für alle Stämme einer Spezies definiert werden kann, sondern daß er von Stamm zu Stamm unterschiedlich ist.

Als nächstes Supplement wurden Fermentationsbeschleuniger (fermentation enhancers, FE) der Firma DMV eingesetzt, die sich schon für Stimulierung des Wachstums milchfremder Organismen in Milch bewährt haben. Bei diesen Fermentationsbeschleunigern, FE 120, 135, 160 und 170 handelt es sich entweder um Produkte aus Molkenproteinen oder Caseinen. Nach dem Firmenprospekt ist es durch den Zusatz dieser FE bei Joghurt und joghurtähnlichen Produkten möglich, die Fermentationszeit um 40 % bzw. die Menge an Starterkultur zu reduzieren, die Nachsäuerung zu kontrollieren, die Lebendkeimzahl von probiotischen Mikroorganismen während der Lagerung zu erhöhen und auf Textur, Geschmack und Aussehen der Produkte positive Einflüsse zu erreichen. Von jedem FE wurden 0,2 % der Milch zugesetzt. Bei den Stämmen LTH 4449, 3878, 4454 und 4456 wurde allerdings kein wachstumsfördernder Effekt beobachtet.

4. Diskussion

Das proteolytische System von Sauerteiglaktobazillen entfaltet je nach Stamm ein großes Spektrum, insbesondere wirkt die proteolytische Aktivität von Stämmen auf einzelne Osborne – Fraktionen und sogar auf die Art der Aminosäuresequenzen sehr unterschiedlich (Kharazmi, 2000). Obwohl durch den Zusatz von Trypsin bei dem Stamm LTH 3878 eine Wachstumsstimulierung beobachtet wurde, konnte dieser Effekt mit der Zugabe des FE (siehe Abb. 16) nicht erreicht werden. Dieses konnte dadurch erklärt werden, daß je nach Zusatz von Trypsin oder Fermentationsbeschleuniger unterschiedliche spezifische Aminosäuren und Peptide in der Milch für Laktobazillen zur Verfügung gestellt wurden. Die genaue Zusammensetzung von FE der Firma ist nicht bekannt, es handelt sich um Spaltprodukte oder hydrolytische Präparate von Milchproteinen. Dies zeigt an, daß durch die Hydrolyse von Milchproteinen nicht notwendigerweise die für das Wachstum der Sauerteigorganismen notwendige Peptide freigesetzt werden.

4.3. Supplementierung mit weiteren Supplinen

Da die Untersuchungen zeigten, daß der Zusatz von Hefeextrakt in Milch auf das Wachstum von Sauerteigorganismen einen positiven Effekt hat, wurde der Bedarf an Vitaminen, besonders der B - Gruppe untersucht. Der Hefeextrakt enthält neben vielen stickstoffhaltigen Substanzen auch eine Reihe von Vitaminen der B - Gruppe. Im Jahr 1936 haben Orla - Jensen festgestellt, daß das Wachstum von Milchsäurebakterien von Riboflavin (Vitamin B₂) und Pantothensäure (gehört zur Gruppe der B₂ - Vitamine) abhängig ist. B - Vitamine sind Bestandteile von Enzymen oder Co - Faktoren und haben somit eine große Bedeutung für Mikroorganismen.

Im Getreide kommen hauptsächlich die wasserlöslichen Vitamine der B – Gruppe vor. Der Vitamingehalt erhöht sich mit dem Ausmahlungsgrad des Mehls (Klingler, 1995). Im Gegensatz zu Getreide enthält die Milch alle Vitamine in unterschiedlichen Konzentrationen. Während die fettlöslichen Vitamine (A, D, E) relativ hitzestabil sind, sind die wasserlösliche Vitamine (B₁, B₆, B₁₂ und Folsäure) weniger hitzestabil.

Bei einer Studie über den Effekt von Vitaminen auf das Wachstum von Mikroorganismen haben Rogosa et al. (1961) festgestellt, daß die Stämme von *L. casei* Folsäure und Vitamin B₆ für das Wachstum brauchen, während *L. plantarum* in Abwesenheit von diesen Vitaminen besser wuchs. Auch das Bedürfnis von Pantothensäure, Niacin und Riboflavin wurde für

4. Diskussion

Laktobazillen von Nakazava et al. (1992) beschrieben. Deshalb wurde das Wachstum von Sauerteigmikroorganismen bei Einsatz einer Vitaminmischung zu Milch untersucht. Das Wachstum wurde bei den Stämmen LTH 4454, 4456, 4457, 4453, 4463, 3878, 3573 und 4419 über den pH - Verlauf verfolgt. Die Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß der Vitaminzusatz auf das Wachstum keine Wirkung hat. Auch bei der Untersuchung mit Trypsin- und Vitaminzusatz zu der Milch wurde festgestellt, daß die Zugabe von Vitaminlösung auf die Erhöhung der Lebendkeimzahl keinen Effekt hat (siehe Abb. 12 und 13). Spicher et al. (1979) haben beschrieben, daß das Vitamin B₂ (Riboflavin) die Säurebildung im Teig stimuliert und das Vitamin B₁ (Thiamin) keinen Einfluß auf die Sauerteiggärung hat. Das Vitamin B₆ (Pyridoxin) und seine Derivate zeigen bei *Lactobacillus plantarum* praktisch keine Wirkung. Die Nicotinsäure beeinflusst das Wachstum der Sauerteigbakterien und ruft eine Stimulierung der Säurebildung hervor.

Hefeextrakt enthält neben Vitaminen, Aminosäuren und Peptiden auch Mineralstoffe. Die Milchsäurebakterien benötigen neben den Kationen K⁺, Na⁺, Ca⁺, Mn²⁺ eine Reihe von Spurenelementen und einige Anionen (Phosphat, Sulfat). Im Mehl hängt der Gehalt an Mineralien von dem Ausmahlungsgrad ab. Mit zunehmendem Ausmahlungsgrad steigt der Gehalt des Mehles an Calcium, Eisen und Phosphor (Belitz und Grosch, 1992).

Die Salzbestandteile kommen in Milch in gelöster Form und kolloid dispergiert vor. Überwiegend gelöst sind einige anorganische Ionen, wie z.B. die des Natriums, des Kaliums und des Chlors. Calcium liegt in der Milch zu einem Teil gelöst in ionischer Form und komplexiert, zum anderen Teil kolloid dispergiert in Form des Casein - Calcium - Phosphat - Citrat - Komplexes in den Caseinmizellen vor. Auch Magnesium ist an die Caseinmizellen gebunden und damit kolloid dispergiert (Schlimme, 1990).

Als erstes wurde untersucht, ob Mn²⁺ ein wachstumsfördernder Bestandteil des Hefeextrakts sein kann. Der Mangangehalt der Milch liegt im Spuren mengenbereich (30 µg / l). vor. Mn²⁺ könnte für enzymatische Reaktionen und für das Abfangen toxischer Sauerstoffradikale benötigt werden (Bellengier et al., 1997, Foucaud et al., 1997). Es wurde bei den untersuchten *L. pontis* Stämmen LTH 4454, 4456, 4463 und *L. sanfranciscensis* Stamm LTH 4453 der Effekt von Manganzusatz über den pH - Verlauf verfolgt. Dabei wurde festgestellt, daß der Manganzusatz das Wachstum nicht beeinflusst. Ebenfalls konnte bei der Untersuchung auf Eisenbedarf keine Wirkung beobachtet werden.

4. Diskussion

Wie oben beschrieben, wurden die im Hefeextrakt vorhandenen Wachstumsfaktoren wie Vitamine und Mineralien einzeln untersucht. Für die Untersuchungen eines kombinierten Effekts von Mineralien und Vitaminen wurde der Milch Tomatensaft zugesetzt. Tomatensaft ist reich an Zuckern (6,1%), Mineralien (Mangan, Magnesium) und Vitaminen der B - Gruppe. Insbesondere das Mangan im Tomatensaft wurde als Stimulant für das Wachstum von Milchsäurebakterien identifiziert (Badran et al., 1993). Über den Effekt von Tomatensaft wurden viele Studien durchgeführt und es wurde festgestellt, daß der Tomatensaftzusatz in Milch die Keimzahl und Säurebildung der untersuchten Organismen stimuliert (Badran et al., 1994, 1995, Babu et al., 1995). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit bei den untersuchten *L. pontis* Stämmen LTH 4449, 4454, 4456, 4457, 4460 und 3574 beobachtet, daß ihr Wachstum durch den Einsatz vom Tomatensaft nicht stimuliert werden konnte.

Als ein weiteres Supplement wurden Fettsäureester zugegeben, da das mMRS4 – Medium 1 ml Tween 80 (Fettsäureester) / l enthält. Sugihara und Kline (1975) haben beschrieben, daß *Lactobacillus sanfranciscensis* einen Bedarf an Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monoolata) hat. Nach Stolz (1993) sollte das Medium für die Isolierung von Sauerteiglaktobazillen neben Hefeextrakt auch Tween 80 enthalten. Dieser Bedarf wurde für fast alle Laktobazillen aus Sauerteigen, mit Ausnahme von *L. reuteri*, beschrieben. Tween 80 ist eine Mischung, die aus 70 % Ölsäure und 30 % Linol-, Palmitin- und Stearinsäure besteht und in der Natur nicht zu finden ist. Die Ölsäure ist essentiell für das Wachstum der Sauerteigorganismen, obwohl das Roggen- und Weizenmehl keine freie Ölsäure enthalten. Die Milchsäurebakterien konnten aus Lipiden die Ölsäure freisetzen und verwenden (Okada et al., 1992). Zur Untersuchung wurde der Milch Tween 80 zugesetzt, es konnte jedoch bei den untersuchten Stämmen LTH 4460, 4453, 4463, 3878 und 3573 kein wachstumsfördernder Effekt gefunden werden.

4.4. Anwendung in der Praxis

Für diese Arbeit wurden diejenigen Stämme der Sauerteiglaktobazillen, die bevorzugt L(+) - Milchsäure bilden, für die Untersuchungen herangezogen. *Lactobacillus sanfranciscensis* und *L. pontis* wurden als DL - Milchsäurebildner beschrieben (Weiss und Schlinger, 1984; Okada et al., 1992, Vogel, 1994). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß unter der

4. Diskussion

Vielzahl der untersuchten *L. sanfranciscensis*- Stämme auch solche gefunden wurden, die einen hohen Anteil an L(+) - Milchsäure bzw. fast ausschließlich L(+) - Milchsäure bilden (Aicher, 1997, Reich, 1998). Die L(+) - Milchsäure ist die physiologische Form, weil sie vom menschlichen Körper als Substrat im Energiestoffwechsel und zur Gluconeogenese genutzt werden kann. Die D(-) - Milchsäure kann vom Menschen sehr viel langsamer und nur in geringer Menge umgesetzt werden (Gieseke et al., 1981), sie kann bei Zufuhr größerer Mengen zur Anreicherung im Blut und Hyperazidität des Urins führen (Belitz und Grosch, 1992). Aus diesem Grund ist es wünschenswert, die fermentierten Lebensmittel mit einem höheren Gehalt an L(+) - Milchsäure herzustellen. Die Verwertbarkeit von D(-) - Milchsäure ist begrenzt. Einer FAO / WHO - Empfehlung zufolge sollten deshalb nicht mehr als 100 mg D(-) - Milchsäure je kg Körpergewicht und Tag aufgenommen werden. Kleinkindernahrung sollte keine D(-) - Milchsäure enthalten. Da Joghurt und Joghurtzubereitungen durch den Einsatz von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 25 – 53 % D(-) – Milchsäure enthalten, wurden Modifikationen des Joghurts entwickelt, in denen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* teilweise oder ganz durch *Lactobacillus acidophilus* ersetzt ist. Nach der Adaptationsphase wurde selektioniert und die Stämme, die Milch schnell säuern, auf Milchsäurekonfiguration untersucht. Alle wurden als DL - Milchsäurebildner charakterisiert.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse wurden die Stämme von *L. pontis* LTH 3878, 4449, 4454, 4456 und 4457 ausgewählt und auf ihre praktische Anwendbarkeit weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurden Sauermilchprodukte folgendermaßen hergestellt:

1. Die vorhandene Lactose wurde durch Zugabe von "Food Grade Enzyme" Lactase gespalten. Die zugegebene Menge wurde so eingestellt, daß keine vollständige Hydrolyse von Lactose stattfand, damit einer Übersüßung des Produktes vorgebeugt wurde.
2. Auf die Zugabe von Hefeextrakt wurde aus geschmacklichen Gründen verzichtet, obwohl ein wachstumsfördernder Effekt bei diesen Stämmen beobachtet wurde.
3. Die Stämme wurden mit einer Dichte von ca. 10^8 KbE / ml in die Milch angeimpft.

Die Verkostung der Produkte durch einige Degustatoren ergab eine Reihe von sehr interessanten Eindrücken. Die Produkte zeigten einen sehr malzigen, bitteren und / oder salzigen Geschmack. Damiani et al. (1996) haben während der Sauerteigfermentation von

4. Diskussion

heterofermentativen Milchsäurebakterien entstandene Geschmackskomponenten (wie Ethylacetat, verschiedene Alkohole und Aldehyde) untersucht. Die unerwünschten Geschmackskomponenten wurden vermutlich entweder bei der Vorzucht produziert und sind durch das Animpfen in die Milch gelangt, oder es handelt sich um die aus Hefeextrakt isolierten malzigen Geschmackskomponenten (3- Methylbutanal, 2- Methylbutanal und 3- Methylbutanol), die Münch et al. (1998) beschrieben haben. Für den salzigen Geschmack läßt sich vermuten, daß eventuell gebundene Ionen während der Fermentation in Milch gelöst werden.

Die Verwendung solcher Stämme als geschmack- bzw. aromagebende Starterkultur ist für die Milchwirtschaft aufgrund der sensorischen Bewertung der Produkte durchaus denkbar. Um diese mögliche Anwendung weiter zu untersuchen, wurde der *L. pontis* Stamm LTH 3878 mit einem Stamm von *Lactococcus lactis* (LTH 4670) kokultiviert, da die Laktokokken genügend eigene proteolytische Aktivität zur Hydrolyse von Milchproteinen besitzen, um essentielle Aminosäuren zu liefern und spezifische Aromastoffe zu bilden. Bei dieser Untersuchung wurde nicht nur die Kombinierbarkeit von diesem Stamm mit klassischen Starterorganismen der Milch untersucht, sondern auch die Möglichkeit, ob kofermentierende Organismen die notwendigen Aminosäuren und Peptide für *L. pontis* oder *L. sanfranciscensis* zur Verfügung stellen können. Eine solche Möglichkeit wurde von Gobbetti (1997) mit Hefen beschrieben.

In der Untersuchung wurde festgestellt, daß *Lactococcus lactis* (LTH 4670) keinen stimulierenden Effekt auf *L. pontis* (LTH 3878) hat. Dies könnte damit zusammenhängen, daß das Wachstum von *Lactococcus lactis* nicht optimal war. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um optimale Bedingungen für solche Kofermentationen bzw. für gemeinsame Ansätze der Starterorganismen in der Praxis zu finden.

5. Zusammenfassung

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit Sauerteigorganismen an das Wachstum in Milch adaptiert werden können. Bei der Untersuchung wurden 32 Stämme der Spezies *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*, nach den Kriterien Raffinose-, Lactose-, Glucose- und Galactoseverwertung sowie L(+) – Milchsäurebildung, ausgewählt. Keiner dieser Stämme konnte an die Verwertung von Lactose oder Galactose adaptiert werden, obwohl einige nach dem API - Zuckerspektrum als lactose - oder galactosepositiv beurteilt wurden. Wenige konnten an die Glucoseverwertung adaptiert werden. Für weitere Untersuchungen wurde der Milchzucker durch Zusatz von Lactozym (Lactase) gespalten. Dabei zeigte sich, daß das API - Testsystem für die Bestimmung der Befähigung zur Verwertung eines Zuckers bei Sauerteiglaktobazillen nicht geeignet ist. Dies hängt damit zusammen, daß die Maßeinheit für die Verwertung eines Zuckers beim API - Testsystem der Farbumschlag des Indikators ist und nicht, wie in dieser Arbeit, die Zunahme der Biomasse, also Wachstum war. Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Zusatz von Hefeextrakt das Wachstum stimulierte. Die Supplementierung der Milch mit anderen Stickstoffquellen (z.B. Fleischextrakt, Fermentationsbeschleuniger) hat das Wachstum nicht beeinflußt. Weiterhin zeigten die Untersuchungen mit Vitaminen, Fettsäuren, Mineralien und Tomatensaft keine Wirkungen auf das Wachstum der Sauerteigbakterien. Zur praktischen Anwendung wurden, durch Zusatz von Lactozym, Sauermilchprodukte hergestellt und verkostet. Die Ergebnisse der Beurteilungen waren in Geschmack, Geruch und Aussehen sehr unterschiedlich. Es traten malzige, brandige und / oder salzige Geschmackskomponenten auf.

Eine Kokultivierung wurde mit dem Stamm LTH 3878 und *Lactococcus lactis* LTH 4670 durchgeführt. Der Stamm LTH 4670 steigerte das Wachstum von LTH 3878 nicht.

6. Literaturverzeichnis

- Adamson, N. J., Reynolds, E. C. (1997): Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release. *Journal of Dairy Research*, **64**: 505-514
- Adamson, N. J., Reynolds, E. C. (1995): Characterization of Multiply Phosphorylated Peptides Selectively Precipitated from a Pancreatic Casein Digest. *J. Dairy Sci.*, **78**: 2653-2659
- Aicher, K. (1997): Physiologische Leistungen von *Lactobacillus sanfrancisco*. Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie, Fachgebiet: Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim
- Arasaratnam, V., Senthuran, A., and Balasubramaniam, K. (1996): Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbiol. Technology*, **19**: 482-486
- Archibald, S. F., Duong, M. (1984): Manganese Acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, **158**: 1-8
- Babu, V., Mital, B. K., and Garg, S. K. (1992): Effect of tomato juice addition on the growth and activity of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, **17**: 67-70
- Badran, I. I., Reichart, O. (1993): Comparative study of some fermentation properties of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* in milk and modified milk media. *Acta Alimentaria*, **22** (4): 359-373
- Badran, I. I., Reichart, O. (1994): Comparative study on some fermentation properties of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* in milk and modified milk media. *Acta Alimentaria*, **23** (2): 133-146
- Badran, I. I., Reichart, O. (1995): Studies on the growth and acid production of pure and mixed cultures of *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Acta Alimentaria*, **24** (3): 277-287

6. Literaturverzeichnis

- Baltes, W. (1995): Lebensmittelchemie. 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- Batt, C.A. (1986): Genetic engineering of *Lactobacillus*. Food Technology, **40** : 95-98
- Belitz, H.D., Grosch, W. (1992): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- Bellengier, P., Richard, J., Foucaud, C. (1997): Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subs. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk. Journal of Dairy Research, **64**: 95-103
- Berg, R.W., Sandine W. E., and Anderson, A. W. (1981): Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. Applied and Environmental Microbiology, **42** (5): 786-788
- Böcker, G. (1993): Ökologische und physiologische Charakterisierung der Sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis* sp. nov. Dissertation, Institut für Lebensmitteltechnologie, Fachgebiet: Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim
- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W. P. (1995): Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauereteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. Getreide Mehl und Brot, **49**: 370-374
- Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M. S., Rossi, J. (1996): The Sourdough Microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds Produced. Lebensm.-Wiss. u.-Technol., **29**: 63-70
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960): A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, **23**: 130-135
- Diaz, O., Gouldsworthy, A. M., and Leaver, J. (1996): Identification of peptides released from casein micelles by limited trypsinolysis. J. Agric. Food Chem., **44**: 2517-2522

6. Literaturverzeichnis

- Foucaud, C., Francois, A., Richard, J. (1997): Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology, **63** (1): 301-304
- Gieseke, D., Fabritius, A. and Wallenberg, P. (1981): A Quantitative Study on the Metabolism of D(-) - Lactic Acid in the Rat and the Rabbit. Comp. Biochem. Physiol., **69B**: 85-89
- Gobbetti, M., Corsetti A. (1997): *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. Food Microbiology, **14**: 175-187
- Gobbetti, M., Corsetti, A. (1994): The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts : metabolism of carbohydrates. Appl. Microbiol. Biotechnol., **41**: 456-460
- Gobbetti, M., Corsetti, A. (1996): Co-metabolism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 citrate-negative strain: effect on growth, end-products and sourdough fermentation. Z. Lebensm. Unters. Forsch., **203**: 82-87
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1995): Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose-negative strain. Applied of Microbiology and Biotechnology, **42**: 939-944
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. (1996): *Lactobacillus sanfrancisco*, a key sourdough lactic acid bacterium : physiology, genetic and biotechnology. Adv. Food Sci., **18** (5/6): 167-175
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Corsetti, A. (1996): The Proteolytic System of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: Purification and Characterization of a Proteinase, a Dipeptidase, and an Aminopeptidase. Applied and Environmental Microbiology, **62**: 3220-3226
- Haandrikman, A.J., Kok, J., Laan, H., Soemitro, S., Ledebøer, A., Konings, W. N., and Venema, G. (1989): Identification of Gene Required for Maturation of an Extracellular Lactococcal Serine Proteinase. Journal of Bacteriology, **171**: 2789-2794

6. Literaturverzeichnis

- Hammes, W. P. (1991): Fermentation of Non-Dairy Foods. In: Food Biotechnology, **5**(3): 293-303
- Hammes, W. P., Gänzle, M. (1997): Sourdough breads and related products. Microbiology of Fermented Foods, **8**: 199-216
- Hammes, W. P., Stolz, P. and Gänzle, M. (1996): Metabolism of Lactobacilli in traditional sourdoughs. Adv. Food Sci., **18** (5 /6): 176-184
- Ibrahim, S. A. (1994): Bovine Milk Kappa-Casein Trypsin Digest is a Growth Promoting Factor for *Bifidobacterium longum*. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **16**: 69-72
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986): Regular, non-sporing gram-positive rods, In: Sneath, P.H. A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2 William and Wilkins, Baltimore
- Kharazmi, M., (2000): Untersuchung proteolytischer Aktivitäten von Milchsäurebakterien aus Sauerteig. Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie, Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim
- Kline, L. und Sugihara, T.F. (1971): Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process, II. Isolation and Characterization of Undescribed Bacterial Species Responsible for the Souring Activity. Applied Microbiology, **21**: 459-465
- Klingler, R.W. (1995): Grundlagen der Getreidetechnologie. B. Behr's Verlag, Hamburg
- Lönner, C., Wilander, T., Molin, N., and Dostalek, M. (1985): The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. Food microbiology, **3**: 3-12
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T., and Jura, T. (1981): Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways. Journal of Bacteriology, **148**: 64-71
- Morishita, T., Fukada, T., Shirota, M. and Jura, T. (1974): Genetic Basis of Nutritional Requirements in *Lactobacillus casei*. Journal of Bacteriology, **120**: 1078-1084

6. Literaturverzeichnis

- Münch, P., Schieberle, P. (1998): Quantitative Studies on the Formation of Key Odorants in Thermally Treated Yeast Extracts Using Stable Isotope Dilution Assays. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 4695-4701
- Nakazawa, Y., Hosono, A. (1992): *Functions of Fermented Milk*. Cambridge, University Press
- Neubauer, H., Glaasker, E., Hammes, W. P., Poolman, B., Konings, W. N. (1994): Mechanism of Maltose Uptake and Glucose Excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *Journal of Bacteriology*, **176** (10): 3007-3012
- Nout, M. J. R. and Creemers-Molenar, T. (1987) : Microbial Properties of Some Wheatmeal Sourdough Starters. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **10**: 162-167
- Okada, S., Ishikawa, M., Yoshida, I., Uchimura, T., Ohara, N., and Kozaki, M. (1992): Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from sour dough sponges. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (4): 572-575
- Ono, T., Takagi, Y., Kunishi, I. (1998): Casein phosphopeptides from casein micelles by successive digestion with pepsin and trypsin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62** (1): 16-21
- Pfeifer, A., Stingle, F., Donnet, A., Neeser, J.-R., Link-Amster, H., Rochat, F., Schiffrin, E., Brassart, D. (1996): Probiotische Milchsäurebakterien für eine neue Generation von Lebensmitteln. *Medizin und Ernährung*, **5**: 89-92
- Reich, G. (1998): Besondere Eigenschaften von Stämmen der Art *Lactobacillus sanfranciscensis*. Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie, Fachgebiet: Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim
- Rogosa, M., Franklin, J. G., Perry, K. D. (1961): Correlation of the Vitamin Requirements with Cultural and Biochemical Characters of *Lactobacillus spp.* *J. Gen. Microbiol.*, **25**: 473-482

6. Literaturverzeichnis

- Rohrlich, M. und Brückner, G. (1966): Das Getreide, 1. Teil: Das Getreide und seine Verarbeitung, Verlag Paul Parey, Berlin
- Saunders, R. M., NG, H. and Kline L. (1972): The Sugars of Flour and their Involvement in the San Francisco Sour Dough French Bread Process. *Cereal Chemistry*, **49**: 86-91
- Schlimme, E. (1990): Kompendium zur Milchwirtschaftlichen Chemie, Volkswirtschaftlicher Verlag, München
- Spicher, G., und Schröder, R. (1979): Die Mikroflora des Sauerteiges, Das Vitaminbedürfnis der in Reinzuchtsauern und in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**: 188-192
- Spicher, G. (1987): Die Mikroflora des Sauerteiges, Die in Weizensauerteigen vorkommenden Lactobacillen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **184**: 300-303
- Spicher, G., Nierle, W. (1988): Proteolytic activity of sourdough bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**: 487-492
- Spicher, G., Schröder, R. (1978): Die Mikroflora des Sauerteiges, Untersuchungen über die Art der in Reinzuchtsauern anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **167**: 342-354
- Spicher, G., Stephan, H. (1999): Handbuch Sauerteig. Biologie, Biochemie, Biotechnologie, 5. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg
- Spicher, G., und Schröder, R. (1979): Die Mikroflora des Sauerteiges, Das Aminosäurebedürfnis der in Reinzuchtsauern und in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**: 397-401
- Sriranganathan, N., Seidler, R. J., Snadine, W.E. and Elliker P.R. (1973): Cytological and Desoxyribonucleic Acid Hybridization Studies on Lactobacillus Isolates from San Francisco Sourdough. *Applied Microbiology*, **25**: 461-470
- Stolz, P., Böcker, G., Vogel, F. R., Hammes, W.P. (1993): Utilisation of maltose und glucose by lactobacilli isolated from sourdough. *FEMS Microbiology Letters*, **109**: 237-242

6. Literaturverzeichnis

- Stolz, P., Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1996): Maltose-phosphorylase and hexokinase activity in lactobacilli from traditionally prepared sourdoughs. *Advances in Science*, **18** (12): 1-6
- Stolz, P., Vogel, R., Hammes, W. P. (1995): Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **201**: 402-410
- Sugihara, F. T., Kline, L. (1975): Further studies on a growth medium for *Lactobacillus sanfrancisco*. *J. Milk Food Technol.*, **38** (11): 667-672
- Vogel, R. F., Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. H., Hammes, W. P. (1994): Identification of Lactobacilli from Sourdough and Description *Lactobacillus pontis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44** (2): 223-229
- Vrese, de M. (1994): Ernährungsphysiologisch und gesundheitliche Bedeutung von lebenden Keimen in fermentierten Milchprodukten. *Deutsche Milchwirtschaft*, **45**: 14-25
- Weiss, N., Schillinger, N. (1984): *Lactobacillus sanfrancisco* sp. nov., nom. rev. *System. Appl. Microbiol.*, **5**: 230-232.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. W.P. Hammes für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse an meiner Arbeit sowie seine ständige Bereitschaft zu hilfreichen Gesprächen.

Herrn Dr. C. Hertel für seine gute Betreuung, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn M. Brandt für seine wertvollen Hilfestellungen und zahlreiche Anregungen.

Frau J. Hinrichs für ihre großzügige Unterstützung in praktischen Dingen und die Bereitstellung der Mikroorganismen aus der Stammsammlung des Instituts.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie für die nette Zusammenarbeit und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen, die meine Arbeit unterstützt haben.

Hiermit versichere ich , daß ich die vorliegende Arbeit selbständig, nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Stuttgart, 15.02.2000 Selda Bulca