

Mikrobiologische und biochemische Analyse der  
Fermentationseigenschaften von *Lactobacillus paralimentarius* AL28 und  
*Lactobacillus plantarum* AL30 in Sauerteigen aus Pseudozerealien

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
Fachbereich Lebensmittelmikrobiologie

vorgelegt von

Antje Vogel

aus Karl-Marx-Stadt

2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. Herbert Schmidt  
2. berichtende Person: Prof. Dr. Lutz Fischer  
3. Prüfer: Prof. Dr. Bernd Hitzmann  
Eingereicht am: 11.04.2011  
Mündliche Prüfung am: 16.12.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 07. 09. 2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	4
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Milchsäurebakterien.....</b>	<b>6</b>
1.1 Profil der Milchsäurebakterien .....	6
1.2 Bedeutung in der Lebensmittelproduktion .....	7
1.3 Die Spezies <i>L. plantarum</i> und <i>L. paralimentarius</i> .....	9
<b>2. Komplexität der Thematik Brot .....</b>	<b>10</b>
2.1 Grundlage: Zerealien, glutenfreie Zerealien und Pseudozerealien .....	10
2.2 Verarbeitung: Bedeutung von Sauerteig .....	12
2.3 Verträglichkeit: Zöliakie und die Folgen .....	15
<b>3. Problemstellung .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Kultivierung der Mikroorganismen.....</b>	<b>18</b>
1.1 Bakterienstämme .....	18
1.2 Nährmedien.....	19
1.3 Anzucht und Zellernte .....	20
1.4 Stammhaltung .....	21
<b>2. Mikrobiologisch-technologische Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Thoma-Kammer.....	21
2.2 Durchführung der Fermentationen.....	21
2.3 Isolation von Mikroorganismen aus den Mehlen und der Teigmatrix.....	22
2.4 Mikroskopie der Mikroorganismen und Dokumentation .....	23
<b>3. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen .....	23
3.2 Präparation von genomischer DNA .....	23
3.2.1 Isolation der genomischen DNA mit kommerziellem Kit .....	24
3.2.2 Isolation der genomischen DNA mit Phenol-Chloroform-Extraktion.....	24
3.3 Isolation und Analyse von Plasmiden aus Milchsäurebakterien .....	25
3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
3.4.1 Anwendungszweck .....	26

---

3.4.2 PCR-Parameter .....	26
3.4.3 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) –PCR .....	29
3.4.4 Agarosegelelektrophorese.....	31
3.4.5. Sequenzierung.....	32
<b>4. Analytische Methoden .....</b>	<b>33</b>
4.1 Messung von pH-Wert und Säuregrad.....	33
4.2 High performance liquid chromatography (HPLC).....	33
4.2.1 Bestimmung von Zuckerspektren .....	33
4.2.2 Bestimmung von organischen Säuren.....	34
4.3 Analytical Profile Index (API)-Testsystem .....	35
4.4 Analyse spezifischer Enzyme .....	35
4.4.1 Untersuchung auf Aktivität der bakteriellen alpha-Amylasen .....	35
4.4.2 Schnellbestimmung freier Aminosäuren im Teig .....	36
<b>5. Herkunft der Geräte und Chemikalien .....</b>	<b>36</b>
<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Charakterisierung der verwendeten Stämme .....</b>	<b>38</b>
1.1 Morphologische Differenzierung.....	38
1.2 Molekulare Differenzierung .....	39
1.3 Phänotyp der Kohlenhydratverwertung .....	43
1.3.1 Api-Testsystem .....	43
1.3.2 Metabolitbildung in Bouillon.....	44
1.3.3 Stärkeabbau.....	44
<b>2. Analyse der verwendeten Substrate.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Charakterisierung der Stämme in der Teigmatrix.....</b>	<b>45</b>
3.1 Wettbewerbsfähigkeit und Verhalten in Amaranth- und Buchweizen .....	45
3.2 Stoffwechsellleistungen während der Fermentationen in Amaranth und Buchweizen .....	51
3.3 Fermentationen mit Variation der Fermentationstemperatur.....	53
3.4 Durchsetzungsvermögen von <i>L. paralimentarius</i> AL28 und <i>L. plantarum</i> AL30 gegenüber der autochthonen Mikroflora.....	56
3.5 Profil als potentielle Starterorganismen während einzelner Propagations-schritte.....	59

---

3.5.1 Vergleich von <i>L. paralimentarius</i> AL28 und <i>L. plantarum</i> AL30 untereinander .....	59
3.5.2 Vergleich von <i>L. paralimentarius</i> AL28 und <i>L. plantarum</i> AL30 mit kommerziell erhältlichen Sauerteigstarterkulturen .....	68
<b>IV. Diskussion.....</b>	<b>77</b>
<b>V. Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>VI. Anhang .....</b>	<b>97</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
Danksagung .....	137

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
AL28	Stamm <i>L. paralimentarius</i> AL28
AL30	Stamm <i>L. plantarum</i> AL30
bp	Basenpaare
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
d	Tag
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolysaccharid
ESS	Einzelstammstarter
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.) = und andere
Exo	Exonuklease I
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>reinst, steril</sub>	steriles Reinstwasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Industriestarterkultur
kb	kilobasen
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LB	Luria Bertani (Komplexmedium)
LTH	Lebensmitteltechnologie Hohenheim
M	mol/l

min	Minute
mMRS5	modifiziertes de Man-Rogosa-Sharpe-5-Medium
MSB	Milchsäurebakterien
MSS	Mehrstammstarter
n.d.	nicht detektiert
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Pulsfeld-Gelelektrophorese)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	kodierender Bereich der DNA für ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natrium-Laurylsulfat)
T	Thymin
TA	Teigausbeute [%]
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris (Hydroxymethyl) aminomethan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität, 1U = 1 µmol Substrat / min)
ÜK	Übernachtskultur
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
W-SSM	Wheat sourdough simulation medium
YGC	Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Medium

### I. EINLEITUNG

Bakterien werden in den Medien oft mit negativen Schlagzeilen in Verbindung gebracht. Das reicht von Lebensmittelrückrufen wegen Verdacht auf Salmonellen (<http://www.produktrückrufe.de>; 2010) oder enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) (<http://www.topnews.de>; 2010) bis hin zu EHEC-Todesfällen in Kindertagesstätten (<http://www.n-tv.de>; 2009).

In den überwiegenden Fällen wird allerdings positiver Nutzen aus den vielfältigen Eigenschaften der Mikroorganismen gezogen. So sind beispielsweise Milchsäurebakterien nicht nur als Probiotikum in aller Munde, sondern auch seit Jahrhunderten fester Bestandteil in der Lebensmittelproduktion.

#### 1. Milchsäurebakterien

##### 1.1 Profil der Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind ubiquitär überall dort verbreitet, wo kohlenhydratreiche Substrate verfügbar sind. Sie kommen natürlicherweise auf Pflanzen wie Kohl und Getreide, auf Mischfutter oder Silage vor und sind daher auch in Materialien pflanzlichen Ursprungs zu finden (HAMMES UND HERTEL, 2009). Weiterhin sind sie eng mit terrestrischen und marinen Tieren, unter anderem mit deren Mund- oder Intestinalschleimhaut, assoziiert. Auch im menschlichen Gastrointestinaltrakt dominieren diese Mikroorganismen. Im Dickdarm erreichen sie Keimzahlen bis zu  $10^8$  KbE (BERNARDEAU *et al.*, 2006).

Milchsäurebakterien werden in der Literatur allgemein als gram-positive Stäbchen und Kokken mit niedrigem G+C-Gehalt zwischen 32 und 53 mol % beschrieben, die keine Sporen bilden (STILES UND HOLZAPFEL, 1997; CAI *et al.*, 1999). Ihr Hauptstoffwechselprodukt ist Laktat. Sie sind Oxidase- und Katalase-negativ, ihnen fehlen Cytochrome und sie leben aerob bis fakultativ anaerob. Sehr sauerstoffempfindlich sind Vertreter der mikroaerophilen Spezies *Lactobacillus acidophilus* oder *L. helveticus* (CARR *et al.*, 2002). Die Taxonomie der, unter dem Begriff Milchsäurebakterien (MSB) zusammengefassten, Mikroorganismen gestaltet sich umfangreich. So sind der Ordnung *Lactobacillales* 9 Familien untergeordnet, zu denen wichtige Gattungen wie *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* oder *Lactococcus* zählen. Für die umfassendste Gattung, *Lactobacillus*, sind derzeit 96 Spezies und 16 Subspezies beschrieben (HAMMES UND HERTEL, 2009). Diese werden laut Orla-Jensen auf Grund ihrer Wachstumstemperaturen und ihres



biochemischen Reaktionsverhaltens in Thermobakterien, Streptobakterien und Betabakterien unterteilt (CARR *et al.*, 2002). Auch wenn diese Einteilung noch durchaus gängig ist, basiert die derzeitige taxonomische Klassifizierung auf molekularen Analysen (COEURET *et al.*, 2003).

Man unterteilt Milchsäurebakterien, auch Laktobazillen genannt, nach ihrem Stoffwechsel in obligat homo-, fakultativ hetero- und obligat heterofermentative Gruppen (HAMMES UND HERTEL, 2009). Laktat ist die namensgebende Stoffwechselkomponente, die bei homofermentativen Organismen mit bis zu 90 % als Hauptprodukt der Milchsäuregärung entsteht (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Im Embden-Meyerhof-Parnas-Weg wird 1 Mol Glukose auf direktem Weg mit dem Enzym Aldolase zu 2 Mol Laktat umgesetzt. Pentosen werden in diesem Stoffwechselweg nicht verwertet (CORSETTI UND SETTANNI, 2007). Heterofermentative Bakterien besitzen ein zusätzliches Enzym, die Phosphoketolase, eine Schlüsselkomponente im Pentosephosphatweg, das Hexosen in Pentosen umwandelt. Dabei entstehen neben 1 Mol Laktat, Kohlenstoffdioxid und Essigsäure/Ethanol. Weiterhin werden Aromakomponenten wie Aldehyd oder Diacetyl gebildet (CARR *et al.*, 2002; ZAUNMÜLLER *et al.*, 2006). Pentosen können durch Epimerasen oder Isomerasen zu Ribulose-5-Phosphat bzw. Xylulose-5-Phosphat umgewandelt und in den Phosphoketolaseweg eingespeist werden (CORSETTI UND SETTANNI, 2007). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28 handelt es sich um fakultativ heterofermentative Organismen. Hexosen werden analog dem homofermentativen Stoffwechsel über Glykolyse umgesetzt. Pentosen werden wie bei den obligat heterofermentativen Laktobazillen beschrieben, fermentiert. Im Unterschied dazu findet nur die Produktion von Milch- und Essigsäure statt, nicht jedoch von Kohlendioxid.

### 1.2 Bedeutung in der Lebensmittelproduktion

Auf Grund ihrer natürlichen Habitate üben Milchsäurebakterien schon sehr lange Einfluss auf die Lebensmittelproduktion aus. Erste fermentierte Nahrung wurde schon im alten Ägypten um 1500 v. Ch. (CORSETTI UND SETTANNI, 2007) hergestellt. Auch Griechen und Römer ernährten sich bereits von Lebensmitteln wie Käse (BERNARDEAU *et al.*, 2006).

Milchprodukte werden unter anderem durch *L. paracasei*, *L. brevis* und *L. helveticus* beeinflusst. Während einer langen Reifepériode können die Keimzahlen von

$10^2$  KbE / g auf  $10^8$  KbE / g ansteigen. Aus fermentiertem Fleisch wurden *L. brevis* und *L. carnis* isoliert und in fermentierter Wurst oder vakuumverpacktem Fleisch zählen *L. sake* und *L. curvatus* zu den dominierenden Spezies. *L. yamanasheinsis* ist hauptsächlich mit Wein und anderen alkoholischen Getränken assoziiert, da es sich hierbei um einen säuretoleranten Vertreter handelt. Nicht zuletzt wurde *L. panis* aus Roggensauerteig isoliert (CARR *et al.*, 2002).

In den beschriebenen Beispielen wurden die Milchsäurebakterien oft unwillkürlich genutzt. Mittlerweile finden sie in der Industrie gezielt Einsatz als Starterkulturen, um eine Prozessstandardisierung zu erzielen und ein Produkt mit spezifischen Eigenschaften herzustellen. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Ansäuerung zur Haltbarkeit der Produkte beiträgt. Dies wird nicht nur bei Joghurt, Brot oder Sauerkraut genutzt, sondern auch bei Erntegut in Silagen. Je nach gewünschtem Produkt sind neben Sicherheitsaspekten auch Säuerungsverhalten, Proteolyse, Phagenresistenz oder Bildung von Exopolysacchariden, Antifungiziden und Acetat von Bedeutung (GÄNZLE, 2009).

Zahlreiche Milchprodukte, die heutzutage unter Einsatz von Starterkulturen erzeugt werden, sind unter anderem Acidophilus Milch, Buttermilch, Joghurt, Hüttenkäse oder Hartkäse wie Cheddar, Provolone, Romano und Edamer. Aber auch die Produktion von Fleisch- und Wurstprodukten, alkoholischen Getränken und eingelegtem Gemüse profitiert von den eingesetzten Laktobazillen und ihrer Fähigkeit der Bildung von aroma- und geschmacksverstärkenden Stoffen. Je nach den Prozessparametern der Herstellung eignen sich die unterschiedlichsten Laktobazillen als Starterorganismen. *L. lactis* wird beispielsweise auf Grund seiner Hitzeresistenz in der Produktion von Schweizer Käse eingesetzt (CARR *et al.*, 2002). Allerdings können spezifische Eigenschaften im anderen Substrat auch negativ auswirken. *L. brevis* und *L. lindneri* zählen im Brauereiprozess zu den bedeutendsten Verderbsorganismen, weil sie Dextrine und Stärke umsetzen können, was zu einer enormen Verdünnung des Produktes führt. Die Bildung von Diacetyl durch *L. casei* ist in diesem Bereich auf Grund des buttrigen Aromas unerwünscht (SAKAMOTO UND KONINGS, 2003). In anderen Produkten wie Käse, Wein oder Brot wirkt sich dieses Aroma positiv auf das Produkt aus (BARTOWSKY UND HENSCHKE, 2004).

Speziell im Bereich der Sauerteigproduktion sind Starterkulturen zur Kontrolle und Optimierung im Fermentationsprozess entscheidend. Ihr Einsatz sollte mit einer schnellen oder zumindest beschleunigten Ansäuerung, einem verbesserten und

vorhersagbaren Fermentationsprozess, angenehmen sensorischen Attributen, verbesserter Sicherheit und reduziertem Hygienierisiko verbunden sein (STILES UND HOLZAPFEL, 1997; MUGULA *et al.*, 2003).

GAGGIANO *et al.* (2007) setzten bei der Suche nach einem geeigneten „ready-to-use“ Sauerteigstarter zusätzlich Kriterien bezüglich der Adaptation an verschiedene technologische Parameter wie Temperatur, Keimzahlen, Wachstumsphase, Teigausbeute und Substrat an.

### 1.3 Die Spezies *L. plantarum* und *L. paralimentarius*

Eine in der Literatur oft erwähnte Spezies ist *L. plantarum*. Sie wurde bereits 1919 von Orla-Jensen beschrieben. Sie wurde unter anderem in Assoziation mit Milchprodukten, Silage, Sauerkraut oder Kuh-Dung beschrieben (HAMMES UND HERTEL, 2009). Vom Stamm *L. plantarum* WCFS1 ist bereits die gesamte Genomsequenz entschlüsselt. Mit 3308274 bp besitzt er das bisher größte nachgewiesene Genom unter den *Lactobacilli*. *L. plantarum* ist eine Spezies, die sich an viele verschiedene Lebensräume adaptieren kann und zeichnet sich durch verschiedenste Eigenschaften aus. Neben *L. johnsonii* zählen einige *L. plantarum*-Stämme zu den probiotischen Laktobazillen (KLAENHAMMER *et al.*, 2007). Stammspezifisch wurde ihm antifungizide Wirkung nachgewiesen (Dal Bello *et al.*, 2007). Isolate aus Perlhirse produzieren Phytasen und wirken sich daher positiv auf die Bioverfügbarkeit von Mineralien aus (MORONI *et al.*, 2009). *L. plantarum* ist an vielen Pflanzen-, Fleisch- und Fischfermentationen beteiligt. Weiterhin ist diese Spezies im Wein für eine Reduktion der Weisäuerung verantwortlich, sowie für die Verbesserung von Geschmack und Aroma des Weines (LONVAUD-FUNEL, 1999). Zu weiteren ökologischen Nischen zählt neben Lebensmitteln wie Milchprodukten auch der menschliche Gastrointestinaltrakt. Gerade die Eigenschaft die Magenpassage im aktiven Zustand zu überleben, macht diese Spezies zu einer interessanten Komponente als Vehikel für Impfstoffe (POUWELS *et al.*, 1998). Dennoch gibt es einige Studien, in denen *L. plantarum* mit 27 % aller Endokarditis-Fälle in Verbindung gebracht wird (HARTY *et al.*, 1994; LEBEER *et al.*, 2008).

In der Produktion von Sauerteigen kann die stammspezifische Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffperoxid durch *L. planarum* positiv gegen unerwünschte Begleitflora wirken (SESEÑA *et al.*, 2005). Weiterhin zeigten *L. plantarum*-Stämme in Almagro-Auberginen im Vergleich zu *L. brevis* und *L. fermentum* das beste Säuerungsverhalten

(SESEÑA *et al.*, 2005). GEREZ *et al.* (2006) beschrieben Indizien, dass *L. plantarum* während der Fermentation Glutenbestandteile abbauen kann.

Sowohl *L. plantarum*, als auch *L. paralimentarius* sind Spezies, die bereits aus Sauerteig isoliert wurden. Sie kamen neben Spezies wie *L. sanfranciscensis*, *L. spicheri*, *L. sakei* und *L. hammesii* vergesellschaftet in französischem Weizenauerteig vor (VALCHEVA *et al.*, 2005). *L. paralimentarius* wurde ebenfalls aus Reissauerteigen isoliert (MORONI *et al.*, 2009). Die Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten aus spontan fermentierten Sauerteigen mit Amaranth. Hier zeigte besonders *L. paralimentarius* in Pseudozerealien substratspezifische Wettbewerbsfähigkeit (VOGELMANN *et al.*, 2009). *L. paralimentarius* ist eine Spezies, die erstmals 1999 aus Sauerteig isoliert und beschrieben wurde (CAI *et al.*, 1999).

## 2. Komplexität der Thematik Brot

### 2.1 Grundlage: Zerealien, glutenfreie Zerealien und Pseudozerealien

Innerhalb der Süßgräser gehören die wichtigsten Getreidearten wie Weizen, Gerste und Roggen, sowie einheimische Grasarten zur Unterfamilie der *Pooidae*. Ihre Früchte bestehen zum Großteil aus Stärke. Speicherort der Stärke ist das Endosperm. Sie enthalten weiterhin Proteine, Ballaststoffe, Fett, Mineralstoffe und Vitamine, sowie sekundäre Pflanzenstoffe. Ein Speicherprotein, das in den Zerealien Stärkekörner und Ballaststoffe umschließt, ist das Klebereiweiß Gluten (Arendt *et al.*, 2006). Es ist im Mehlkörper der Getreidekörner lokalisiert und setzt sich aus Prolaminen und Glutelinen zusammen. Die alkohollösliche Prolaminfraktion ist für allergische Reaktionen von Zöliakiepatienten kausal.

Hirse, Mais und Reis sind sogenannte glutenfreie Zerealien. Sie zählen botanisch ebenfalls zu den Süßgräsern, gehören aber jeweils anderen Unterfamilien an als Weizen, Roggen oder Gerste.

Amaranth und Buchweizen werden, ebenso wie Quinoa, zu den Pseudozerealien gezählt. Sie gehören nicht zu den Gräsern, sondern zu Familien der Fuchsschwanz-, Knöterich- bzw. Gänsefußgewächse, bilden aber wie Getreide stärkehaltige Körner aus (Schoenlechner *et al.*, 2008). Diese besitzen allerdings kein Gluten, weshalb sie für den Ernährungsplan von glutenintoleranten Patienten von Bedeutung sind. Die Glutenfreiheit der Pseudozerealien ist aus backtechnologischer Sicht aber negativ. Dadurch fehlt das charakteristische viskoelastische Netzwerk von Teigen, das grundlegend für das Volumen und Gashaltevermögen der Backwaren ist (Arendt *et al.*, 2006). Dies wird

in der Praxis durch den Zusatz von glutenfreier Stärke ausgeglichen. Auf Grund ihrer Zusammensetzung werten Pseudozerealien auch konventionelle Produkte auf. Sie zeichnen sich durch einen hohen ernährungsphysiologischen Wert aus. Sie besitzen im Vergleich zu Zerealien einen hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren wie Methionin, Lysin, Arginin oder Tryptophan (MAUTZ *et al.*, 2000; AUBRECHT UND BIACS, 2001; GORINSTEIN *et al.*, 2002) und sind reich an Mineralien. Dies gilt beispielsweise im Amaranth für Kalzium, Magnesium, Eisen, Kalium und Zink. Amaranth ist weiterhin Quelle für Riboflavin, Vitamin C, Folsäure und Vitamin E. Der Fettgehalt ist in Amaranth und Buchweizen 2-3 mal höher als in Zerealien. Ihr Öl enthält zwischen 75 % und 80 % ungesättigte Fettsäuren, ist besonders reich an der mehrfach ungesättigten Linolensäure oder Squalen und senkt den Cholesterinspiegel (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008). Buchweizen enthält Fagopyritol und Derivate von *D-chiro*-Inositol, die sich auf die Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus positiv auswirken können (STEADMAN *et al.*, 2000). Buchweizenproteine wirken der Entstehung von Brust- oder Dickdarmkrebs entgegen, indem sie die Östradiolkonzentration im Serum senken bzw. die Zellproliferation reduzieren (KAYASHITA *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2001). Sie unterdrücken Gallensteinbildung und senken ebenfalls den Cholesterinspiegel (KAYASHITA *et al.*, 1995; TOMOTAKE *et al.*, 2000).

Hauptkohlenhydratkomponente der Pseudozerealien ist Stärke. Sie liegt im Vergleich mit Zerealien jedoch in geringeren Konzentrationen vor. Amaranth besitzt einen hohen Amylopektinanteil. Daher sind Eigenschaften wie Gefrier-Tau- und Retrogradationstabilität besser als in herkömmlichen Zerealien. Weiterhin werden dadurch höhere Wasserbindekapazität oder Viskosität bewirkt. Wie in Buchweizen wird auch ein besseres Quellvermögen beschrieben (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008).

Die Stärke von Amaranth und Quinoa ist nicht im Endosperm, sondern im Perisperm lokalisiert. Buchweizenkörner ähneln hingegen im Speicherort den Zerealien. Die 55 % Speicherstärke des Endosperm besteht im gleichen Verhältnis aus Amylose und Amylopektin. Der Amylosegehalt ist höher als in Amaranth oder Quinoa. Das Verhältnis von Resistenter Stärke zum Gesamtstärkegehalt ist im Buchweizen mit 6,5 % bis zu dreifach höher als in den anderen Pseudozerealien. Resistente Stärke ähnelt funktionell den Ballaststoffen und ist nicht durch humane Enzyme abbaubar. Sie werden mit vermindertem Darmkrebsrisiko und Senkung der Blutfettwerte in Verbindung gebracht (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008).

Nachteilig zu betrachten ist, dass glutenfreies Brot oft mit einer trockenen, krümelnden Textur, geringem Volumen, wenig Mundgefühl und Geschmack, sowie kurzer Haltbarkeit verbunden wird. In der Anwendung als Sauerteig können diese Kriterien verbessert werden. So wird die Textur weicher, Brotvolumen und Gashaltevermögen steigen, das Mundgefühl wird verbessert, Aromakomponenten gebildet und das Altbacken werden wird verzögert (HOUBEN *et al.*, 2010; MORONI *et al.*, 2009).

Bedingt durch die wertvollen Eigenschaften und das Fehlen allergener Prolaminfraktionen sind Amaranth und Buchweizen interessante Substrate für Sauerteigfermentationen.

### 2.2 Verarbeitung: Bedeutung von Sauerteig

Unter einem Sauerteig versteht man im Allgemeinen einen Teig aus Wasser und Mehl einer Zerealie, der mit Milchsäurebakterien und / oder Hefen fermentiert wurde (ROTHER *et al.*, 1973). Dieser Prozess kann spontan, durch die im Mehl enthaltene autochthone Mikroflora, erfolgen oder durch den gezielten Einsatz von Starterorganismen.

Zu der dominierenden Mikrobiota in spontan fermentierten glutenfreien Zerealien zählen *L. plantarum* und *L. paralimentarius*. Aus Reissauerteigen wurden weiterhin *L. paracasei*, *L. perolens* und *L. spicheri* isoliert, sowie die Hefe *S. cerevisiae* (MORONI *et al.*, 2009). In Maissauerteigen etablierten sich *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Pediococcus acidilactici*, sowie *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (EDEMA UND SANNI, 2006).

Zwar wurden aus Sauerteigen auch *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* oder *Streptococcus* Spezies isoliert, doch der überwiegende Teil in diesem Ökosystem zählt zu der Gattung *Lactobacillus* (CORSETTI UND SETTANNI, 2007; MORONI *et al.*, 2011). *L. spicheri*, *L. nantensis* oder *L. siliginis* sind nur einige Spezies, die in den letzten Jahren erstmals beschrieben und aus Sauerteig isoliert wurden (CORSETTI UND SETTANNI, 2007).

Die Nutzung der Sauerteige erfolgt bei einem breiten Produktspektrum wie Brot, Kuchen oder Crackern (CORSETTI UND SETTANNI, 2007). Je nach Kulturkreis werden unterschiedliche Anforderungen an ein Sauerteigprodukt gestellt. Werden in Südeuropa vorwiegend Teige auf Weizenbasis mit einem niedrigen Säuregrad präferiert, sind es in Mittel-, Nord- und Osteuropa bevorzugt Roggenteige mit einem höheren Säuregrad (BRANDT 2007). Neben den sensorischen Aspekten gibt es eine Reihe von

technologischen Einflüssen, die den Einsatz von Sauerteig bei der Brotproduktion bedingen.

Bei der Herstellung von Sauerteig wird in erster Linie die Säuerungsaktivität der Milchsäurebakterien genutzt. In Weizenfermentationen führt das direkt zu einem pH-Optimum von Enzymen, die in ihrer Aktivität Einfluss auf die Textur (CLARKE *et al.*, 2004) und den Geschmack (HAMMES UND GÄNZLE 1998; GOBBETTI *et al.*, 2005) des Produktes nehmen. Weiterhin kommt es zu einer Erhöhung des Brotvolumens, durch die im Stoffwechsel gebildeten Gase (CORSETTI *et al.*, 1998a), verzögerter Stärkeretrogradation und Verhärtung (CORSETTI *et al.*, 2000), sowie zum Einfluss von Metaboliten wie Essigsäure auf das Aroma (GOBBETTI *et al.*, 2005). Auch in Roggenfermentationen hat das Säuerungsverhalten der Milchsäurebakterien enorme Bedeutung. Beispielsweise wird das ganz typische Aroma (HAMMES UND GÄNZLE, 1998) oder eine Reduktion amylytischer Aktivitäten erreicht, wodurch die weitere Verarbeitung des Teiges verbessert wird (LÖNNER UND AHRNE 1995; SIMONSON *et al.*, 2003). Das ist notwendig, da im Roggen eine höhere  $\alpha$ -Amylaseaktivität herrscht als im Weizen. Diese würde noch beim Backprozess die verkleisternde Stärke abbauen, und somit kann keine elastische Brotkrume gebildet werden. Resultat ist ein flaches Brot, mit reduziertem Gashaltevermögen, was in einer CO<sub>2</sub>-Ansammlung unter der Brotkruste resultiert (BRANDT, 2006a).

Die niedrigen pH-Werte der Sauerteige führen zu einer verlängerten Produkthaltbarkeit. Die enthaltenen Milchsäurebakterien können Schimmel und dem Altbackenwerden entgegenwirken (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

Neben der Wahl der Zerealie sind grundlegende Parameter wie Temperatur, Teigausbeute oder Führungsdauer schon determinierend für die Qualität und die Verarbeitungseigenschaften des Endproduktes. All dies bestimmt den Selektionsdruck im Sauerteig und die Umgebungsbedingungen und hat somit Auswirkung auf die Dominanz von Milchsäurebakterienspezies und die allgemeine Florenzzusammensetzung (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Die jeweiligen Milchsäurebakterien beeinflussen wiederum durch die Adaptation an die definierten Parameter das Produkt. Beispielsweise ist der Arginin-Deaminase-Weg durch eine höhere Temperatur optimierbar. Er bietet eine Möglichkeit Säurestress zu tolerieren. Dabei wird aus Arginin über die Zwischenstufe Citrullin Ornithin gebildet. Dies ist eine gewünschte Aromakomponente, da es beim Backprozess positiven Einfluss auf das Krustenaroma hat (GAGGIANO *et al.*, 2007). VRANCKEN *et al.* (2009b) beschrieben, dass zwar die

Bildung von Citrullin durch Temperaturvariation nicht beeinflusst werden konnte, jedoch dessen Umsatz zu Ornithin bei erhöhter Temperatur stieg.

Generell verstärken Aromakomponenten und –vorstufen, sowie Oligo- und Exopolysaccharide (EPS) die ernährungsphysiologischen Möglichkeiten und verbessern die Teig rheologie und Brotstruktur (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

Je nach Führungsdauer und –temperatur unterscheidet man drei Haupttypen von Sauerteig. Die tägliche Propagation, um die Mikroflora in einem aktiven metabolischen Status zu halten, ist charakteristisch für Typ1-Sauerteige. Diese werden bei Temperaturen bis zu 30°C mit dem Ziel geführt, die Teige zu lockern und eine verbesserte Produktqualität als Resultat der Säuerung zu erhalten (GÄNZLE UND BRANDT, 2006). Dominante Organismen, die von den hierbei auftretenden Parametern profitieren, sind die sehr säureresistenten Spezies *L. sanfranciscensis* und *L. pontis*, die sich zusätzlich durch eine schnelle Wachstumsrate auszeichnen (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Von industriellem Interesse sind vorrangig die letzten beiden Sauerteigeinstufungen. Typ2-Sauerteige dienen in der Regel als Säuerungs- und Aromakomponente. Sie werden bis zu einer Woche bei Temperaturen von teilweise über 40°C geführt. Diese Parameter schränken die Milchsäurebakterien in ihrer Stoffwechselaktivität ein. In diesen Teigen sind hohe Säuregrade und Spezies wie *L. pontis*, *L. panis* und *L. fermentum* charakteristisch. Die Typ2-Varianten dienen oft als Grundlage zur Herstellung von Typ3-Sauerteigen. Dabei handelt es sich um getrocknete Sauerteige, die über eine aktive Mikroflora verfügen und zur Säuerung oder als Starterkultur im Backbetrieb eingesetzt werden (GÄNZLE UND BRANDT, 2006). Typische Spezies, die auf Grund ihrer Resistenz gegenüber Trocknung und Gefrietrocknung für diese Art von Sauerteig geeignet sind, sind *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *L. delbrueckii* und *L. fructivorans* (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

Somit beeinflussen sowohl die intrinsischen Faktoren wie Nährstoffe und Enzyme des Mehles, als auch die Fermentationsparameter die Mikroflora, deren Metabolismus und dadurch das Produkt (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

Gluten ist kausal für die viskoelastischen Eigenschaften und somit entscheidend für das Wasser- und Gashaltevermögen der Teige. Beim Einsatz von glutenfreien Substraten kann ein ähnlich funktionierendes Netzwerk durch Verwendung von Hydrokolloiden erzeugt werden. In Abhängigkeit vom gewählten Substrat haben Hydrokolloide, wie Methylzellulosen, Einfluss auf das Brotvolumen und die Krumenhärte (MORONI *et al.*, 2009). GALLE *et al.* (2011) zeigten, dass Heteropolysaccharide von *L. buchneri* die



Rheologie von Sorghum-Sauerteigen positiv beeinflussen. RENZETTI *et al.* (2008) beschrieben, dass ebenso der Zusatz von Proteinen die Eigenschaften von glutenfreien Produkten verbessern kann. Die Ausbildung eines Proteinnetzwerkes kann auch durch zusätzliche enzymatische Behandlung begünstigt werden. Brote auf Basis von Buchweizen und braunem Reis zeigten durch Proteinaddition und Zusatz von Transglutaminase die größte Verbesserung in der Brotqualität. Nachteile dieser Verfahren sind einerseits die hohen Kosten der Additive, andererseits können allergische Reaktionen auftreten. Dies betrifft besonders den Einsatz von Milchproteinen (MORONI *et al.*, 2009). Weiterhin können sich die Additive, wie beispielsweise der Einsatz von Magermilchpulver in Sorghum, auch negativ auf die Brotqualität auswirken (SCHOBER *et al.*, 2005). Daher ist es von großer Bedeutung, geeignete Starterkulturen zu finden, die durch ihre Eigenschaften schon in dem Maße auf das Endprodukt Einfluss nehmen, dass der Einsatz von kostspieligen Additiven reduziert wird oder nicht mehr notwendig ist.

### **2.3 Verträglichkeit: Zöliakie und die Folgen**

Eine zunehmend an Bedeutung gewinnende Lebensmittelintoleranz ist die Zöliakie. In der europäischen Bevölkerung ist jeder 130ste betroffen, in den USA leidet eine unter 300 Personen daran. Aus Südamerika, Nordafrika oder Asien sind keine repräsentativen Daten verfügbar, da hier andere klinische Schwerpunkte und Untersuchungsmethoden manifestiert sind (DI CAGNO *et al.*, 2004) und Lebensmittel präferiert werden, die nicht auf glutenhaltigen Zerealien basieren.

In den Industrieländern gewinnt Zöliakie aber zunehmend an Bedeutung. Sie äußert sich in einer Unverträglichkeit von glutenhaltigen Lebensmitteln, die auf einer Reihe von Immunkaskaden basiert. Diese enden in einer so genannten Enteropathie, einer Erkrankung der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes. Klassische Symptome von Patienten mit einer typischen Zöliakie sind unter anderem chronische Diarrhö, Erschöpfung und Gewichtsverlust. Die atypische Zöliakie tritt in Kombination mit Varianten von Malabsorption, wie beispielsweise der Eisenmangelanämie, auf, oder aber unabhängig davon mit anderen Krankheiten wie Dermatitis herpetiformis. Zugrunde liegt eine Autoimmunreaktion, die durch den endoluminalen proteolytischen Verdau des Glutens in seine prolin- und glutaminreichen Polypeptide ausgelöst wird und zu den intestinalen Läsionen führt. Es gibt allerdings auch so genannte stille Formen, die vollkommen asymptomatisch verlaufen. Hierbei treten keine Symptome

auf, die mit dem Intestinaltrakt in Verbindung stehen. Vielmehr können hier Langzeitkomplikationen wie Osteoporose, Unfruchtbarkeit oder Krebs entstehen (DI CAGNO *et al.*, 2005).

Derzeit gibt es keine Heilmittel gegen Zöliakie. Den Betroffenen wird lediglich eine vollkommen glutenfreie Ernährungsweise empfohlen. An dieser Stelle werden Pseudozerealien wie Amaranth oder Buchweizen für den Verbraucher aktuell. Es gibt Untersuchungen, in denen Patienten glutenarme Kost verabreicht wurde. Der Fokus liegt hier unter anderem auf Hafer, da dessen Prolamingehalt um 25 % niedriger ist als in vergleichbaren Zerealien. Der Großteil der Probanden tolerierte die Haferkost (HABOUBI *et al.*, 2006). Ein weiteres Untersuchungsfeld ist der Einsatz von Sauerteig mit Milchsäurebakterien, die Gluten bzw. glutenverwandte Proteine abbauen können. Die Experimente basieren auf der Idee, dass nichttoxische Zerealien bzw. Pseudozerealien auf Grund ihrer schlechten Eigenbackfähigkeit mit Weizenteig kombiniert werden. Damit die Verträglichkeit des Produktes gewährleistet bleibt, wird dessen Glutengehalt in Fermentationen mit Stämmen von Spezies wie *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis* oder *L. hilgardii* reduziert. Dieses Prinzip wurde bereits mit Sauerteigbrot (DI CAGNO *et al.*, 2004) und Pasta (DI CAGNO *et al.*, 2005) getestet. Solche Studien sind allerdings sehr umstritten. Beispielsweise repräsentieren die Ergebnisse der Haferkoststudien unterschiedlich große Testgruppen von 23 bis 116 Personen, deren Daten über einen maximalen Zeitraum von 5 Jahren aufgenommen wurden (HABOUBI *et al.*, 2006). Auch für die Kombination von Pseudozerealien mit Weizen gibt es derzeit noch keine Ergebnisse aus *in-vivo*-Studien. Über langzeitliche Folgen, gerade auch in Anbetracht der stillen Zöliakieform, kann derzeit noch keine Aussage getroffen werden.

### 3. Problemstellung

Weizen steht weltweit an zweiter Stelle der Getreideproduktion (<http://faostat.fao.org>; 2009). Er gehört in der Lebensmittelindustrie neben Gerste oder Roggen zum Standard der Produktpalette. Seit Ergründung der Ursachen von Zöliakie, aber auch in Hinblick auf gesunde Alternativprodukte in der Backwarenindustrie, sind Rohstoffe wie Amaranth und Buchweizen in den Fokus der Forschung gerückt (JEKLE *et al.*, 2010; MORONI *et al.*, 2011). Es existieren derzeit keine kommerziell erhältlichen Starterkulturen für Sauerteigfermentationen mit diesen Pseudozerealien. Aus ernährungsphysiologischer und sensorischer Sicht könnte der Einsatz von geeigneten

Starterkulturen einen positiven Einfluss auf das Produkt haben.

Ziel dieser Dissertation war es, zwei Stämme der Gattung *Lactobacillus* näher zu charakterisieren und ihre Eignung für den Einsatz in Sauerteigerzeugnissen aus Amaranth und Buchweizen zu bewerten. Für die Grundlagenevaluierung potentieller Starterkulturen im Bereich Sauerteig, sollten sowohl technologische, als auch molekularbiologische und analytische Methoden zum Einsatz kommen.

Zunächst sollten *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28 einzeln und in Kombination in verschiedenen Fermentationsansätzen beschrieben werden. Im Fokus standen Wettbewerbsfähigkeit und Kontinuität. Es war zu klären, ob beide Stämme über einen definierten Zeitraum hinweg in verschiedenen Substraten kompetitiv sind, d.h. die Mikroflora dominieren und sich stabile Parameter wie pH-Wert und Säuregrad im Teig einstellen. Dies sollte einerseits durch Fermentationen evaluiert werden, in denen sie bereits mit hohen Keimzahlen den Substraten zugesetzt wurden. Andererseits sollten Fermentationen durchgeführt werden, in denen die autochthone Mikroflora auf das gleiche Keimzahlniveau herangewachsen war, wie die einzusetzenden Stämme.

Eine Sauerteigstarterkultur sollte Funktionen wie Säuerung und Metabolitbildung in einer möglichst kurzen Zeitspanne effektiv erfüllen. Daher war es essentiell das Fermentationsverhalten beider Stämme innerhalb eines Propagationsschrittes näher zu analysieren. Um die ermittelten Daten anwendungsbezogen bewerten zu können, sollten vergleichende Fermentationen mit gewerblich erhältlichen Starterkulturen für Zerealien durchgeführt werden.

Desweiteren stand die physiologische Charakterisierung der Mikroorganismen über Fermentationsprofile mit *high performance liquid chromatographie* (HPLC) und kommerziellem *analytical profile index* (API)-Testsystem im Mittelpunkt. Dabei war von Interesse, inwieweit Unterschiede in Zusammensetzung und Quantität der produzierten Metabolite im Medium bzw. Teig auftraten und ob beide Stämme teigrelevante Enzyme wie Amylasen oder Proteasen produzieren.

Weiterhin ist eine Anforderung an Starterkulturen, gegenüber wechselnden Prozessparametern stabil zu sein. Daher sollte der Einfluss der Temperatur auf die Fermentationsresultate überprüft werden.

Es war notwendig beide Stämme genau identifizieren zu können, um sie von der Begleitflora zu differenzieren. Hierbei sollten molekularbiologische Methoden wie Sequenzierung und *random amplified polymorphic DNA* (RAPD)-PCR zum Einsatz kommen.

**II. MATERIAL UND METHODEN**

**1. Kultivierung der Mikroorganismen**

**1.1 Bakterienstämme**

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und Starterkulturen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Verwendete Mikroorganismen in dieser Arbeit

<b>Organismus</b>	<b>Herkunft bzw. Stammhaltung</b>	<b>Bemerkung / Einsatz</b>
<i>L. paralimentarius</i> AL28	Amaranthisolat <sup>1</sup> , LTH6731	zu evaluierender Stamm
<i>L. paralimentarius</i> DSM13238 <sup>T</sup>	LTH5450	Referenzorganismus Stammunterscheidung
<i>L. plantarum</i> AL30	Amaranthisolat <sup>1</sup> , LTH6730	zu evaluierender Stamm
<i>L. plantarum</i> DSM20147 <sup>T</sup>	LTH969	Referenzorganismus Stammunterscheidung
<i>Staphylococcus aureus</i> B18	Isolat aus Schweine- lende, LTH925	Positivkontrolle bei der 16S rDNA-PCR
<i>Bacillus subtilis</i> DSM10 <sup>T</sup>	LTH3561	Positivkontrolle im Amylasetest
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen	Negativkontrolle im Amylasetest
Reissauerteig-Starter (10 <sup>9</sup> KbE / g MSB und 10 <sup>7</sup> KbE / g Hefen, je ± 50 %)	Böcker GmbH & Co. KG, Minden, Deutschland Bezeichnung in dieser Arbeit als IS1	Mehrstammstarter (MSS) IS1 als Vergleichs- mischstarterkultur in Fermentationen
<i>L. fermentum</i> LF1	Blessing Biotech GmbH, Stuttgart, Deutschland Bezeichnung in dieser Arbeit als IS2	Einzelstammstarter (ESS) IS2 als einzelne Vergleichs- starterkultur in Fermentationen

<sup>1</sup> im Rahmen der Dissertation von S. Vogelmann isoliert (VOGELMANN *et al.*, 2009)

### 1.2 Nährmedien

Zur Anzucht der Milchsäurebakterien wurde modifiziertes de Man Rogosa Sharp (mMRS5)-Medium nach STOLZ (1995) verwendet (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung von mMRS5-Medium, pH  $5,8 \pm 0,1$

Menge	Substanz
10,00 g	Bacto Trypton (BD)
5,00 g	Fleischextrakt (BD)
5,00 g	Hefeextrakt (BD)
10,00 g	Maltosemonohydrat (Sigma)
5,00 g	Fruktose (Merck)
5,00 g	Dextrose (Gewürzmüller)
5,00 g	Natriumacetat (Merck)
2,60 g	$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ (Merck)
4,00 g	$KH_2PO_4$ (Merck)
0,10 g	$MgSO_4 \times 1 H_2O$ (Merck)
0,05 g	$MnSO_4 \times 1 H_2O$ (Merck)
0,50 g	Cysteinhydrochlorid (Merck)
1,00 g	Tween 80 <sup>®</sup> (Sigma)
ad 1 l	$H_2O_{deionisiert}$

Für die Kultivierung auf festem mMRS5-Medium wurde zusätzlich 2 % Europäischer Agar (BD) eingesetzt. Weiterhin wurde zur Unterscheidung der verschiedenen Milchsäurebakterienspezies Bromkresolgrün (0,025 g / l, Sigma) zugefügt.

Hefen und Schimmelpilze wurden in Yeast-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Medium (Tabelle 3) nach MEROTH *et al.* (2003) kultiviert, wobei auch hier für das feste Medium 1,5 % Europäischer Agar (BD) und der Farbstoff Bromkresolgrün (0,025 g / l, Sigma) zugesetzt wurden.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung von YGC-Medium, pH  $6,6 \pm 0,2$

Menge	Substanz
20,00 g	Dextrose (Gewürzmüller)
5,00 g	Hefeextrakt (BD)
ad 1 l	$H_2O_{deionisiert}$

Bevor die Medien zur Anzucht und Kultivierung eingesetzt werden konnten, wurden sie 20 min bei 1 bar und 121°C autoklaviert.

Im Anschluss wurde dem mMRS5-Agar zur Unterdrückung der Begleitflora und Begünstigung der Milchsäurebakterien steril filtriertes (Sterilfilter Rotilab<sup>®</sup>, 0,22 µm PVDF, Roth) Cycloheximid (Sigma) mit einer Endkonzentration von 0,1 g/l zugegeben, sowie 0,1 % steril filtrierte Vitaminstammlösung (je 10 mg Thiamin, Niacinamid, Pyridoxal, Cobalmin, Folsäure, Pantothensäure in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>deionisiert</sub>, pH 5,8 ± 0,1; alle Sigma).

Chloramphenicol (Sigma) wurde in Ethanol gelöst mit einer Endkonzentration von 0,1 g/l im YGC-Agar eingesetzt.

Die Ermittlung der Gesamtkeimzahl erfolgte auf Standard-I-Agar (Tabelle 4). Dieser wurde ebenfalls vor dem Einsatz 20 min bei 1 bar und 121°C autoklaviert.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung von Standard-I-Agar, pH 7,5

Menge	Substanz
15,00 g	Bacto Trypton (BD)
6,00 g	NaCl (Merck)
1,00 g	Dextrose (Gewürzmüller)
3,00 g	Hefeextrakt (BD)
12,00 g	Europäischer Agar (BD)
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>deionisiert</sub>

### 1.3 Anzucht und Zellernte

Die in dieser Arbeit verwendeten Milchsäurebakterien wurden aerob, ohne Schütteln, in flüssigem mMRS5-Medium (Tabelle 2) bei 30°C über Nacht angezogen. Für das Wachstum auf mMRS5-Agar wurden sie 48 h unter modifizierter Atmosphäre bei 88 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 2 % O<sub>2</sub> inkubiert.

Hefen und Schimmelpilze wurden sowohl in YGC-Medium, als auch auf YGC-Agar aerob bei 30°C für 48 h bebrütet.

Zur Anreicherung der autochthonen Mehlflora wurde 1 g Mehl 1:10 in Saline (8,5 g NaCl (Merck); 1,0 g Trypton (BD); ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deionisiert</sub>; pH 5,9 ± 0,1) verdünnt und 48 h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion auf mMRS5- und YGC-Agar.

Für weitere Untersuchungen der Mikroorganismen aus Flüssigkultur wurden die Zellen bei 4°C für 10 min mit  $5000 \times g$  geerntet, in 1 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*: 8,18 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,245 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deionisiert}}$ ; pH 7,4; alle Merck) aufgenommen und bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

### 1.4 Stammhaltung

Alle Milchsäurebakterienstämme bzw. Teigisolate wurden als Glycerinkulturen bei -80°C gelagert. Dazu wurden 6 bis 8 ml Übernachtkultur bei 4°C 10 min mit  $2000 \times g$  geerntet und anschließend in frischem mMRS5-Medium (Tabelle 2) aufgenommen. Das Volumen wurde so gewählt, dass nach Zugabe von Glycerin (Roth) eine 30 %ige Glycerinkultur vorlag.

Die Konservierung der Hefeisolate erfolgte adäquat. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen von YGC-Medium (Tabelle 3) aufgenommen.

## 2. Mikrobiologisch-technologische Methoden

### 2.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Thoma-Kammer

Zur Ermittlung der Zellzahl von Übernachtkulturen, wurden diese zunächst 7 min bei  $2000 \times g$  und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen anschließend in 20 ml Saline (II. 1.3) resuspendiert. Von dieser Lösung wurden eine 1:10 und 1:100 Verdünnung hergestellt und jeweils 10  $\mu\text{l}$  auf den mittleren geschliffenen Steg des Objektträgers pipettiert. Das Deckglas wurde zuvor so aufgelegt, dass an den Rändern die Newton'schen Ringe sichtbar wurden. Nur dann erhält man das angegebene Kammervolumen von  $0,004 \text{ mm}^3$ . Aus den ermittelten Zellzahlen von 3 Großquadraten (mit je 16 Kleinquadraten) wurde der Mittelwert bestimmt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe der Zelltiter (Zellen / ml) errechnet.

### 2.2 Durchführung der Fermentationen

Die Fermentationen wurden mit Amaranth (Herkunftsland Peru) und Buchweizen (Herkunftsland China) der Davert GmbH durchgeführt. Dazu wurden die Pseudocerealien immer frisch mit einer Retsch Getreidemühle ZM100 (0,5 mm Lochsieb) zu Vollkornmehl vermahlen und in sterilen Plastikdosen bei 4°C gelagert. Um Fremdkontaminationen zu vermeiden, wurde die Mühle vor jedem Mahlvorgang

mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

Alle Sauerteige wurden mit einer Teigausbeute (TA) 200 angesetzt. Sie ist über die Formel

$$TA = \frac{\text{Mehleinwaage} + \text{Wassereinwaage}}{\text{Mehleinwaage}} \times 100$$

definiert.

Zur Führung der Sauerteige wurde zunächst die Feuchte des jeweiligen Mehles mit dem Moisture Analyser (Sartorius) bestimmt und entsprechend der Soll-Feuchte von 14 % die benötigte Mehlmenge nach der Formel

$$\frac{100 - (\text{Soll-Feuchte})}{100 - (\text{Ist-Feuchte})} \times \text{g Mehl} = \text{eingesetzte Menge Mehl in g}$$

in Dreifachbestimmung ermittelt.

Der Sauerteig wurde an der Brennerflamme in sterilen Fermentationsdosen angesetzt. Dazu wurden das Mehl, das auf die jeweilige Fermentationstemperatur vorgewärmte Leitungswasser und die Laktobazillenstämme *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30, jeweils  $10^7$  KbE / g Teig, mit einem zuvor desinfizierten Handrührgerät vermischt.

Die Inkubation der Sauerteige erfolgte bei 25°C oder 30°C im Wasserbad und betrug mindestens 48 h bis maximal 10 Tage. Dabei wurde jeweils nach 24 h ein neuer Teig angesetzt. Dieser bestand aus der auf die Soll-Feuchte korrigierten Mehlmenge, vorgewärmtem Leitungswasser und 10 % des bereits fermentierten Teiges. Spontan fermentierte Sauerteige wurden ebenso, allerdings ohne externe Zugabe von Mikroorganismen, angesetzt und entsprechend geführt (I. 3.4; 3.5.1) bzw. nach 24 h mit den Starterorganismen wie beschrieben inokuliert (I. 3.4).

Entnommene Teigproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert, die Keimzahlbestimmung (II. 2.3) wurde jedoch sofort durchgeführt. Die Zeitpunkte der Probenahmen resultierten aus den jeweiligen experimentellen Fragestellungen von zweistündig bis täglich.

### 2.3 Isolation von Mikroorganismen aus den Mehlen und der Teigmatrix

Um Aufschluss über die Zusammensetzung der autochthonen Mikroflora der Mehle zu bekommen, wurde zu Beginn jeder Fermentation 1 g Mehl in 9 ml Saline (II. 1.3) gelöst, zur Anreicherung der Mikrobiota für 48 h bei 30°C aerob inkubiert und anschließend eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt. Von dieser wurden 0,1 ml in



Doppelbestimmung auf den entsprechenden Nährböden (II. 1.2) ausplattiert. Die Auswertung erfolgte mit den Platten, auf denen sich zwischen 30 und 300 Kolonien befanden.

Die Isolation von Mikroorganismen aus den Teigen erfolgte analog. Da hier jedoch die Mikrobiota zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt bestimmt werden sollte, entfiel der Anreicherungsschritt bei 30°C. Die Verdünnungsreihe wurde sofort erstellt und auf den jeweiligen Selektionsmedien ausplattiert.

### 2.4 Mikroskopie der Mikroorganismen und Dokumentation

Zur Beschreibung der jeweiligen Mikroorganismen wurde zunächst eine morphologische Grobunterscheidung nach Größe, Form, Rand, Oberfläche und Farbe durchgeführt. Damit auch zwischen Fermentationen unterschiedlicher Zeitpunkte verglichen werden konnte, wurden die verschiedenen Kolonietypen auf den Selektionsplatten mit dem Binokular Stemi SV11 und der Kamera AxioCamICc1 (Zeiss) dokumentiert.

Um Schimmelpilze nicht nur molekular, sondern auch mit dem Bestimmungsschlüssel (SAMSON *et al.*, 2004) identifizieren zu können, wurden deren Hyphen auf dem Objektträger mit Anilinblau angefärbt und mit dem Axiovert200M mikroskopiert, sowie durch die Kamera AxioCamMR als Bildmaterial mit der Software AxioVision 3.1 (Zeiss) festgehalten.

## 3. Molekularbiologische Methoden

### 3.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die Geräte und Lösungen, soweit nicht anders beschrieben, 20 min einem Sterilisationsschritt bei 121°C und 1 bar im Autoklav (Integra) unterzogen.

Alle DNA-Proben wurden, sofern nicht gleich weiterbearbeitet, bei -20°C gelagert.

### 3.2 Präparation von genomischer DNA

Da durch morphologische Unterscheidung allein keine Aussage über die Spezies oder den Stamm von Mikroorganismen getroffen werden kann, wurden diese über ihr Erbgut identifiziert. Die Präparation der DNA erfolgte einerseits nach dem Ionenaustauschprinzip mittels eines kommerziellen Kits, sowie mit der Extraktion durch den Einsatz von Phenol und Chloroform. Die Konzentrationen wurden photometrisch

bei 260 nm in einer 10 mm Quarzküvette mit dem Photometer GeneQuant 1300 (GE Healthcare) bestimmt. Um Aussagen über den Reinheitsgrad der DNA treffen zu können, wurden ebenfalls die Proteinabsorptionen bei 280 nm aufgenommen. Mit Messungen bei 230 nm wurden phenolische Rückstände beschrieben.

### 3.2.1 Isolation der genomischen DNA mit kommerziellem Kit

Die genomische DNA der Milchsäurebakterien wurde mit dem Illustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit von GE-Healthcare gemäß den Herstellerangaben für gram-positive Bakterien isoliert. Ausgangspunkt waren jeweils 2 ml Übernachtskultur, die wie zuvor beschrieben (II. 1.3) behandelt wurden. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 50 µl auf 70°C vorgewärmtem, sterilen Reinstwasser, so dass ein Volumen von 100 µl für die weiterführenden Arbeiten zur Verfügung stand.

### 3.2.2 Isolation der genomischen DNA mit Phenol-Chloroform-Extraktion

(modifiziert nach VOGELMANN *et al.*, 2009)

Bei Hefen und Schimmelpilzen wurde die gesamte Übernachtskultur geerntet und ein bis zweimal mit PBS gewaschen (II. 1.3). Es schloss sich der Zellaufschluss an. Hierfür wurde das Zellpellet in 117 µl STE-Puffer (67,0 g Saccharose (Merck); 6,0 g Tris (Biomol); 1,86 g EDTA (Biomol); ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deionisiert</sub>; pH 8,0 ± 0,1), 8,2 U Ribonuclease A (Serva) und 6 µl Lysispuffer, bestehend aus 9080 U Lyticase (Sigma) und 40 mg Lysing Enzymes von *Trichoderma harzianum* (Sigma) in 1 ml STE-Puffer, vollständig resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl 20 %iger SDS-Lösung (Merck) und 14 µl Proteinase K (10 mg/ml; Sigma) folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 min bei 60°C. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 200 µl auf 65°C vorgewärmtes Phenol (Roth) für 6 min bei selbiger Temperatur gefällt und auf Eis abgekühlt. Dann wurden 220 µl 10 mM TrisHCl pH 8,0 und 300 µl Phenol (Roth) zugesetzt. Zur optimalen Durchmischung wurden die Proben für 1 min bei voller Kraft gevortext und dann bei 16000 × g 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch fand im Reaktionsgefäß eine Phasentrennung statt. Die phenolische Unterphase, sowie die Protein-Interphase wurden verworfen. Die DNA befand sich in der oberen wässrigen Phase, welche in ein neues Gefäß überführt wurde. Zur weiteren Aufreinigung wurden erneut 300 µl Phenol (Roth) dazugegeben und der

Durchmischungs- und Zentrifugationsschritt wiederholt. In den folgenden Extraktionsschritten wurden je zweimal ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) bzw. Chloroform (beide Roth) an Stelle von Phenol der wässrigen Phase zugesetzt. Die DNA-Fällung erfolgte 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder über Nacht bei  $20^{\circ}\text{C}$  nach Zugabe von 3 Volumen eiskaltem Ethanol (99,8 %ig, Roth) und 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat-Lösung (Merck). Nun konnte die DNA bei  $20000 \times g$  für 25 min bei  $20^{\circ}\text{C}$  sedimentiert und der Überstand verworfen werden. Anschließend wurde die DNA-Präparation im Vakuum getrocknet (Savant Speed Vac Concentrator SVC100H) und in  $100 \mu\text{l}$  10 mM TrisHCl pH 8,0 aufgenommen.

### 3.3 Isolation und Analyse von Plasmiden aus Milchsäurebakterien

(modifiziert nach O'SULLIVAN UND KLAENHAMMER, 1993)

Zur Isolation von Plasmiden aus Milchsäurebakterien wurden die Stämme bis zu einer  $\text{OD}_{580} = 2,0$  in mMRS5-Medium angezogen (Tabelle 2), 10 min bei  $5000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  geerntet und in 5 ml PBS (II. 1.3) aufgenommen. Um den Zellaufschluss effektiver durchführen zu können, wurden die Zellpellets bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 10 min bei  $5000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml Saccharoselösung (25 % w/v Saccharose (Merck); 30 mg/ml Lysozym; 0,1 mg/ml RNase, beide Serva) resuspendiert. Nach Zugabe von  $80 \mu\text{l}$  Mutanolysin (10 U/ $\mu\text{l}$ ; Sigma) erfolgte eine zweistündige Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden  $400 \mu\text{l}$  EDTA-Lösung (0,25 mM EDTA; 50 mM TrisHCl pH 8,0; beide Biomol) zugeführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich nach Zugabe von 3,5 ml SDS-NaOH-Lösung (3 % SDS w/v; 0,2 N NaOH; beide Merck) weitere 10 min bei Raumtemperatur an. Nach Durchmischung mit 2,5 ml eiskalter Natriumacetatlösung (3M; pH 5,0; Merck) wurde 15 min bei  $20500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 13 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) versetzt und geschüttelt. Das Gemisch wurde zur Phasentrennung bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min bei  $20500 \times g$  zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde mit der Oberphase und 10 ml Chloroform-Isoamylalkohol (Roth) zweimal wiederholt. Es folgte die Zugabe von 5 ml eiskaltem Isopropanol (Roth) und 1 h Inkubation bei  $-25^{\circ}\text{C}$ . Nach der Fällung der Plasmid-DNA wurde 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  für  $20500 \times g$  zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 8 ml 70 % Ethanol (Roth) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min mit

20500 × g erfolgte die Trocknung unter der Sterilbank. Die Plasmide wurden in 800 µl sterilem Reinstwasser aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

Damit die Plasmide einzeln untersucht werden konnten, wurden sie in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (II. 3.4.4), mit Ethidiumbromid (Roth) angefärbt und unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte nach dem Protokoll des Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Die Plasmid-DNA wurde mit 70 µl auf 65°C vorgewärmten nukleasefreiem Wasser von der Säulenmatrix eluiert und bei 4°C gelagert.

### 3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 3.4.1 Anwendungszweck

Ein wichtiger Punkt war die Identifizierung der Organismen, die aus den Teigen isoliert wurden. Hierfür kamen klassische PCR-Methoden zum Einsatz. Einerseits konnte mit der isolierten genomischen DNA (II. 3.2) und unspezifischen Primern ein stammspezifisches Bandenmuster (Fingerprint) erstellt werden. Andererseits wurden die Bakterien durch Sequenzbestimmung der 16S rDNA, bzw. Hefen und Schimmelpilze mit der 28S rDNA - Sequenz, taxonomisch eingeordnet. Ribosomale DNA ist in allen Organismen zu finden und kodiert für hoch konservierte und variable Regionen. Mutationsereignisse in den variablen Sequenzabschnitten sind für den Organismus funktionell kaum von Bedeutung. Daher zeugen Unterschiede von einer anderen phylogenetischen Entwicklung. Mit diesem Marker können Mikroorganismen auf Speziesebene charakterisiert werden.

#### 3.4.2 PCR-Parameter

Die lyophilisierten Primer (Operon) (Tabelle 5) wurden entsprechend den Herstellerangaben mit sterilem Reinstwasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20°C gelagert. Die verwendeten PCR-Reagenzien stammten von Genaxxon.

**Tabelle 5:** Verwendete PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Literatur
616V	AGA GTT TGA TYM TGG CTC	STERR <i>et al.</i> , 2009
630R	AAG GAG GTG ATC CAR CC	STERR <i>et al.</i> , 2009
97K	CTG CTG CCT CCC GTA	STERR <i>et al.</i> , 2009

**Tabelle 5 (Fortsetzung):** Verwendete PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Literatur
P1	ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG	SANDHU <i>et al.</i> , 1995
P2	CTC TGG CTT CAC CCT ATT C	SANDHU <i>et al.</i> , 1995
M13V <sub>mod</sub>	GTT TTC CCA GTT CAC GAC	STERR <i>et al.</i> , 2009
M13V <sub>org</sub>	GTT TTC CCA GTC ACG AC	MÜLLER <i>et al.</i> , 2001
1254	CCG CAG CCA A	TORRIANI <i>et al.</i> , 1999
RAPD3	GTA GAC CCG T	VAN DEN BRAAK <i>et al.</i> , 2000
RAPD7	AGC AGC GTG G	COCCONCELLI <i>et al.</i> , 1995
RAPD8	ACG CGC CCT	JOHANSSON <i>et al.</i> , 1995
RAPD9	ACG GTC TTG G	MOLNÁR <i>et al.</i> , 1995
RAPD12	ACG CAG GCA C	HOLZAPFEL <i>et al.</i> , 1997
RAPD13	GCG ATC CCC A	DAUD KHALED <i>et al.</i> , 1997

### a) Amplifikation der 16S rDNA von Bakterien

Zur Identifizierung der Milchsäurebakterien wurde die 16S rDNA entsprechender Isolate sequenziert. Um diese zu amplifizieren, kamen die Primer 616V und 630R (Tabelle 5) zum Einsatz. Die PCR-Komponenten für einen Ansatz mit 50 µl Endvolumen sind in Tabelle 6 aufgelistet, die Reaktionsparameter in Tabelle 7.

**Tabelle 6:** Reaktionsansatz zur Amplifikation der 16S rDNA

Volumen	Reagenz
5,0 µl	PCR-Puffer E (10×; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
1,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,0 µl	Primer 616V (0,01 mM)
1,0 µl	Primer 630V (0,01 mM)
40,7 µl	H <sub>2</sub> O <small>reinst, steril</small>
1,0 µl	genomische DNA
0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U / µl)

**Tabelle 7:** Reaktionsparameter der 16S rDNA-Amplifikation

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
Denaturierung	240	94	
Denaturierung	30	94	← 40 Zyklen
Annealing	60	57	
Elongation	120	72	
Elongation	300	72	
Pause	∞	15	

Als Referenz der PCR wurde einerseits eine ebenso behandelte Negativkontrolle ohne Template-DNA mitgeführt, andererseits eine Positivkontrolle mit genomischer DNA von *Staphylococcus aureus* LTH 910.

Die PCR-Produkte wurden zur Abschätzung der Konzentration auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (II. 3.4.4).

**b) Amplifikation der 28S rDNA von Hefen und Schimmelpilzen**

Zur Identifizierung der Hefen und Schimmelpilze wurde auf die 28S rDNA zurückgegriffen. Um diese zu amplifizieren, kamen die Primer P1 und P2 (Tabelle 5) zum Einsatz. Die PCR-Komponenten für einen Ansatz mit 50 µl Endvolumen sind in Tabelle 8 aufgelistet, die Reaktionsparameter in Tabelle 9.

**Tabelle 8:** Reaktionsansatz zur Amplifikation der 28S rDNA

Volumen	Reagenz
5,0 µl	PCR-Puffer E (10×; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
1,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,0 µl	Primer P1 (0,05 mM)
1,0 µl	Primer P2 (0,05 mM)
40,7 µl	H <sub>2</sub> O reinst, steril
1,0 µl	genomische DNA
0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U / µl)

**Tabelle 9:** Reaktionsparameter der 28S rDNA-Amplifikation

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
Denaturierung	240	94	
Denaturierung	30	94	← 35 Zyklen
Annealing	60	62	
Elongation	60	72	
Elongation	420	72	
Pause	∞	15	

Als Referenz der PCR wurde eine ebenso behandelte Negativkontrolle ohne Template-DNA mitgeführt.

Die PCR-Produkte wurden zur Abschätzung der Konzentration auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen (II. 3.4.4).

**c) Aufreinigung von PCR-Produkten**

Damit verbliebene Primer und Nukleotide bei späterer Sequenzierung (II. 3.4.5) nicht als Störfaktoren fungierten, wurden die Reaktionsansätze enzymatisch aufgereinigt. Durch die Exonuclease I (Exo) und Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) wurden einerseits die durch die PCR gebildeten einzelsträngigen Überhänge der DNA und ungebundene Primer abgebaut, andererseits auch die endständigen Phosphatgruppen entfernt. Das Ergebnis dieses Verdaus waren DNA-Stränge mit glatten Enden, die durch das Fehlen der Phosphatgruppen nicht mehr religieren konnten.

Für einen Exo-SAP-Ansatz wurden 5 µl PCR-Produkt, 10 U Exonuklease I und 2 U SAP eingesetzt. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 37°C und die Inaktivierung der Enzyme durch 15 min bei 80°C.

**3.4.3 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) –PCR**

Das Prinzip der RAPD-PCR besteht aus der zufälligen Bindung eines unspezifischen Primers an genomische DNA und dem daraus resultierenden charakteristischen Bandenmuster im Agarosegel, oft auch als Fingerprint bezeichnet. Diese Methode ist in der Populationsanalytik von Milchsäurebakterien weitläufig anerkannt und ermöglicht die Differenzierung auf Stammesebene (MOHANIA *et al.*, 2008).

Zur Analyse der Populationen im Sauerteig wurden die Primer M13V<sub>mod</sub>, M13V<sub>org</sub> und 1254 (Tabelle 5) im Ansatz von Tabelle 10 mit den Reaktionsparametern von Tabelle

11 bzw. Tabelle 12 eingesetzt.

**Tabelle 10:** Reaktionsansatz für RAPD-PCR mit Primer 1254, M13V<sub>mod</sub>, M13V<sub>org</sub>

Volumen	Reagenz
5,0 µl	PCR-Puffer S (10×; 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
7,0 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2,0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1,0 µl	Primer M13V <sub>mod</sub> (0,1 mM), alternativ M13V <sub>org</sub> (0,1 mM)
ad 50,0 µl	H <sub>2</sub> O <sub>reinst, steril</sub>
2,0 µg	genomische DNA
0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U / µl)

**Tabelle 11:** Reaktionsparameter der RAPD-PCR mit Primer M13V<sub>mod</sub>, M13V<sub>org</sub>

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
Denaturierung	45	94	
Denaturierung	180	94	3 Zyklen
Annealing	300	40	
Elongation	300	72	
Denaturierung	60	94	32 Zyklen
Annealing	120	60	
Elongation	180	72	
Pause	∞	15	

**Tabelle 12:** Reaktionsparameter der RAPD-PCR mit Primer 1254

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
Denaturierung	45	94	
Denaturierung	300	94	4 Zyklen
Annealing	300	36	
Elongation	300	72	
Denaturierung	60	94	30 Zyklen
Annealing	60	36	
Elongation	120	72	
Elongation	600	72	
Pause	∞	15	



Die Primer RAPD3, 7, 8, 9, 12 und 13 (Tabelle 5) wurden auch auf ihre Eignung zur Stammdifferenzierung überprüft. Dazu wurde der beschriebene Reaktionsansatz (Tabelle 13) in einem entsprechenden PCR-Programm (Tabelle 14) eingesetzt.

**Tabelle 13:** Reaktionsansatz für RAPD-PCR mit Primer RAPD3, 7, 8, 9, 12, 13

Volumen	Reagenz
2,47 µl	PCR-Puffer E (10×; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
0,49 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
2,0 µl	Primer (entsprechend 12,5 µM)
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O reinst, steril
0,5 µl	genomische DNA
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U / µl)

**Tabelle 14:** Reaktionsparameter der RAPD-PCR mit Primer RAPD3, 7, 8, 9, 12, 13

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	
Denaturierung	300	95	
Denaturierung	300	95	← 45 Zyklen
Annealing	60	36	
Elongation	120	72	
Elongation	480	72	
Pause	∞	4	

Zur Bestätigung der Reinheit der PCR-Reagenzien wurde eine Probe ohne Template-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend im 1,5 %igen Agarosegel unter definierten Parametern aufgetrennt (II. 3.4.4).

Die Auswertung der RAPD-Bandenmuster und somit die Darstellung des phylogenetischen Verwandtschaftsgrades der Isolate erfolgte mit dem Programm Bionumerics V2.00 (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgien).

### 3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurden sie mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür standen horizontale Flachbettapparaturen (Peqlab) zur Verfügung. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (50×: 240 g Tris; 37,2 g EDTA; pH 8,3 ± 0,1 mit Eisessig eingestellt, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>deionisiert</sub>; Biomol) unter Aufkochen gelöst und nach kurzem Abkühlen in die Gelkammern gegossen. Zum Beladen der Gele wurde den

Proben 1/5 farbstoffhaltiger Puffer (0,025 g Bromphenolblau (Merck); 0,025 g Xylencyanol (Serva); 8 ml Glycerol (Roth); 4 ml H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>) zum Beschweren beigelegt. Je nach erwarteter Größe der Probe wurde der Puffer zum Teil auch mit nur einem der beiden Farbstoffe hergestellt. Die Variation erfolgte bei kleinen Fragmenten mit Xylencyanol und bei großen mit Bromphenolblau. Als Molekulargewichtsmarker, zur Auswertung von RAPD-Gelen, wurden 3 µl λHindIII/EcoRI-Marker mit aufgetragen und zur Quantifizierung von 16S- bzw. 28S rDNA-Produkten 10 µl λHindIII-Marker (beide Fermentas).

RAPD-PCR-Produkte wurden in 1,5 %igen Gelen unter konstanten Parametern, wie 90 min bei 100 V, aufgetrennt. Die Färbezeit im Ethidiumbromidbad (10 mg / ml, Roth) betrug exakt 20 min. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung schlossen sich 10 min Entfärben im Wasserbad an. Die Dokumentation erfolgte bei einer Wellenlänge von 302 nm mit dem Ultraviolett-Transilluminator (Bachhofen) und der Digitalkamera (E.A.S.Y. 429 K) bzw. dem zugehörigen Programm (E.S.A.Y. Win32, Herolab).

Alle anderen PCR-Produkte oder DNA-Isolate wurden auf 1 %ige analytische Gele, Plasmidpräparationen auf 0,8 %ige präparative Gele aufgetragen und bei 130 V in variierenden Zeitspannen aufgetrennt. Nach 10 min Färbung in Ethidiumbromid erfolgte die Dokumentation wie oben beschrieben.

### 3.4.5. Sequenzierung

Milchsäurebakterien konnten anhand ihrer 16S rDNA identifiziert werden. Hier kamen die Primer 616V und 97K (II. 3.4.2) zum Einsatz, mit denen bis zu 600 bp der 5'-Region der 16S rDNA sequenziert werden konnten. Die Identifikation der Hefen und Schimmelpilze erfolgte über Sequenzen der 28S rDNA mit den Primern P1 und P2 (II. 3.4.2).

Dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte (II. 3.4.2 c) entsprechend den Herstellerangaben des CEQ<sup>TM</sup> DTCS Quick Start Kits bearbeitet, mit der Kettenabbruchmethode nach SANGER *et al.* (1977) im Kapillarsequencer CEQ<sup>TM</sup> 8000 analysiert und mit der CEQ<sup>TM</sup>-Software V9.0.25 (beide Beckman Coulter), sowie dem Programm BioEdit V7.0.9.0. (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) ausgewertet. Die Zuordnung der Spezies erfolgte durch Sequenzvergleiche in der Datenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 4. Analytische Methoden

#### 4.1 Messung von pH-Wert und Säuregrad

Bei der Teigführung wurden bei jeder Probenahme pH-Wert und Säuregrad mit dem Titrator TitroLine alpha (Schott) bestimmt. Während der pH-Wert über die Elektrode ermittelt wurde, ergab sich der Säuregrad aus der Menge an 0,1 M Natronlauge (Merck), die benötigt wurde, um eine Probe auf einen End-pH-Wert von 8,5 einzustellen. Hierzu wurde pro Untersuchung zweimal 5 g Teig jeweils in 50 ml deionisiertem Wasser gelöst und die titrierte Basenmenge addiert.

#### 4.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

Mit der HPLC-Analytik kann man unter anderem Zucker, Zuckeralkohole und organische Säuren detektieren. Hierzu wurden sowohl Überstände von Übernachtskulturen, als auch Teigproben der verschiedenen Fermentationen mit Amaranth und Buchweizen untersucht. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung aufgearbeitet.

##### 4.2.1 Bestimmung von Zuckerspektren

Zur Untersuchung der Teige auf Zucker und Zuckeralkohole wurden zunächst  $40 \pm 1$  mg Teigprobe bzw. 40  $\mu$ l Überstand der Übernachtskultur und des Standards 1:50 mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  verdünnt und einer Carrez-Fällung unterzogen. Im ersten Schritt folgte die Zugabe von 20  $\mu$ l Carrez-Lösung I (10,6 % w/v  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ; Merck) mit 1 min Inkubation bei Raumtemperatur, im zweiten die Zugabe von 20  $\mu$ l Carrez-Lösung II (28,8 % w/v  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; Merck) und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden anschließend bei 4°C 30 min mit  $16600 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m Cellulose Acetat Membran, VWR), 1:2 mit 80:20 (w/w) Acetonitril / Reinstwasser verdünnt und in die entsprechenden Glasröhrchen (VWR) gefüllt. Diese wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert. Mit jedem Probensatz wurde bei der Aufarbeitung ein Standard mitgeführt, der später für eine 6-Punkt-Kalibrierung eingesetzt wurde. Dieser enthielt je 0,1 g/l Mannitol, Maltose, Glukose, Fruktose, Saccharose (jeweils Merck, Reinheit  $\geq 99,0$  %), sowie Trehalose, Cellobiose und Gentobiose (jeweils Fluka, Reinheit  $\geq 99,0$  %). Die HPLC-Anlage (Komponenten siehe Tabelle 15) wurde mit einer Flussrate von 0,9 ml / min, und einer Säulentemperatur von 25°C betrieben. Das Eluentenverhältnis

Acetonitril zu Reinstwasser betrug 70:30.

**Tabelle 15:** Aufbau der HPLC-Anlage für die Analyse von Zuckern und Zuckeralkoholen

Komponente	Modell und Hersteller
Autosampler	Agilent 1100 Series G1313A ALS
Pumpe	Agilent 1100 Series G1311A Quat Pump
Entgaser	Agilent 1100 Series 61322A Degaser
Säulenofen	Agilent 1100 Series G1316A Colcom
ELS-Detektor	Alltech ELSD 2000 ES
Säule	Previa Carbohydrate ES (Alltech Grom GmbH, Rottenburg, Deutschland)

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Agilent Chem Station for LC; Rev. B. 01. 01.

### 4.2.2 Bestimmung von organischen Säuren

Zur Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung organischer Säuren und von Ethanol wurden  $2,50 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  Teig mit 22,5 ml 5 mM entgaster Schwefelsäure (Merck) vermischt und 1 min mit dem Ultraturrax (Dispo X, IDL) bei einer Leerlaufdrehzahl von 8000 rpm / min homogenisiert. Es folgte die Zentrifugation von 2 ml der Suspension bei 4°C für 10 min und 20800 x g. Der Überstand wurde in entsprechende Glasröhrchen (Bischoff) sterilfiltriert (0,45 µm PFTE Membran, VWR). Die Lagerung der Proben erfolgte nicht länger als 1 Woche bei 4-8°C. Die Überstände der Übernachtskulturen wurden 1:10 mit 5 mM entgaster Schwefelsäure verdünnt und gleichfalls wie beschrieben sterilfiltriert.

Als wesentliche aromagebende Komponenten wurden Milch-, Essig-, Zitronen-, Succinyl-, Ameisen- und Propionsäure, sowie Ethanol für die Analyse ausgewählt und davon jeweils eine 100 mM Stammlösung zur Kalibrierung eingesetzt. Die HPLC-Anlage (Komponenten siehe Tabelle 16) wurde mit einer Flussrate von 0,4 ml / min, einem Druck von 20-35 bar und einer Säulentemperatur von 70°C betrieben. Lösungsmittel und Eluent war jeweils 5 mM entgaste Schwefelsäure.

**Tabelle 16:** Aufbau der HPLC-Anlage für die Analyse organischer Säuren bzw. von Ethanol

Komponente	Modell und Hersteller
Autosampler	728 Autosampler (Bischoff)
Pumpe	Σ871 (IRICA, Japan)
Ventil	Rheodyne MX 7900-000 (Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Deutschland)
Säulenofen	HPLC Säulenthermostat mit gesteuerter Peltier Heizung/Kühlung (Bischoff)
RI-Detektor	Modell 8100 (Bischoff)
Säule	Rezex ROA-Organic Acid H <sup>+</sup> (8 %), 300 × 7,8 mm, 8 micron, (Phenomenex Inc., Torrance, USA)

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der McDAcq Integrator V1.5 Software (Bischoff).

### 4.3 Analytical Profile Index (API)-Testsystem

Zur Untersuchung des Kohlenhydrat-Verwertungsspektrums der beiden zu evaluierenden *Lactobacillus*-Spezies wurde ein kommerzieller api<sup>®</sup> 50CH-Test (bioMérieux) eingesetzt. Die Stämme wurden wie beschrieben (II. 1.3) auf farbstofffreiem mMRS5-Agar (II. 1.2) für 48 h kultiviert und mit einem sterilem Wattestäbchen in das vom Hersteller bereitete api 50CHL Medium überführt, bis die optische Dichte visuell mit dem McFarland Standard 2 übereinstimmte. Die weitere Durchführung und Auswertung mit der apilab software version 5.1 entsprach den Herstellerangaben.

### 4.4 Analyse spezifischer Enzyme

#### 4.4.1 Untersuchung auf Aktivität der bakteriellen alpha-Amylasen

Der Nachweis mikrobieller alpha-Amylasen beruht auf dem Prinzip, dass sich Stärke aufgrund ihrer Struktur mit Iodkaliumiodidlösung anfärben lässt. Hierzu wurden Standard-I-Agarplatten (II. 1.2) mit 0,2 % Stärkeanteil und 0,1 % Dextroseanteil als Zuckerquellen hergestellt und mit den zu testenden Stämmen 72 h bei 30°C unter modifizierter Atmosphäre inkubiert. Als Positivkontrolle diente *B. subtilis* LTH3561. Die Anzucht der Negativkontrolle *E. coli* DH5α erfolgte aerob bei 37°C. Da der

Stamm *L. paralimentarius* AL28 nur sehr schlecht auf Standard-I-Agar wuchs, wurden ebenfalls mMRS5-Agar-Platten (II. 1.2) mit 1 % Stärkeanteil und 0,5 % Dextroseanteil als einzige Zuckerquellen hergestellt und wie beschrieben (II. 1.3) behandelt. Die Stämme, die alpha-Amylase produzieren, können die im Agar enthaltene Stärke abbauen. Daher zeichnet sich nach Zugabe einiger Tropfen Lugol'scher Lösung (Merck) eine helle Zone um die Kolonien ab, während die nicht abgebaute Stärke violett-schwarz angefärbt wird.

### 4.4.2 Schnellbestimmung freier Aminosäuren im Teig

Die Untersuchung der proteolytischen Vorgänge im Teig erfolgte nach FOLKERTSMA UND FOX (1992). Hierzu wurde  $1,0 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  Teig bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $20800 \times g$  10 min zentrifugiert und der Überstand 1:100 mit sterilem Reinstwasser verdünnt. Nach 5 min Inkubation mit 500  $\mu\text{l}$  Cadmium-Ninhydrin-Reagenz (0,4 g Ninhydrin (Sigma); 40 ml Ethanol (Roth); 5 ml Eisessig (Roth); 0,5 ml  $\text{CdCl}_2$  [1 g / ml] (Sigma)) bei  $84^\circ\text{C}$  wurden die Proben auf Eis abgekühlt und anschließend photometrisch die optische Dichte bei 507 nm in Halbmikroküvetten (Brand) bestimmt. Das somit gemessene Ruhemanns-Violett beruht auf der Farbreaktion von Ninhydrin mit freien Aminogruppen von  $\alpha$ -Aminosäuren. Die Eichgerade wurde mit Leucin im Konzentrationsbereich von 0 bis 50  $\mu\text{g}$  erstellt. Durch den Abgleich der Werte ließen sich Aussagen über den Gehalt an freien Aminosäuren im Teig ableiten.

## 5. Herkunft der Geräte und Chemikalien

Das Reinstwasser wurde über eine Milli Q Plus PF Anlage (Millipore, Billerica, USA) hergestellt.

Die weiterhin verwendeten Geräte stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Bachhofen (Reutlingen, Deutschland), Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland), Bischoff (Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH, Leonberg, Deutschland), Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland), Herolab (Wiesloch, Deutschland), IDL (Interessengemeinschaft der Laborfachhändler GmbH & Co KG, Nidderau, Deutschland), Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland), Peqlab Biotech GmbH (Erlangen, Deutschland), Retsch GmbH (Haan, Deutschland), Sartorius AG (Göttingen, Deutschland), Schott AG (Mainz, Deutschland) und Zeiss (Göttingen, Deutschland).

Soweit nicht gesondert vermerkt, stammten alle Chemikalien von BD (Beckton Dickinson and Company, Sparks, USA), Biomol (Hamburg, Deutschland), Gewürzmüller (Korntal-Münchingen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Promega GmbH (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Sigma (Steinheim, Deutschland).

Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen, Primer von Operon (Ebersberg, Deutschland) und alle restlichen PCR-Reagenzien von Genaxxon (Ulm, Deutschland). Weitere Verbrauchsmaterialien lieferten die Firmen bioMérieux<sup>®</sup> (Nürtingen, Deutschland), Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland).

*E. coli* DH5 $\alpha$  stammte von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

Die Utensilien für den api<sup>®</sup> 50CH-Test wurden von der Firma bioMérieux<sup>®</sup> (Nürtingen, Deutschland) geliefert.

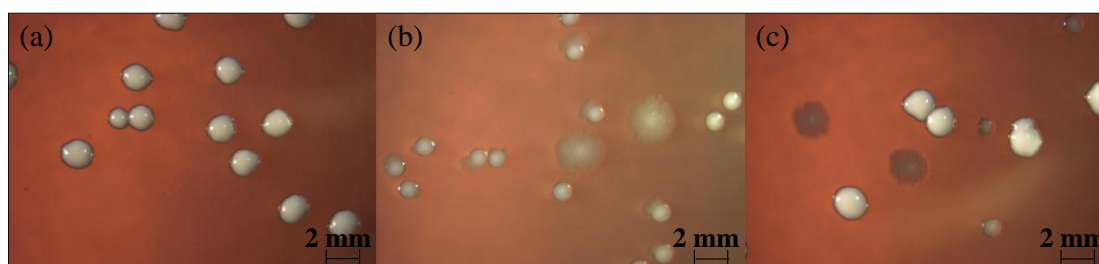
---

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Charakterisierung der verwendeten Stämme

##### 1.1 Morphologische Differenzierung

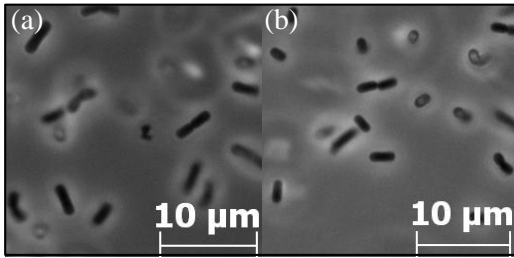
Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Organismen handelte es sich um *Lactobacillus paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30. Beide Stämme sind Isolate aus Spontanfermentationen mit Amaranth, die im Rahmen der Dissertation von S. Vogelmann kultiviert wurden (VOGELMANN *et al.*, 2009). Sie wurden aufgrund ihres Wachstums auf mMRS5-Agar in verschiedene Morphotypen unterteilt. *L. plantarum* AL30 wuchs in weiß glänzenden, erhabenen Kolonien mit 1,5 bis 2 mm Durchmesser (Abbildung 1a). Dies wurde als Morphotyp a bezeichnet. *L. paralimentarius* AL28 wuchs in matt weißen, kleineren, flachen Kolonien von ca. 1 mm Durchmesser.



**Abbildung 1:** Aufnahmen der Koloniemorphotypen „a“ von *L. plantarum* AL30 (a) und „b+c“ von *L. paralimentarius* AL28 (b), sowie beider Morphotypen im Vergleich (c) auf mMRS5-Agar nach 48 h Inkubation bei 30°C unter modifizierter Atmosphäre.

Besonders war in dem Fall, dass die Kolonien sowohl glatt als auch ausgefranst wuchsen und daher Morphotyp b bzw. c zugeordnet wurden (Abbildung 1b). Vereinzlungen und Plattierung aus einer Übernachtskultur oder aus in Saline (II. 1.3) aufgenommenen Zellen ergaben, dass Morphotyp b und c ineinander übergehen können. Das bedeutet, dass bei einer Vereinzlung von Morphotyp b auch Morphotyp c auftrat und umgekehrt. Eine erneute Vereinzlung dieses Morphotyps c resultierte wiederum in Morphotyp b. Dieses Phänomen konnte auch auf den Platten beobachtet werden, auf denen die aus dem Sauerteig reisolierten Stämme ausplattiert wurden. Je länger die Platten inkubiert wurden, umso mehr Morphotypen b wurden zu c (Abbildung 1b, c). Vor jedem Fermentationseinsatz wurden die beiden Stämme auch mikroskopisch bezüglich ihrer Reinheit überprüft. Sie wiesen die typische Stäbchenform der Gattung *Lactobacillus* auf (Abbildung 2).





**Abbildung 2:** Phasenkontrastaufnahme der Zellen von *L. paralimentarius* AL28 (a) und *L. plantarum* AL30 (b).

#### 1.2 Molekulare Differenzierung

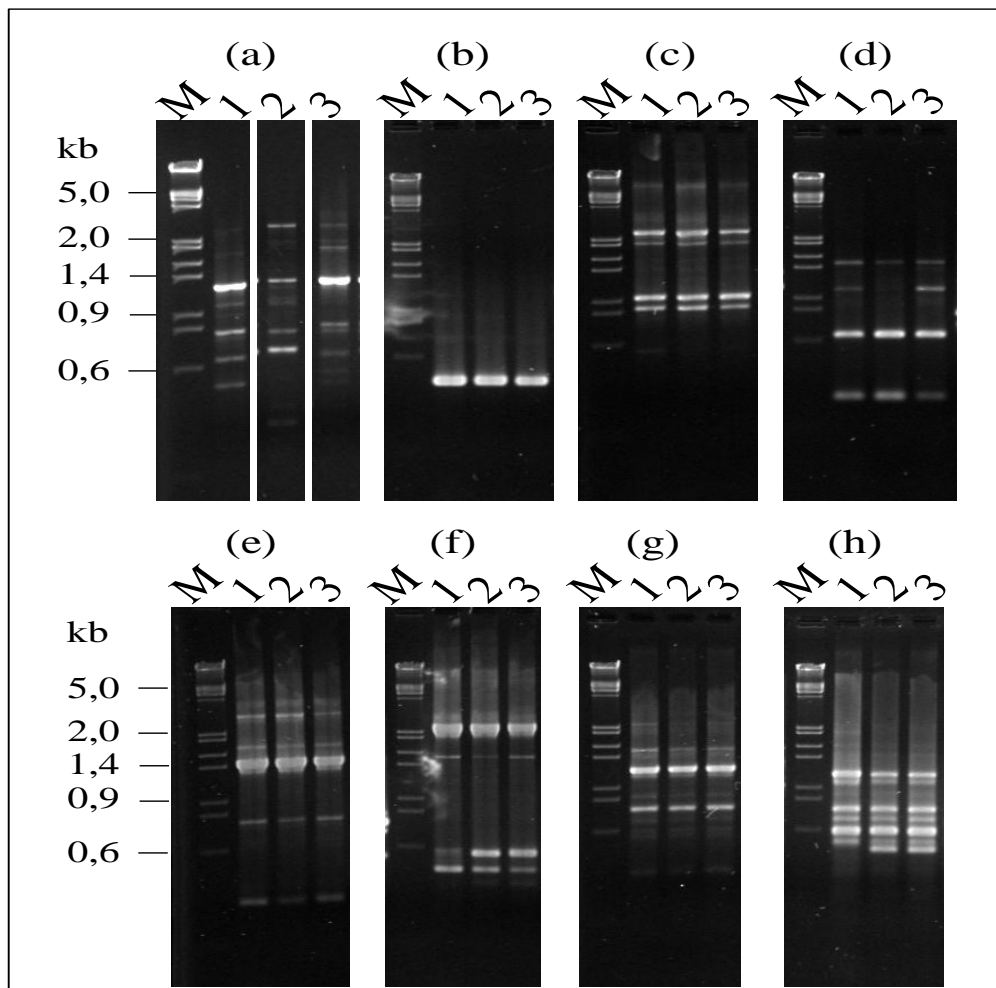
Die Spezieszugehörigkeit der beiden Stämme wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durch Sequenzanalyse der gesamten 16S rDNA bestätigt (MERKLE, 2008).

Eine wesentliche Herausforderung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand darin, dass die beiden verwendeten Stämme sicher während der Fermentationsexperimente identifiziert und von anderen Bakterien unterschieden werden mussten. Hierzu wurde die RAPD-PCR als eine klassische und anerkannte Methode zum Fingerprinting eingesetzt. Verschiedene Primersysteme wurden verwendet und auf ihre Tauglichkeit untersucht. Ziel war eine optimale Differenzierbarkeit, sowie Stabilität der PCR Profile. Beide verwendeten Stämme ergaben in der RAPD-PCR einen charakteristischen Fingerprint. Die Morphotypen b und c zeigten dasselbe Bandenmuster. Dies war zu erwarten, da sie morphologische Varianten des selben Stammes darstellen. Um dennoch eine Kontamination der Kultur *L. paralimentarius* AL28 auszuschließen, wurden die unterschiedlichen Morphotypen b und c mit 8 verschiedenen Primern in RAPD-PCR untersucht (Abbildung 3).

Die erhaltenen Fingerprints variierten von 1 bis 9 Banden im Größenbereich von < 0,6 kb bis 10 kb. Bei 6 von 8 Primern waren die Fingerprint-Muster der Morphotypen b und c identisch (Abbildung 3b, c, e, f, g, h). Nicht alle Primer eigneten sich zur Stammunterscheidung. Die durch Primer RAPD7 erzeugten Fingerprints bestanden beispielsweise aus nur einer Bande (Abbildung 3b). Einzig bei den mit Primer M13V<sub>org</sub> erzeugten Fingerprints, wurden beide Morphotypen eindeutig von dem Typstamm differenziert (Abbildung 3h).

Die durch Primer RAPD3 und RAPD9 erzeugten Fingerprints von Morphotyp b bzw. c differierten zwar nicht beide vom Typstamm, waren im Vergleich miteinander jedoch unterschiedlich (Abbildung 3a, d). Beide Primer erwiesen sich als ungeeignet zur

Stammdifferenzierung, da keine reproduzierbaren Bandenmuster erstellt werden konnten.

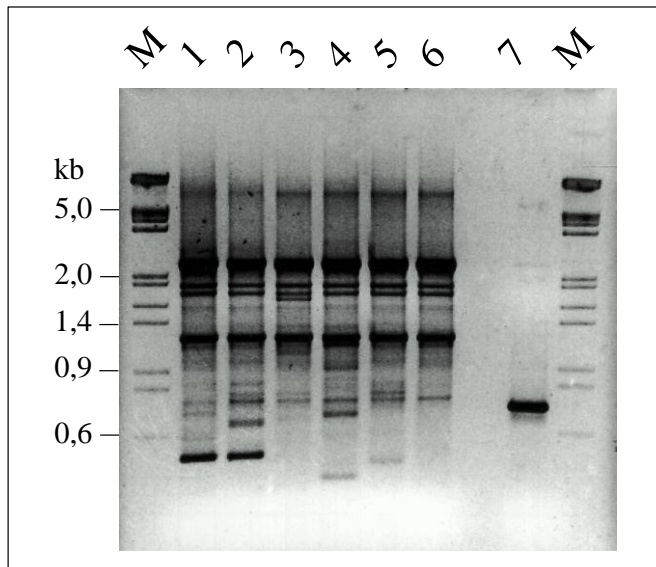


**Abbildung 3:** Agarosegel (1,5 %) der RAPD-PCR-Produkte, resultierend aus Ansätzen mit Primer RAPD3 (a), RAPD7 (b), RAPD8 (c), RAPD9 (d), RAPD12 (e), RAPD13 (f), M13V<sub>mod</sub> (g) bzw. M13V<sub>org</sub> (h) und jeweils DNA-Templates von *L. paralimentarius* 13238<sup>T</sup> (1), *L. paralimentarius* AL28 Morphotyp b (2) bzw. c (3). Als Molekulargewichtsmarker wurde  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M) aufgetragen.

Dies ist im Folgenden am Beispiel von Primer RAPD3 dargestellt (Abbildung 4).

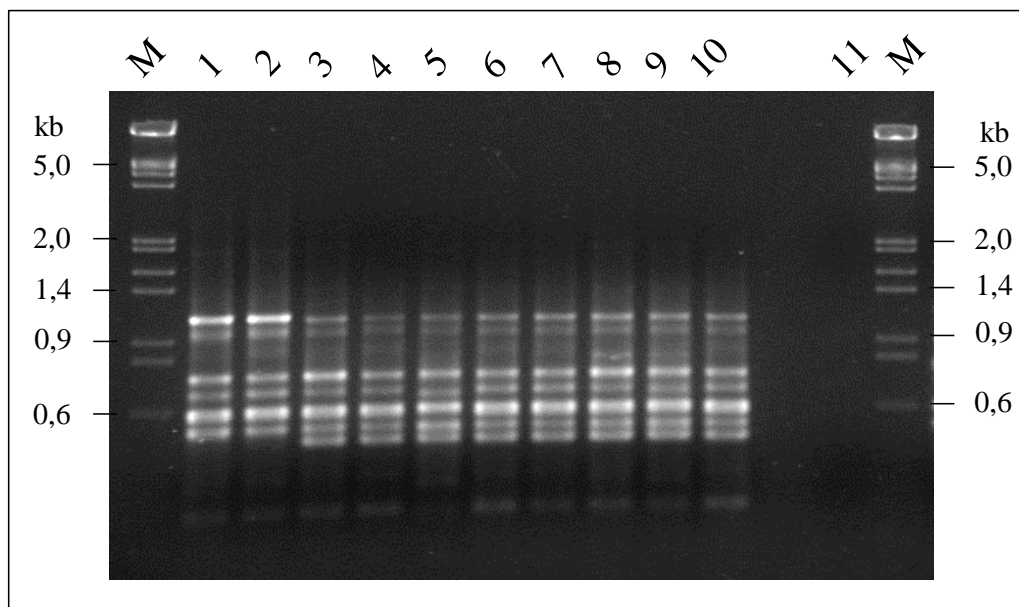
Keine der RAPD3-Fingerprints von Morphotyp b bzw. c waren untereinander identisch. Das betraf sowohl den Vergleich zwischen Morphotyp b und c, als auch die Fingerprints der einzelnen Morphotypen untereinander. Mit Primer RAPD3 wurden auch für Präparationen, die auf eine Kultur zurückgehen (Abbildung 4, Spur 1-2 bzw. 4-5), keine gleichen Fingerprints erzeugt. Der Primer selbst tendierte zu Oligomerbildung, was sich durch Banden in der Negativkontrolle ohne DNA-Template widerspiegelte (Abbildung 4, Spur 7). Eine Verunreinigung wurde durch Austausch der PCR-

Reagenzien sowie mehrmaliger Wiederholung der PCR überprüft und ausgeschlossen.



**Abbildung 4:** Agarosegel (1,5 %) der RAPD-PCR-Produkte, resultierend aus einem Ansatz mit Primer RAPD3 und DNA-Templates von *L. paralimentarius* AL28 Morphotyp b (1-3) und c (4-6). Als Molekulargewichtsmarker wurde  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M) und als Negativkontrolle (7) ein PCR-Ansatz ohne DNA-Template aufgetragen. Spur 1 + 2, 3, 4 + 5, sowie 6 zeigen Fingerprints, die jeweils auf Präparationen einer ÜK basieren.

Mit M13V<sub>org</sub> konnten beide Stämme deutlich von dem DSMZ-Typstamm differenziert werden (Abbildung 3h, Abbildung 5).



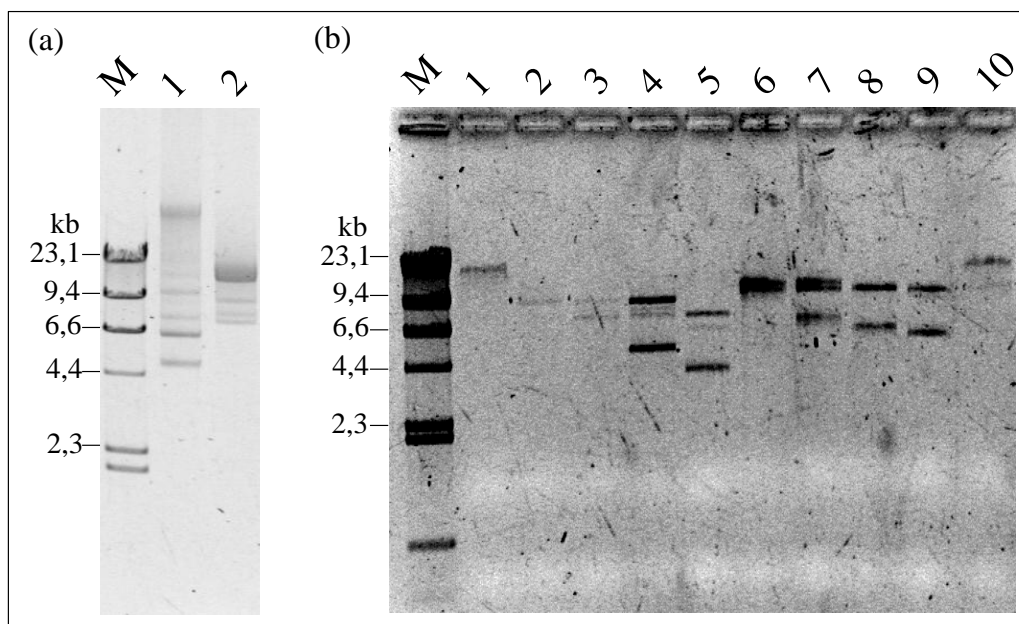
**Abbildung 5:** Agarosegel (1,5 %) der RAPD-PCR-Produkte, resultierend aus einem Ansatz mit Primer M13V<sub>org</sub> und DNA-Templates von *L. paralimentarius* DSM13238<sup>T</sup> (1-2), *L. paralimentarius* AL28 Morphotyp b (3-6) und c (7-10). Die DNA-Templates für die PCR stammten aus verschiedenen Präparationen jeweils zweier Übernachtskulturen (ÜK1: 1, 3, 4, 7, 8; ÜK2: 2, 5, 6, 9, 10). Als Molekulargewichtsmarker wurde  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M) und als Negativkontrolle (11) ein PCR-Ansatz ohne DNA-Template aufgetragen.

Dabei wurden nicht nur unterschiedliche Stämme verglichen, sondern auch die Reproduzierbarkeit des Fingerprints getestet (Abbildung 5). Hierfür wurden je Morhotyp von zwei parallel angesetzten Übernachtskulturen aus  $2 \times 2,0$  ml (aus ÜK1) und  $1 \times 2,0$  ml (aus ÜK2) genomische DNA präpariert.

Für den DSMZ-Typstamm ergaben sich Fingerprints mit 7 markanten Banden, während sich die Profile von Morphotyp b und c durch 8 markante Banden auszeichneten. Die Unterscheidung konnte eindeutig über die dritte Bande unterhalb von 0,6 kb erfolgen, die im Profil des Typstammes nicht vorhanden war, dagegen aber bei b und c.

Im Folgenden wird daher der Morphotyp von *L. paralimentarius* AL28 als „b+c“ beschrieben.

Neben der gesamten genomischen DNA wurden ebenso Plasmide aus den beiden *Lactobacillus*-Stämmen präpariert und einzeln aufgereinigt (II. 3.3). Jeder der untersuchten Stämme besaß ein Profil mit mehreren Plasmidbanden (Abbildung 6a).



**Abbildung 6:** Agarosegele (0,8 %) mit Plasmidprofilen (a) von *L. paralimentarius* AL28 (1) und *L. plantarum* AL30 (2), sowie einzeln aufgereinigte Plasmide aus 50 ml Präparationen (b) mit den Plasmiden P2 (1), P3 (2), P4 (3), P6 (4) und P7 (5) aus *L. paralimentarius* AL28 und P1 (6), P2 (7), P3 (8), P4 (9) und P5 (10) aus *L. plantarum* AL30. Als Molekulargewichtsmarker diente  $\lambda$ HindIII (M).

Diese variierten in ihrer Anzahl je nach Präparationsvolumen. Im kleinen 8-ml Maßstab (Abbildung 6a) befand sich im Profil von *L. paralimentarius* AL28 genomische DNA oberhalb von 23 kb, sowie 7 weitere Plasmidbanden im Größenbereich zwischen

23 kb und 4,4 kb. Bei *L. plantarum* AL30 sieht man eine kräftige Bande bei 12 kb und drei weitere zwischen 6 kb und 10 kb. Zur Aufreinigung der einzelnen low copy Plasmide wurden größere Probenvolumina von 50 ml als Ausgangszellmaterial verwendet.

Bei allen Präparationen wurden je Stamm 5 Plasmidbanden erhalten (Abbildung 6b), die somit zum Plasmidprofil in Abbildung 6a variierten. Das Plasmidprofil von Stamm AL28 enthielt höchstwahrscheinlich zwei Banden, die nur einer Plasmidkonformation entsprachen, die sich im großen Präparationsmaßstab nicht ausbildete.

Stamm AL30 wies oberhalb der vier beschriebenen eine zusätzliche Bande auf, die möglicherweise erst durch die größeren Probenvolumina im Agarosegel sichtbar wurden.

Die Größen der 5 untersuchten Plasmide betragen für *L. paralimentarius* AL28 23 kb, 12 kb, 9 kb, 6 kb, sowie 4,5 kb und für *L. plantarum* AL30 20 kb, 12 kb, 8 kb, 6,6 kb und 6,3 kb. Nach der Aufreinigung lagen die Plasmide in einer bis drei verschiedenen Konformationen vor (Abbildung 6b).

Auf Grund der geringen Plasmidkonzentrationen nach der Einzelpräparation, wurde auf eine nähere Analyse der einzelnen Plasmide verzichtet. Zur Beschreibung der Stämme AL28 und AL30 sind in dieser Arbeit nur die Gesamt-Plasmidprofile dargestellt. Der low-copy-Status, sowie das damit zusammenhängende unausgewogene Verhältnis von Präparationsvolumen zu Plasmidausbeute waren ausschlaggebend, die Plasmidprofile nicht zur Differenzierung der Stämme in den geplanten Fermentationen zu nutzen.

### 1.3 Phänotyp der Kohlenhydratverwertung

#### 1.3.1 Api-Testsystem

Neben den genetischen Merkmalen wurden die zu evaluierenden Stämme auch mit einem api<sup>®</sup> 50CH-Test (II. 4.3) auf ihr Kohlenhydratverwertungsprofil untersucht und damit taxonomisch differenziert. Von den 49 getesteten Substraten wurden D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose, N-acetylglukosamin, Amygladin, Arbutin, Esculin-Eisenziträt, Salicin, D-Zellobiose, D-Maltose, D-Saccharose, D-Trehalose und Gentobiose von beiden Stämmen verwertet. *L. plantarum* AL30 setzte zusätzlich noch D-Ribose, D-Galaktose, D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Laktose, D-Melibiose, D-Melezitose, D-Raffinose und D-Turanose um. Die Auswertung mit der apilab<sup>®</sup>-Software ergab, dass dies ein typisches Profil für die Spezies *L. plantarum* ist. Die Identifikationsstufe betrug

99,9 % ohne widersprechende Reaktionen. *L. paralimentarius* ist keine hinterlegte Spezies in der Datenbank und wurde mit 70 % der Spezies *L. acidophilus* zugeordnet. Als widersprechende Reaktion wurde die Galaktoseverwertung angegeben.

### 1.3.2 Metabolitbildung in Bouillon

Zusätzlich zu diesem Fermentationsprofil wurden die beiden Stämme auf ihren Stoffwechsel in mMRS5-Bouillon getestet (Tabelle 17). In Abgleich mit der Medium-Kontrolle bildete *L. paralimentarius* AL28 innerhalb von 17 h bei 30°C 67 mM Milchsäure, *L. plantarum* AL30 bewegte sich mit 79 mM im selben Bereich. In den Ansätzen beider Stämme wurden jeweils 19 mM Mannitol gebildet. Die Glukosewerte des Mediums nahmen über den getesteten Zeitrahmen bei beiden Kulturen um 38 mM ab. Die Fruktosewerte sanken bei *L. paralimentarius* AL28 um 29 mM und bei *L. plantarum* AL30 um 36 mM, während Maltose mit ca. 20 mM auf einem konstanten Level blieb. Ameisensäure blieb mit etwa 5 mM konstant. Essigsäure, im Medium in Form von Natriumacetat enthalten, wurde vollständig umgesetzt. Weitere Metabolite, wie beispielsweise Ethanol, wurden nicht detektiert (Anhang 3, Tabelle 26).

**Tabelle 17:** Säuren und Zucker in mM im mMRS5-Medium nach 17 h Inkubation bei 30°C, mit Zusatz von *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30

Substanz	ohne Kultur	mit AL28	mit AL30
Laktat	3,9 ± 0,3	71,3 ± 1,7	82,6 ± 2,1
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	19,1 ± 0,1	18,9 ± 0,0
Formiat	4,8 ± 2,2	6,0 ± 0,5	5,0 ± 2,2
Acetat	40,6 ± 0,6	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 <sup>2</sup>
Glukose	57,7 ± 1,2	19,7 ± 0,1	19,6 ± 0,1
Fruktose	58,3 ± 3,0	29,6 ± 1,4	22,4 ± 0,1
Maltose	21,6 ± 1,0	20,4 ± 0,4	18,2 ± 0,1

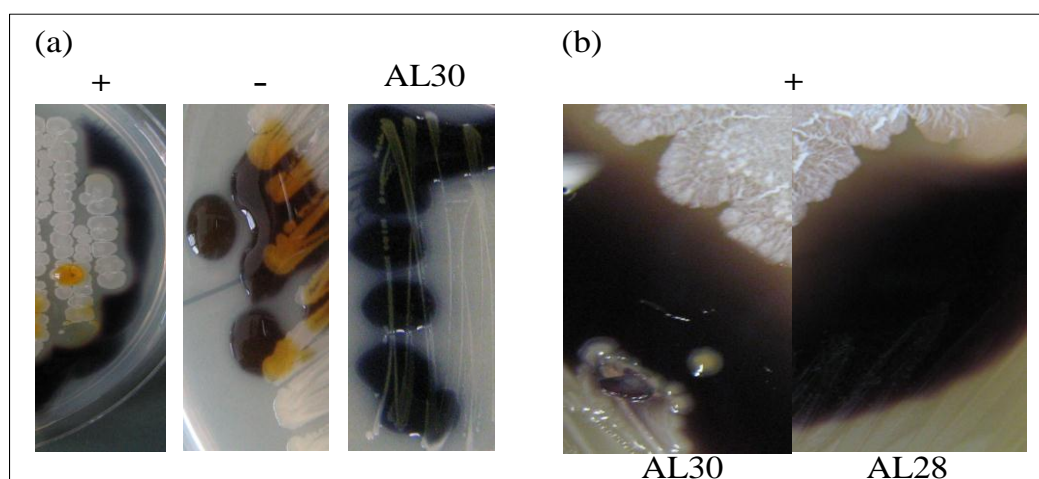
<sup>1</sup> n.d. = nicht detektiert;

<sup>2</sup> ≤ 3 = Werte unter dem Detektionslimit der Anlage von 3 mM, die aber Signal lieferten

### 1.3.3 Stärkeabbau

Aus technologischer Sicht sind amylolytische Aktivitäten im Teig bedeutsam (siehe I. 2.2). Daher wurden die Stämme auf ihre Fähigkeit untersucht, Stärke abzubauen. Das Prinzip beruht auf dem Nachweis dieses Substrates mit Lugol'scher Lösung auf den entsprechenden Nährmedien (II. 4.4.1). Bei der Positivkontrolle *B. subtilis* erkennt man sowohl auf Standard I-, als auch auf mMRS5-Agar, dass die Bereiche um die

Kolonien nicht angefärbt werden konnten und somit ein Stärkeabbau stattgefunden haben muss (Abbildung 7a). Die Untersuchungen von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 ergaben das gleiche Ergebnis wie die Negativkontrolle *E. coli* DH5 $\alpha$ . Im gesamten Bereich um die Kolonien wurde Stärke nachgewiesen (Abbildung 7b). Somit sind die getesteten Stämme nicht in der Lage, die Stärke des Festmediums zu verwerten.



**Abbildung 7:** Standard-I-Agar (a) und mMRS5-Agar (b) mit Stärke und Dextrose im Verhältnis 2:1 als einzige Kohlenstoffquellen für *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30), der Positivkontrolle *B. subtilis* (+) und Negativkontrolle *E. coli* DH5 $\alpha$  (-). Der Stärkenachweis erfolgte mit Lugol'scher Lösung.

## 2. Analyse der verwendeten Substrate

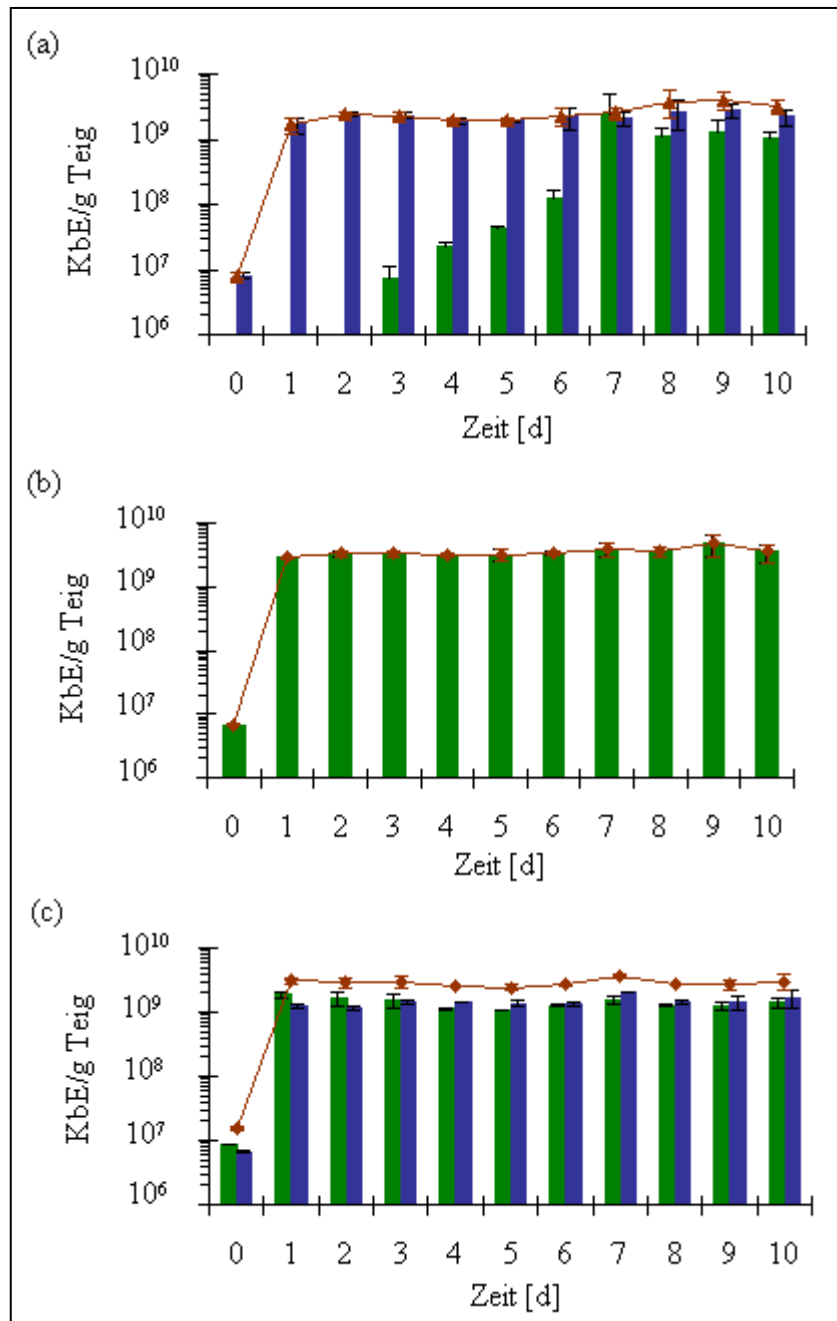
Die eingesetzten Substrate unterschieden sich in ihrer Mehlfeuchte. Amaranth wies mit 9,7 %  $\pm$  0,5 % geringere Werte auf als Buchweizen mit 12,7 %  $\pm$  0,7 %. Nach Anreicherung der Mikroflora des Mehles (II. 1.3) wurde im Amaranth eine größere Vielfalt an Organismen nachgewiesen, als in der anderen verwendeten Pseudozerealie. Von den 90 getesteten Isolaten wurde ein Drittel näher analysiert (Zusammenfassung Datenbankabgleich siehe Anhang 4, Tabelle 39). Davon wurden 49 % als Spezies *L. plantarum* und 16 % als *L. paralimentarius* identifiziert. Weiterhin wurden 16 % *Pediococcus pentosaceus*, 3 % Enterokokken und 16 % *Candida glabrata* angereichert. Aus Buchweizen konnten hingegen nur *Cryptococcus sp.* isoliert werden.

## 3. Charakterisierung der Stämme in der Teigmatrix

### 3.1 Wettbewerbsfähigkeit und Verhalten in Amaranth- und Buchweizen

In allen Fermentationen erreichten die eingesetzten Stämme *L. paralimentarius* AL28

und *L. plantarum* AL30 Keimzahlen zwischen  $10^9$  und  $10^{10}$  KbE / g Teig. Dies war sowohl unabhängig vom Substrat, als auch vom Einsatz als Einzelstammstarter (ESS) oder in Kombination als Mehrstammstarter (MSS) (Abbildung 8).

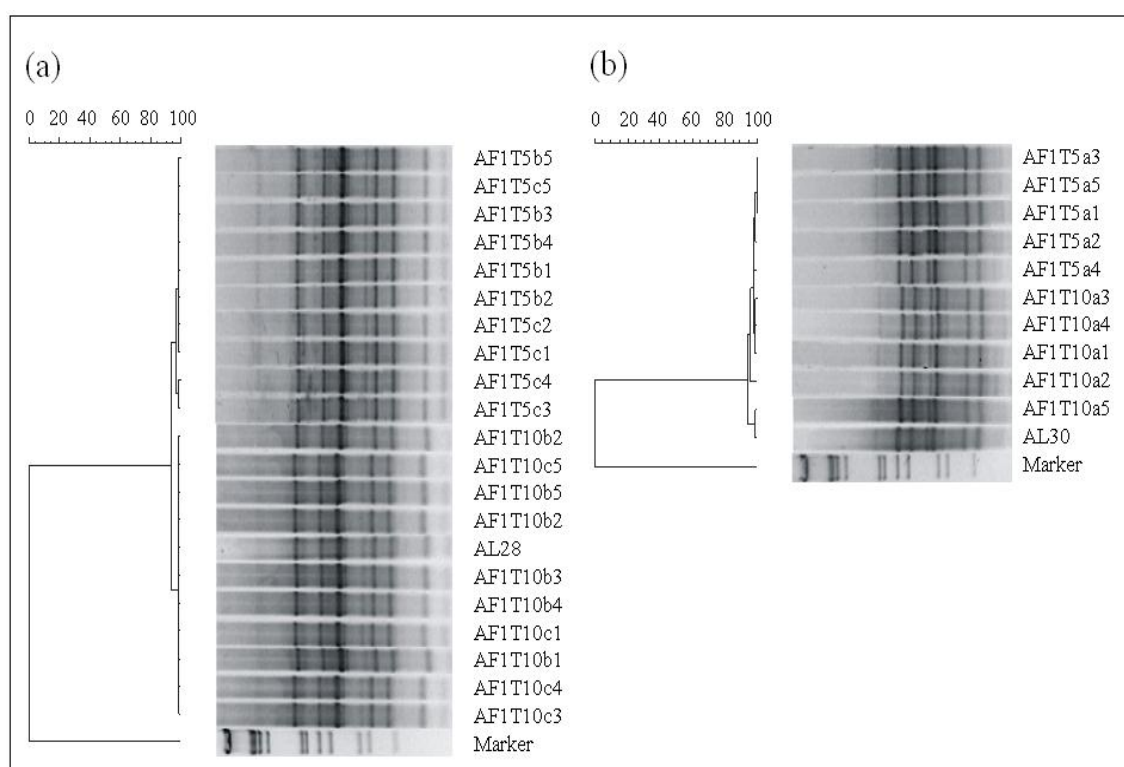


**Abbildung 8:** Verlauf der Keimzahlen im Substrat Buchweizen in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (a), *L. plantarum* AL30 (b) und beiden Stämmen in Kombination (c). Dargestellt sind Morphotyp b+c (blaue Balken) sowie Morphotyp a (grüne Balken) und die Gesamtkeimzahl (Graphen) auf mMRS5-Agar.

Die Zuordnung der Keimzahlen, die auf morphologischer Unterscheidung der Kolonien beruhten, wurde auch auf molekularer Ebene mit RAPD-PCR (II. 3.4.3) bestätigt (Abbildung 9). Es wurden Isolate aus der Stammkultur bzw. zum Fermentationsstart,



sowie an Tag 5 und Tag 10 der Fermentationen näher betrachtet. An jedem der genannten Probenahmezeitpunkte wurden je Morphotyp 5 Stichproben analysiert. In den daraus resultierenden Dendrogrammen ergaben sich innerhalb der Cluster für die Isolate der Morphotypen b und c untereinander (Abbildung 9a), bzw. für die Isolate des Morphotyp a (Abbildung 9b), über 94 % phylogenetische Verwandtschaft. SCHEIRLINCK *et al.* (2009) beschrieben gleiche Stämme mit einer evolutionären Distanz von 6 %. Daher wurden die aus dem Teig reisolierten Organismen als die eingesetzten Kulturen identifiziert.

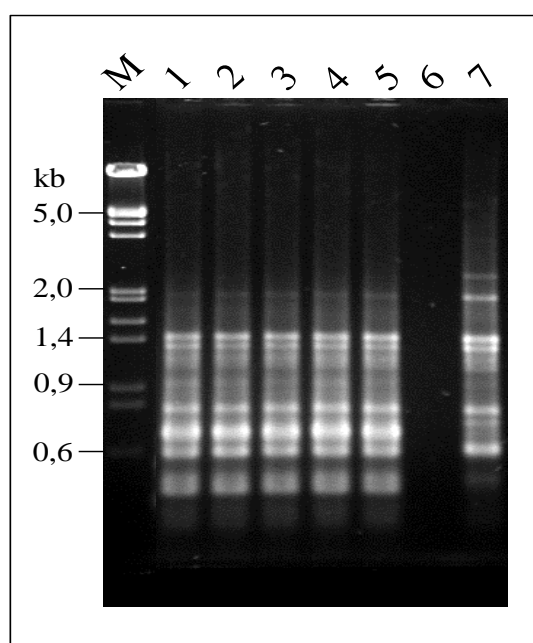


**Abbildung 9:** Dendrogramme mit Vergleich verschiedener Isolate aus einer Amaranthfermentation (AF1) von Tag 5 (T5) und Tag 10 (T10) mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination. Morphotypen b und c bzw. a (mit entsprechender Isolatnummer) in Bezug zu Stamm AL28 (a) bzw. Stamm AL30 (b).

Trotz der hohen Keimzahlen lag lediglich *L. plantarum* AL30 nach der gesamten Fermentationsperiode von zehn Tagen im Buchweizen konstant bei einem Wert von 100 %  $\pm$  0 % Anteil an der Milchsäurebakterienflora des Sauerteiges (Abbildung 8b). *L. paralimentarius* AL28 erreichte dagegen an Tag 10 einen Wert von 68 %  $\pm$  1 %. Auch im Amaranth erreichte *L. plantarum* AL30 mit 98 %  $\pm$  2 % einen größeren Anteil im Teig als *L. paralimentarius* AL28 mit 76 %  $\pm$  14 %. Beim Einsatz beider Stämme in Kombination zeigte sich jedoch, dass *L. paralimentarius* AL28 über *L. plantarum*

AL30 dominierte. War das Verhältnis im Buchweizen mit  $54 \% \pm 3 \%$  zu  $46 \% \pm 3 \%$  noch annähernd ausgeglichen, so wurden im Amaranth mit  $81 \% \pm 3 \%$  zu  $19 \% \pm 3 \%$  Unterschiede am Anteil im Teig deutlich. *L. plantarum* AL30 fiel von 59 % zu Fermentationsbeginn auf 19 % am Fermentationsende (Rohdaten siehe Anhang 1).

Weiterhin war auffällig, dass eine Kombination von beiden Stämmen in der Summe der Gesamtkeimzahl entsprach. In diesem Fall war die mehleigene Flora in den auswertbaren Verdünnungsstufen  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  nicht nachweisbar und folglich nicht im Teig dominierend. Anders als beispielsweise in der Fermentation von *L. paralimentarius* AL28 im Buchweizen (Abbildung 8a). Ab Tag 3 wurden auf dem Selektivagar für Milchsäurebakterien Kolonien dokumentiert, die dem Morphotyp a entsprachen. Diese ergaben in der RAPD-PCR auch mit dem Primer M13V<sub>mod</sub> identische Bandenmuster bezüglich *L. pantarum* AL30. Durch den Einsatz von M13V<sub>org</sub> konnte dieser Morphotyp allerdings als ein anderer Stamm der, durch Sequenzierung bestimmten, Spezies *L. plantarum* identifiziert werden (Abbildung 10).

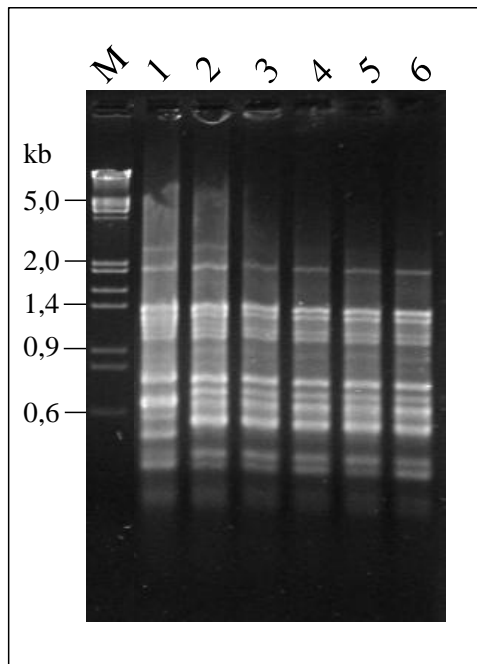


**Abbildung 10:** Agarosegel (1,5 %) der RAPD-PCR-Produkte mit Primer M13V<sub>org</sub> von Isolaten der Begleitflora mit Morphotyp a (1-5) an Tag 10 einer Buchweizenfermentation mit *L. paralimentarius* AL28 im Vergleich mit *L. plantarum* AL30 (7). Als Molekulargewichtsmarker wurde  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M) und als Negativkontrolle (6) ein PCR-Ansatz ohne DNA-Template aufgetragen.

Die Fingerprints unterschieden sich in 4 Banden. Auf Laufhöhe von 2,5 kb besitzt der Fingerprint von *L. plantarum* AL30 eine Bande, die in den Teigisolaten fehlt. Ebenso ist das bei der Bande mit einer Größe von 0,75 kb der Fall. Auf einer Laufhöhe von

0,7 kb und unterhalb von 0,6 kb besitzen die Teigisolate markante Banden, die wiederum im Fingerprint von *L. plantarum* AL30 fehlen. Somit wurde gezeigt, dass sich die Begleitflora an Milchsäurebakterien in den Buchweizenfermentationen vom Stamm *L. plantarum* AL30 unterschied.

Die Morphotypen a in Amaranthfermentationen mit *L. paralimentarius* AL28, in denen Morphotyp b+c erwartet wurde, wurden ebenfalls mit RAPD-PCR analysiert (Abbildung 11).

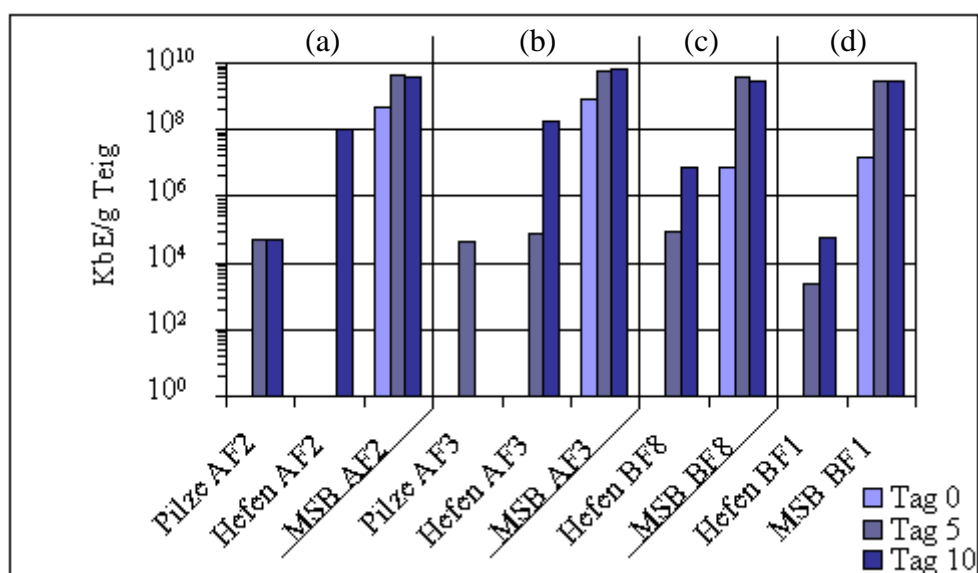


**Abbildung 11:** Agarosegel (1,5 %) der RAPD-PCR-Produkte mit Primer M13V<sub>org</sub> von *L. plantarum* DSM20147<sup>T</sup> (1) und *L. plantarum* AL30 (2) im Vergleich mit Fermentationsisolaten des Morphotyps a (3-6) ausgewählter Amaranthfermentationen mit *L. paralimentarius* AL28. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde  $\lambda$ HindIII/EcoRI aufgetragen.

Die Bande auf Laufhöhe von 2,5 kb trat nur beim Referenzstamm *L. plantarum* DSM20147<sup>T</sup> und *L. plantarum* AL30 auf. In den Fingerprints der Amaranthisolate fehlte diese Bande, was darauf hindeutet, dass es sich um einen anderen Stamm handelt. Die Stammunterscheidung basiert im vorliegenden Fall auf einer sehr schwachen Bande. Diese könnte in Abhängigkeit der Qualität der Ausgangs-DNA oder anderen Parametern variieren. Die Wiederholung der PCR resultierte in einem Fingerprint, in dem die entscheidende Bande vorhanden war. Die Isolate wurden nicht eindeutig über RAPD-PCR von *L. plantarum* AL30 differenziert. *L. plantarum* DSM20147<sup>T</sup> und *L. plantarum* AL30 unterschieden sich eindeutig in mehreren Banden (Abbildung 11).

Der Typstamm besaß bei 0,7 kb keine Bande, dagegen aber *L. plantarum* AL30. Diesem fehlte wiederum die Bande unterhalb von 0,6 kb, die Teil des Fingerprints des Typstammes war.

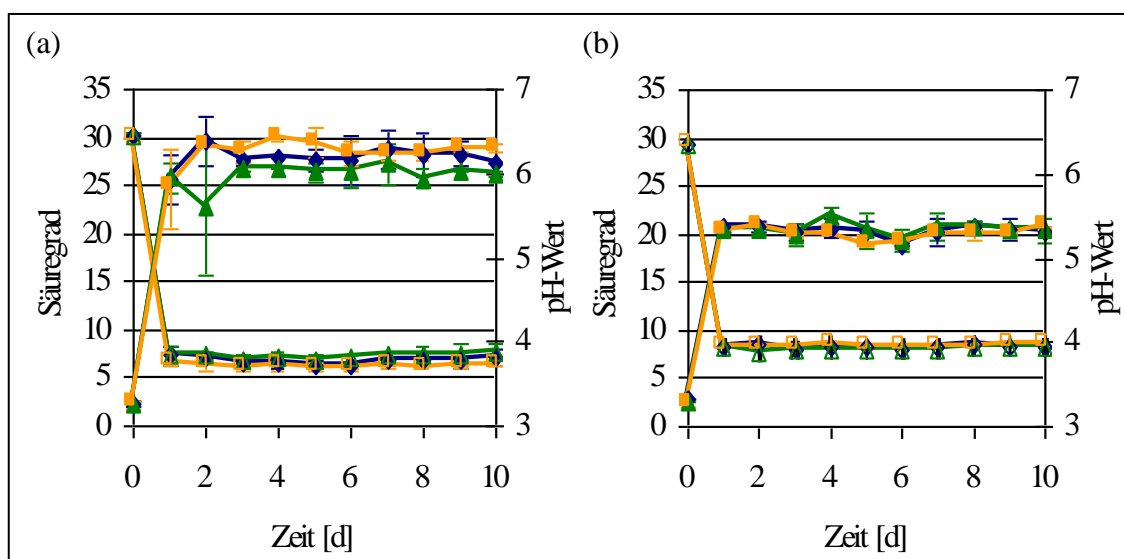
Neben den Milchsäurebakterien wurden die Teige ebenfalls mit RAPD-PCR bzw. Sequenzierung auf Hefen und Schimmelpilze untersucht (Anhang 1, Tabelle 23; Zusammenfassung Datenbankabgleich siehe Anhang 4, Tabelle 40). Die Gattung *Mucor* war in Amaranth vorherrschend, während vereinzelt auch Hefen wie *Candida glabrata* auftraten. *C. glabrata* erreichte nach fünf Propagationsschritten bereits  $10^5$  KbE / g Teig und am Ende der Amaranthfermentation  $10^8$  KbE / g Teig (Abbildung 12a und b). Dies trat allerdings nur in einer Fermentation in zwei parallel geführten Teigen auf, in der dieselbe Charge Amaranthkörner eingesetzt wurde. Ein ähnlicher Fall trat in einer einzelnen Buchweizenfermentation auf. Hier erreichte *Pichia anomala* nach 10 Tagen  $7 \times 10^6$  KbE / g Teig (Abbildung 12c). In allen Fällen lagen die Keimzahlen mindestens um eine Zehnerpotenz unter denen der Milchsäurebakterien. Eine andere Hefe, die aus einem fermentierten Buchweizenteig isoliert wurde, war *Cryptococcus flavescens*. Deren Keimzahlen blieben aber bei  $10^4$  KbE / g Teig (Abbildung 12d) und erreichten somit weniger als die 50 %, bezogen auf die Keimzahlen der Milchsäurebakterien.



**Abbildung 12:** Vergleich der Keimzahlen pro Gramm Sauerteig zwischen Pilzen, Hefen und Milchsäurebakterien (MSB) zweier Amaranth- [(a) und (b)] bzw. Buchweizenfermentationen [(c) und (d)] an Tag 0 (hellblau), Tag 5 (blau-grau) und Tag 10 (dunkelblau).

In den Substraten Amaranth und Buchweizen säuerten *L. paralimentarius* AL28 bzw.

*L. plantarum* AL30 die Teige innerhalb eines Tages auf einen pH-Wert von etwa 4 an (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Verlauf von pH-Wert (leere Symbole) und Säuregrad (ausgefüllte Symbole) in den Substraten Amaranth (a) und Buchweizen (b) in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen), *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen) und beiden Stämmen in Kombination (gelbe Graphen).

Hierbei lagen die Werte im Amaranth durchschnittlich um 0,2 pH-Einheiten unter denen des Buchweizenteiges. Die eingesetzten Kulturen, ob einzeln oder in Kombination, erzielten gleiche Werte. Analog gilt das auch für die Säuregrade im Buchweizen. Die Amaranthfermentationen waren dadurch gekennzeichnet, dass sich erst nach dem zweiten Propagationsschritt stabile Werte zwischen 25 und 30 einstellten. Neben den niedrigeren pH-Werten waren hier entsprechend auch höhere Säuregrade zu verzeichnen als im Buchweizen, in welchem sie bei 20 lagen.

### 3.2 StoffwechsellLeistungen während der Fermentationen in Amaranth und Buchweizen

Wie bereits der Verlauf der pH-Werte und Säuregrade implizierte, unterschieden sich die fermentierten Teige in der Konzentration der mikrobiologisch gebildeten Metabolite. Hierbei traten ebenfalls nur Unterschiede zwischen den verschiedenen Substraten Amaranth und Buchweizen auf. Die eingesetzten Kulturen erzielten jeweils ähnliche Werte. Am Beispiel des Buchweizens wurde gezeigt, dass das auch bezüglich

der verschiedenen Tage innerhalb der Fermentationen galt (Anhang 3, Tabellen 28, 29). Die hauptsächlich in den Teigen nachgewiesenen Säuren waren Milch-, Ameisen- und Essigsäure. Zitronen-, Succinyl- und Propionsäure wurden entweder gar nicht oder nur in so geringen Mengen gemessen, die am Detektionslimit der Anlage bei  $\leq 3$  mM lagen (Anhang 3, Tabelle 30). Die höheren Laktat-Konzentrationen wurden in Amaranth detektiert (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Konzentrationen von Säuren in [mM] in den Substraten Amaranth und Buchweizen nach 10-Tage-Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28, *L. plantarum* AL30 und beiden Stämmen als MSS (AL28+AL30).

	AL28	AL30	AL28+AL30
<b>Amaranth</b>			
Laktat	186,3 ± 2,8	179,2 ± 5,3	198,6 ± 7,9
Formiat	67,0 ± 4,6	46,7 ± 5,6	59,5 ± 4,6
Acetat	5,4 ± 0,7	5,8 ± 1,1	4,8 ± 1,1
Ethanol	162,9 ± 75,7 <sup>2</sup>	137,6 ± 131,3 <sup>2</sup>	63,2 ± 7,2
<b>Buchweizen</b>			
Laktat	143,3 ± 9,3	144,3 ± 14,3	151,2 ± 6,9
Formiat	13,2 ± 1,6	14,2 ± 2,5	13,3 ± 1,4
Acetat	8,0 ± 1,4	9,8 ± 2,4	8,0 ± 1,3
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> n.d. = nicht detektiert

<sup>2</sup> hohe Standardabweichung durch große Varianz zwischen Messungen der Fermentation und Wiederholungsfermentation, Einzelangabe siehe Anhang 3, Tabelle 27

Essigsäure wurde in beiden Substraten in geringen Konzentrationen zwischen 5 mM und 9 mM detektiert. Das molare Verhältnis von Milchsäure zu Essigsäure variierte sowohl in Amaranth, als auch in Buchweizen in Abhängigkeit von den eingesetzten Stämmen. Der Fermentationsquotient der Amaranthteige war generell größer als in den Buchweizenteigen. Dabei wurde in den Teigen mit *L. plantarum* AL30 das niedrigste Verhältnis mit 30,9 bzw. 15,4 erreicht, gefolgt von *L. paralimentarius* AL28 mit 34,5 bzw. 17,8. Der MSS beider Stämme in Kombination erzielte mit 41,4 bzw. 20,4 das höchste molare Konzentrationsverhältnis.

Die höchsten Werte von Ameisensäure wurden ebenfalls mit ca. 58 mM in den Amaranthteigen gemessen. Im Buchweizen lagen die Werte deutlich niedriger bei 14 mM. Die Ethanolkonzentrationen variierten in Abhängigkeit vom jeweiligen Fermentationsansatz in Amaranth, während es im Buchweizen nicht nachgewiesen

wurde. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Ethanolproduktion und den Chargen der Amaranthkörner beobachtet werden. Die Charge ist entscheidend für die Zusammensetzung der autochthonen Mikroflora. Besonders hohe Ethanolkonzentrationen wurden immer dann gemessen, wenn die Belastung des Substrates mit Hefen und Pilzen besonders groß war (III. 3.1; Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Zusammenhang zwischen Florenzzusammensetzung und Ethanoldetektion in den Amaranth-Fermentationen

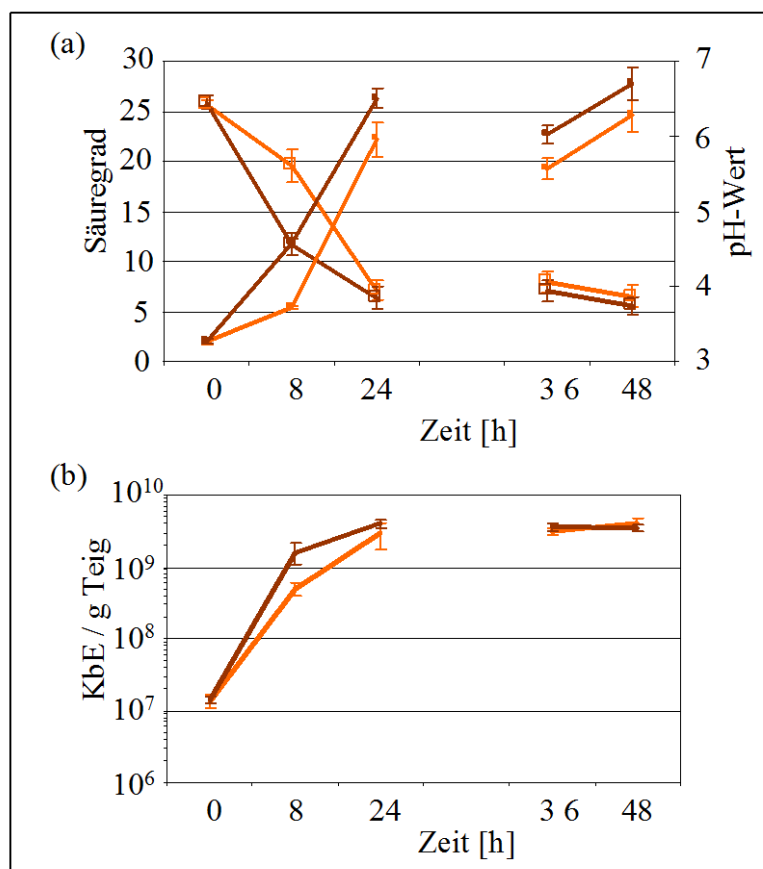
Fermentation	Nr.	Charge	Florentyp	KbE / g Teig auf YGC-Agar	Ethanol [mM]
<b>AL28</b>	F2	I	Hefe / Pilz	$1,0 \times 10^8$	<b>238,5 ± 4,1</b>
	F7	II	Pilz	$2,5 \times 10^5$	<b>87,2 ± 4,4</b>
<b>AL30</b>	F3	I	Hefe	$1,9 \times 10^8$	<b>257,3 ± 8,0</b>
	F8	II	Pilz	$3,4 \times 10^4$	<b>17,9 ± 3,9</b>
<b>AL28+AL30</b>	F9	II	Pilz	$1,3 \times 10^5$	<b>68,6 ± 3,3</b>
	F10	II	Pilz	$2,0 \times 10^5$	<b>57,8 ± 5,4</b>

Bei den Fermentationen F2 und F3, in denen Hefen auftraten, korrelierten die höchsten Keimzahlen von  $10^8$  KbE / g Teig mit den höchsten Ethanolwerten. In Fermentationen, in denen Pilze mit einer Größenordnung von  $10^5$  KbE / g Teig detektiert wurden, waren die Ethanolkonzentrationen um eine Zehnerpotenz niedriger. Die Belastung der Teige mit Hefen wurde einer einzigen Charge nach 10 Fermentationstagen zugeordnet.

### 3.3 Fermentationen mit Variation der Fermentationstemperatur

In den 10tägigen Amaranth-Fermentationen erzielten beide getesteten Stämme einzeln (als ESS) und in Kombination (als MSS) ähnliche Ergebnisse für Säuregrad, pH-Wert und Keimzahlen. Daher wurde der Einfluss der Temperatur auf das Fermentationsverhalten nur mit dem MSS über 48 h getestet. Abweichend von der Standardfermentationstemperatur bei 30°C, wurden die Analysen parallel bei 25°C durchgeführt.

Bereits innerhalb der ersten 8 h sank der pH-Wert mit einer Rate von 0,2 Einheiten pro Stunde im höher temperierten Teig doppelt so schnell wie im Teig, der kälter geführt wurde. Auch die Säuregrade stiegen mit 1,2 Einheiten pro Stunde bei 30°C schneller als bei 25°C mit einer Rate von 0,4 Einheiten pro Stunde (Abbildung 14a).



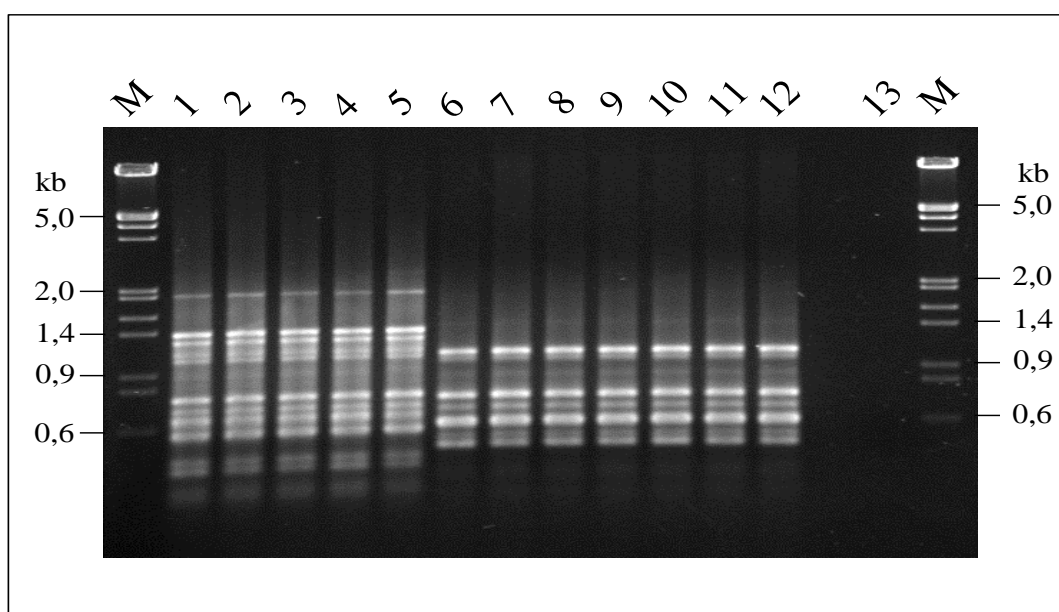
**Abbildung 14:** Verlauf von pH-Wert (leere Symbole) und Säuregrad (ausgefüllte Symbole) (a), sowie Keimzahlen [KbE / g Teig] (b) im Substrat Amaranth in 25°C – (orange) und 30°C – (braun) Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination.

Der Unterschied der Werte zwischen den Teigen zum Zeitpunkt 8 h betrug 1,1 pH- und 6,4 Säuregrad-Einheiten. Im weiteren Verlauf erreichten die pH-Werte beider Teige einen Wert von  $3,9 \pm 0,1$ , während sich die Säuregrade angleichen. Die Differenz der Säuregrade betrug nach 48 h nur noch 3,2 Einheiten. Die unterschiedlichen Werte innerhalb des ersten Propagationsschrittes korrelierten mit den Keimzahlen der eingesetzten Laktobazillen im Teig (Abbildung 14b). Nach 8 h befanden sich die Mikroorganismen im geringer temperierten Teig mit  $5 \times 10^8$  KbE / g noch mitten in der exponentiellen Wachstumsphase, im wärmer temperierten Teig schon in der späten exponentiellen Phase mit  $1,6 \times 10^9$  KbE / g. Nach 24 h war die stationäre Phase erreicht, in der die Keimzahlen bei  $3 \times 10^9$  bzw.  $4 \times 10^9$  KbE / g Teig lagen.

Somit wurde gezeigt, dass beide Fermentationen gleich, wenn auch verzögert, verliefen. Trotz nahezu gleicher Keimzahlen, unterschieden sich die Säuregrade der beiden Teige auch nach 48 h. Dies deutet darauf hin, dass der Stoffumsatz temperaturabhängig ist.

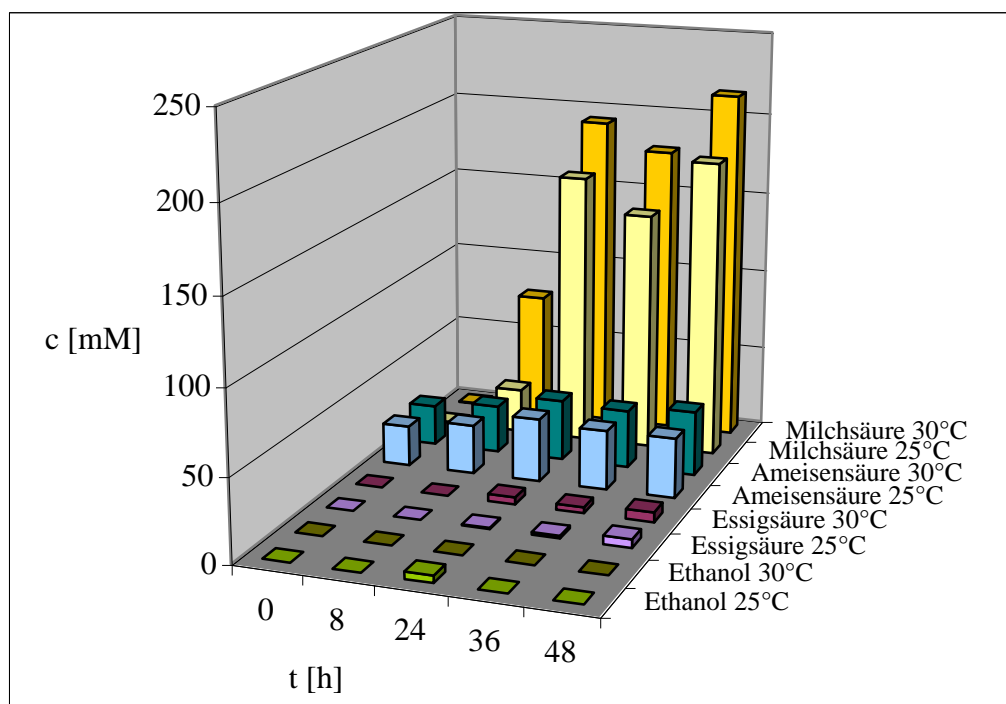


Die optische Unterscheidung der eingesetzten *Lactobacilli*, basierend auf den Koloniemorphologien, wurde mit RAPD-PCR und dem Primer M13V<sub>org</sub> bestätigt (Abbildung 15). Die Fingerprints der eingesetzten Stämme entsprachen denen der Isolate zum Zeitpunkt von 24 h. Bei der während der Fermentationen aufgetretenen Begleitflora handelte es sich überwiegend um Pilze mit Keimzahlen bis zu 10<sup>2</sup> KbE / g Teig. Diese lagen in beiden Teigen bereits nach 24 h in Größenordnungen, die mit der niedrigsten gewählten Verdünnungsstufe nicht mehr detektiert wurden und waren somit unter 10<sup>2</sup> KbE / g Teig einzustufen.



**Abbildung 15:** Agarosegel (1,5 %) mit RAPD-PCR-Produkten von *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30) von Amaranthfermentationen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Proben der Isolate vom Zeitpunkt 24 h wurden wie folgt aufgetragen: Molekulargewichtsmarker  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M), AL30 (1), Morphotyp a aus der 25°C- (2-3) und 30°C-Führung (4-5), AL28 (6), Morphotyp b+c aus der 25°C- (7-9) und 30°C-Führung (10-12), Negativkontrolle ohne Template-DNA (13).

Die unterschiedlichen Werte in den Keimzahlen der exponentiellen Wachstumsphase, sowie bei pH-Wert und Säuregrad spiegeln sich auch in den HPLC-Ergebnissen wieder (Abbildung 16). Im höher temperierten Teig wurde während des gesamten Fermentationsverlaufes mehr Milchsäure detektiert als im niedriger temperierten. Bereits nach 8 h unterschieden sich die Konzentrationen um 40 mM. Nach 24 h wurden im Teig, der bei 30°C geführt wurde, Werte von 192,2 mM  $\pm$  4,5 mM erreicht, die sich bei 25°C erst nach 48 h einstellten. Hier wurden 180,0 mM  $\pm$  7,4 mM erreicht.



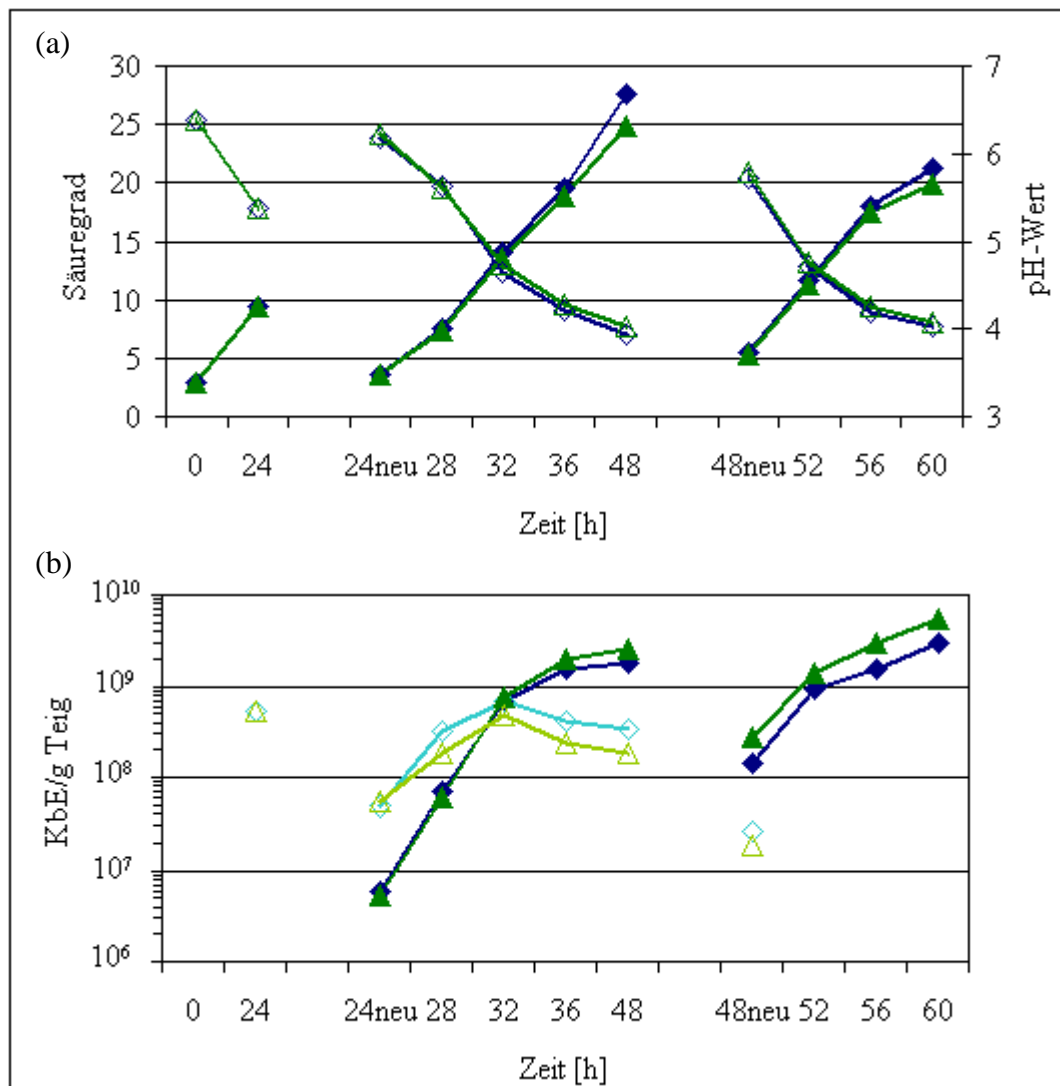
**Abbildung 16:** Konzentrationen organischer Säuren und von Ethanol in [mM] über eine Zeitspanne von 48 h in Amaranthteigen mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 bei unterschiedlichen Führungstemperaturen von 25°C und 30°C.

Die kurzzeitige Reduktion der ermittelten Milchsäurewerte zum Zeitpunkt von 36 h liegt darin begründet, dass die Messung im bereits neu propagierten Teig stattfand. Ameisensäure blieb, unabhängig von der Temperatur, während der gesamten Fermentationen auf einem konstanten Niveau von etwa 35 mM. Geringe Konzentrationen von  $4,2 \text{ mM} \pm 1,2 \text{ mM}$  Essigsäure wurden bei 30°C nach 24 h gemessen. Bei einer Führungstemperatur von 25°C wurden ähnliche Werte erst nach 48 h gemessen. In keinem der Teige wurde zu diesem Zeitpunkt Ethanol detektiert, ebenso wie Propionat, Succinat oder Ziträt (Anhang 3, Tabellen 31 und 32). Der Gärungsquotient lag unabhängig von der Temperatur nach 48 h bei 36.

### 3.4 Durchsetzungsvermögen von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 gegenüber der autochthonen Mikroflora

Die Aussage über das Dominanzverhalten der einzelnen Stämme in den Fermentationen sollte spezifiziert werden. Es wurde überprüft, inwieweit sie sich gegen eine autochthone Mikroflora durchsetzen können, die von  $<10^3$  KbE / g bereits auf einen Wert von  $5 \times 10^8$  KbE / g Teig herangewachsen war. Dazu wurde ein Amaranthteig bei 30°C spontan geführt (II. 2.2; Abbildung 17: 0 bis 24 h). Hierbei sank der pH-Wert von 6,4 auf 5,4 und der Säuregrad stieg von 2,3 auf 9,4 an. *L. paralimentarius* AL28 und

*L. plantarum* AL30 wurden erst im zweiten Propagationsschritt (Abbildung 17: 24neu bis 48 h) jeweils mit  $10^7$  KbE / g Teig eingesetzt.



**Abbildung 17:** Verlauf von pH-Wert (leere Symbole) und Säuregrad (ausgefüllte Symbole) (a) sowie Keimzahlen (b) der inokulierten Stämme (ausgefüllte Symbole) und der Begleitflora (leere Symbole) im Substrat Amaranth in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen) bzw. *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen) nach vorheriger Spontanfermentation (0 – 24 h).

Innerhalb der ersten 8 h stiegen in beiden Teigen sowohl die inokulierten Stämme, als auch die Begleitflora auf Werte von ca.  $7 \times 10^8$  KbE / g Teig. Die Keimzahlen der im Teig vorhandenen Hefen und Schimmelpilze lagen zu diesem Zeitpunkt bereits unter  $10^2$  KbE / g Teig (Anhang 1, Tabelle 24).

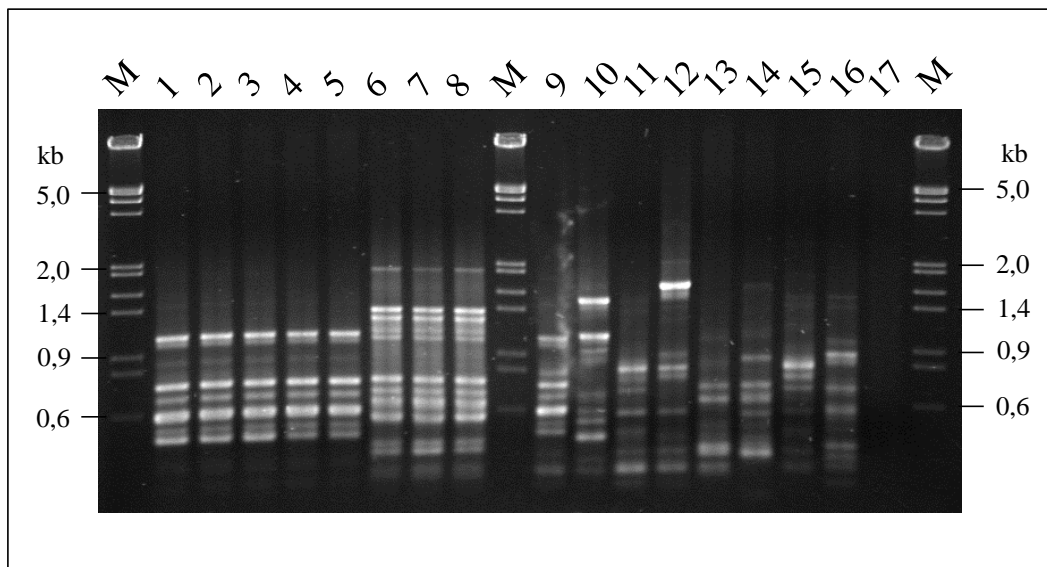
In den folgenden Stunden stiegen die Keimzahlen der zu testenden Stämme weiter auf etwa  $10^9$  KbE / g Teig an, während die Keimzahlen der Begleitflora absanken und eine Zehnerpotenz unter der von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 lagen. Im

erneuten Propagationsschritt sanken die Werte schon nach 4 h auf etwa  $10^6$  KbE / g Teig. Nach einer Gesamtzeit von 60 h befanden sich  $3 \times 10^9$  KbE / g *L. paralimentarius* AL28 bzw.  $5,5 \times 10^9$  KbE / g *L. plantarum* AL30 im Teig. Letzterer Stamm wurde zu diesem Zeitpunkt bereits als einziger Morphotyp auf mMRS5-Agar nachgewiesen und mit RAPD-PCR bestätigt. Im Fall von *L. paralimentarius* AL28 wuchsen vereinzelt noch Kolonien der Begleitflora auf dem Selektivagar. Diese lagen bei den untersuchten Verdünnungsstufen allerdings maximal bei  $10^6$  KbE / g Teig. Die Tendenz der Begleitflorenkeimzahl war weiterhin sinkend.

Mit jedem Propagationsschritt änderten sich die pH-Werte und Säuregrade in den jeweiligen Teigen schneller (Abbildung 17a). Bei Stammzugabe wurde nach 8 h ein pH-Wert von 4,7 und ein Säuregrad von 14 erreicht. Im darauffolgenden Propagationsschritt stellten sich diese Werte bereits nach 4 h ein. Dies korrelierte mit den Keimzahlen, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt  $10^9$  KbE / g Teig erreichten (Abbildung 17b).

Auch hier wurde die morphologische Kolonieunterscheidung mit Primer M13V<sub>org</sub> in der RAPD-PCR bestätigt. Die dem Morphotyp b+c bzw. a zugeordneten Isolate entsprachen auch den eingesetzten Kulturen von *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30 (Abbildung 18).

Die Begleitflora, die sich nach 24 h Spontanfermentation im Teig etabliert hatte, trat in zwei verschiedenen Morphologien auf. Beide waren rund und glänzend, der Durchmesser betrug  $\leq 1$  mm und war somit kleiner als die Morphotypen a und b+c. Desweiteren waren sie weiß bzw. gelb-weiß. Am Ende der Fermentationszeit wurden erstere noch aus dem Teig mit *L. paralimentarius* AL28 isoliert. Unter den RAPD-Fingerprints der Begleitflora waren nur zwei identisch (Abbildung 18, Spur 11 und 15).



**Abbildung 18:** Agarosegel (1,5 %) mit RAPD-PCR-Produkten einer Fermentation zur Durchsetzung von *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30) gegen die autochthone Mikroflora in Amaranth bei 30°C. Die Proben der Isolate vom Zeitpunkt 60 h wurden wie folgt aufgetragen: Molekulargewichtsmarker  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M), AL28 (1), Morphotyp b (2-3) und c (4-5), AL30 (6), Morphotyp a (7-8), Begleitflora vom Teig mit AL28 (9-12), sowie die Proben der Isolate des spontan fermentierten Teiges zum Zeitpunkt von 24 h (13-16) und die Negativkontrolle ohne Template-DNA (17).

Alle 8 Isolate der Begleitflora wurden der Gattung *Enterococcus* zugeordnet (Zusammenfassung Datenbankabgleich siehe Anhang 4, Tabelle 41). Davon wurden 2 Isolate als Spezies *E. mundtii* und 4 als *E. faecium* identifiziert. Der mit denen der Datenbanken (alle Genbanken, EMBL, DDBJ, PDB) verglichene Sequenzbereich umfasste 99 % bis 100 %. Die maximale Identität betrug dabei 99 % bis 100 %. Bei 2 Isolaten der Begleitflora war der Vergleich mit den Referenzsequenzen nicht eindeutig. Tendenziell zeigten hier 41 von 59 Vergleichssequenzen, mit einem Sequenzvergleich von 100 % und einer maximalen Identität von 99 %, die Spezies *E. faecium* an.

### 3.5 Profil als potentielle Starterorganismen während einzelner Propagationsschritte

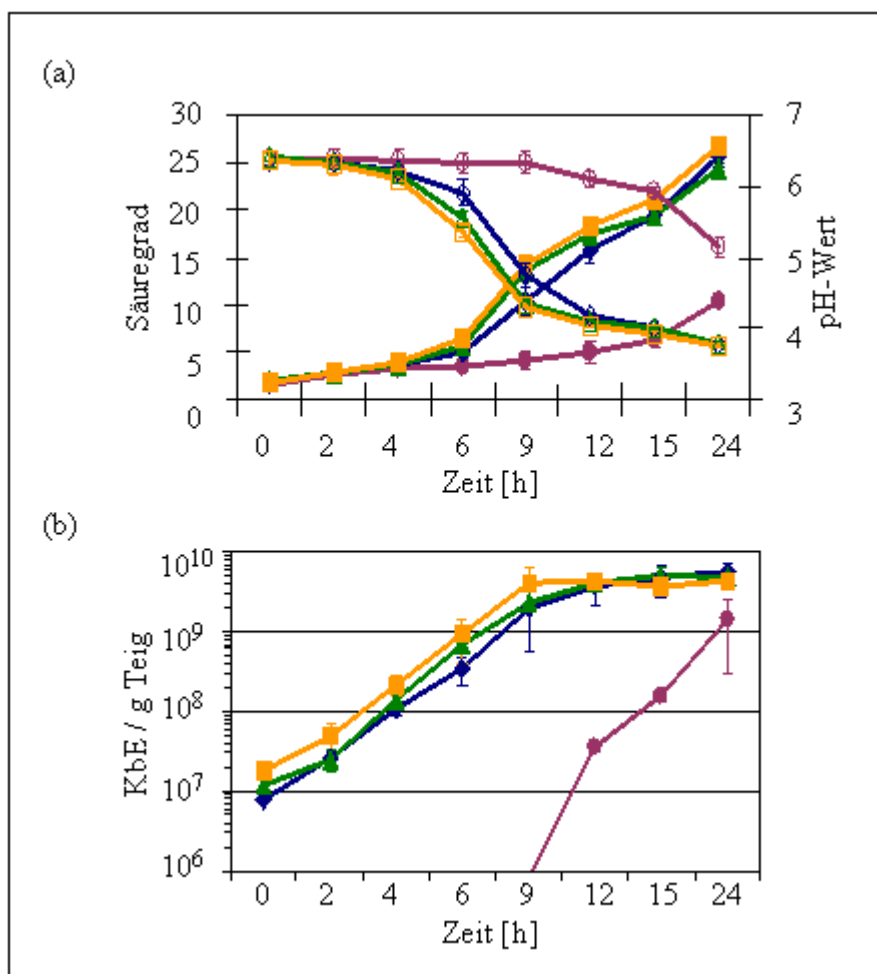
#### 3.5.1 Vergleich von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 untereinander

Die Untersuchung von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 als potentielle Starterkulturen wurde im Detail innerhalb eines Propagationsschrittes in Amaranth untersucht. Hierfür wurden die Stämme einzeln (ESS) und in Kombination als MSS bei 30°C geführt. Parallel dazu wurde zusätzlich ein Kontrollteig ohne externe Zugabe von

Mikroorganismen spontan fermentiert (II. 2.2).

### a) Keimzahlen, pH-Wert und Säuregrad

Während der ersten 4 h änderten sich die pH-Werte und Säuregrade nicht merklich. Zwischen 4 h und 12 h sanken die pH-Werte in den inokulierten Teigen von durchschnittlich 6,2 auf 4,1, während sich die Säuregrade von durchschnittlich 3,7 auf 17,2 erhöhten (Abbildung 19a).



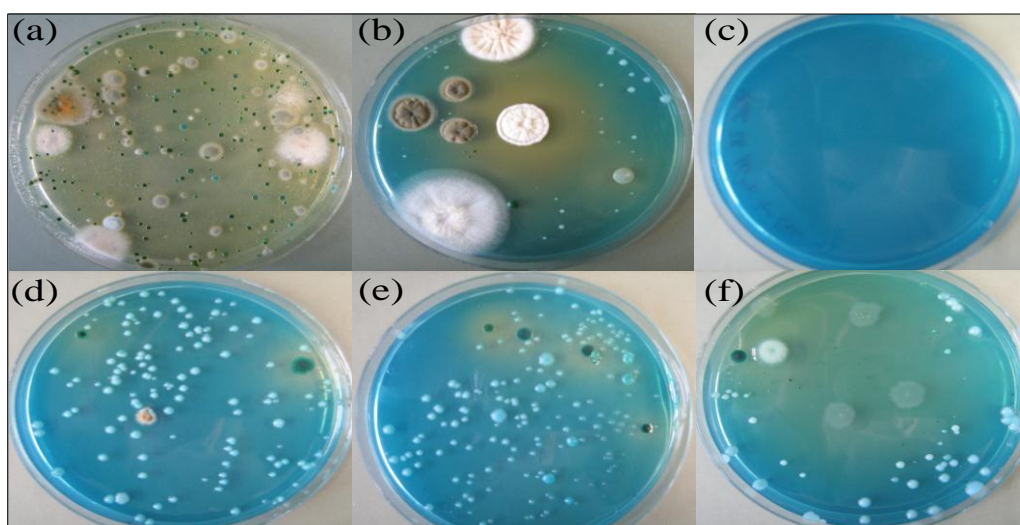
**Abbildung 19:** Verlauf von pH-Wert (leere Symbole) und Säuregrad (ausgefüllte Symbole) (a), sowie Keimzahlen (b) im Substrat Amaranth in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen), *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen), beidn Stämmen in Kombination (gelbe Graphen) und einem spontan geführten Teig (lila Graphen).

In diesem Zeitrahmen war die durchschnittliche Anstiegsrate von 1,8 Säuregrad-Einheiten pro Stunde beträchtlich höher als im Kontrollteig. Mit einer Anstiegsrate von 0,2 Einheiten pro Stunde erhöhte sich hier der Säuregrad von  $3,3 \pm 0,3$  auf  $5,0 \pm 1,1$ .

Der pH-Wert sank im spontan geführten Teig nur langsam und erreichte nach 12 h einen Wert von  $6,1 \pm 0,1$ .

Nach 24 h erreichten die pH-Werte der inokulierten Teige einen End-pH-Wert von 3,8. Die Messung nach dem zweiten Propagationsschritt lag bei 3,8. Im spontan fermentierten Teig lag der pH-Wert nach 24 h bei  $5,2 \pm 0,1$ .

Die Säuregrade stiegen hingegen im zweiten Propagationsschritt noch an und erreichten End-Werte, die mit denen der bisherigen Messungen der 10-Tage-Fermentationen (III. 3.1) übereinstimmten. Im inokulierten Teig mit *L. plantarum* AL30 wurden mit 24,7 die niedrigsten Säuregrade gemessen und im MSS-Teig mit 28,6 die höchsten. Die exponentielle Wachstumsphase des MSS endete nach 9 h, die der ESS erst nach 12 h (Abbildung 19b). Beim Erreichen der stationären Wachstumsphase lagen die Keimzahlen zwischen  $10^9$  und  $10^{10}$  KbE / g Teig. Nach 12 h Fermentation wurden im Teig vorkommende Hefen und Schimmelpilze sukzessive verdrängt. Nach 24 h wurden sie nur noch in geringen Mengen detektiert, während sie im spontan fermentierten Teig mit bis zu  $10^6$  KbE / g Teig präsent waren (Abbildung 20).

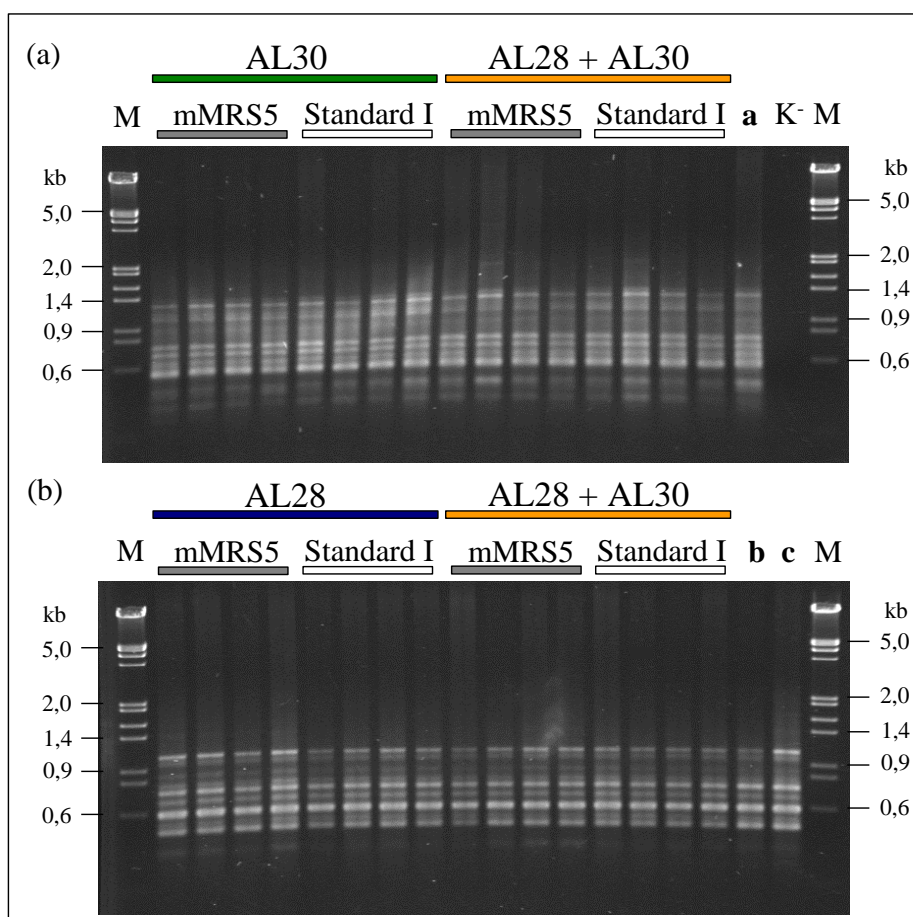


**Abbildung 20:** YGC-Agar mit  $10^{-2}$ -Verdünnung des Amaranthteiges mit AL28 nach 0 h (a), 12 h (b) und 24 h (c) der Fermentation, sowie  $10^{-4}$ -Verdünnung des spontan fermentierten Teiges nach 0 h (d), 12 h (e) und 24 h (f) der Fermentation.

Diese hohen Werte repräsentieren allerdings nur ein Fermentationsexperiment. In der Wiederholung war das Mehl nicht in solchem Ausmaß mit Hefen und Pilzen belastet. Hier lagen die Keimzahlen bereits nach 12 h unter  $10^3$  KbE / g Teig. Morphologisch wurden die Pilze am Ende der Fermentation, nach 48 h, der Gattung *Mucor* zugeordnet. Allerdings wurde eine generelle Verbindung zwischen dem Rückgang der Hefen bzw. Schimmelpilze und dem Erreichen der Keimzahl an Milchsäurebakterien von

$10^9$  KbE / g Teig beobachtet. Dies traf auch für den spontan fermentierten Teig zu, in dem zwar im Allgemeinen höhere Keimzahlen zu verzeichnen waren, jedoch mit Zunahme an Milchsäurebakterien auch hier die Zahl der eukaryotischen Begleitflora sank.

Auf Standard-I-Agar wurde die Gesamtkeimzahl bestimmt. Diese entsprach am Fermentationsende in etwa den Werten der eingesetzten Stämme. Dabei wurden zwei Morphotypen, h und k, auf diesem Agar beschrieben. Bei beiden handelte es sich um glatte, runde, weiße Kolonien mit ca. 1 mm bzw. unter 1 mm Durchmesser. Je fünf Kolonien der zwei Morphotypen h und k dieses Agars wurden, ebenso wie je fünf Proben vom mMRS5-Agar, mit Primer M13V<sub>org</sub> in der RAPD-PCR untersucht und überprüft, ob es sich dabei um die eingesetzten Stämme handelte (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Agarosegel (1,5 %) mit Vergleich der RAPD-PCR-Produkte von Isolaten verschiedener Agar (mMRS5 und Standard I) der Fermentationen von *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30) einzeln und in Kombination (AL28+30) in Amaranth bei 30°C. Neben dem Molekulargewichtsmarker  $\lambda$ HindIII/EcoRI (M) wurden die Proben der Isolate vom Morphotyp a der Kultur AL30 (a), sowie die Proben der Isolate vom Morphotyp b und c der Kultur AL28 (b c) im Vergleich mit den Isolaten der entsprechenden Agar zum Zeitpunkt 24 h aufgetragen. Mitgeführt wurde eine Negativkontrolle ohne Template-DNA (K<sup>-</sup>).



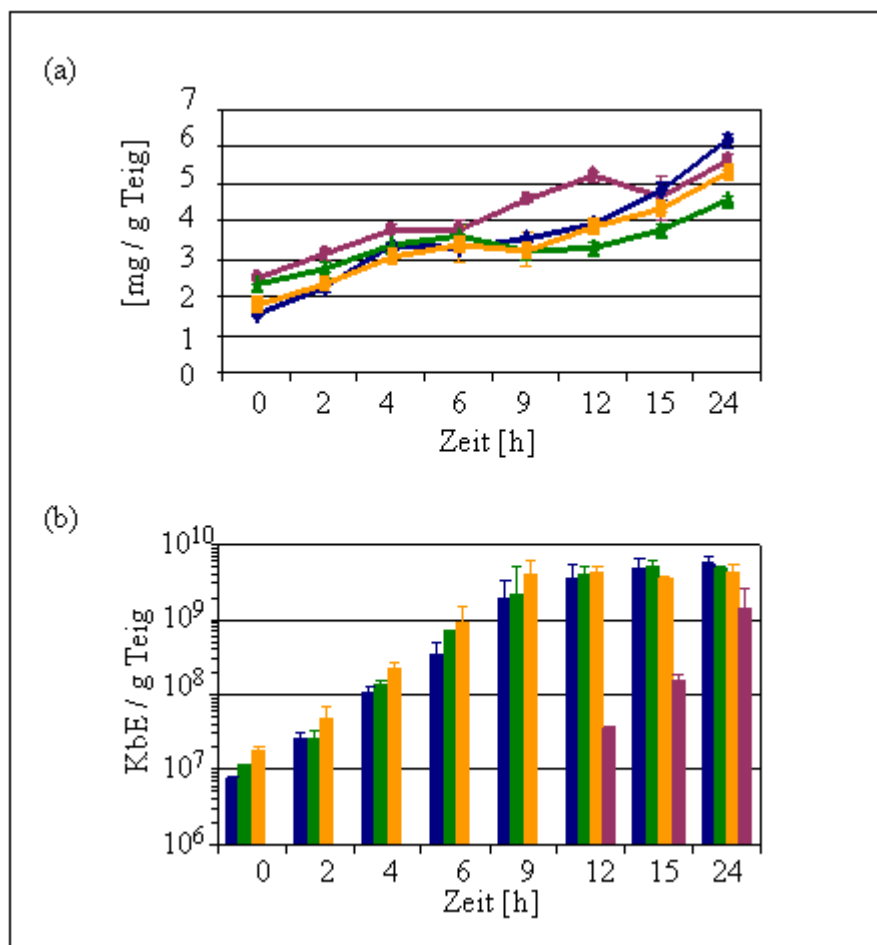
Somit konnte eingeschätzt werden, in wie weit die Keimzahlen auf dem Selektivagar für Laktobazillen der Gesamtkeimzahl entsprechen. Es wurden die RAPD-Profile der Proben von Morphotyp a des mMRS5-Agars und der entsprechende Morphotyp h des Standard-I-Agars der verschiedenen Teige miteinander verglichen (Abbildung 21a). Ebenso die Morphotypen b+c mit dem entsprechenden Morphotyp k (Abbildung 21b). Es wurde nachgewiesen, dass die Fingerprints der Morphotypen a und h bzw. b+c und k jeweils dieselben Muster und somit gleiche Stammzugehörigkeit zeigten.

#### **b) Proteolyse**

Neben pH-Wert, Säuregrad und Keimzahlen, wurde auch der Einfluss der Stämme *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 auf die proteolytischen Vorgänge im Teig betrachtet (Rohdaten siehe Anhang 2). In den ersten sechs Stunden stieg die Konzentration an freien Aminosäuren in allen vier Teigen auf Werte zwischen 3,3 und 3,7 mg / g Teig an. In der folgenden Fermentationszeit blieben die Werte in allen inokulierten Teigen konstant zwischen 3,2 und 3,6 mg / g Teig (Abbildung 22a).

Das ist ein Indiz für den im Gleichgewicht stehenden Katabolismus und Anabolismus freier Aminosäuren in der exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen. Die Ausnahme war der spontan fermentierte Teig, indem ein Anstieg auf  $4,6 \text{ mg / g} \pm 0,1 \text{ mg / g}$  Teig stattfand. Die exponentielle Wachstumsphase war hier zu diesem Zeitpunkt noch nicht in dem Maße fortgeschritten, wie in den inokulierten Teigen. Die Keimzahlen erreichten erst nach 12 h  $3,6 \times 10^7 \text{ KbE / g}$  Teig (Abbildung 22b).

Mit dem Übergang in die stationäre Phase zwischen 9 h und 12 h nahm die Konzentration an freien Aminosäuren in den inokulierten Teigen mit einer durchschnittlichen Rate von  $0,2 \text{ mg / g / h}$  wieder zu, während im Teig von AL30 die Werte erst nach 12 h mit einer Rate von  $0,1 \text{ mg / g / h}$  wieder stiegen. Nach 24 h lagen die Werte zwischen  $4,6 \pm 0,1$  und  $6,2 \pm 0,2 \text{ mg / g}$  Teig. Die niedrigsten Konzentrationen wurden in dem Teig gemessen, der mit *L. plantarum* AL30 inokuliert wurde, während der größte Anteil im Teig mit *L. paralimentarius* AL28 vorherrschte.

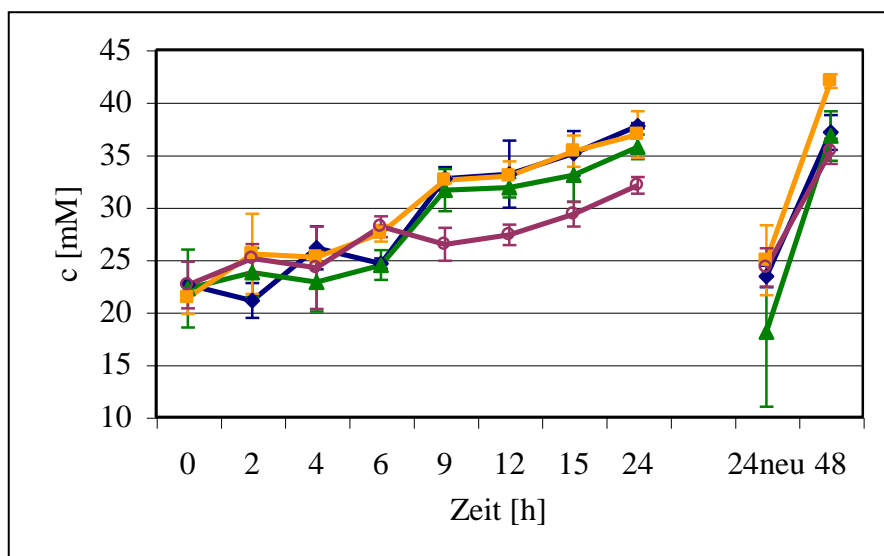


**Abbildung 22:** Verlauf der Konzentration an freien Aminosäuren (a) und Keimzahlen (b) im Substrat Amaranth in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Säulen/Graphen), *L. plantarum* AL30 (grüne Säulen/Graphen), beiden Stämmen in Kombination (gelbe Säulen/Graphen) und einem spontan geführten Teig (lila Säulen/Graphen).

### c) Produktbildung

Die HPLC-Resultate innerhalb des ersten Propagationsschrittes korrelierten mit den pH-Werten und Säuregraden (III. 3.5.1.a).

Zu Beginn der Fermentationen wurde in allen Teigen bei der Analyse organischer Säuren lediglich Ameisensäure mit ca. 22 mM detektiert. Diese stieg kontinuierlich im Fermentationsverlauf an (Abbildung 23).

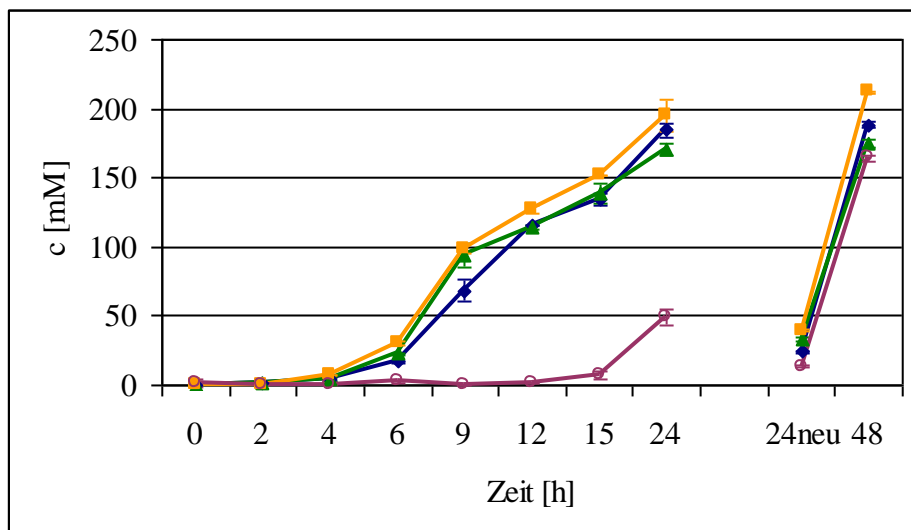


**Abbildung 23:** Konzentrationen von Ameisensäure in [mM] in Amaranthfermentationen bei 30°C ohne Starterzugabe (lila Graph) bzw. mit *L. paralimentarius* AL28 (blauer Graph), *L. plantarum* AL30 (grüner Graph) und beiden in Kombination (gelber Graph).

Zwischen 6 h und 9 h, also am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der potentiellen Starterorganismen, erhöhten sich die Konzentrationen mit einem durchschnittlichen Anstieg von 2,5 mM / h bei den ESS von 24,6 mM auf 32,2 mM in Bezug auf den Gesamtverlauf der Grafen am stärksten. Der MSS beider Stämme stieg mit einer Rate von 1,7 mM / h auf 32,6 mM  $\pm$  0,3 mM. Im spontan geführten Teig blieb zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg aus. Zwischen 9 h und 24 h differierten die Werte zwischen den mit den potentiellen Starterkulturen inokulierten und dem spontan geführten Teig um 6 mM. Nach 48 h wurde im Teig mit beiden potentiellen Starterorganismen als MSS mit 42,0 mM  $\pm$  0,7 mM deutlich höhere Werte gemessen, als in den Teigen, in denen sie als ESS eingesetzt wurden bzw. dem spontan fermentierten. Die Konzentration der Ameisensäure erhöhte sich in allen Teigen bis zum Fermentationsende durchschnittlich um 13 mM, den Kontrollteig eingeschlossen.

In allen Teigen wurden erste Milchsäurewerte nach 4 h detektiert. In den Teigen mit AL30 bzw. dem MSS aus AL30 und AL28 erfolgte der größte Anstieg mit 23,9 mM / h bzw. 22,8 mM / h zwischen 6 h und 9 h. Im Teig mit AL28 dauerte dieser Prozess mit einem Anstieg von 16,4 mM / h bis zu 12 h. Die Werte von AL28 lagen bis zu diesem Zeitpunkt etwas unter denen der anderen Teige, erzielte im folgenden Fermentationsverlauf aber höhere Werte als der ESS AL30. In der Zeitspanne bis 24 h wurden in den Sauerteigen mit den potentiellen Starterkulturen Werte von ca. 184 mM

erreicht (Abbildung 24a) und ebenso nach 48 h ermittelt. Dabei wurde die größte Milchsäurekonzentration von  $211,8 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$  in den Ansätzen mit dem MSS aus AL28 und AL30 erhalten.

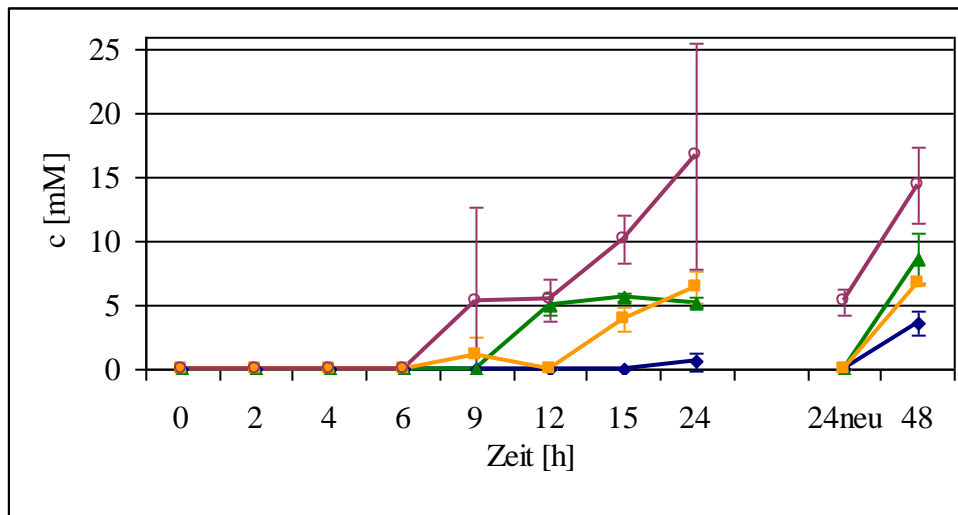


**Abbildung 24:** Konzentrationen von Milchsäure in [mM] in Amaranthfermentationen bei  $30^\circ\text{C}$  ohne Starterzugabe (lila Graphen) bzw. mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen), *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen) und beiden Stämmen in Kombination (gelbe Graphen).

Im spontan fermentierten Teig stieg der Gehalt an Milchsäure allerdings nur sehr langsam an. Hier waren es nach 15 h erst 7 mM, 49 mM nach 24 h und erst am Ende des zweiten Propagationsschrittes wurden 165 mM erreicht. Damit lag die Konzentration zwar unterhalb derer der inokulierten Teige, aber im gleichen Größenbereich.

Essigsäure wurde zuerst im nicht inokulierten Teig nach einer Fermentationszeit von 9 h mit 5 mM detektiert (Abbildung 25).

Ähnliche Werte stellten sich nach 12 h im Teig mit AL30 und zwischen 15 und 24 h im Teig mit dem MSS aus AL28 und AL30 ein. Im Amaranthteig, der mit dem Stamm AL28 inokuliert wurde, lagen die Werte auch nach 48 h Fermentation unter 5 mM Essigsäure. In den anderen beiden, mit Starterorganismen inokulierten, Teigen lagen die Werte knapp über 5 mM. Die höchsten Konzentrationen wurden im spontan fermentierten Teig mit  $16,7 \text{ mM} \pm 8,9 \text{ mM}$  gemessen. Alle Werte, die in diesen Kontrollteigen gemessen wurden unterlagen solchen Schwankungen, die in großen Standardabweichungen bis zu 141 % resultierten. Wurden definierte Stämme eingesetzt, waren die Standardabweichungen nicht größer als 22 %.



**Abbildung 25:** Konzentrationen Essigsäure in [mM] in Amaranthfermentationen bei 30°C ohne Starterzugabe (lila Graphen) bzw. mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen), *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen) und beiden Stämmen in Kombination (gelbe Graphen).

Das molare Verhältnis von Milchsäure zu Essigsäure stieg in der Teigprobe mit *L. plantarum* AL30 über die Fermentationszeit von 22 auf 33 an, da bei gleichbleibender Essigsäurekonzentration der Gehalt an Milchsäure weiter stieg. Im Amaranthsauerteig mit dem MSS aus AL30 und AL28 verringerte sich das molare Verhältnis zwischen 9 h und 24 h von 95 auf 30. Im spontan geführten Teig stellte sich ein Fermentationsquotient von 3 ein.

Zitronen-, Succinyl- und Propionsäure wurden gar nicht oder in so geringen Mengen detektiert, dass sie unter der Nachweisgrenze lagen (Anhang 3, Tabellen 33-36).

Ethanol wurde ohne eine erkennbare Gesetzmäßigkeit in einzelnen Fermentationen detektiert. Die Werte schwankten von nicht detektiert bis zu 17 mM in den beimpften Teigen und erreichten Werte bis zu 71 mM im spontan geführten Kontrollteig.

Obwohl beide Stämme in mMRS5-Bouillon (Tabelle 2) Mannitol gebildet haben, wurde es im Amaranthteig, den Kontrollteig eingeschlossen, nicht detektiert.

Fruktose wurde nicht abgebaut und blieb im Fermentationsverlauf bei ca. 42 mM. In Einzelfällen wurde Fruktose zwischen 15 h und 24 h gebildet und erreichte Werte bis zu 80 mM. Im spontan geführten Kontrollteig stiegen die Fruktosekonzentrationen bei 15 h

auf 66 mM bis 82 mM und sanken danach auf 53 mM bzw. unter das Detektionslimit (siehe Anhang 3, Tabellen 33-36).

Die Saccharose- und Zellobiosekonzentrationen sanken im Fermentationsverlauf kontinuierlich von durchschnittlich 45 mM bzw. 41 mM bis unter das Detektionslimit. Ausnahme bildete eine Einzelfermentation mit *L. plantarum* AL30, in der die Konzentration von Saccharose und Zellobiose bis zum Fermentationsende von 58 mM bzw. 60 mM kontinuierlich bis auf 47 mM bzw. 55 mM abnahm (siehe Anhang 3, Tabellen 33-36).

Im Laufe der Fermentationen wurde Gentobiose gebildet. Die Werte erreichten durchschnittlich 55 mM. In den Wiederholungsfermentationen, ausgenommen der Teig mit dem MSS, wurde Gentobiose nicht detektiert (siehe Anhang 3, Tabellen 33-36).

Trehalose verhielt sich, unabhängig von der eingesetzten Kultur, ohne eine erkennbare Gesetzmäßigkeit. Im spontan fermentierten Teig herrschte über den gesamten Fermentationsverlauf eine Konzentration von durchschnittlich 26 mM. In der Wiederholungsfermentation erreichte die Konzentration bei 9 h ein Maximum von 62 mM und sank bis zum Fermentationsende auf 50 mM. Diese Konzentrationsverläufe wurden auch in den Teigen mit *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30 verzeichnet (siehe Anhang 3, Tabellen 33-36).

#### **3.5.2 Vergleich von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 mit kommerziell erhältlichen Sauerteigstarterkulturen**

Damit die getesteten Stämme *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 hinsichtlich ihres Fermentationsverhaltens bewertet werden konnten, wurden sie einerseits mit einer Mehrstammstarterkultur aus Milchsäurebakterien und Hefen (IS1), andererseits mit der Industriestarterkultur *L. fermentum* (IS2) in Parallelfermentationen verglichen. Diese wurden bei 30°C im Amaranth durchgeführt. Laut Herstellerangaben bestand der IS1, ein frischer Sauerteig, aus verschiedenen Milchsäurebakterien-Spezies ( $10^9$  KBE / g  $\pm$  50 %). Um einen Überblick über die aktuelle Zusammensetzung des IS1 zu erhalten, wurden daraus gewonnene Isolate näher analysiert. Es wurden 5

verschiedene Morphotypen auf mMRS5-Agar dokumentiert und über Sequenzierung der 16S rDNA identifiziert (Tabelle 20; Anhang 4, Tabelle 42).

**Tabelle 20:** Isolate der Reissauerteig-Starterkultur IS1

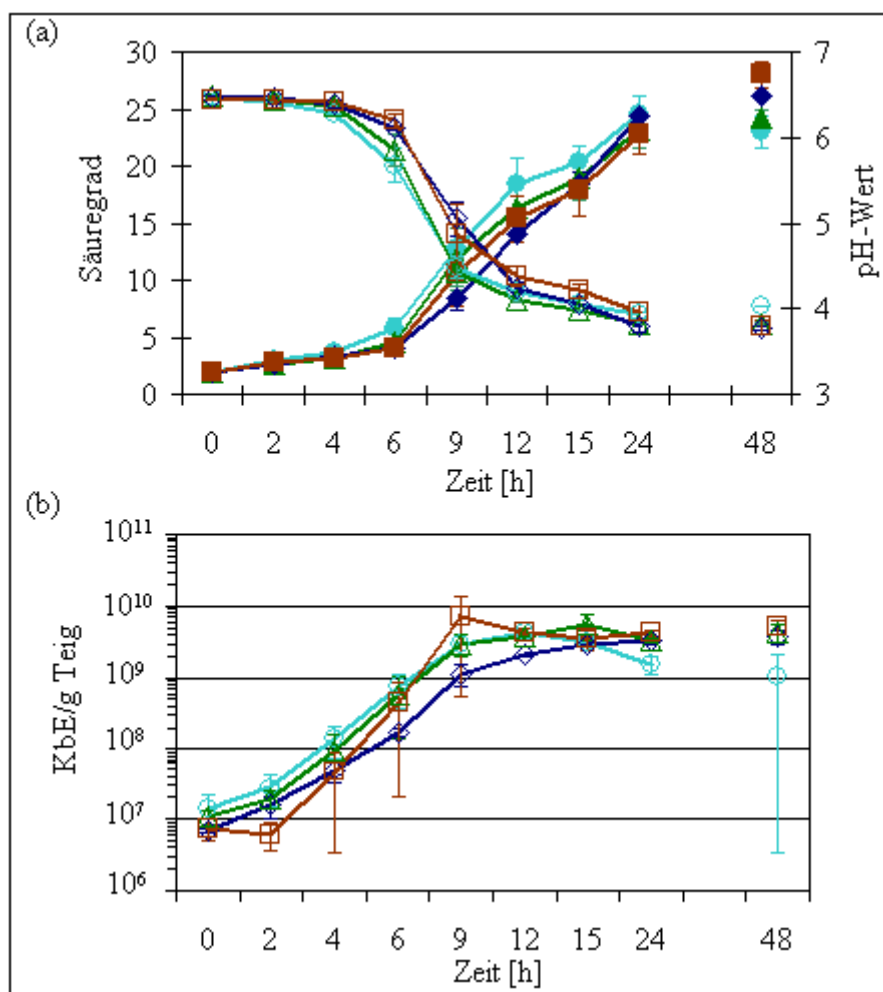
Isolatnr.	Beschreibung	identifizierte Spezies
1	rund, erhaben, gelblich-weiß, Ø 1,5-2 mm	<i>L. casei</i>
2	Morphotyp c	<i>L. paralimentarius</i>
3	rund, erhaben, weiß, Ø max. 1,5 mm	<i>L. plantarum</i>
4	rund, flach, grünlich –weiß mit dunklem Zentrum, Ø ca. 1,5 mm	<i>Leuconostoc lactis</i>
5	Morphotyp a	<i>L. plantarum</i>

Die Identifizierung von Isolat 3 und 5 war beinahe eindeutig. Bei denen durch die Datenbank angegebenen Vergleichssequenzen gab es sowohl Übereinstimmung mit *L. plantarum*, als auch mit *L. pentosus*. Bei beiden Organismen handelt es sich um eng verwandte Spezies. Die Interpretation der Isolate als *L. plantarum* liegt darin begründet, dass es sich bei den Referenzen zu *L. pentosus* um Daten handelte, die einzig in der Datenbank publiziert wurden. Es gab auch keine Übereinstimmung mit einem entsprechenden DSMZ- oder ATCC-Stamm. Der überwiegende Teil der Vergleichssequenzen repräsentierten *L. plantarum*.

Folglich bestand der MSS zum Zeitpunkt der Fermentationsexperimente aus 3 *Lactobacillus*-Spezies und *Leuconostoc lactis*. Sie bildeten eine Gesamtkeimzahl von  $3,8 \times 10^9$  KbE / g Vorteig.

#### a) pH-Wert, Säuregrad und Keimzahlen

Zunächst änderten sich auch in diesem Experiment Säuregrad und pH-Wert innerhalb der ersten 4 h nicht merklich, obwohl sich die Starterkulturen ab einem Zeitpunkt von 2 h bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die größten Änderungen der Messwerte waren für alle Teige zwischen 4 h und 12 h zu verzeichnen (Abbildung 26a). Nach 24 h Fermentation bewegten sich die pH-Werte zwischen dem niedrigsten Wert im Teig von *L. paralimentarius* AL28 mit  $3,8 \pm 0,1$  und Maximalwerten von  $4,0 \pm 0,1$  im Teig von IS1. Die Säuregrade waren zu diesem Zeitpunkt im Teig von MSS IS1 mit  $22,9 \pm 1,8$  am geringsten und im Teig von ESS IS1 mit  $24,5 \pm 1,6$  am größten. Somit erreichten die Industriestarterkulturen sowohl den höchsten, als auch den niedrigsten Wert.



**Abbildung 26:** Verlauf von pH-Wert (leere Symbole) und Säuregrad (ausgefüllte Symbole) (a) sowie Keimzahlen (leere Symbole) (b) im Substrat Amaranth in 30°C – Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 (blaue Graphen) bzw. *L. plantarum* AL30 (grüne Graphen) im Vergleich mit MSS IS1 (braune Graphen) bzw. ESS IS2 (hellblaue Graphen).

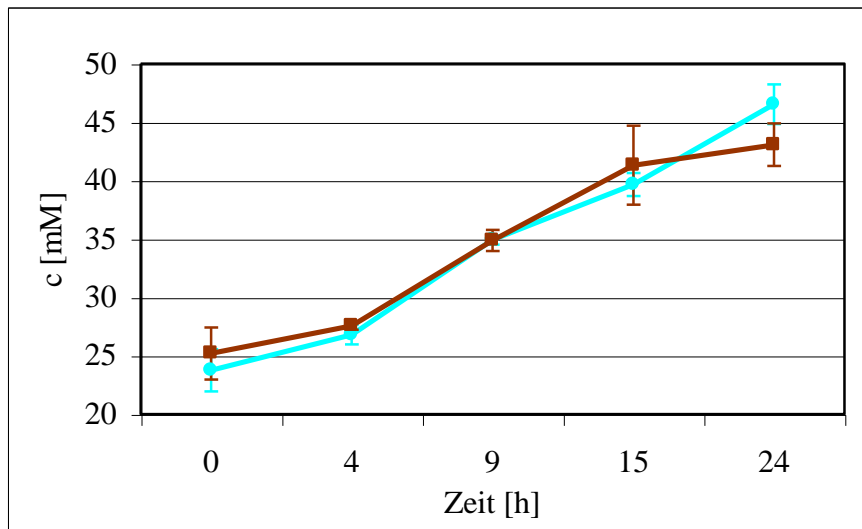
Der Verlauf der Keimzahlen variierte je nach eingesetztem Starterorganismus. Nach neun Fermentationsstunden wurden in allen Teigen Keimzahlen  $\geq 10^9$  KbE / g Teig dokumentiert (Abbildung 26b). Nach 24 h erreichte der MSS IS1 mit  $4,1 \times 10^9 \pm 4,2 \times 10^8$  KbE / g Teig die höchsten Keimzahlen, während die Werte des ESS IS2 bereits nach 12 h abnahmen und nach einem Propagationsschritt mit  $1,6 \times 10^9 \pm 4,5 \times 10^8$  KbE / g Teig die niedrigsten Messwerte bildeten.

### b) Metabolische Aktivitäten

*L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 verhielten sich bezüglich ihres Metabolismus wie unter Punkt 3.5.1 erläutert und werden daher im Folgenden nicht erneut näher beschrieben.



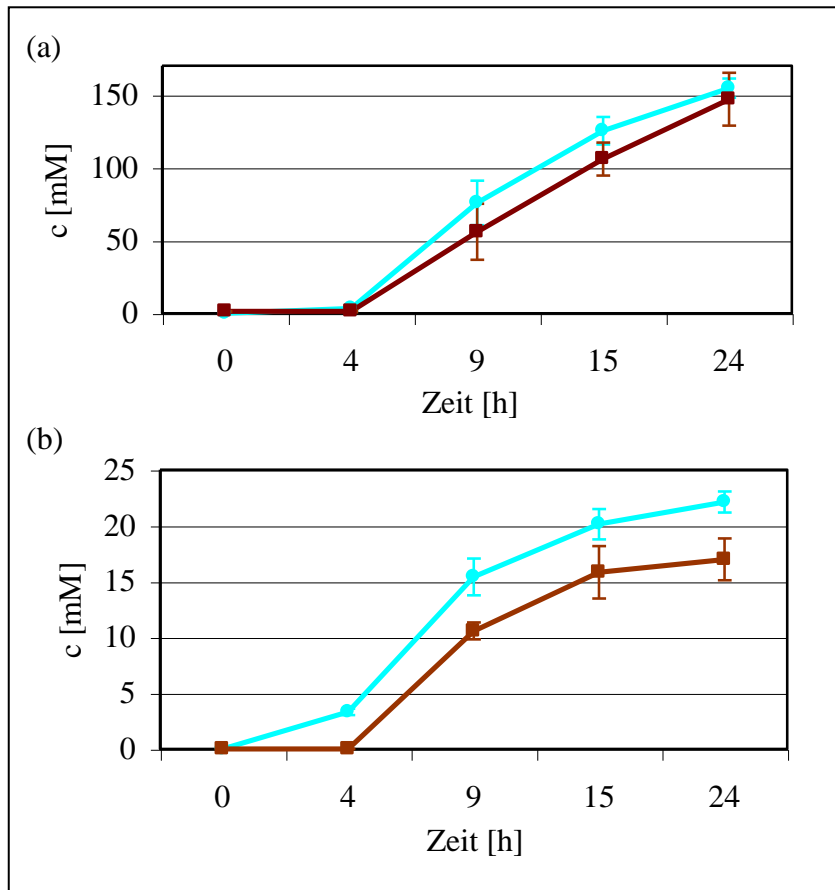
Die zu Beginn der Fermentationen gemessenen Konzentrationen an Ameisensäure stiegen innerhalb eines Propagationsschrittes in den Teigen mit ESS IS2 und MSS IS1 kontinuierlich an (Abbildung 27). Die größte Anstiegsrate von 1,2 mM/h wurde zwischen 4 und 15 h gemessen. Während die Werte im Teig mit IS2 auf  $46,5 \text{ mM} \pm 1,7 \text{ mM}$  anstiegen, änderten sich im weiteren Verlauf die Werte des Teiges mit IS1 kaum und erreichten nach 24 h eine Endkonzentration von  $43,1 \text{ mM} \pm 1,6 \text{ mM}$ .



**Abbildung 27:** Konzentrationen von Ameisensäure in [mM] in Amaranthfermentationen bei 30°C mit MSS IS1 (brauner Graph) und ESS IS2 (blauer Graph).

Die Konzentration der Ameisensäure erhöhte sich bis zum Fermentationsende durchschnittlich um 20 mM.

In beiden Teigen wurden erste Milchsäurewerte nach 4 h detektiert, die im Teig mit dem ESS IS2 in der Zeitspanne bis 15 h am stärksten zunahmten (Abbildung 28a). Die Anstiegsrate betrug 11 mM/h und zwischen 15 h und 24 h nur noch 3,3 mM/h. MSS IS1 stieg dagegen weiter mit einer Rate von 4,6 mM/h an. Nach 24 h wurden in beiden Teigen Werte von ca. 151 mM erreicht.



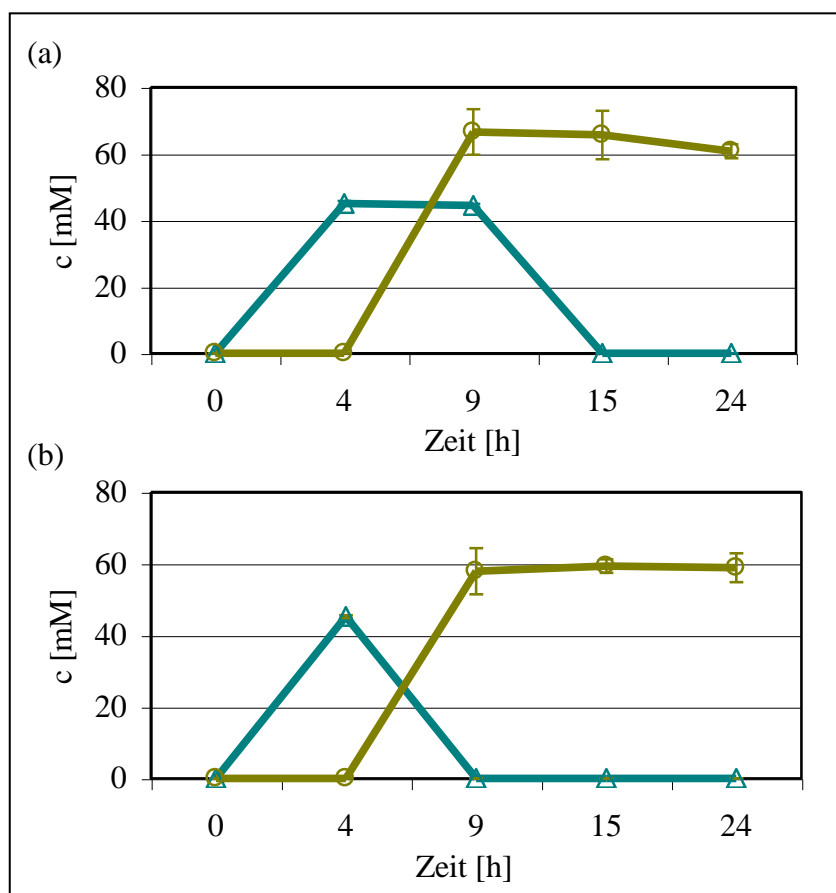
**Abbildung 28:** Konzentrationen von Milchsäure (a) und Essigsäure (b) in [mM] in Amaranthfermentationen bei 30°C mit MSS IS1 (braune Graphen) und ESS IS2 (blaue Graphen).

Die Essigsäurekonzentration war im Teig mit ESS IS2 immer um ca. 4 mM höher, als in dem mit MSS IS1 (Abbildung 28b). Die Produktion wurde erstmals nach 4 h bei IS2 detektiert und nach 9 h im Teig mit IS1. In Bezug zum gesamten Fermentationsverlauf, war die Anstiegsrate mit 2,4 mM / h bzw. 5,3 mM / h zwischen 4 h und 9 h am größten. Am Ende des ersten Propagationsschrittes wurden in den Teigen mit IS2 22,1 mM  $\pm$  0,9 mM bzw. mit IS1 17,0 mM  $\pm$  1,9 mM detektiert.

Das molare Verhältnis von Milch- zu Essigsäure stieg im Fall von IS2 zwischen 4 und 24 h von 1 auf 7. Auch im Teig von IS1 wurde nach 24 h ein Fermentationsquotient von 8,6 erreicht.

Ein weiterer, in den Teigen der Industriestarterkulturen nachgewiesener Metabolit, war Mannitol. Es wurde jeweils zwischen 4 h und 9 h gebildet und blieb danach auf einem konstanten Niveau von etwa 60 mM.

Der Zusammenhang zwischen Fruktose- und Mannitolbildung ist im Stoffwechsel begründet und der zeitliche Konzentrationsverlauf in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29:** Konzentrationsverlauf von Fruktose (blaue Graphen) und Mannitol (olivgrüne Graphen) in [mM] in einer Beispielfermentation im Amaranth bei 30°C mit MSS IS1 (a) und ESS IS2 (b).

Mannitolbildung erfolgte um einen Messpunkt zeitversetzt immer dann, wenn Fruktose in den Teigen detektiert wurde. Die Werte betragen durchschnittlich 47 mM. Im Fall des MSS von IS1 blieb die Konzentration an Fruktose zunächst konstant und sank bis 15 h wieder auf 0 mM ab. Bei ESS IS2 sank der Fruktosegehalt bereits zwischen 4 h und 9 h unter das Detektionslimit.

Zellobiose wurde in beiden Teigen zu Beginn der Fermentation mit durchschnittlich 43 mM detektiert, Saccharose mit 47 mM. Nach 9 h wurden beide Zucker nicht mehr im Amaranthteig mit MSS IS1 detektiert. Dieser Fall trat beim Einsatz von ESS IS2 erst nach 15 h auf.

Der Verlauf der jeweiligen Zucker und Zuckeralkohole in einem Zeitrahmen von 24 h wurde in jeder der Fermentationen beobachtet (Rohrdaten siehe Anhang 3, Tabellen

37, 38). Lediglich die Konzentrationswerte schwankten in Abhängigkeit von der Lagerdauer der verwendeten Mehlladung. So schwankten in den Fermentationen mit IS2 die Mannitolwerte von 60 mM bis 122 mM in der Wiederholungsfermentation. Trehalose wurde mit ca. 25 mM detektiert, diese Werte lagen in der Wiederholungsfermentation, abgesehen von der Messung bei 24 h, in Größenordnungen unter dem Detektionslimit. Gentobiose wurde in keinem der Teige detektiert.

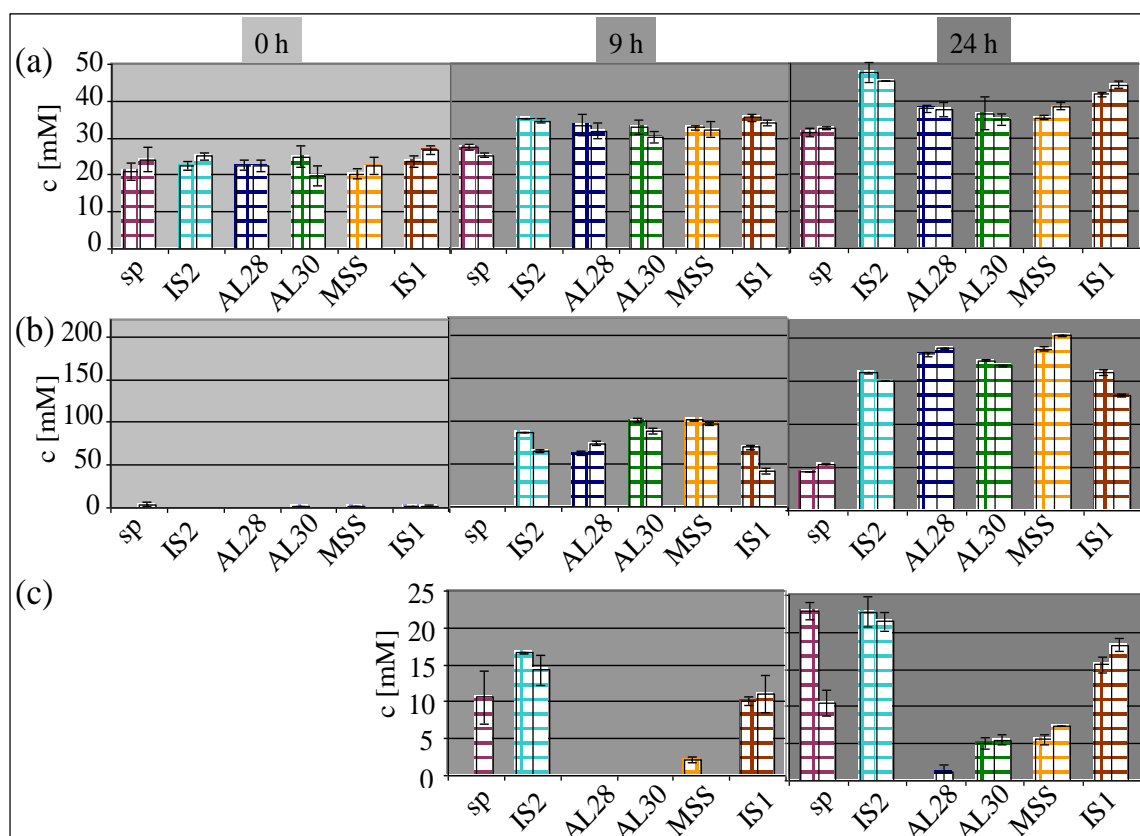
Beide eingesetzten Industriestarterkulturen erzeugten reproduzierbar Ethanol in den Amaranthteigen. Erste Werte wurden bereits nach 4 h gemessen. Diese lagen für MSS IS1 bei  $9,1 \text{ mM} \pm 1,3 \text{ mM}$  und für den heterofermentativen ESS IS2 bei  $14,3 \text{ mM} \pm 9,2 \text{ mM}$ . Sie stiegen im Verlauf der Fermentationen an und erreichten  $73,2 \text{ mM} \pm 2,2 \text{ mM}$  und  $151,1 \text{ mM} \pm 6,4 \text{ mM}$  für die Teige mit IS1 bzw. IS2.

#### **c) Metabolite aller 24 h-Fermentationen im Vergleich**

Minimale Unterschiede traten bei der Ameisensäure auf, wenngleich die Teige der Industriestarterkulturen zu jedem Probenahmezeitpunkt die höheren Konzentrationen aufwiesen (Abbildung 30a).

Der Unterschied zu den anderen Teigen wurde erst dann deutlicher, als sich die Starterorganismen nach 15 h in der stationären Phase befanden. Die Werte lagen nach 24 h in allen Teigen zwischen 32 mM und 47 mM. Im spontan fermentierten Teig war die Differenz zwischen Anfangs- und Endkonzentration an Ameisensäure im Teig mit einer Differenz von 9,5 mM am geringsten. Mit 22,8 mM war die Differenz, und somit die Formiatbildung, im Teig des ESS IS2 am größten.

Trotz gleicher oder höherer Keimzahlen wurde in den Teigen, die mit den Industriestarterkulturen inokuliert wurden, niedrigere Konzentrationen an Milchsäure gemessen. Dies galt für den gesamten Fermentationsverlauf. Ausnahme war der Messpunkt von 9 h, an dem die Werte im Teig mit *L. paralimentarius* AL28 unter denen von IS1 und IS2 lagen (Abbildung 30b). In allen anderen Vergleichsteigen wurden größere Werte detektiert.



**Abbildung 30:** Konzentrationen von Ameisensäure (a), Milchsäure (b) und Essigsäure (c) in [mM] an drei Messpunkten in Amaranthfermentationen bei 30°C ohne Starterzugabe (sp) bzw. mit ESS IS2, *L. paralimentarius* AL28 (AL28), *L. plantarum* AL30 (AL30), beiden in Kombination (MSS) und MSS IS1.

Im Teig mit dem MSS aus *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 lagen die Werte für Milchsäure nach 24 h sogar noch um 48 mM höher als in denen der Industriestarterkulturen. Auch im Vergleich mit den ESS der potentiellen Starterkulturen wurden in diesem Teig die höchsten Werte ermittelt.

Mit 185 mM erzielte die Fermentation mit dem ESS *L. paralimentarius* AL28 die zweithöchsten Milchsäurekonzentrationen, während der MSS IS1 mit 147 mM die niedrigsten Werte ergab. Die Konzentration der Milchsäure im spontan fermentierten Kontrollteig stieg im Fermentationsverlauf zwar kontinuierlich an, erreichte nach 24 h aber nur 50 mM.

Essigsäure war die Substanz, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Starterkultur den größten Schwankungen unterlag. Sie wurde erstmals in geringen Konzentrationen zwischen 4 h und 9 h in den Teigen der Industriestarterkulturen gemessen und erst zwischen 12 h und 15 h in den Teigen der potentiellen Starterkulturen. Die

Industriestarterkulturen IS1 und IS2 erzielten nach 24 h mit 17 mM bzw. 22 mM höhere Mengen an Essigsäure als die getesteten Starterorganismen *L. paralimentarius* AL28, *L. plantarum* AL30 und dem MSS aus *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 mit 1 mM;  $5,3 \text{ mM} \pm 0,3 \text{ mM}$  bzw.  $6,4 \text{ mM} \pm 1,3 \text{ mM}$  (Abbildung 30c).

Der Zusammenhang der Essigsäureproduktion mit den dominierenden Mikroorganismen wird im Vergleich zweier Fermentationen der spontan fermentierten Teige deutlich. Hier traten zwischen den Messungen Unterschiede von 45 % auf.

In diesen Teigen lagen die Ethanolkonzentrationen unter 10 mM, während sie mit Einsatz von IS1 und IS2 ab 4 h bzw. 9 h kontinuierlich anstiegen und am Fermentationsende mit 73 mM bzw. 151 mM detektiert wurden.

Das molare Verhältnis von Milch- zu Essigsäure war in den untersuchten Teigen, die mit den potentiellen Starterkulturen *L. paralimentarius* AL28, *L. plantarum* AL30 oder beiden Stämmen in Kombination als MSS inokuliert wurden, viermal so groß wie in denen der Industriestarterkulturen.

### IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28 in zahlreichen Fermentationen auf ihre Eignung zum Einsatz in Sauerteigen aus den Pseudozerealien Amaranth und Buchweizen getestet. Aus den Ergebnissen sollte eine Evaluierung beider Stämme als potentielle Starterkulturen erfolgen.

Je nach Bereich der Lebensmittelbranche stehen andere Kriterien bezüglich des Einsatzes von Mikroorganismen im Vordergrund. In der Produktion von Milchprodukten werden diese beispielsweise vor dem Einsatz geeigneter Starterkulturen durch thermische Behandlung keimfrei gemacht (FREUND 2006). Daher spielt hier die Wettbewerbsfähigkeit eine untergeordnete Rolle. Dagegen ist es im Bereich von Getreideerzeugnissen wichtig, dass die Starterkulturen wettbewerbsstark sind und sich gegen die autochthone Mikroflora der Zerealien oder Pseudozerealien durchsetzen können. Nach dem Mahlvorgang können Mehle noch mit Keimzahlen zwischen  $10^3$  KbE / g bis  $10^7$  KbE / g belastet sein (GÄNZLE 2006a).

Um eine Aussage über das Verhalten der beiden getesteten Stämme im Substrat treffen zu können, war es notwendig, die Mikroflora des Teiges, bzw. die näher untersuchten Isolate, genau bestimmen zu können. Als Standardmethoden zur Identifizierung der potentiellen Starterkulturen, sowie der Begleitflora, wurden Sequenzierung und RAPD-PCR verwendet. Die Sequenzierung ist eine grundlegende Methode Organismen anhand ihrer genetischen Sequenz zu identifizieren. Die dazu meistgenutzte Genregion ist die Basensequenz der ribosomalen RNA. Die Sequenzanalyse der 16S bzw. 28S rDNA bzw. von Teilabschnitten variabler Regionen dieser rDNA, lässt allerdings nur eine Identifizierung bis zur Speziesebene zu. Auch diese ist bei eng verwandten Spezies nicht immer eindeutig. Das betraf in dieser Arbeit z.B. Enterokokken. Um Spezies innerhalb solcher eng verwandten Organismen klassifizieren zu können, wird auf einen anderen phylogenetischen Marker zurückgegriffen. Jackson *et al.* (2004) differenzierten verschiedene *Enterococci*-Spezies anhand des Genes der Suberoxididismutase in Multiplex-PCR. Auch *L. plantarum* und *L. pentosaceus* lassen sich in der Regel besser durch Multiplex-PCR des RecA-Gens (TORRIANI *et al.*, 2001) voneinander differenzieren.

Plasmide werden in einigen Fällen auch zur Differenzierung von Mikroorganismen verwendet (DUFFNER *et al.*, 1995; RICCI *et al.*, 2006). Mindestens 25 Laktobazillenspezies besitzen native Plasmide, die in ihrer Anzahl zwischen 1 und 16

(MATHUR UND SINGH, 2005), sowie in der Größe zwischen 1,2-150 kb variieren (WANG UND LEE, 1997). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Stämme wiesen unterschiedliche Plasmidprofile auf, die in der Anzahl und Größe im Rahmen der Literaturangaben liegen. Da nicht alle Milchsäurebakterien Plasmide besitzen (RICCI *et al.*, 2006), sind Plasmidprofile zur Analyse von der Mikrobiota im Sauerteig ungeeignet. Eine zeit- und kostensparende Variante bekannte Spezies auf Stammesebene zu differenzieren, ist die RAPD-PCR (SPANO *et al.*, 2002; ROSSETTI UND GIRAFFA, 2005; GODET UND MUNAUT, 2010). Mit der Methode konnten im Rahmen dieser Arbeit durch reproduzierbare Fingerprints entsprechende Isolate in verschiedene Stämme klassifiziert werden. In den Vorversuchen wurden die Primer M13V<sub>mod</sub> und M13V<sub>org</sub> als geeignet eingestuft, die beiden eingesetzten potentiellen Starterkulturen von der autochthonen Mikroflora zu unterscheiden. Somit konnten diese aus dem Teig reisoliert und neu identifiziert werden. Damit ließ sich der prozentuale Anteil von *L. paralimentarius* AL28 und / oder *L. plantarum* AL30 an der detektierten Laktobazillenflora ableiten und eine Aussage über die Wettbewerbsfähigkeit treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit war das Wachstum von *L. paralimentarius* AL28 in zwei verschiedenen Kolonieformen, die ineinander übergehen konnten, ein interessantes Phänomen. Auffällig war, dass Morphotyp c besonders dann auftrat, wenn die Zellen zuvor einer Stresssituation, wie beispielsweise einem Zentrifugationsschritt und anschließender Aufnahme in Saline (II. 1.3), ausgesetzt waren. Laktobazillen besitzen ein breites Spektrum an Möglichkeiten Temperatur-, Säure-, osmotischen und anderen Stress auszugleichen (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Eine mögliche Ursache für die veränderte Kolonieform könnte die Bildung von Exopolysacchariden sein. Diese sind laut Literatur eine Variante Säurestress zu tolerieren (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Die Stammeszugehörigkeit wurde 8 Primern analysiert und mit M13V<sub>org</sub> bestätigt. Nicht alle Primer eigneten sich zur Identifizierung. Beispielsweise waren Unterschiede im RAPD-Profil zwischen Morphotyp b und c mit dem Primer RAPD3 (Tabelle 5) nicht reproduzierbar. Dass die RAPD-PCR eine weit verbreitete Differenzierungsmethode ist, aber auch empfindlich in der Reproduktion schwacher Banden, zeigte sich u.a. in den Analysen der Begleitflora (Abbildung 11). Weitere gängige Methoden der Stammidentifizierung sind beispielsweise die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) oder Ribotyping (KAHALA *et al.*, 2008; HOPPE-SEYLER *et al.*, 2007), mit denen RAPD-basierte Klassifizierung überprüft und bestätigt werden kann.



Gewöhnlich werden in Weizenfermentationen Keimzahlen zwischen  $10^8$  und  $10^9$  KbE / g Teig erzielt (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007). Auch in den Analysen der Weizensauerteige bei VRANCKEN *et al.* (2008) erreichte *L. fermentum*  $3 \times 10^9$  KbE / g bis  $4 \times 10^9$  KbE / g Teig. Auch für Buchweizen oder Zwerghirse werden Werte  $\geq 10^9$  KbE / g Teig beschrieben (MORONI *et al.*, 2011). Sowohl im Amaranth, als auch in den Buchweizenfermentationen wurden die Werte mit  $10^9$  KbE / g bis  $10^{10}$  KbE / g Teig schon nach einem Propagationsschritt bestätigt und waren sogar minimal größer gegenüber den Zerealien. In dieser Hinsicht existiert kein Unterschied zwischen Zerealien und Pseudozerealien. STERR *et al.* (2009) konnten in Amaranthteigen ebenfalls Keimzahlen bis zu  $10^{10}$  KbE / g Teig bestimmen. Die phylogenetische Verwandtschaft der eingesetzten zu den reisolierten Organismen betrug mindestens 94 %. Somit existierten maximal 6 % Divergenz zwischen den isolierten Mikroorganismen und es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um denselben Stamm handelte, der eingesetzt wurde. SCHEIRLINCK *et al.* (2009) postulierten einen Grenzwert von 6 % evolutionärer Distanz innerhalb eines Stammes. Das bedeutet, dass die eingesetzten Stämme innerhalb der Fermentationsperioden in den Teigen aus Amaranth und Buchweizen dominierten, erfolgreich reisoliert und auf Stammesebene wieder zugeordnet wurden.

Beide Stämme waren als ESS in allen getesteten Substraten dominant. Sie erreichten prozentuale Anteile von 68 % bis 100 % an der Milchsäurebakterienflora der Sauerteige. Gerade *L. plantarum* wird in der Literatur als Spezies beschrieben, die besonders an das Substrat Buchweizen adaptiert ist (MORONI *et al.*, 2011). Dies spiegelt sich in dem Keimzahlanteil von 100 % in den in dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen wieder. In Fermentationen, in denen die jeweils eingesetzten Kulturen nicht 100 % der MSB-Flora darstellten, ähnelte der Begleitflorenanteil an Fermentationstag 10 dem Morphotyp nach der jeweils anderen eingesetzten Kultur. Im Buchweizen war mittels RAPD-PCR eine Differenzierung möglich. Die Begleitflora in den Amaranthfermentationen, die als Spezies *L. plantarum* identifiziert wurde, unterschied sich nicht vom RAPD-Profil des Stammes *L. plantarum* AL30. In dem Fall waren die Grenzen der verwendeten Methode erreicht. In der Literatur ist hinterlegt, dass gleiche Bandenmuster dennoch von unterschiedlichen Stämmen zeugen können (WEISS *et al.*, 2005). Zur eindeutigen Differenzierung müsste eine andere Art der Identifikation angewandt werden. Eine Möglichkeit wäre der Einsatz von

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (SAWADOGO-LINGANI *et al.*, 2007). Auch TYNKKYNNEN *et al.* (1999) unterschieden mit einer zweiten Analyse zwischen Stämmen, die in der RAPD-PCR ein identisches Muster erzielten. Sie determinierten mit PFGE 17 der 24 Genotypen von Stämmen der Spezies *L. casei*, 15 mit Ribotyping und 12 mit RAPD-PCR.

Es ist allerdings auch nicht ganz auszuschließen, dass es sich beim Teigisolat der Begleitflora tatsächlich um denselben Stamm handelte. *L. plantarum* ist eine weit verbreitete und mit Getreide assoziierte Spezies (CARR *et al.*, 2002). Sie wurde aus Sauerteigen verschiedenster Substrate wie Weizen (ROBERT *et al.*, 2009), Roggen (SKREDE *et al.*, 2007) oder Pseudozerealien (MORONI *et al.*, 2011; VOGELMANN *et al.*, 2009) isoliert. Eine Verunreinigung der Teige mit dem eigenen Stamm AL30 ist daher unwahrscheinlich, besonders da die Begleitflora *L. plantarum* in wiederholten Fermentationen auftrat und auch im Mehl nachgewiesen wurde (III. 2).

Hefen konnten zwar in den meisten Fermentationen verdrängt werden, besonders im Substrat Amaranth etablierten sich aber bei längerer Fermentationsdauer Pilze der Gattung *Mucor*. Diese sind natürlicherweise auf Pflanzen (RAILA *et al.*, 2009) oder im Boden (KURAKOV *et al.*, 2008) zu finden und wurden bereits in der Literatur als Teil der autochthonen Mikroflora (NOUT, 2009) oder direkt als gewünschter Phytaseproduzent (ROOPESH *et al.*, 2006) mit Sauerteigfermentationen in Verbindung gebracht. Der Einfluss der eingesetzten Stämme auf die eukaryotische Begleitflora war nur partiell und durch die Fermentationsdauer beeinflussbar. Es ist auch nicht auszuschließen, dass für die Verdrängung der Hefen die Pilzflora kausal war. Beispielsweise haben viele Enzyme von *Mucor racemosus* im sauren Milieu bei pH 4 ihr Wirkoptimum (TAKÓ *et al.*, 2010).

In einzelnen Fermentationen etablierten sich dagegen Hefen im Teig. Es ist bekannt, dass *Pichia anomala* ein großes Toleranzspektrum bezüglich pH-Wert und Sauerstofflimitierung besitzt. Diese Hefe spielt in einer Vielzahl von fermentierten Lebensmitteln als Verderbniserreger aber auch als Biokontrolle gegen Schimmelpilze eine Rolle (PASSOTH *et al.*, 2006). In den Fermentationen, in denen Hefen, wie *Pichia anomala* auftraten, wurde entsprechend auch keine Pilzflora detektiert. *Candida glabrata* toleriert aufgrund der ökologischen Nischen in der Umwelt und dem Gastrointestinaltrakt gesunder Menschen ebenfalls ein breites pH-Spektrum (SCHMIDT *et al.*, 2008). Sie wurde nicht nur als Begleitflora in den Fermentationen identifiziert,

sondern auch als Organismus der autochthonen Mikroflora der verwendeten Mehlcharge.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass es je nach Lagerbedingungen und Mehlcharge immer möglich ist, dass Hefen und Schimmelpilze im Sauerteig ein Problem darstellen können. Eine gezielte Beeinflussung der autochthonen Hefen und Pilze könnte durch die Kombination der einzelnen Stämme mit einer Hefestarterkultur erfolgen. Laktobazillen werden in Fermentationen oft in Kombination mit *S. cerevisiae* eingesetzt, da sich beide Organismen so beeinflussen, dass der Sauerteig durch diese Synergie positiv beeinflusst wird (GUERZONI *et al.*, 2007). So wirkt sich beispielsweise die Aminosäureproduktion von Hefen positiv auf das Wachstum von *L. sanfranciscensis* aus. Die Assoziation von *L. plantarum* mit *S. cerevisiae* erhöht deren Produktion von Kohlenstoffdioxid (CORSETTI UND SETTANNI, 2007). Im Falle einer sehr starken Belastung des Mehles mit *P. anomala*, *C. glabrata* oder anderen Eukaryoten, können diese mit einer Laktobazillus-Hefe-Starterkultur erfolgreicher zurückgedrängt und Keimzahlen bis zu  $10^8$  KbE / g Sauerteig umgangen werden.

Der Einsatz der potentiellen Starterkulturen als MSS im Buchweizen erzielte nach 10 Tagen ein ausgewogenes Verhältnis von etwa 1:1 beider Stämme zueinander. In Amarantheigen dominierte *L. paralimentarius* AL28 über *L. plantarum* AL30. Dieses Ergebnis wurde auch in Hirse erhalten (MERKLE 2008). Somit entsteht der Eindruck, dass *L. plantarum* AL30 nicht in jedem Substrat als Teil eines MSS eingesetzt werden kann. Nach einem Fermentationstag erreichten allerdings sowohl *L. paralimentarius* AL28 als auch *L. plantarum* AL30 gleiche Keimzahlen. Erst im Laufe der weiteren Propagationsschritte sanken die Werte für *L. plantarum* AL30, während *L. paralimentarius* AL28 auf dem Keimzahlniveau blieb. Dies ist ein wichtiger Fakt für die industrielle Anwendung. Sollen die Stämme in Teigen eingesetzt werden, die über mehrere Tage hinweg propagiert werden, ist der Dominanzstatus von *L. plantarum* AL30 nur in Buchweizenteigen gewährleistet. Das verliert allerdings an Bedeutung, wenn die Sauerteige für jede Anwendung neu angesetzt werden. In diesem Fall ist es sogar von Vorteil, wenn der Verbraucher die Starterkultur erneut erwerben muss. Im allgemeinen kann für die industrielle Anwendung geschlussfolgert werden, dass beide Stämme als ESS über mehrere Tage propagiert werden können, während sie für zuverlässige Ergebnisse als MSS nur für einen Propagationsschritt verwendet werden sollten. Auf Grund der kontinuierlichen Führungsdauer und der gewählten

Fermentationstemperatur, sind die untersuchten Teige den Typ1-Sauerteigen zuzuordnen. In diesen wird die Mikroflora durch tägliches Propagieren stabil gehalten, was im Fall von *L. plantarum* AL30 im MSS nicht gegeben war. In der industriellen Anwendung werden hingegen Typ2-Sauerteige verwendet, die einen weniger zeitaufwendigen einstufigen Fermentationsprozess beinhalten (DE VUYST UND NEYSENS, 2005). Daher sind beide Stämme interessante Kandidaten für den Einsatz in Sauerteigen aus Pseudozerealien.

Neben spezifischen Fähigkeiten, beispielsweise der Produktion von Reuterizyclin durch *L. reuteri* (DE VUYST UND NEYSENS, 2005), basiert die Dominanz einer Starterkultur in erster Linie auf dem Säuerungsverhalten im Substrat. Niedrige pH-Werte bieten acidophilen Spezies einen Selektionsvorteil und grenzen daher die im Teig vorhandene Mikroflora ein. Weiterhin begünstigt ein saures Milieu stammspezifische Enzymaktivitäten wie die der Arginin-Deaminase von *L. fermentum* IMDO 130101 (VRANCKEN *et al.*, 2009a). Beide in dieser Arbeit bewerteten Stämme zeigten in Amaranth und Buchweizen reproduzierbare Fermentationscharakteristika. Säuregrad und pH-Wert stellten sich unabhängig von der Spezies der eingesetzten Kultur ein. Die Werte differierten allerdings in Abhängigkeit vom Substrat. In den Amaranthteigen stellten sich höhere Säuregrade ein, als im Buchweizen. Die pH-Werte verhielten sich konträr. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von VOGELMANN *et al.* (2009) überein. Sie erhielten Säuregrade zwischen 26,4 und 30,4 für Amaranthteige und zwischen 20,8 und 25,6 beim Einsatz von Buchweizen. In dieser Arbeit wurden im Amaranth zwischen 26,1 und 28,9 bzw. zwischen 20,2 und 20,7 im Buchweizen gemessen. Dass ein niedriger pH-Wert mit einem hohen Säuregrad korreliert, deckt sich ebenfalls mit den Daten. MOORE *et al.* (2007) ermittelten in Buchweizenfermentationen mit *L. plantarum*-Stämmen Säuregrade zwischen 16,2 und 16,5. Die pH-Werte lagen bei 3,8 und 3,9. Trotz ähnlicher Werte im Buchweizen von 3,9 unterschieden sich die Säuregrade dieser Arbeit und anderer Literatur (VOGELMANN *et al.*, 2009) um 4 bis 9 Einheiten von denen, die MOORE *et al.* (2007) publizierten. Differenzen innerhalb einer Pseudozerealie oder Zerealie sind auf unterschiedliche Spezies oder Umwelteinflüsse zurückzuführen. Variationen im Mineralienhaushalt resultieren beispielsweise aus unterschiedlicher Verfügbarkeit der Spurenelemente im Boden (ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2009). Diese beeinflussen wiederum die Puffereigenschaften der Mehle.

Die Mehlfeuchte der untersuchten Pseudozerealien war mit  $9,7 \% \pm 0,5 \%$  und  $12,7 \% \pm$

0,7 % für Amaranth bzw. Buchweizen niedriger, als Werte, die in der Literatur für Weizen mit  $14,0 \% \pm 0,2 \%$  oder Dinkel mit  $13,8 \% \pm 0,2 \%$  beschrieben werden (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007). Allerdings variieren diese Werte auch in Abhängigkeit von der Bearbeitung der Getreidekörner. Sogar gleiche Kornchargen, die mit unterschiedlichen Mühlen gemahlen werden, sind für Unterschiede in der Mehlfuchte kausal. VAN DER MEULEN *et al.* (2007) erhielten für Weizenmehl in Abhängigkeit von den gewählten Mühlen 13,8 % und 14,1 % Feuchtegehalt. Der minimale Unterschied von 0,3 % korreliert mit den Standardabweichungen innerhalb der verschiedenen Feuchtegehalte dieser Arbeit. Unterschiede in der Aufarbeitung der Mehle können aber auch größere Auswirkungen haben. Buchweizenmehl, das aus geschälten Körnern besteht, besitzt laut MARIOTTI *et al.* (2008) 13,9 % Mehlfuchte, während gepufftes Buchweizenmehl nur 7,3 % besitzt. Ebenfalls werden dadurch die physikochemischen Eigenschaften der Mehle beeinflusst.

Die unterschiedlichen Werte in den verschiedenen Substraten sind durch deren differentielle Zusammensetzung, besonders den Aschegehalt betreffend, zurückzuführen (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). In Hirse beträgt dieser in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies zwischen 0,8 % und 3,7 % (TAYLOR UND NAUSHAD EMMAMBUX, 2008). Im Amaranth wurden für *Amarantus caudatus* Werte von 2,8 % ermittelt und für das Buchweizenbeispiel *Fagopyrum esculentum* 2,1 %. Im Weizen *Triticum aestivum* betrug der Aschegehalt nur 1,5 % (ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2009).

Die unterschiedlichen Messergebnisse in Amaranth und Buchweizen korrelieren mit den gemessenen Säurekonzentrationen. Diese waren im Amaranth größer als im Buchweizen, woraus höhere Säuregrade bzw. niedrigere pH-Werte resultierten. Die ermittelten pH-Werte von etwa 3,7 für Amaranth sind typische Werte, die auch in Weizen- und Roggenfermentationen erreicht werden (SCHEIRLINCK *et al.*, 2007; VOGELMANN *et al.*, 2009). Jede Laktobazillenspezies hat ein bestimmtes pH-Minimum, bis zu dem der Säurestress toleriert wird. Bei *L. plantarum* liegt es bei pH 3,4 (GIRAUD *et al.*, 1991). Unabhängig von den Ausgangswerten wurden die Teige nicht stärker angesäuert, als es die jeweilige dominierende Spezies tolerierte. Auch in Weizenteigen stellten sich bei Einsatz von *L. plantarum* pH-Werte zwischen 3,4 und 3,8 ein (PEPE *et al.*, 2004).

Starterkulturen werden dem Substrat in der Regel in hohen Keimzahlen zugefügt. Diese liegen beispielsweise für Roggen bei  $10^7$  KbE / g (VOGELMANN UND HERTEL, 2011), für

Gerste bei  $9 \times 10^8$  KbE / g bis  $3 \times 10^{10}$  KbE / g Teig (ZANNINI *et al.*, 2009) und für Weizen werden Werte von  $10^7$  KbE / g (SETTANNI *et al.*, 2005) oder  $7 \times 10^7$  KbE / g beschrieben (SIRAGUSA *et al.*, 2009). Für Pseudozerealien werden Werte von  $5 \times 10^7$  KbE / g Teig angegeben (DI CAGNO *et al.*, 2004). Daher sind sie von Beginn der Fermentation der autochthonen Mikroflora gegenüber zahlenmäßig überlegen. Ein wettbewerbsstarker Starter sollte sich auch gegen Organismen gleicher Keimzahl durchsetzen können. Im Weizen sind beispielsweise *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. brevis* oder *L. alimentarius* vorherrschend (CORSETTI *et al.*, 2003), während in Hirse oder Buchweizen *L. plantarum*, *P. pentosaceus* und *L. paralimentarius* die Mehle dominieren (WEISS *et al.*, 2009). Amaranth ist oft mit *L. plantarum*, *L. sakei* oder *Pediococcus pentosaceus* belastet (STERR *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden vorherrschende Spezies wie *L. plantarum* oder *Pediococcus pentosaceus* aber auch *L. paralimentarius* im Amaranthmehl bestätigt.

Es gibt ebenso Studien, in denen Enterokokken aus Dinkel- (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007; WECKX *et al.*, 2010) oder Amaranthsauerteigen isoliert wurden (STERR *et al.*, 2009). Nach 24 h Spontanfermentation des Amaranthmehles wurde die autochthone Mikroflora durch Enterokokken dominiert. Gegen diese sollten sich dann die potentiellen Starterkulturen *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28 behaupten. Die gesamte Begleitflora stieg, ebenso wie die eingesetzten Starterkulturen, bis 8 h auf Werte von  $6,5 \times 10^8$  KbE / g Teig an. Zu diesem Zeitpunkt lag der pH-Wert bei 4,7. Am nächsten Messpunkt nach 12 h Fermentationszeit nahm die Keimzahl der Begleitflora wieder ab. Der pH-Wert war in dem Fall bereits auf einen Wert von 4,3 abgesunken. In jedem weiteren Propagationsschritt setzte sich die Begleitflora bereits zu Beginn aus weniger Organismen zusammen, die entsprechend von den potentiellen Starterkulturen zurückgedrängt wurden. Die Verschiebung von Populationsstrukturen ist beispielsweise für Spontanfermentationen in Weizen und Dinkel beschrieben (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007; WECKX *et al.*, 2010). Auch hier wurden die anfänglich dominierenden Enterokokken- und Laktokokken nach den ersten zwei Propagationsschritten von Spezies wie *Pediococcus pentosaceus* oder *Lactobacillus curvatus* verdrängt. Ebenso wurden beschrieben, dass die Verdrängung der Enterokokken mit einer pH-Absenkung bis ca. 4 korrelierte (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007). Ab dem dritten Propagationsschritt dominierten Spezies von *L. plantarum*, *L. fermentum* oder *L. rossiae* die Teige bis zum Fermentationsende. Durch den Einsatz

der potentiellen Starterkulturen in einer entsprechend hohen Keimzahl von  $10^7$  KbE / g Teig wurde dieser Prozess nicht signifikant beschleunigt. Die Begleitflora wurde nach zwei Propagationsschritten mit *L. paralimentarius* AL28 zwar deutlich reduziert aber nicht verdrängt.

Gerade in der Anwendung ist es von Bedeutung, dass sich die finalen Werte im Teig möglichst schnell einstellen. Optimal wäre eine effiziente Ansäuerung innerhalb von 4 h, ohne dass die sensorischen Eigenschaften und das gewünschte Backverhalten durch die kurze Führungsdauer beeinträchtigt sind (MESSENS *et al.*, 2002). Der Fokus einer verkürzten Fermentation liegt unter anderem darin begründet, dass damit Zeitersparnis erzielt wird, die Biodiversität limitiert ist und somit rheologische und aromatische Eigenschaften des Brotes konstant gehalten werden und die Laktobazillen ihre Funktionen behalten. Mit jedem Propagationsschritt steigt das Risiko, dass wichtige plasmidkodierte Eigenschaften verloren gehen. Beispiele hierfür wären die EPS- oder Bakteriozinsynthesen (MORA *et al.*, 2000; VAN HIJUM *et al.*, 2004). Daher wurden die Analysen auf einen Zeitrahmen von 24 h konzentriert. Im Säuerungsverhalten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den ESS und dem MSS. *L. paralimentarius* AL28 säuerte den Teig zunächst etwas langsamer an. In Bezug zu den Keimzahlen muss aber angemerkt werden, dass gerade dieser Teig minimal geringer inokuliert wurde. Die Messwerte glichen denen in den anderen Teigen ab dem Punkt, an dem in allen Sauerteigen die gleichen Keimzahlen vorherrschten. Wie zu erwarten war, wurden die inokulierten Teige viel schneller angesäuert als der spontan fermentierte. Die hauptsächliche pH-Wert-Reduktion korrelierte mit der exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen, was auch in der Literatur, beispielsweise für Weizenfermentationen verzeichnet ist (GAGGIANO *et al.*, 2007). Zwar traten die größten Veränderungen zwischen 4 h und 12 h auf, jedoch änderten sich die Metabolitkonzentrationen und Säuregrade noch bis zum Zeitpunkt von 24 h. Es ist bekannt, dass die Fermentationsdauer einen wesentlichen Einfluss auf die Aromenbildung im Teig hat (DE VUYST *et al.*, 2009).

Für die industrielle Anwendung ist daraus zu schließen, dass ein fermentierter Teig bezüglich seines pH-Wertes bereits nach 12 h einsetzbar ist. Für ein maximales Aromaprofil sollte die Inkubationszeit ausgedehnt werden, bis die verschiedenen Metabolite in den prozessbedingten optimalen Konzentrationen im Teig vorherrschen.

Der Säuerungsprozess hat, ebenso wie die Fermentationsdauer, Einfluss auf die Enzymaktivitäten im Sauerteig. Innerhalb dieses Fermentationsansatzes wurde die proteolytische Aktivität in den 4 Teigen mit *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30, sowie beiden Stämmen in Kombination und einem spontan geführten Kontrollteig bestimmt. Aminosäuren stellen einerseits Aromavorläufer für thermische Reaktionen dar, sind andererseits aber auch Substrate für die Umsetzung zu Aromastoffen durch die Mikroflora der Sauerteige (GÄNZLE *et al.*, 2005).

Aminosäuren werden durch Proteolyse erhalten, die einerseits auf Enzyme zurückzuführen ist, die über das Mehl mit dem Teig assoziiert sind, andererseits wird sie durch die Mikroflora des Teiges beeinflusst (SERRAZANETTI *et al.*, 2009). Sie gehören als Grundbaustein für jegliche Proteine einer Zelle zum notwendigen Intermediat des bakteriellen Metabolismus und sind zusätzlich eine wichtige Quelle von komplexem Stickstoff. In der Regel nutzen Laktobazillen der Sauerteige aber Peptide, die durch spezifische Transportsysteme in die Zelle gelangen und dort zu Aminosäuren hydrolysiert werden (GÄNZLE *et al.*, 2005). GÄNZLE *et al.* (2007) beschrieben auch, dass die bakterielle intrazelluläre Hydrolyse von Peptiden zur Akkumulation freier Aminosäuren im Sauerteig führt. Proteolytische Aktivität der Mikroorganismen ist nach ZOTTA *et al.* (2006) stammspezifisch. Sie wurde beispielsweise im Weizensauerteig für *L. plantarum* nachgewiesen, allerdings nur bei 6,6 % der untersuchten Stämme (PEPE *et al.*, 2004). Der Stamm *L. plantarum* AL30 stand in den Experimenten dieser Arbeit mit den niedrigsten Konzentrationen freier Aminosäuren in Verbindung. Dies prägte sich besonders in der stationären Wachstumsphase aus. In allen inokulierten Teigen waren die Konzentrationen an freien Aminosäuren niedriger als in der spontan fermentierten Kontrolle. Die deutlichsten Unterschiede wurden zwischen 6 h und 12 h gemessen. Hier betrugen die Anfangswerte durchschnittlich 3,5 mg / g Teig. Nach 12 h bewegten sich die Werte in den starterbeimpften Teigen bei durchschnittlich 3,7 mg / g Teig. In Dinkel- und Weizenfermentationen wurden Konzentrationen über 3,0 mg / g Teig erst nach 48 h bestimmt (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007). Innerhalb eines Propagationsschrittes lagen die Werte hier zwischen 2,0 mg / g und 3,0 mg / g Teig, was in den Amaranthfermentationen dieser Arbeit bereits nach 12 h erreicht wurde. Im Zeitfenster zwischen 6 h und 12 h erfolgte auch die stärkste pH-Wert-Absenkung von durchschnittlich 5,6 auf 4,1. Das Ungleichgewicht freier Aminosäuren mit Beginn der stationären Wachstumsphase resultiert aus einer Unausgewogenheit zwischen deren



Produktion durch, größtenteils teigeigene, Proteasen und deren Verwendung für den Metabolismus der Laktobazillen. Die Wirkoptima der Aspartat-Proteasen in Roggen- und Weizenmehlen liegt laut Literatur bei einem pH-Wert zwischen 3,0 und 3,5 (GÄNZLE *et al.*, 2005). Für Pseudozerealien sind zu dieser Thematik derzeit keine Daten erhältlich. Durch den Einsatz der potentiellen Starterkulturen wurde keine Erhöhung der verfügbaren Aminosäuren im Teig bestimmt. Allerdings wurden insgesamt größere Konzentrationen bereits nach kurzer Fermentationsdauer erhalten als es in der Literatur für Zerealien beschrieben wurde.

Ebenso wie die proteolytische Aktivität ist auch der Stärkeabbau nur für einzelne Stämme charakteristisch. Laut RODRIGUEZ-SANOJA *et al.* (2005) ist das Gen *amyA*, das für die  $\alpha$ -Amylase kodiert, im Allgemeinen bei der Spezies *L. plantarum* vorhanden. Danach müsste der Nachweis für einen Stärkeabbau in den Untersuchungen dieser Arbeit möglich gewesen sein. Im Resultat konnte aber weder bei *L. plantarum* AL30, noch bei *L. paralimentarius* AL28 amylolytische Aktivität im api<sup>®</sup> 50CH Test bestätigt werden. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von JOHANSSON *et al.* (1995), in deren Studien von zahlreichen getesteten *L. plantarum*-Stämmen nur 14 % der Isolate als amylolytisch eingestuft wurden. Weiterhin ist in der Literatur (CAI *et al.*, 1999) verzeichnet, dass die Spezies *L. paralimentarius* laut api<sup>®</sup> 50CH Test keine Stärke verwerten kann. Daher wurde in dem Fall ein negatives Ergebnis erwartet und erhalten. Manche Stämme zeigen im Vergleich von api-Testsystemen mit Analysen auf stärkehaltigem Agar jedoch widersprüchliche Ergebnisse (SANNI *et al.*, 2002). Das Negativresultat von *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 wurde bestätigt, in dem beide Stämme auch auf stärkehaltigem mMRS5-Agar keine Stärkehydrolysehöfe zeigten.

Amylaseaktivität ist im Teig dahingehend von Bedeutung, dass sie der Stärkeretrogradation und somit dem Altbackenwerden von Backwaren entgegenwirkt (ARENDE *et al.*, 2007). Da gerade Pseudozerealien einen hohen Stärkeanteil besitzen (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008), wäre eine Reduktion der Stärke durch amylolytische Aktivität vorteilhaft, um die Retrogradation einzudämmen.

Die durch den api<sup>®</sup> 50CH Test untersuchte metabolische Aktivität von *L. plantarum* AL30 zeigte die der Spezies typischen Reaktionen. Es gab keine widersprechenden Verwertungsprofile. Da die Spezies *L. paralimentarius* nicht in der api<sup>®</sup> 50CH Datenbank verzeichnet war, konnte diese mit der Methode nicht eindeutig bestimmt

werden. *L. paralimentarius* AL28 zeigte ein ähnliches Fermentationsspektrum, wie es von CAI *et al.* (1999) beschrieben wurde. Der getestete Stamm konnte allerdings keine Ribose verwerten, wie es allgemein für die Spezies *L. paralimentarius* bekannt ist (HAMMES UND HERTEL, 2009).

Komplexe Medien wie das mMRS5-Medium (II. 1.2), bieten den Laktobazillen ein umfassendes Angebot an Substraten für ihren Metabolismus. Es enthält unter anderem Maltose, Fruktose und Glukose, wobei Maltose gegenüber den anderen beiden Zuckern in doppelter Konzentration vorliegt. Die Anzucht der zu evaluierenden Stämme führte in einem Zeitraum von 17 h zur Umwandlung der Zuckersubstrate in Metabolite wie Milchsäure und Mannitol. Die Reduktion der Glukose- und Fruktosewerte deutet darauf hin, dass vordergründig diese Zucker zur Energiegewinnung genutzt wurden. Maltose war zum Zeitpunkt der Messung noch in den gleichen Konzentrationen von etwa 20 mM im Medium enthalten, wie in der nicht inokulierten Kontrollprobe. Laut Literatur (CAI *et al.*, 1999); und api-Test-Datenbank können die Spezies *L. paralimentarius* und *L. plantarum* bzw. die in dieser Arbeit getesteten zugehörigen Stämme alle drei Zuckersubstrate verwerten. Glukose und Fruktose stellen energetisch günstigere Substrate dar und wurden daher von den Mikroorganismen in gleichem Maße präferiert. So wurden von den beiden Stämmen *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 jeweils 38 mM Glukose und zwischen 29 mM und 36 mM Fruktose umgesetzt. Das Hauptprodukt im Metabolismus der Laktobazillen ist Milchsäure. Diese wurde auch als einzige Säure mit 67 mM bzw. 79 mM im Medium detektiert. Der heterofermentative Organismus *L. fermentum* IMDO 130101 zeigte in Experimenten von VRANCKEN *et al.* (2009b) ähnliches Verhalten und produzierte in einem W-SSM-Medium bei 30°C 65 mM Milchsäure. Mannitol ist ein Produkt der Konversion von Fruktose mittels Mannitol-Dehydrogenase (VRANCKEN *et al.*, 2008). Neben vielen heterofermentativen Laktobazillen wie *L. sanfranciscensis* (KLINE UND SUGIHARA, 1971) sind auch einige homofermentative Laktobazillen zu dieser Umwandlung fähig (AKINTERINWA *et al.*, 2008). In Hinblick auf die Eigenschaft als Süßstoff ist die Bildung von Mannitol erwünscht. Es wird beispielsweise in zuckerfreiem Kaugummi eingesetzt und findet unter anderem Anwendung als texturgebende Komponente. Einer der Gründe, warum Mannitol ein gebräuchliches Lebensmitteladditiv ist, ist das Potential die Haltbarkeit verschiedenster Lebensmittel zu verlängern (PATRA *et al.*, 2009). Somit

ist die Mannitolbildung von etwa 19 mM durch die potentiellen Starterkulturen als positiv einzustufen. Im Vergleich dazu produzierte *L. paralimentarius* in mMRS-Medium innerhalb von 16 h 0,2 mM bis 3 mM Mannitol (DE VUYST *et al.*, 2002), was deutlich unter der Konzentration der getesteten potentiellen Starterorganismen lag.

Allerdings sind die Parameter innerhalb eines Fermentationsprozesses ausschlaggebend für den Metabolismus der Laktobazillen. Es existieren Studien, in denen die Säure- und Metabolitproduktion durch Temperatur, pH-Wert und Teigausbeute (GAGGIANO *et al.*, 2007) oder Salzkonzentration (VRANCKEN *et al.*, 2009b) beeinflusst werden sollten. So kann beispielsweise durch den Zusatz von Natriumchlorid die Säuerungsaktivität in Weizenteigen ebenso positiv beeinflusst werden, wie durch die Erhöhung der Teigausbeute von 150 auf 180. Andererseits zeigten die Experimente von GAGGIANO *et al.* (2007), dass die Teigausbeute bei einem Inokulum von  $10^7$  KbE / g Teig keinen Einfluss auf die Säuerungsaktivität hatten. Dies verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren im Model Sauerteig. Auch das Substrat stellt eine wichtige Komponente dar. So bieten verschiedene Zerealien und Pseudozerealien auch unterschiedliche Substratspektren bzw. Zusammensetzung (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008; CODA *et al.* 2010). Dies könnte ursächlich dafür sein, dass in den durchgeführten Fermentationen mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 keine Mannitolbildung erfolgte. Aber auch innerhalb eines Substrates können Laktobazillen unterschiedliches Verhalten zeigen. VAN DER MEULEN *et al.* (2007) analysierten spontan fermentierte Weizenteige, in denen *L. fermentum* nach 10 Tagen dominierte. In einem der Teige wurde Mannitol nachgewiesen, im anderen nicht. Die Autoren diskutieren dieses Phänomen mit der Verfügbarkeit der Vorstufe Fruktose.

Sowohl in Bouillon, als auch im Teig wurde Fruktose detektiert und stand somit als Substrat zur Verfügung. Es wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass beide Stämme im mMRS5-Medium zu Mannitolproduktion in der Lage sind, nicht jedoch in den Substraten Amarant oder Buchweizen. Es existieren Studien, in denen *L. paralimentarius* auch in Weizensauerteigen keine detektierbaren Mengen an Mannitol bildete (PARAMITHIOTIS *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu wurde in den Sauerteigen, die mit den Industriestarterkulturen inokuliert wurden, Mannitol nachgewiesen. Die Vorstufe dieses Zuckers ist Fruktose, die in heterofermentativen Organismen mittels Mannitoldehydrogenase zur Mannitolbildung führt. (HAMMES *et al.*, 1996) Dieser Zusammenhang wurde in den

entsprechenden Diagrammen deutlich (Abbildung 28). Die Fruktosewerte stiegen bis zum Zeitpunkt von 4 h an. Zwischen 4 und 9 h wurde der Zucker abgebaut und Mannitol in den Teigen gemessen. Zwischen 9 und 24 h blieben die Mannitolwerte konstant. Der größte Umsatz von Fruktose erfolgte im Teig mit ESS IS2 zwischen 4 und 9 h. In diesem Zeitraum sank der pH-Wert von 6,4 auf ca. 4,5. Bei MSS IS1 wurde Fruktose erst nach 15 h nicht mehr im Teig detektiert. Es ist bekannt, dass bei verschiedenen Spezies der Gattung *Lactobacillus* eine optimale Mannitolproduktion bei einem pH-Wert zwischen 5,4 und 5,8 erfolgt (VON WEYMARN *et al.*, 2002). Das korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der dieser Wert im Teig von IS2 schon zu einem Zeitpunkt von 4 h erreicht wurde. Im Teig von IS1 lag der pH-Wert auch nach 6 h erst bei 6,2. Der Umsatz von Fruktose erfolgte entsprechend zeitversetzt.

Die Mannitolbildung erfolgte zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase und erreichte Höchstwerte, als sich die Starterkulturen nach 9 h in der stationären Phase befanden. Dies deckt sich mit der Literatur, in der Mannitol als ein Zucker beschrieben wird, der besonders von Zellen gebildet wird, die nicht im Wachstum sind (PATRA *et al.*, 2009).

Der Einsatz von kommerziellen Starterkulturen in Amaranth führte zu nahezu identischen Ergebnissen bezüglich pH-Wert, Säuregrad und dem Verlauf der getesteten potentiellen Starterkulturen *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28. Das bedeutet, dass sie in einer Fermentation nicht nur ebenso effektiv waren wie der obligat heterofermentative ESS IS2, sondern auch wie der MSS IS1, der aus mindestens 3 verschiedenen Laktobazillenspezies bestand. *L. plantarum* AL30 und *L. paralimentarius* AL28 konkurrierten gegen Stämme der eigenen Spezies und gegenüber zusätzlichen fakultativ heterofermentativen Milchsäurebakterien. Als Hauptprodukt des Laktobazillenmetabolismus wurde Milchsäure gebildet. Sie ist ausschlaggebend für die Absenkung von pH-Wert und die Steigung der Säuregrade während der Fermentation. Somit determiniert sie einen Großteil der Eigenschaften, die den Einsatz von Sauerteigen in der Lebensmittelproduktion bedingen. Die gemessenen Milchsäurekonzentrationen stimmen mit denen ähnlicher Experimente der Literatur überein, die zwischen 134 mM und 182 mM lagen (STERR *et al.*, 2009). Sie sind mit 185 mM für *L. paralimentarius* AL28 und 171 mM für *L. plantarum* AL30 sogar höher, als die der industriellen Starterkulturen, von denen im Teig mit IS1 147 mM und mit

IS2 155 mM erzielt wurden. Die Kombination der beiden potentiellen Starterkulturen unterschied sich von den einzeln eingesetzten Stämmen nach 24 h nur um 10 mM und nach 48 h um 20 mM. Auch nach 10 Tagen Führungsdauer der Amaranthteige wurde zwischen Einzelstämmen und deren Kombination ein Konzentrationsunterschied zwischen 10 mM und 20 mM gemessen. Im Buchweizen hingegen erreichte *L. paralimentarius* AL28 ähnliche Konzentrationen an Milchsäure wie der MSS beider potentieller Starterkulturen. Der Verlauf der Milchsäurewerte im Kontrollteig wurde reproduziert, während die Konzentrationen an Essigsäure in der Wiederholungsfermentation größeren Schwankungen unterlagen. Dies lässt vermuten, dass sich in den Spontanfermentationen entsprechend nach 15 h Milchsäurebakterien im Teig etablierten. Zu diesem Zeitpunkt stieg die Keimzahl auf mMRS5-Agar auf  $10^8$  KbE / g Teig. Die Produktion der Essigsäure war hingegen von der entsprechenden Florenzzusammensetzung des verwendeten Mehls abhängig und unterschied sich offensichtlich in den jeweiligen Fermentationsdurchgängen. In den Fermentationen, in denen Industriestarterkulturen zum Einsatz kamen, wurden Acetatkonzentrationen von ca. 20 mM gemessen. In dem Ansatz, der mit dem MSS beider potentiellen Starterkulturen geführt wurde, blieb die Acetatkonzentration gering, bei maximal 5 mM. Bei beiden Stämmen handelt es sich um fakultativ heterofermentative Organismen (HAMMES UND HERTEL, 2009). Laut Literaturangaben sind manche davon in der Lage 1 mol Glukose in 4 mol Acetat umzuwandeln (GÄNZLE, 2006b), während andere dieser Konversion nicht fähig sind. Während *L. plantarum* AL30 in der Lage ist Acetat zu bilden, wurde es für *L. paralimentarius* AL28 nicht erwartet. Generell schwankten die Ausbeuten an Acetat in den Fermentationsansätzen in Abhängigkeit vom Substrat. *L. sanfrancicensis* bildete in Weizenteigen innerhalb von 24 h maximal 24 mM und im Roggen dagegen bis zu 90 mM (KORAKLI *et al.*, 2001). Acetat ist generell eine wichtige Komponente in Sauerteigen, da es ein bedeutender Aromastoff ist. Zusätzlich beugt dieser Stoff Schimmel und Krumenklebrigkeit vor (CORSETTI *et al.*, 1998b; RÖCKEN, 1996). Im Allgemeinen wird in der Backindustrie ein molares Verhältnis von Lactat zu Acetat mit 2,5 angestrebt (RÖCKEN, 1996). HAMMES UND GÄNZLE (1998) beschrieben eine Spanne von 2,0 bis 2,7. In den vorliegenden Fermentationen wurde es weder von den Industrie-, noch von den potentiellen Starterkulturen erreicht. Allerdings ist der Gärungsquotient der Industriestarterkulturen um ein Vierfaches geringer, als bei den getesteten potentiellen Starterorganismen. Es existieren derzeit noch keine Daten,

inwieweit dieses Verhältnis bei Pseudozerealien von Bedeutung ist. Weiterführende sensorische Analysen würden darüber Aufschluss geben. Die Kombination der potentiellen Starterkulturen mit *S. cerevisiae* könnte zu einer Optimierung des angestrebten molaren Verhältnisses führen. PARAMITHIOTIS *et al.* (2006) belegten für Weizensauerteige, dass die Hefe *S. cerevisiae* in Kombination mit *L. paralimentarius* die Bildung von Essigsäure und sogar Mannitol begünstigt. Eine andere Möglichkeit stellt der Zusatz von externen Substanzen dar. Beispielsweise führte der Zusatz von Fruktose als alternativer Elektronenakzeptor zu Erhöhung der Acetatproduktion (KORAKLI *et al.*, 2001; RÖCKEN, 1996).

Ameisensäure wurde von Beginn an in den Teigen mit etwa 20 mM detektiert und stieg im Fermentationsverlauf leicht auf Werte bis zu 46 mM an. Daher wird angenommen, dass Ameisensäure eine natürliche Komponente der verwendeten Getreide ist. Sie ist im Teig erwünscht, da geschmacksgebende (LÜCK UND JAGER, 1995) und konservierende Eigenschaften (CORSETTI *et al.*, 1998b) mit dieser Säure in Verbindung gebracht werden. Bei den beiden getesteten Stämmen handelte es sich um fakultativ heterofermentative Organismen. Als solche sind sie in der Lage Pyruvat mit einer Pyruvat-Formiat-Lyase unter Formiatbildung zu Acetyl-CoA umzusetzen. Zwar besitzt *L. plantarum* das Enzym Pyruvat-Formiat-Lyase (LADERO *et al.*, 2007), mit dem neben Formiat und Acetat auch Ethanol entsteht, doch ist dieses unter anaeroben Bedingungen bei neutralem pH-Wert aktiv (GÄNZLE, 2006b). Daher ist dieser Stoffwechselweg im Sauerteig unwahrscheinlich. Die erwarteten Verhältnisse von Formiat, Acetat und Ethanol mit 2:1:1 wurden ebenfalls nicht in den Fermentationen erreicht. Nach 10 Tagen Propagation wurde in Amaranth mehr Ethanol als Formiat detektiert und in Buchweizen keines. Auch in den Fermentationsanalysen innerhalb von 24 h wurden in den Fällen, in denen Ethanolproduktion auftrat, ähnliche Resultate beobachtet.

Ethanolbildung könnte auf die entsprechende Pilzflora zurückzuführen sein, da auch Hefen zu den jeweiligen Zeitpunkten nicht auf YGC-Agar nachgewiesen wurden. In Amaranth wurde häufig die Gattung *Mucor* identifiziert. Sie gehört neben *Penicillium* und *Aspergillus spp.* zu den am häufigsten gefundenen Pilzen auf Getreidesilagen (REYES-VELÁZQUEZ *et al.*, 2008). Vertreter dieser sind dimorphe Spezies, die unter fermentativen Bedingungen hohe Raten an Ethanol produzieren können (ORLOWSKI, 1991). Es gibt unter anderem Untersuchungen zu den Spezies *M. indicus* (SUES *et al.*, 2005; SHARIFIA *et al.*, 2008) oder *M. circinelloides* (RANGEL-PORRAS *et al.*, 2005).

Auch für *M. racemosus* ist diese Metabolitbildung beschrieben (INDERLIED UND SYPHERD, 1978). Aus mykotoxologischer Sicht ist die Anwesenheit von Pilzen im Sauerteigerzeugnis kritisch zu betrachten. *Mucor spp.* sind im Allgemeinen aber als nicht pathogen einzustufen und werden sogar technologisch genutzt. Zwar wurde *M. racemosus* beispielsweise aus verdorbenen Konditoreiprodukten isoliert und daher als Verderbniserreger eingestuft (DANTIGNY *et al.*, 2004), andererseits analysierten ihn ROOPESH *et al.* (2006) als Phytaseproduzent in fermentierter Weizenkleie. Ebenso wurde er aus natürlich fermentierten italienischen Würsten isoliert, und trug zum charakteristischen Aroma bei (COCOLIN *et al.*, 2006).

Bei der Ethanolgärung von Hefen werden neben dem namensgebenden Hauptprodukt keine zusätzlichen organischen Säuren gebildet (EIKMANN UND EIKMANN, 2001). Laut Vertriebsinformation sollte IS1 Hefen mit einer Keimzahl von  $10^7$  KBE / g haben, während alle anderen fermentierten Amaranthteige nicht mit Hefen inokuliert wurden. Jedoch lagen die Keimzahlen für Hefen in allen Teigen unter  $10^2$  KBE / g. Dennoch wurde in den Teigen mit IS1 und IS2 Ethanol mit 73 mM bzw. 151 mM nachgewiesen. Dies ist demnach ein Resultat der heterofermentativen Verwertung von Hexosen über den Pentosephosphatweg. In diesem sind Laktat, Ethanol und CO<sub>2</sub> die Hauptprodukte (GÄNZLE *et al.*, 2007).

Zucker wie Gentobiose, Trehalose, Zellobiose oder Saccharose wurden ebenfalls in den Teigen detektiert. In Abhängigkeit der verschiedenen Prozessparameter und Florenzusammensetzung, sowie Lagerdauer der Mehle, lagen sie als Spaltprodukte niedermolekularer Kohlenhydrate im Teig vor oder aber als Substrat für den Metabolismus der Sauerteigflora. (BRANDT, 2006b). Aus diesem Grund verliefen die Konzentrationen im Teig in den verschiedenen Fermentationen unterschiedlich. Tendenziell fungierten Zellobiose und Saccharose mit sinkender Konzentration als Energiequelle. Trehalose und Gentobiose wurden als Spaltprodukt in den Teigen detektiert und können in folgenden Backprozessen als wichtige Aromavorstufen dienen (BRANDT, 2006a).

Allgemein hat die Fermentationstemperatur Einfluss auf den Verlauf und das Resultat einer Fermentation. Ein Temperaturunterschied von 5°C kann bereits enormen Einfluss auf die Wachstumsrate, Ansäuerung und der Menge an gebildeten Metaboliten, wie beispielsweise Milchsäure, haben. GAGGIANO *et al.*, (2007) beschrieben, dass die pH-Wert-Senkung bei einer Fermentation mit der Spezies *L. plantarum* bei einer

Führungstemperatur von 25°C um mehr als die Hälfte langsamer verlief, als bei einer Führungstemperatur von 37°C. JEKLE *et al.* (2010) verzeichneten in Amaranthfermentationen mit *L. plantarum* und *L. paralimentarius* eine Keimzahlreduktion von 80 % bzw. 85 %, wenn die Teige statt bei 30°C, bei einer Temperatur von 35°C geführt wurden. Daher wurden in dieser Arbeit hauptsächlich Fermentationen bei einer Standardtemperatur von 30°C durchgeführt. Eine Reduktion auf 25°C führte zu einem verlangsamten Wachstum der Mikroorganismen im Teig, sowie einer verzögerten bzw. reduzierten Ansäuerung und Metabolitbildung. Während der gesamten Fermentationszeit lagen die Werte für die Laktatkonzentrationen in dem Teig, der bei 25°C geführt wurde, ca. 30 mM unter den Werten der Standardführung. Dies war auch nach 24 h der Fall, wo sich die Mikroorganismen in beiden Teigen in der stationären Wachstumsphase befanden. Laut GAGGIANO *et al.* (2007) kann diese Differenz jedoch ausgeglichen werden, indem man eine größere Keimzahl der entsprechenden Starterkultur inokuliert. Dagegen spricht, dass auch nach 48 h bezüglich der Milchsäurekonzentration in den Teigen weiter anstiegen und noch immer ein Unterschied von 33 mM bestand, obwohl die Keimzahlen in beiden Fällen bereits bei  $4 \times 10^9$  KbE / g Teig lagen. Der Gärungsquotient lag nach 48 h unabhängig von der gewählten Temperatur bei 36. Allerdings könnte eine verringerte Fermentationstemperatur den Milchsäuregehalt reduzieren und in Kombination mit förderlichen Bedingungen für die Acetatbildung den Quotienten optimieren.

Die Konzentrationen der Milchsäure bei 25°C Führungstemperatur sind nicht als zu gering einzustufen. Vergleicht man die Laktatkonzentration des MSS mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 bei 25°C mit denen des MSS IS1 bei 30°C, so erhält man ähnliche Werte von 166 mM vs. 147 mM. Auch bezüglich der Fermentationscharakteristika pH-Wert, Säuregrad und Keimzahlen gab es zwischen den beiden Fällen kaum Unterschiede. Vergleicht man die 25°C-Fermentation mit 30°C, so wurde am Fermentationsende jeweils ein pH-Wert von 4,0 erreicht, Säuregrade von 22,2 und 22,9, sowie Keimzahlen mit Werten von  $4,0 \times 10^9$  KbE / g und  $4,2 \times 10^9$  KbE / g Teig mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 bzw. MSS IS1. Das heißt, dass der MSS aus den getesteten potentiellen Starterkulturen sogar unter suboptimalen Bedingungen die gleichen Ergebnisse erzielt wie eine kommerzielle Starterkultur unter optimalen Fermentationsbedingungen.



### V. ZUSAMMENFASSUNG

Pseudozerealien besitzen kein Gluten und sind daher für Menschen mit Zöliakie von Bedeutung. Es gibt derzeit keine kommerziell erhältlichen Starterkulturen für Sauerteige aus Pseudozerealien. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stämme *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in ihrer Eignung als Starterkulturen für Sauerteige aus Pseudozerealien evaluiert.

In den Analysen wurden Amaranth und Buchweizen eingesetzt. Die Teige wurden im Labormaßstab bei 30°C und einer Teigausbeute 200 zwischen zwei und zehn Tagen mit täglichem Anfrischen geführt. *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 säuerten sowohl einzeln als auch in Kombination Teige aus Amaranth und Buchweizen innerhalb der ersten zwei Propagationsschritte auf pH-Werte von rund 4 und Säuregrade von 25 bis 30 (Amaranth) bzw. 20 (Buchweizen) an.

Die zu evaluierenden Stämme wurden innerhalb der jeweiligen Fermentationen, ebenso wie die Mikroflora der Teige, über RAPD-PCR und Sequenzierung der 16S rDNA bzw. 28S rDNA identifiziert und voneinander differenziert. Darauf basierend zeigte sich, dass beide Stämme wettbewerbsstark sind. Sie setzten sich gegen die autochthone Milchsäurebakterien-Mikroflora durch, darunter auch gegen Stämme derselben Spezies. Sie verdrängten den Großteil an Hefen und Pilzen bereits innerhalb der ersten 12 h. In Ausnahmefällen konnten Hefen, Pilze und vereinzelt auch Milchsäurebakterien über eine längere Fermentationsdauer nicht vollständig zurückgedrängt werden. Dennoch setzten sie sich gegen eine Mikroflora durch, die bereits auf  $10^8$  KbE / g Teig angewachsen war. Weiterhin dominierten die beiden Stämme die Milchsäurebakterien-Mikroflora in den Teigen nach 10 Tagen immer mit einem Anteil  $\geq 68$  %. *L. paralimentarius* AL28 eignete sich diesbezüglich sowohl als Einzelstammstarter-, wie auch als Mehrstammstarterkultur in beiden Pseudozerealien. *L. plantarum* AL30 schien besonders im Buchweizen als Teil der Mehrstammstarterkultur geeignet, da hier beide Stämme im Verhältnis 1:1 vorlagen, was im Amaranth nicht der Fall war (AL28:AL30 = 4:1). Als Einzelstammstarterkultur erreichte er sowohl in Buchweizen, als auch in Amaranth Anteile  $\geq 98$  %.

Die Analysen einzelner Propagationsschritte ergaben, dass nach einer kurzen lag-Phase ( $\leq 2$  h) die exponentielle Wachstumsphase nach 9 h Fermentationszeit in die stationäre Phase übergang und sich Keimzahlen zwischen  $10^9$  KbE / g und  $10^{10}$  KbE / g Teig einstellten.

Die Bildung literaturbekannter Aroma-Markersubstanzen wie z.B. Laktat, Acetat oder Mannitol wurden im Sauerteig und Kultivierungsmedium über HPLC analysiert. Des Weiteren wurden sie bezüglich ihres metabolischen Profils auf proteolytische Aktivität, sowie Stärkeabbau getestet und mittels api<sup>®</sup> 50CH Test weiter charakterisiert. Die getesteten potentiellen Starterkulturen bildeten in mMRS5-Boullion Mannitol, jedoch nicht in den fermentierten Pseudozerealien. Sie bildeten weiterhin bis zu 214 mM Milchsäure. Bei keinem der Stämme wurden erhöhte proteolytische Aktivitäten im Teig oder amylolytische Eigenschaften nachgewiesen.

In Bezug zu den getesteten Parametern zeigten die eingesetzten potentiellen Starterkulturen ähnliche Eigenschaften wie kommerziell erhältliche. Sie produzierten sogar bis zu 48 mM mehr Laktat.

Die Stämme sind stabil gegenüber schwankenden Fermentationstemperaturen. Sogar unter suboptimalen Bedingungen, bei einer Temperaturerniedrigung um 5°C, erzielte die Mehrstammstarterkultur vergleichbare Fermentationscharakteristika wie die kommerziell erhältliche Mehrstammstarterkultur IS1 unter optimalen Fermentationsparametern (30°C). Beispielsweise wurde bei 25°C durch die Kombination beider Stämme noch 20 mM mehr Laktat gebildet, als bei einem bei 30°C geführten Amaranth-Teig, der mit IS1 inokuliert wurde.

Abschließend betrachtet erfüllen die analysierten Stämme aus mikrobiologischer Sicht alle wichtigen Anforderungen an eine Sauerteigstarterkultur. Sie zeigten sich kompetitiv und stabil im Fermentationsverhalten und sind interessante Kandidaten für den Einsatz in Sauerteigen.

## VI. ANHANG

**Anhang 1: Keimzahlen, pH-Werte und Säuregrade der Fermentationen**

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus allen, den angegebenen Parametern entsprechend durchgeführten, Fermentationen und Wiederholungsfermentationen dar.

**Tabelle 21:** Einzel- und Gesamtkeimzahlen in [ $10^9$  KbE / g] von *L. paralimentarius* AL28 (AL28, Morphotyp b+c), *L. plantarum* AL30 (AL30, Morphotyp a) und beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30) in Amaranth über 10 Fermentationstage.

Einsatz	AL28		AL30		AL28+AL30		
	b+c	gesamt	a	gesamt	b+c	a	gesamt
<b>Amaranth</b>							
Tag 0	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,6	0,4 ± 0,6	0,007 ± 0,001	1,1 ± 0,0003	0,02 ± 0,0008
Tag 1	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,5	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,4	1,6 ± 0,6	2,3 ± 0,7	3,9 ± 0,07
Tag 2	2,8 ± 0,07	2,8 ± 0,06	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1,6 ± 0,5	2,7 ± 1,3	4,4 ± 0,8
Tag 3	3,2 ± 0,6	3,2 ± 0,6	5,5 ± 1,6	5,5 ± 1,6	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,07	3,1 ± 0,3
Tag 4	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,4	6,4 ± 1,3	6,4 ± 1,3	2,8 ± 0,07	1,6 ± 0,6	4,4 ± 0,5
Tag 5	4,2 ± 0,5	4,2 ± 0,5	5,6 ± 0,6	5,6 ± 0,6	2,6 ± 0,04	1,2 ± 0,4	3,9 ± 0,6
Tag 6	3,7 ± 0,5	3,8 ± 0,4	6,3 ± 0,9	6,3 ± 0,9	2,8 ± 0,4	1,3 ± 0,5	4,1 ± 0,8
Tag 7	3,4 ± 0,07	3,8 ± 0,4	5,5 ± 1,0	5,5 ± 1,0	2,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2	3,5 ± 0,04
Tag 8	4,0 ± 0,7	4,2 ± 0,5	6,2 ± 1,2	6,2 ± 1,2	3,1 ± 0,1	0,8 ± 0,07	3,9 ± 0,2
Tag 9	3,2 ± 0,4	3,9 ± 0,7	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,04	4,0 ± 0,1
Tag 10	2,7 ± 0,4	3,6 ± 0,1	4,2 ± 3,4	4,3 ± 3,8	3,2 ± 0,1	7,3 ± 0,2	3,9 ± 0,3

**Tabelle 22:** Einzel- und Gesamtkeimzahlen in [ $10^9$  KbE / g] von *L. paralimentarius* AL28 (AL28, Morphotyp b+c), *L. plantarum* AL30 (AL30, Morphotyp a) und beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30) in Buchweizen über 10 Fermentationstage.

Einsatz	AL28		AL30		AL28+AL30		
	b+c	gesamt	a	gesamt	b+c	a	gesamt
<b>Buchweizen</b>							
Tag 0	0,008 ±0,0009	0,008 ±0,0009	0,007 ±0,0003	0,007 ±0,0003	0,00007 ±0,0004	0,009 ±0,00007	0,02 ±0,0007
Tag 1	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,5	2,9 ± 0,07	2,9 ± 0,07	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	3,1 ± 0,3
Tag 2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,4	2,9 ± 0,6
Tag 3	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,4	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,4	3,0 ± 0,6

**Tabelle 22 (Fortsetzung):** Einzel- und Gesamtkeimzahlen in [ $10^9$  KbE / g] von *L. paralimentarius* AL28 (AL28, Morphotyp b+c), *L. plantarum* AL30 (AL30, Morphotyp a) und beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30) in Buchweizen über 10 Fermentationstage.

Einsatz	AL28		AL30		AL28+AL30		
	b+c	gesamt	a	gesamt	b+c	a	gesamt
Tag 4	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3	1,4 ± 0,007	1,1 ± 0,02	2,5 ± 0,0
Tag 5	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,2 ± 0,6	3,2 ± 0,6	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,04	2,5 ± 0,2
Tag 6	2,2 ± 0,8	2,3 ± 0,8	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	1,4 ± 0,07	1,3 ± 0,02	2,7 ± 0,07
Tag 7	2,1 ± 0,5	2,5 ± 0,5	4,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0	2,1 ± 0,04	1,6 ± 0,3	3,7 ± 0,2
Tag 8	2,7 ± 1,3	3,8 ± 1,7	3,6 ± 0,7	3,6 ± 0,7	1,5 ± 0,07	1,3 ± 0,06	2,7 ± 0,0
Tag 9	2,8 ± 0,6	4,1 ± 1,3	4,7 ± 1,7	4,7 ± 1,7	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,6
Tag 10	2,2 ± 0,6	3,2 ± 0,9	3,5 ± 1,1	3,5 ± 1,1	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,3	3,1 ± 0,8

**Tabelle 23:** Keimzahlen in [KbE / g] auf YGC- (Hefe, Pilz) und mMRS5- (Milchsäurebakterien: MSB) Agar einzelner Fermentationen in Amaranth und Buchweizen mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30), in denen die eukaryotische Begleitflora auch an Tag 10 auftrat.

Einsatz	AL28			AL30		
	Hefe	Pilz	MSB	Hefe	Pilz	MSB
<i>Amaranth</i>						
Tag 0	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$5,1 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$8,3 \times 10^8$
Tag 5	n.d. <sup>1</sup>	$5,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^9$	$7,7 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$6,0 \times 10^9$
Tag 10	$1,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^4$	$3,7 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	$7,1 \times 10^9$
<i>Buchweizen</i>						
Tag 0	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$1,5 \times 10^7$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$7,0 \times 10^6$
Tag 5	$2,5 \times 10^3$	n.d. <sup>1</sup>	$2,9 \times 10^9$	$8,5 \times 10^4$	n.d. <sup>1</sup>	$3,7 \times 10^9$
Tag 10	$5,9 \times 10^4$	n.d. <sup>1</sup>	$2,8 \times 10^9$	$7,0 \times 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	$2,8 \times 10^9$

<sup>1</sup> n.d. = nicht detektiert, Keimzahl  $< 10^2$

**Tabelle 24:** pH-Werte, Säuregrade und Keimzahlen [KbE / g] in spontan geführter Amaranthfermentation (0 h bis 24 h) und nach Zusatz von *L. paralimentarius* AL28 bzw. *L. plantarum* AL30 (24 h neu bis 60 h) bei 30°C Führungstemperatur über 60 h. Angegebene Keimzahlen für Morphotyp b+c, Morphotyp a, Hefen und bakterielle Begleitflora (Bakt. BGF).

<i>Amaranth</i>	pH		SH		KbE / g Teig					
<b>spontan</b>										
0 h	6,4		2,9		n.d. <sup>1</sup>					
24 h	5,4		9,4		Bakterielle Flora: $5,2 \times 10^8$ / Hefen: $4,3 \times 10^4$					
Einsatz	AL28	AL30	AL28	AL30	AL28			AL30		
					„b+c“	Bakt. BGF	Hefen	„a“	Bakt. BGF	Hefen
24 h neu	6,2	6,2	3,6	3,5	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$	$3,7 \times 10^3$	$5,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	$5,4 \times 10^3$
28 h	5,6	5,6	7,5	7,3	$7,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^3$	$6,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^3$
32 h	4,6	4,7	14,1	13,5	$6,9 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	$7,5 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>
36 h	4,2	4,3	19,5	18,9	$1,5 \times 10^9$	$4,1 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	$2,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>
48 h	3,9	4,0	27,5	24,9	$1,8 \times 10^9$	$3,3 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	$2,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>
48 h neu	5,7	5,8	5,5	5,4	$1,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	n.d. <sup>1</sup>	$2,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	n.d. <sup>1</sup>
52 h	4,7	4,8	11,6	11,3	$9,5 \times 10^8$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$1,4 \times 10^9$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
56 h	4,2	4,3	18,1	17,5	$1,5 \times 10^9$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$3,0 \times 10^9$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
60 h	4,0	4,1	21,3	19,9	$3,0 \times 10^9$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	$5,5 \times 10^9$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> n.d. = nicht detektiert, Keimzahl  $< 10^2$

**Anhang 2: Rohdaten der Proteolyse**

**Tabelle 25:** Konzentrationen an freien Aminosäuren in [mg / g Teig] in Amaranthteigen mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28), *L. plantarum* AL30 (AL30), beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30) und einem spontan geführten Teig über 48 h Fermentation.

Einsatz	AL28	AL30	AL28+AL30	spontan
<i>Amaranth</i>	[mg / g]	[mg / g]	[mg / g]	[mg / g]
0 h	1,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1
2 h	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1
4 h	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,0	3,8 ± 0,1
6 h	3,3 ± 0,0	3,6 ± 0,3	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,3
9 h	3,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,4	4,6 ± 0,1
12 h	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,1	5,2 ± 0,1
15 h	4,8 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	4,6 ± 0,6
24 h	6,2 ± 0,2	4,6 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1
24 h neu	2,4 ± 0,1	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1
48 h	6,0 ± 0,0	4,0 ± 0,4	5,2 ± 0,6	3,3 ± 0,3

**Anhang 3: HPLC-Daten der Teiganalysen**

Die angegebenen Mittelwerte resultieren aus jeweils sechs Messwerten einer Fermentation und der dazugehörigen Wiederholungsfermentation. Werte, die unter dem Detektionslimit der Anlage von 3 mM lagen aber ein Signal lieferten, sind mit  $\leq 3$  mM angegeben.

Verhielten sich Werte einer Fermentation nicht wie die der dazugehörigen Wiederholungsfermentation, so wurde der Mittelwert jeweils aus den drei Messwerten eines Teiges gebildet und die Resultate der Fermentation bzw. Wiederholungsfermentation einzeln aufgelistet.

**Tabelle 26:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] im mMRS5-Medium nach 17 h Inkubation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28), *L. plantarum* AL30 (AL30) bzw. ohne Zusatz von Mikroorganismen (Blank).

Einsatz	Blank	AL28	AL30
<i>mMRS5-Bouillon</i>	[mM]	[mM]	[mM]
Laktat	3,9 ± 0,3	71,3 ± 1,7	82,6 ± 2,1
Formiat	4,8 ± 2,2	6,0 ± 0,5	5,0 ± 2,2
Acetat	40,6 ± 0,6	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Glukose	57,7 ± 1,2	19,7 ± 0,1	19,6 ± 0,1
Fruktose	58,3 ± 3,0	29,6 ± 1,4	22,4 ± 0,1
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	19,1 ± 0,1	18,9 ± 0,0
Saccharose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Zellobiose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Maltose	21,6 ± 1,0	20,4 ± 0,45	18,2 ± 0,1
Trehalose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 27:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Amaranthteigen nach 10 Tagen Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28), *L. plantarum* AL30 (AL30) und beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30).

Einsatz	AL28	AL30	AL28+AL30
<i>Amaranth</i>	[mM]	[mM]	[mM]
Laktat	186,3 ± 2,8	179,2 ± 5,3	198,6 ± 7,9
Formiat	67,0 ± 4,6	46,7 ± 5,6	59,5 ± 4,6
Acetat	5,4 ± 0,7	5,8 ± 1,1	4,8 ± 1,1
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Ethanol	238,5 ± 4,1 87,2 ± 4,4	257,3 ± 8,0 17,9 ± 4,0	63,2 ± 7,2

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 28:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Buchweizenteigen nach 1, 5 und 10 Tagen Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28) und *L. plantarum* AL30 (AL30).

Einsatz	AL28			AL30		
	Tag 1	Tag 5	Tag 10	Tag 1	Tag 5	Tag 10
<i>Buchweizen</i>						
Laktat	149,7 ± 1,9	147,5 ± 3,2	143,3 ± 9,3	149,6 ± 2,5	153,2 ± 3,5	144,3 ± 14,3
Formiat	13,3 ± 3,4	13,0 ± 1,7	13,2 ± 1,6	9,0 ± 1,1	11,7 ± 1,9	14,2 ± 2,5
Acetat	5,1 ± 1,1	7,9 ± 2,9	8,0 ± 1,4	6,8 ± 2,7	8,2 ± 2,0	9,8 ± 2,4
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert



**Tabelle 29:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Buchweizenteigen nach 1, 5 und 10 Tagen Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination (AL28+AL30).

Einsatz	AL28+AL30		
<i>Buchweizen</i>	Tag 1	Tag 5	Tag 10
Laktat	148,9 ± 5,0	139,1 ± 2,6	151,2 ± 6,9
Formiat	12,4 ± 1,9	11,2 ± 1,7	13,7 ± 1,4
Acetat	6,9 ± 2,3	8,7 ± 2,2	8,0 ± 1,3
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 30:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Buchweizenteigen nach 10 Tagen Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 (AL28), *L. plantarum* AL30 (AL30) und beiden Stämmen in Kombination (AL28+AL30).

Einsatz	AL28	AL30	AL28+AL30
<i>Buchweizen</i>	[mM]	[mM]	[mM]
Laktat	143,3 ± 9,3	144,3 ± 14,3	151,2 ± 6,9
Formiat	13,2 ± 1,6	14,2 ± 2,5	13,7 ± 1,4
Acetat	8,0 ± 1,4	9,8 ± 2,4	8,0 ± 1,3
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 31:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 25°C mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination.

AL28+AL30	25°C				
<i>Amaranth</i>	0 h	8 h	24 h	36 h	48 h
Laktat	≤ 3 mM	26,7 <sup>2</sup>	165,6 ± 1,7	145,5 ± 4,2	181,0 ± 7,4
Formiat	24,4 ± 1,0	29,7 <sup>2</sup>	38,3 ± 3,8	36,0 ± 1,9	36,3 ± 0,7
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	5,0 ± 1,0
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	4,2 ± 3,9	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>nur ein Messwert, da durch Anlagenprobleme Materialverlust

**Tabelle 32:** Konzentrationen von Säuren und Ethanol in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 25°C mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination.

AL28+AL30	30°C				
<i>Amaranth</i>	0 h	8 h	24 h	36 h	48 h
Laktat	≤ 3 mM	75,9 <sup>2</sup>	192,2 ± 4,5	176,5 ± 2,2	214,3 ± 8,4
Formiat	24,4 ± 1,0	28,7 <sup>2</sup>	37,0 ± 2,7	35,2 ± 1,3	39,2 ± 1,0
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	4,2 ± 3,5	3,6 ± 0,5	5,9 ± 1,4
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>nur ein Messwert, da durch Anlagenprobleme Materialverlust

**Tabelle 33:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C ohne Zusatz von Starterkulturen.

	spontan				
<i>Amaranth</i>	0 h	2 h	4 h	6 h	9 h
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Formiat	22,6 ± 3,0	25,1 ± 1,4	25,6 ± 3,4	28,1 ± 1,0	26,4 ± 1,4
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	5,3 ± 7,5
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Fruktose	44,1 ± 0,2 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	47,7 ± 0,7 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	57,2 ± 1,3 81,0 ± 1,0
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Saccharose	68,8 ± 5,2 68,4 ± 4,8	k.A. <sup>2</sup>	56,6 ± 5,0 65,8 ± 9,5	k.A. <sup>2</sup>	41,9 ± 0,8 63,2 ± 6,2
Zellobiose	55,8 ± 3,4 45,4 ± 3,3	k.A. <sup>2</sup>	56,3 ± 3,2 52,3 ± 1,1	k.A. <sup>2</sup>	46,0 ± 5,6 45,6 ± 1,6
Maltose	24,1 ± 0,0 47,8 ± 2,5	k.A. <sup>2</sup>	24,3 ± 0,1 51,5 ± 3,2	k.A. <sup>2</sup>	24,1 ± 0,1 56,4 ± 1,3
Trehalose	25,8 ± 1,4 47,5 ± 2,0	k.A. <sup>2</sup>	25,5 ± 0,4 61,5 ± 5,3	k.A. <sup>2</sup>	24,6 ± 1,0 61,7 ± 7,3
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 33 (Fortsetzung):** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C ohne Zusatz von Starterkulturen.

Amaranth	spontan				
	12 h	15 h	24 h	24 h neu	48 h
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	7,2 ± 2,7	49,3 ± 4,9	13,5 ± 0,7	164,5 ± 2,0
Formiat	27,4 ± 1,0	29,3 ± 1,4	32,1 ± 1,0	24,2 ± 1,8	35,3 ± 1,2
Acetat	5,4 ± 1,6	10,2 ± 2,1	16,7 ± 8,9	5,3 ± 1,0	4,4 ± 3,0
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	3,6 ± 0,3	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Ethanol	19,8 ± 6,7	23,4 ± 5,1	70,6 ± 3,6 45,7 ± 0,7	15,0 ± 0,2	27,7 ± 2,1
Fruktose	k.A. <sup>2</sup>	66,2 ± 1,6 82,0 ± 2,9	53,0 ± 0,5 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Mannitol	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Saccharose	k.A. <sup>2</sup>	28,8 ± 0,6 56,5 ± 6,0	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Zellobiose	k.A. <sup>2</sup>	34,3 ± 3,1 43,8 ± 4,3	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Maltose	k.A. <sup>2</sup>	24,1 ± 0,3 50,5 ± 3,0	24,2 ± 0,1 43,6 ± 0,7	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Trehalose	k.A. <sup>2</sup>	24,8 ± 0,2 59,8 ± 6,4	25,7 ± 0,4 49,7 ± 2,3	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Gentobiose	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> 62,2 ± 6,6	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 34:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28.

Einsatz	AL28				
	0 h	2 h	4 h	6 h	9 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	4,2 ± 1,0	16,7 ± 0,6	68,0 ± 6,5
Formiat	22,6 ± 1,4	21,1 ± 1,7	22,1 ± 2,8	24,6 ± 0,5	32,7 ± 2,4
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> 9,6 ± 3,2
Fruktose	38,8 ± 0,1 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	40,8 ± 0,9 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	43,8 ± 1,7 n.d. <sup>1</sup>
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Saccharose	34,1 ± 2,8 52,0 ± 1,3	k.A. <sup>2</sup>	30,5 ± 3,9 55,7 ± 4,2	k.A. <sup>2</sup>	24,5 ± 1,2 49,5 ± 2,0
Zellobiose	33,7 ± 3,5 42,0 ± 1,8	k.A. <sup>2</sup>	26,2 ± 0,2 43,2 ± 4,7	k.A. <sup>2</sup>	19,9 ± 0,6 38,7 ± 2,4
Maltose	n.d. <sup>1</sup> 44,4 ± 1,2	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 47,9 ± 1,4	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Trehalose	22,7 ± 0,2 47,4 ± 0,4	k.A. <sup>2</sup>	22,4 ± 0,1 56,5 ± 7,5	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 34 (Fortsetzung):** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28.

Einsatz	AL28				
	12 h	15 h	24 h	24 h neu	48 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	115,3 ± 0,3	134,7 ± 4,3	184,5 ± 4,1	24,0 ± 0,4	188,5 ± 1,8
Formiat	33,1 ± 3,2	35,1 ± 2,3	37,7 ± 1,3	23,4 ± 1,0	37,1 ± 1,7
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>	3,6 ± 0,9
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
		12,4 ± 4,9	11,6 ± 2,9		
Fruktose	k.A. <sup>2</sup>	44,7 ± 2,1	41,9 ± 1,1	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		80,5 ± 1,9	80,1 ± 0,9		
Mannitol	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Saccharose	k.A. <sup>2</sup>	20,9 ± 0,2	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		46,7 ± 1,5	n.d. <sup>1</sup>		
Zellobiose	k.A. <sup>2</sup>	17,8 ± 0,7	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		37,2 ± 3,3	n.d. <sup>1</sup>		
Maltose	k.A. <sup>2</sup>	20,7 ± 0,1	20,6 ± 0,2	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		41,9 ± 0,3	n.d. <sup>1</sup>		
Trehalose	k.A. <sup>2</sup>	22,2 ± 0,2	22,0 ± 0,2	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		46,0 ± 0,8	n.d. <sup>1</sup>		
Gentobiose	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		56,3 ± 2,3	56,3 ± 2,0		

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 35:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum* AL30.

Einsatz	AL30				
	0 h	2 h	4 h	6 h	9 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	4,4 ± 1,1	22,9 ± 0,6	94,4 ± 7,2
Formiat	22,2 ± 3,8	23,8 ± 2,3	22,9 ± 3,2	24,5 ± 1,4	31,6 ± 2,2
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Fruktose	38,6 ± 0,4 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	40,7 ± 0,7 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	39,2 ± 0,1 n.d. <sup>1</sup>
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Saccharose	36,4 ± 4,2 57,9 ± 1,7	k.A. <sup>2</sup>	31,8 ± 2,5 56,9 ± 1,4	k.A. <sup>2</sup>	23,2 ± 0,4 51,6 ± 0,8
Zellobiose	30,4 ± 3,0 60,2 ± 0,5	k.A. <sup>2</sup>	25,5 ± 3,2 62,1 ± 1,8	k.A. <sup>2</sup>	20,0 ± 1,7 61,8 ± 1,5
Maltose	20,6 ± 0,1 49,0 ± 0,3	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 49,8 ± 0,5	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Trehalose	21,7 ± 0,6 55,7 ± 1,4	k.A. <sup>2</sup>	22,0 ± 0,5 64,7 ± 0,6	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 51,5 ± 1,7	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 46,3 ± 1,6

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 35 (Fortsetzung):** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum* AL30.

Einsatz	AL30				
	12 h	15 h	24 h	24 h neu	48 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	113,9 ± 1,7	138,6 ± 6,0	170,9 ± 3,5	32,9 ± 1,7	174,4 ± 3,2
Formiat	31,8 ± 0,9	33,0 ± 3,2	35,7 ± 3,2	18,1 ± 7,1	36,8 ± 2,4
Acetat	5,1 ± 0,8	6,7 ± 1,7	5,3 ± 0,7	n.d. <sup>1</sup>	8,7 ± 1,9
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Propionat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
		9,3 ± 1,9	7,6 ± 0,6		
Fruktose	k.A. <sup>2</sup>	39,5 ± 0,2	39,9 ± 0,3	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		n.d. <sup>1</sup>	88,3 ± 0,3		
Mannitol	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Saccharose	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		48,9 ± 0,7	46,9 ± 0,7		
Zellobiose	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		59,8 ± 0,7	55,4 ± 4,7		
Maltose	k.A. <sup>2</sup>	20,6 ± 0,1	20,6 ± 0,0	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>		
Trehalose	k.A. <sup>2</sup>	21,9 ± 0,1	22,0 ± 0,4	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>		
Gentobiose	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
		54,4 ± 2,0	55,3 ± 4,2		

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt



**Tabelle 36:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination.

Einsatz	AL28+AL30				
	0 h	2 h	4 h	6 h	9 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	7,2 ± 0,7	30,5 ± 1,0	98,7 ± 3,0
Formiat	21,4 ± 1,9	25,5 ± 3,8	25,2 ± 0,7	27,5 ± 0,8	32,6 ± 0,3
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	10,8 ± 3,1 n.d. <sup>1</sup>
Fruktose	44,2 ± 0,3 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	45,8 ± 0,3 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	44,6 ± 0,4 n.d. <sup>1</sup>
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Saccharose	35,0 ± 2,0 51,5 ± 1,3	k.A. <sup>2</sup>	36,2 ± 2,8 50,2 ± 2,3	k.A. <sup>2</sup>	26,2 ± 1,0 45,7 ± 0,0
Zellobiose	37,6 ± 4,2 42,8 ± 3,2	k.A. <sup>2</sup>	36,5 ± 3,0 45,9 ± 8,6	k.A. <sup>2</sup>	28,5 ± 1,0 40,0 ± 2,6
Maltose	n.d. <sup>1</sup> 43,1 ± 0,5	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 44,6 ± 0,6	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Trehalose	n.d. <sup>1</sup> 47,4 ± 1,3	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> 49,9 ± 2,9	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 36 (Fortsetzung):** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 48 h Fermentation bei 30°C mit *L. paralimentarius* AL28 und *L. plantarum* AL30 in Kombination.

Einsatz	AL28+AL30				
	12 h	15 h	24 h	24 h neu	48 h
<i>Amaranth</i>					
Laktat	126,9 ± 3,3	151,3 ± 2,4	194,9 ± 8,8	39,7 ± 1,3	211,8 ± 0,2
Formiat	32,9 ± 1,4	35,3 ± 2,0	36,9 ± 1,9	24,9 ± 3,3	42,0 ± 0,7
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	3,9 ± 1,2	6,2 ± 1,1	n.d. <sup>1</sup>	6,7 ± 0,1
Zitrat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	16,9 ± 3,6 n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Fruktose	k.A. <sup>2</sup>	44,7 ± 0,3 n.d. <sup>1</sup>	44,8 ± 0,2 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Mannitol	k.A. <sup>2</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Saccharose	k.A. <sup>2</sup>	23,3 ± 0,5 44,1 ± 1,1	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Zellobiose	k.A. <sup>2</sup>	24,9 ± 0,5 36,3 ± 0,2	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Maltose	k.A. <sup>2</sup>	24,0 ± 0,0 n.d. <sup>1</sup>	24,2 ± 0,1 n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Trehalose	k.A. <sup>2</sup>	24,0 ± 0,4 n.d. <sup>1</sup>	24,8 ± 0,4 44,6 ± 1,0	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>
Gentobiose	k.A. <sup>2</sup>	54,6 ± 1,6 55,4 ± 3,3	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	k.A. <sup>2</sup>	k.A. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert; <sup>2</sup>k.A. = keine Analyse an diesem Messpunkt

**Tabelle 37:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 24 h Fermentation bei 30°C mit MSS IS1.

Einsatz	IS1				
<i>Amaranth</i>	0 h	4 h	9 h	15 h	24 h
Laktat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	55,9 ± 15,2	109,2 ± 8,9	146,9 ± 14,3
Formiat	25,2 ± 2,1	27,6 ± 1,4	34,9 ± 1,1	41,3 ± 3,7	43,1 ± 1,6
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	10,6 ± 1,7	15,8 ± 2,3	17,0 ± 1,9
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	9,1 ± 1,3 n.d. <sup>1</sup>	52,5 ± 10,0	75,0 ± 10,6	73,2 ± 2,2
Fruktose	n.d. <sup>1</sup> 44,4 ± 0,5	45,1 ± 0,7 50,8 ± 0,5	44,2 ± 0,5 47,1 ± 0,3	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Mannitol	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	66,5 ± 6,8 58,7 ± 2,3	65,6 ± 7,3 60,1 ± 2,3	60,7 ± 2,1 58,8 ± 1,9
Saccharose	35,8 ± 4,8 38,8 ± 3,2	30,7 ± 2,4 27,3 ± 0,4	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Zellobiose	34,9 ± 3,9 40,8 ± 2,6	29,7 ± 1,1 31,2 ± 1,1	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Maltose	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>
Trehalose	n.d. <sup>1</sup> 24,5 ± 0,4	n.d. <sup>1</sup> 23,7 ± 0,1	n.d. <sup>1</sup> 23,9 ± 0,5	n.d. <sup>1</sup> 24,0 ± 0,4	24,6 ± 0,7 24,6 ± 0,5
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup> n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Tabelle 38:** Konzentrationen von Säuren, Ethanol, Zuckern und Zuckeralkoholen in [mM] in Amaranthteigen über 24 h Fermentation bei 30°C mit ESS IS2.

Amaranth	IS2				
	0 h	4 h	9 h	15 h	24 h
Laktat	n.d. <sup>1</sup>	3,0 ± 1,3	75,8 ± 12,5	125,4 ± 7,3	154,7 ± 5,1
Formiat	23,8 ± 1,6	27,7 ± 2,5	34,9 ± 0,5	39,7 ± 1,2	46,5 ± 2,2
Acetat	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM	15,4 ± 1,8	20,1 ± 1,2	22,1 ± 0,9
Zitrat	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Succinat	n.d. <sup>1</sup>	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM	≤ 3 mM
Propionat	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Ethanol	n.d. <sup>1</sup>	14,3 ± 9,2	81,7 ± 14,8	124,7 ± 8,0	151,1 ± 6,4
Fruktose	n.d. <sup>1</sup>	54,2 ± 0,4	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
	n.d. <sup>1</sup>	46,8 ± 0,6	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Mannitol	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	57,9 ± 6,4	59,3 ± 1,9	58,9 ± 4,0
	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	122,4 ± 5,9	103,8 ± 2,3	99,0 ± 5,9
Saccharose	36,2 ± 7,3	32,8 ± 2,2	7,8 ± 3,5	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
	75,5 ± 5,6	54,8 ± 1,7	26,2 ± 0,1	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Zellobiose	32,7 ± 6,2	33,2 ± 3,2	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
	63,3 ± 0,8	54,8 ± 10,4	29,6 ± 0,6	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Maltose	24,1 ± 0,0	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	23,8 ± 0,1
	24,1 ± 0,4	23,9 ± 0,1	24,0 ± 0,1	24,1 ± 0,2	24,2 ± 0,1
Trehalose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	24,1 ± 0,2
	24,9 ± 0,2	25,0 ± 0,4	24,6 ± 0,4	24,8 ± 0,2	25,1 ± 0,1
Gentobiose	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>n.d. = nicht detektiert

**Anhang 4: Ergebnisse der Bestimmung der Spezieszugehörigkeit**

Alle molekularbiologisch analysierten Organismen wurden zunächst mit RAPD-PCR untersucht. Pro verschiedenem RAPD-Fingerprint wurde anschließend je eine Probe sequenziert. Die Zuordnung der Spezies anhand der Sequenzabgleiche mit Datenbanken (II. 3.4.5), ist in den folgenden Anhängen zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 39:** Organismen der autochthonen Mehlflora: Angaben über interne Sequenzierungs-Nr. (Nr.), Sequenzidentität (ID) [%], Query Coverage (QC) [%], Maximal Score (Max) [bits], Total Score (Tot) [bits], Accession-Nr. (Acc.-Nr.), Bemerkungen zu den Suchergebnissen und daraus resultierende Bewertung (Interpretation) der Spezieszugehörigkeit.

Autochthone Mehlflora							
Nr.	ID	QC	Max	Tot	Acc.-Nr.	Bemerkung	Interpretation
AV15	99	100	1162	5763	CP002222.1	ausschließlich <i>L. plantarum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
AV16	99	100	1035	1035	AJ422034.1	<i>L. paralimentarius</i>	<i>Lactobaillus paralimentarius</i>
	99	100	1035	1035	AJ417500.1	DSMZ-Stamm	
AV17	100	100	987	987	GU138609.1	<i>L. paralimentarius</i>	<i>Lactobaillus paralimentarius</i>
	99	100	981	981	AJ417500.1	DSMZ-Stamm	
AV18	99	100	1037	1037	AJ417500.1	ausschließlich <i>L. paralimentarius</i> als Ergebnis	<i>Lactobaillus paralimentarius</i>
	100	100	1042	1042	GU138607.1		
AV19	99	100	1151	1151	GU552552.1	ausschließlich <i>L. plantarum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	99	100	1151	5708	CP002222.1		
AV20	99	100	1253	1253	GU552552.1	ausschließlich <i>L. plantarum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	99	100	1253	6215	CP002222.1		
AV21	100	100	1142	5661	CP002222.1	ausschließlich <i>L. plantarum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
AV32	99	100	1264	6271	CP002222.1	ausschließlich <i>L. plantarum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus plantarum</i>
AV27	99	100	1249	1249	-	verschiedene Enterokokken	<i>Enterococcus sp.</i>
	99	99	1243	1243	EU438983.1	<i>Enterococcus sp.</i>	
AV28	99	100	1249	6241	CP000422.1	ATCC-Stamm	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
AV36	99	100	1168	1168	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
AV48	98	100	1110	1110	FN689395.1	<i>C. laurentii</i> , nicht eindeutig bzgl. anderer Ergebnisse	<i>Cryptococcus sp.</i>

**Tabelle 40:** Organismen der eukaryotischen Begleitflora: Angaben über interne Sequenzierungs-Nr. (Nr.), Sequenzidentität (ID) [%], Query Coverage (QC) [%], Maximal Score (Max Sco) [bits], Total Score (Tot Sco) [bits], Accession-Nr. (Acc.-Nr.), Bemerkungen zu den Suchergebnissen und daraus resultierende Bewertung (Interpretation) der Spezieszugehörigkeit.

Eukaryotische Begleitflora							
Nr.	ID	QC	Max Sco	Tot Sco	Acc.-Nr.	Bemerkung	Interpretation
AV31	99	100	1101	1101	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
AV32	99	100	1037	1037	CR380958.2	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
AV34	99	74	784	784	AB085807.1	<i>Cryptococcus flavescens</i>	<i>Cryptococcus flavescens</i>
AV43	99	100	1002	1002	FN650662.1	<i>Mucor sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>
AV44	99	100	1140	1140	EU057562.1	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>
AV45	99	100	1245	1245	EU057562.1	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>
AV46	99	100	1210	1210	EU057562.1	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>

**Tabelle 41:** Organismen der ekaryotischen Begleitflora innerhalb eines Propagations-schrittes: Angaben über interne Sequenzierungs-Nr. (Nr.), Sequenzidentität (ID) [%], Query Coverage (QC) [%], Maximal Score (Max Sco) [bits], Total Score (Tot Sco) [bits], Accession-Nr. (Acc.-Nr.), Bemerkungen zu den Suchergebnissen und daraus resultierende Bewertung (Interpretation) der Spezieszugehörigkeit.

Eukaryotische Begleitflora							
Nr.	ID	QC	Max Sco	Tot Sco	Acc.-Nr.	Bemerkung	Interpretation
AV73	99	100	1224	1024	-	nicht eindeutig, ob <i>Enterococcus hirae</i> oder <i>faecium</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
AV74	99	100	1223	1223	AY172570.1	viele Suchergebnisse mit <i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
AV75	99	99	1190	1190	AB326300.1	viele Suchergebnisse mit <i>E. faecium</i> , alle gleiche ID und QC	<i>Enterococcus faecium</i>
AV76	99	100	1116	1116	AJ420806.1	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>
AV77	99	100	966	966	EF428246.2	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>
	100	95	942	942	NR_024906.1	ATCC-Stamm	
AV78	99	100	1149	1149	AJ276355.1	DSMZ-Stamm	<i>Enterococcus faecium</i>
AV79	99	100	1011	1011	-	verschiedene Enterokokken, viel <i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus sp.</i>

**Tabelle 42:** Organismenzusammensetzung der industriellen Starterkulturen: Angaben über interne Sequenzierungs-Nr. (Nr.), Sequenzidentität (ID) [%], Query Coverage (QC) [%], Maximal Score (Max Sco) [bits], Total Score (Tot Sco) [bits], Accession-Nr. (Acc.-Nr.), Bemerkungen zu den Suchergebnissen und daraus resultierende Bewertung (Interpretation) der Spezieszugehörigkeit.

Industrielle Starterkulturen							
Nr.	ID	QC	Max Sco	Tot Sco	Acc.-Nr.	Bemerkung	Interpretation
AV51	99	100	1371	6851	CP000423.1	ATCC-Stamm	<i>Lactobacillus casei</i>
AV52	99	100	1249	1249	AJ417500.1	DSMZ-Stamm	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>
AV53	99	100	1258	1258	AB104855.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	99	100	1253	6265	CP001617.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	99	100	1253	1253	AB362675.1	<i>Lactobacillus pentosus</i> , nur in der Datenbank publiziert	
AV54	99	100	1236	1236	AB618812.1	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>
AV55	99	100	1317	1317	AB362758.1	<i>Lactobacillus pentosus</i> , nur in der Datenbank publiziert	<i>L. plantarum</i>
	99	100	1317	1317	FJ386491.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
AV56	99	100	1195	5951	CP002033.1	Ausschließlich <i>L. fermentum</i> als Ergebnis	<i>Lactobacillus fermentum</i>

### VII. LITERATURVERZEICHNIS

- AKINTERINWA, O.; KHANKAL, R. UND CIRINO, P.C. (2008) Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 461-467.
- ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E.K. UND GALLAGHER, E. (2009) Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int J Food Sci Nutr* **60**: 240-257.
- ARENDT, E.K.; KATINA, K.; LIUKKONON, K.-H.; AUTIO, K.; FLANDER, L.; POUTANEN, K. UND ULMER, H.M. (2006) Bedeutung des Sauerteiges für ernährungsphysiologische Eigenschaften von Backwaren. S.57-75 In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- ARENDT, E.K.; RYAN, L.A.M. UND DAL BELLO, F. (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* **24**: 165-174.
- AUBRECHT, E. UND BIACS, P.Á. (2001) Characterization of buckwheat grain proteins and its products. *Acta Aliment* **30**: 71-80.
- BARTOWSKY, E.J. UND HENSCHKE, P.A. (2004) The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int J of Food Microbiol* **96**: 235-252.
- BERNARDEAU, M.; GUGUEN, M. UND VERNOUX, J.P. (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 487-513.
- BRANDT, M.J. (2006a) Bedeutung von Sauerteig für die Brotqualität. S. 22ff In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- BRANDT, M.J. (2006b) Bedeutung von Rohwarenkompnenten. S. 42f In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- BRANDT, M. J. (2007) Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol* **24**: 161-164.



- CAI, Y.; OKADA, H.; MORI, H.; BENNO, Y. UND NAKASE, T. (1999) *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1451-1455.
- CARR, F.J.; CHILL, D. UND MAIDA, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* **28**: 281-370.
- CLARKE, C.I.; SCHOBER, T.J.; DOCKERY, P.; O`SULLIVAN K. UND ARENDT, E.K. (2004) Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chem* **81**: 409-417.
- COEURET, V.; DUBERNET, S.; BERNARDEAUX, M.; GUEGUEN, M. UND VERNOUX, J.P. (2003) Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* **83**: 269-306.
- COCCONCELLI, P.S.; PORRO, D.; GALANDINI, S. UND SENINI, L. (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol* **21**: 376-379.
- COCOLIN, L.; URSO, R.; RANTSIOU, K., CANTONI, C. UND COMI, G. (2006) Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res* **6**: 692-701.
- CODA, R.; RIZZELLO, C.G. UND GOBBETTI, M. (2010) Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *Int J Food Microbiol* **137**: 236-245.
- CORSETTI, A.; DE ANGELIS, M.; DELLAGLIO, F.; PAPARELLA, A.; FOX, P.F.; SETTANNI, L. UND GOBBETTI, M. (2003) Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J Appl Microbiol* **94**:641-654.
- CORSETTI, A; GOBBETTI, M.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L. UND ROSSI, J. (1998a) Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J Food Sci* **63**: 347-351.
- CORSETTI, A; GOBBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L. UND ROSSI, J. (2000) Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and

- additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem* **48**: 3044-3051.
- CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. UND DAMIANI, P. (1998b) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 253-256.
- CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N. UND GOBBETTI, M. (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int J Food Microbiol* **64**: 95-104.
- CORSETTI, A. UND SETTANNI, L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int* **40**: 539-558.
- DAL BELLO, F.; CLARKE, C.I.; RYAN, L.A.M.; ULMER, H.; SCHOBER, T.J.; STROM, K.; SJORGREN, J.; VAN SINDEREN, D.; SCHNURER, J. UND ARENDT, E.K. (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cer Sci* **45**: 309-318.
- DANTIGNY, P.; GUILMART, A.; RADOI, F.; BENSOUSSAN, M. UND ZWIETERING, M. (2005) Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *Int J Food Microbiol* **98**: 261-269.
- DAUD KHALED, A.K.; NEILAN, B.A.; HENRIKSSON, A. UND CONWAY, P.L. (1997) Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiol Lett* **153**: 191-197.
- DE VUYST, L. UND NEYSENS, P. (2005) The sourdough Microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol* **16**: 43-56.
- DE VUYST, L.; SCHRIJVERS, V.; PARAMITHIOTIS, S.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. UND MESSENS, W. (2002) The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6059-6069.

- DE VUYST, L.; VRANCKEN, G.; RAVYTS, F.; RIMAU, T. UND WECKX, S. (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol* **26**: 666-675.
- DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; ALFONSI, G.; DE VINCENZI, M.; SILANO, M.; VINCENTINI, O. UND GOBBETTI, M. (2005) Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J Agric Food Chem* **53**: 4393-4402.
- DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; AURICCHIO, S.; GRECO, L.; CLARKE, C.; DE VINCENZI, M.; GIOVANNINI, C.; D'ARCHIVIO, M.; LANDOLFO, F.; PARRILLI, G.; MINERVINI, F.; ARENDT, E. UND GOBBETTI, M. (2004) Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1088-1096.
- DUFFNER, F. UND O'CONNELL, M. (1995) Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. *J Appl Bacteriol* **78**: 20-27.
- DOUSSET, X.; GÄNZLE, M.G. UND VOGEL, R.F. (2005) *Lactobacillus hammesii* sp. Nov., isolated from French sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 763-767.
- EDEMA, M.O. UND SANNI, A.I. (2006) Micro-population of fermenting maize meal for sour maize bread production in Nigeria. *Nig J Microbiol* **20**: 937-946.
- EIKMANN, M. UND EIKMANN, B. (2001) Chemoorganotrophe Bakterien. S. 8-61 In: MUNK, K. (Hrsg.) Grundstudium Biologie Mikrobiologie. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- FREUND, W. (2006) Starterkulturen und Sauerteigprodukte. S. 353-375 In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- GAGGIANO, M.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; ARNAULT, P.; TOSSUT, P.; FOX, P.F. UND GOBBETTI, M. (2007) Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. *Food Microbiol* **24**: 15-24.
- GALLE, S.; SCHWAB, C.; ARENDT, E.K. UND GÄNZLE, M.G. (2011) Structural and

- rehological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiol* **28**: 547-553.
- GÄNZLE, M.G. (2006a) Mikrobiologie des Sauerteiges. S. 84 In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- GÄNZLE, M.G. (2006b) Physiologie und Biochemie der Mikroflora des Sauerteiges. S. 112f In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- GÄNZLE, M.G. (2009) From gene to function: metabolic traits of starter cultures for improved quality of cereal foods. *Int J Food Microbiol* **134**: 29-36.
- GÄNZLE, M.G. UND BRANDT, M.J. (2006) Begriffsbestimmungen und lebensmittelrechtliche Aspekte. S. 12f In M.J. BRANDT UND M.G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag.
- GÄNZLE, M.G.; THIELE, C.; VERMEULEN, N. UND VOGEL, R. F. (2005) Metabolism of lactobacilli and their influence on bread aroma. *Getreidetechnologie* **59**: 148-152.
- GÄNZLE, M.G.; VERMEULEN, N. UND VOGEL, R.F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol* **24**: 128-138.
- GIRAUD, E.; BRAUMAN, A.; KELEKE, S.;LELONG, B. UND RAIMBAULT, M. (1991) Isolation and physiological study of an amyolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**: 379-383.
- GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A. UND DI CAGNO, R. (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* **16**: 57-69.
- GODET, M. UND MUNAUT, F. (2010) Molecular strategy for identification in Aspergillus section Flavi. *FEMS Microbiol Lett*.
- GORINSTEIN, S.; PAWELZIK, E.; DELGADO-LICON, E.; HARUENKIT, R.; WEISZ, M. UND

- TRAKHTENBERG, S. (2002) Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *J Sci Food Agric* **82**: 886-891.
- GUERZONI, M.E.; VERNOCCHI, P.; NDAGIJIMANA, M.; GIANOTTI, A. UND LANCIOTTI, R. (2007) Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions. *Food Microbiol* **24**:139-148.
- HABOUBI, N.Y.; TAYLOR, S. UND JONES, S. (2006) Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgrad Med J* **82**: 672-678.
- HAMMES, W.P. UND GÄNZLE, M.G. (1998) Sourdough breads and related products. S. 199-216 In WOOD, B.J.B. (Hrsg.) Microbiology of fermented foods. 2. Auflage, Blackie Academic and Professional.
- HAMMES UND HERTEL (2009) Genus I. *Lactobacillus*. S. 465-510 In VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.-H. UND WITHMAN, W.B. (Hrsg.). Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 3: The Firmicutes. 2. Auflage, Springer Verlag.
- HAMMES, W.P.; STOLZ, P. UND GÄNZLE, M.G. (1996) Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Adv Food Sci* **18**: 176-184.
- HARTY, D.W.; OAKEY, H.J.; PATRIKAKIS, M.; HUME, E.B. UND KNOX, K.W. (1994) Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol* **24**: 179-189.
- HOLZAPFEL, W.H. UND WOOD, B.J.B. (1995) Lactic acid bacteria in contemporary perspective. S.1-6 In WOOD, B.J.B. (Hrsg.) The genera of lactic acid bacteria. 1. Auflage, Chapman & Hall.
- HOPPE-SEYLER, T.S.; JAEGER, B.; BOCKELMANN, W.; GEIS, A. UND HELLER, K.J. (2007) Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. *Syst Appl Microbiol* **30**: 50-57, 2007.
- HOUBEN, A.; GÖTZ, H.; MITZSCHERLING, M. UND BECKER, T. (2010) Modification of the rheological behavior of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) dough. *J Cereal Sci* **51**: 350-356.

- JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J. UND BARRETT, J.B. (2004) Use of a genus- and species-specific Multiplex-PCR for identification of *Enterococci*. *J Clinical Microbiol* **42**: 3558-3565, 2004.
- JEKLE, M.; HOUBEN, A.; MITZSCHERLING, M.; BECKER, T. (2010) Effects of selected lactic acid bacteria on the characteristics of amaranth sourdough. *J Sci Food Agric* **90**: 2326-2332.
- JOHANSSON, M.L.; SANNI, A.; LONNER, C. UND MOLIN, G. (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int J Food Microbiol* **25**: 159-168.
- JOHANSSON, M.L.; QUEDNAU, M.; MOLIN, G. UND AHRNE, S. (1995) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol* **21**: 155-159.
- KAHALA, M.; MÄKI, M.; LEHTOVAARA, A.; TAPANAINEN, J.-M.; KATISKA, R.; JUURUSKORPI, M.; JUHOLA, J. UND JOUTSJOKI, V. (2008) Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. *J Appl Microbiol* **105**: 1929-1938.
- KAJASHITA, J.; SHIMAOKA, I. UND NAKAJOH (1995). Hypocholesterolesterolemic effect of buckwheat protein extract in rats fed cholesterol enriched diets. *Nutr Res* **15**: 691-698.
- KAJASHITA, J.; SHIMAOKA, I.; NAKAJOH, M.; KISHIDA, N. UND KATO, N. (1999) Consumption of a buckwheat protein extract retards 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1837-1839.
- KLAENHAMMER, T.R.; AZCARATE-PERIL, M.A.; ALTERMANN, E. UND BARRANGOU, R. (2007) Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *J of Nutr* **137**: 748S-750S.
- KLINE, L. UND SUGIHARA, T.F. (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. *Appl Microbiol* **21**: 459-465.

- KORAKLI, M.; ROSSMANN, A.; GÄNZLE, M.G. UND VOGEL, R.F. (2001) Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Agric Food Chem* **49**: 5194-5200.
- LADERO, V.; RAMOS, A.; WIERSMA, A.; GOFFIN, P.; SCHANCK, A.; KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J.; SMID, E.J. UND HOLS, P. (2007) High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol* **Mar**: 1864-1872.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J. UND DE KEERSMAECKER, S.C. (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 728-764.
- LIU, Z.; ISHIKAWA, W.; HUANG, X.; TOMOTAKE, H.; KAYASHITA, J.; WATANABE, H. UND KATO, N. (2001) A buckwheat protein product suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by reducing cell proliferation. *J Nutr* **131**: 1850-1853.
- LÖNNER, C. UND AHRNE, S. (1995) *Lactobacillus* (Baking). S. 797-844 In HUI, Y.H. UND KHACHATOURIANS, G.G. (Hrsg.), Food Biotechnology Microorganisms. 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft.
- LONVAUD-FUNEL, A. (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 317-331
- MARIOTTI, M.; LUCISANO, M.; PAGANI, M.A. UND IAMETTI, S. (2008) Macromolecular interactions and rheological properties of buckwheat-based dough obtained from differently processed grains. *J Agric Food Chem* **56**: 2458-2467.
- MATHUR, S. UND SINGH, R. (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *Int J Food Microbiol* **105**: 281-295.
- MAUTZ, J.; BARTOK, T.; MOROCZ-SALOMON, K. UND BONA, L. (2000) Structure and potential allergenic character of cereal proteins I. Protein content and amino acid composition. *Cereal Res Commun* **28**: 263-270.
- MERKLE, S. (2008) Untersuchung von Starterkulturen auf ihre Eignung zur

Fermentation von Hirsseauerteigen. Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Deutschland

- MEROTH, C.B.; HAMMES, W.P. UND HERTEL, C. (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7543-7461.
- MESSENS, W.; NEYSENS, P.; VANSIELEGHEM, W.; VANDERHOEVEN, J. UND DE VUYST, L. (2002) Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1431-1435.
- MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O. UND YADAV, H. (2008) Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis* **9**: 190-198.
- MOLNÁR, O.; MESSNER, R.; PRILLINGER, H.J.; STAHL, U. UND SLAVIKOVA, E. (1995) Genotypic identification of *Saccharomyces* species using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Syst Appl Microbiol* **18**: 136-145.
- MORA, D.; FORTINA, M.G.; PARINI, C.; DAFFONCHIO, D. UND MANICHINI P.L. (2000) Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *System Evol* **146**: 2027-2038.
- MORONI, A.V.; ARENDT, E.K. UND DAL BELLO, F. (2011) Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol* **28**: 497-502.
- MORONI, A.V.; DAL BELLO, F. UND ARENDT, E.K. (2009) Sourdough in gluten-free bread making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol* **26**: 676-684.
- MOORE, M.M.; JUGA, B.; SCHOBER, T.J. UND ARENDT, E.K. (2007) Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and



- ultrastructure of gluten-free bread. *Cereal Chem* **84**: 357-364.
- MUGULA, J.K.; SORHAUG, T. UND STEPANIAK, L. (2003) Proteolytic activities in togwa, a Tanzanian fermented food. *Int J Food Microbiol* **84**: 1-12.
- MÜLLER, M.R.A.; WOLFRUM, G.; STOLZ, P.; EHRMANN; M.A. UND VOGEL, R.F. (2001) Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiol* **18**: 217-227.
- NOUT, M.J. (2009) Rich nutrition from the poorest - cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiol* **26**: 685-692.
- ORLOWSKI, M. (1991) Mucor dimorphism. *Microbiol Rev* **55**: 234-258.
- O'SULLIVAN, D.J. UND KLAENHAMMER, T.R. (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **59**:2730-2733.
- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.Ä. UND SCHNÜRER, J. (2006) Biotechnology, physiology and enetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res* **6**: 3-13.
- PARAMITHIOTIS, S.; GIOULATOS, S.; TSAKALIDOU, E. UND KALANTZOPOULOS, G. (2006) Interactions between *S. cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem* **41**: 2429-2433.
- PATRA, F.; TOMAR, S.K. UND ARORA, S. (2009) Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *J Food Sci* **74**: R16-R23.
- PEPE, O.; BLAIOTTA, G.; ANASTASIO, M.; MOSCHETTI, G.; ERCOLINI, D. UND VILLANI, F. (2004) Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Syst Appl Microbiol* **27**: 443-453.
- POUWELS, P.H.; LEER, R.J.; SHAW, M.; HEIJNE DEN BAK-GLASHOUWER, M.J.; TIELEN, F.D.; SMIT, E.; MARTINEZ, B.; JORE, J. UND CONWAY, P.L. (1998) Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food*

*Microbiol* **41**: 155-167.

- RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; KEMZURAITE, A.; ZVICEVICIUS, E.; RAGAZINSKIENE, O. UND RAILIENE, M. (2009) Different drying technologies and alternation of mycobiots in the raw material of *Hyssopus officinalis* L. *Ann Agric Environ Med* **16**: 93-101.
- RANGEL-PORRAS, R.A.; MEZA-CARMEN, V.; MARTINEZ-CADENA, G.; TORRES-GUZMAN, J.C.; GONZALEZ-HERNANDEZ, G.A.; ARNAU, J. UND GUTIERREZ-CORONA, J.F. (2005) Molecular analysis of an NAD-dependent alcohol dehydrogenase from the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* **274**: 354-363.
- RENZETTI, S.; DAL BELLO, F. UND ARENDT, E.K. (2008) Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *J Cereal Sci* **49**: 33-45.
- REYES-VELÁZQUEZ, W.P.; ISAIAS ESPINOZA, V.H.; ROJO, F.; JIMÉNEZ-PLASENCIA, C.; DE LUCAS PALACOIS, E., HERNÁNDEZ-GÓBORA, J. UND RAMIREZ-ALVAREZ, A. (2008) Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Rev Iberoam Microbiol* **25**: 182-185.
- RICCI, G.; BORGIO, F. UND FORTINA, M.G. (2006) Plasmids from *Lactobacillus helveticus*: distribution and diversity among atural isolates. *Lett Appl Microbiol* **42**: 254-258.
- ROBERT, H.; GABRIEL, V. UND FONTAGNE-FAUCHER, C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int J Food Microbiol* **135**: 53-59.
- RÖCKEN, W. (1996) Applied aspects of sourdough fermentation. *Adv Food Sci* **18**: 212-216.
- RODRIGUEZ-SANOJA, R.; RUIZ, B.; GUYOT, J.P. UND SANCHEZ, S. (2005) Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus* alpha-amylases. *Appl Environ Microbiol* **71**: 297-302.
- ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G. UND PANDEY, A.

- (2006) Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresour Technol* **97**: 506-511.
- ROSSETTI, L. UND GIRAFFA, G. (2005) Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods* **63**: 135-144.
- ROTHER, M.; SCHNEEWEISS, R. UND EHRLICH, R. (1973) Zur historischen Entwicklung von Getreideverarbeitung und Getreideverzehr. *Ernährungsforschung* **18**: 249-283.
- SAKAMOTO, K. UND KONINGS, W.N. (2003) Beer soilage bacteria and hop resistance. *Int J food microbiol* **89**: 105-124
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. UND FILTENBORG, O. Introduction to food- and airborne fungi 2004, 7. Ausgabe, Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherland.
- SANNI, A.I.; MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J.P. (2002) New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int J Food Microbiol* **72**: 53-62.
- SANDHU, G.S.; KLINE, B.C.; STOCKMAN, L. UND ROBERTS, G.D. (1995) Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* **33**: 2913-2919.
- SAWADOGO-LINGANI, H.; LEI, V.; DIAWARA, B.; NIELSEN, D.S.; MOLLER, P.L.; TRAORE, A.S. UND JAKOBSEN, M. (2007) The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J Appl Microbiol* **103**: 765-777.
- SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; DE VUYST L., VANDAMME, P. UND HUYS, G. (2009) Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *J Appl Microbiol* **106**: 1081-1092.
- SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; VAN SCHOOR, A.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L., VANDAMME, P. UND HUYS, G. (2007) Influence of geographical

- origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional belgian sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6262-6269.
- SCHMIDT, P.; WALKER, J.; SELWAY, L.; STEAD, D.; YIN, Z.; ENJALBERT, B.; WEIG, M. UND BROWN, A.J. (2008) Proteomic analysis of the pH response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Proteomics* **8**: 534-544.
- SCHOBER, M.; MESSERSCHMIDT, M.; BEAN, S.R.; PARK, S.-H. UND ARENDT, E.K. (2005) Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. *Cereal Chem* **82**: 394-404.
- SCHOENLECHNER, R., SIEBENHANDL, S. UND BERGHOFER, E. (2008) Pseudocereals S.149-190 In E.A. ARENDT UND F. DAL BELLO (Hrsg.) *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. 1. Auflage, Academic Press.
- SESEÑA, S.; SÁNCHEZ, I. UND PALOP, L. (2005) Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. *Int J Food Microbiol* **104**: 325-335
- SERRAZANETTI, D.I.; GUERZONI, M.E.; CORSETTI, A. UND VOGEL, R. (2009) Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol* **26**: 700-711.
- SETTANNI, L.; MASSITTI, O.; VAN SINDEREN, D. UND CORSETTI, A. (2005) In situ activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *J Appl Microbiol* **99**: 670-681.
- SHARIFIA, M.; KARIMI, K. UND TAHERZADEH, M.J. (2008) Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 1253-1259.
- SIMONSON, L.; SALOVAARA, H. UND KORHOLA, M. (2003) Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and Sucrose variations. *Food Microbiol* **20**: 193-199.
- SIRAGUSA, S.; DI CAGNO, R.; ERCOLINI, D.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M. UND DE

- ANGELIS M. (2009) Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1099-1109.
- SKREDE, A.; SAHLSTROM, S.; AHLSTROM, O.; CONNOR, K.H. UND SKREDE, G. (2007) Effects of lactic acid fermentation and gamma irradiation of barley on antinutrient contents and nutrient digestibility in mink (*Mustela vison*) with and without dietary enzyme supplement. *Arch Anim Nutr* **61**: 211-221.
- SPANO, G.; BENEDEUCE, L.; TARANTINO, D.; ZAPPAROLI, G. UND MASSA, S. (2002) Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR. *Lett Appl Microbiol* **35**: 370-374.
- STEADMAN, K.J.; BURGOON, M.S.; SCHUSTER, R.L.; LEWIS, B.A.; EDWARDSON, S.E. UND OBERDORF, R.L. (2000) Fagopyritol, D-chiro-inositol, and other soluble carbohydrates in buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fiber. *J Agric Food Chem* **48**: 2843-2847.
- STERR, Y.; WEISS, A. UND SCHMIDT, H. (2009) Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *Int J Food Microbiol* **136**: 75-82.
- STILES, M.E. UND HOLZAPFEL, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* **36**: 1-29.
- STOLZ, P. (1995) Untersuchungen des Maltosemetabolismus von Laktobazillen aus Sauerteigen, Promotionsarbeit, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland
- SUES, A.; MILLATI, R.; EDEBO, L. UND TAHERZADEH, M.J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res* **5**: 669-676.
- TAKÓ, M.; FARKAS, E.; LUNG, S.; KRISCH, J.; VÁGVÖLGYI, C. UND PAPP, T. (2010) Identification of acid- and thermotolerant extracellular beta-glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biol Hung* **61**: 101-110.
- TAYLOR, J.R.N. UND NAUSHAD EMMAMBUX, M. (2008) Gluten-free foods and

- beverages from millets. S. 123 In E.A. ARENDT UND F. DAL BELLO *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. 1. Auflage, *Academic Press*.
- TOMOTAKE, H.; SHIMAOKA, I.; KAYASHITA, J.; YOKOYAMA, F.; NAKAJOH, M. UND KATO, N. (2000) A buckwheat protein product suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters. *J Nutr* **130**: 1670-1674.
- TORRIANI, S.; FELIS, G.E. UND DELLAGLIO, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3450-3454.
- TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G. UND DELLAGLIO, F. (1999) Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4351-4356.
- TYNKKYNNEN, S.; SATOKARI, R.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. UND SAXELIN, M. (1999) Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3908-3914.
- VALCHEVA, R.; KORAKLI, M.; ONNO, B.; PREVOST, H.; IVANOVA, I.; EHRMANN, M.A.; DOUSSET, X.; GÄNZLE, M.G. UND VOGEL, R.F. (2005) *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 763-767.
- VAN DEN BRAAK, N.; POWER, E.; ANTHONY, R.; ENDTZ, H.P.; VERBRUGH, H.A. UND VAN BELKUM, A. (2000) Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of SmaI DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 45-52.
- VAN DER MEULEN, R.; SCHEIRLINCK, I.; VAN SCHOOR, A.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; VANDAMME, P. UND DE VUYST, L. (2007) Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4741-4750.

- VAN HIJUM, S.A.F.T.; SZALOWSKA, E.; VAN DER MAAREL, M.J.E.C. UND DIJKHUIZEN, L. (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol* **150**: 621-630.
- VOGELMANN, S.A. UND HERTEL, C. (2011) Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol* **28**: 583-589.
- VOGELMANN, S.A.; SEITTER, M.; SINGER, U.; BRANDT, M.J. UND HERTEL, C. (2009) Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int J Food Microbiol* **130**: 205-212.
- VON WEYMARN, N.; HUJANEN, M. UND LEISOLA, M. (2002) Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem* **37**: 1207-1213.
- VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; DE VUYST, L. UND LEROY, F. (2008) Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. *Int J Food Microbiol* **128**: 58-66.
- VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; WECKX, S.; DE VUYST, L. UND LEROY, F. (2009a) Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO130101. *Int J Food Microbiol* **135**: 216-222.
- VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; WOUTERS, D.; LEROY, F. UND DE VUYST L. (2009b) The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. *Food Microbiol* **26**: 720-727.
- WANG, T.T. UND LEE, B.H. (1997) Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit Rev Biotechnol* **17**: 227-72.
- WECKX, S.; VAN DER MEULEN, R.; ALLEMEERSCH, J.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; VAN HUMMELEN, P. UND DE VUYST, L. (2010) Community dynamics of bacteria in

sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5402-5408.

WEISS, A.; BERTSCH, D.; STRÜTT, S.; STERR, Y. UND SCHMIDT, H. (2009) Isolierung und Charakterisierung potentieller Starterkulturen aus Amaranth-, Buchweizen- und Hirse-Sauerteigen. *Getreidetechnologie* **04**: 68-75

WEISS, A.; LETTNER, H.P.; KRAMER, W.; MAYER, H.K. UND KNEIFEL, W. (2005) Molecular methods used for the identification of potentially probiotic *Lactobacillus reuteri* strains. *Food Technol Biotechnol* **43**: 295-300.

ZANNINI, E.; GAROFALO, C.; AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; SILVESTRI, G. UND CLEMENTI, F. (2009) Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. *Food Microbiol* **26**: 744-753.

ZAUNMÜLLER, T.; EICHERT, M.; RICHTER, H. UND UNDEN, G. (2006) Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 421-429.

ZOTTA, T.; PIRAINO, P.; RICCIARDI, A.; MCSWEENEY, P.L. UND PARENTE, E. (2006) Proteolysis in model sourdough fermentations. *J Agric Food Chem* **54**: 2567-2574.

Quellen aus dem Internet, zuletzt abgerufen am 13.03.2011:

- <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (2009)

- <http://www.n-tv.de/panorama/Tod-nach-EHEC-Infektion-article456741.html>  
(11.8.2009)

- <http://www.produktrueckrue.de/nahrungsmittel-und-genussmittel/501-ruegenwaldermuehle-rueckruf-teewurst>  
(15.12.2010)

- <http://www.topnews.de/wellie-kaese-mit-ehc-bakterien-verseucht-387500>  
(02.06.2010)



---

---

## Danksagung

Nach langer Zeit, wer hätt's gedacht, ist auch das Schreiben nun vollbracht. An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Leuten bedanken, die auf die ein oder andere Art und Weise Einfluss auf diese Promotionsarbeit genommen haben.

Zunächst gilt mein Dank **Prof. Dr. H. Schmidt** für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine Anleitung und Motivation, sowie für die Erstellung des Erstgutachtens.

**Prof. Dr. L. Fischer** und **Prof. Dr. B. Hitzmann** danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens bzw. der Drittprüferschaft und das damit verbundene Interesse an meiner Arbeit.

Ermöglicht wurde sie als Teil des von der **FEI** (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn) geförderten Projektes AiF 15188N.

Den Fachbereichen „Prozessanalytik und Getreidetechnologie“ und „Lebensmittel tierischer Herkunft“ des Institutes für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim danke ich für die gute Kooperation und für die Möglichkeit der Nutzung verschiedener Geräte und Arbeitsmaterialien. Ein besonderer Dank gilt dabei **H. Götz** und **Dipl.-LM-Ing. R. Schuster-Wolff-Bühning** für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen.

Ein großer Dank geht auch an **alle Mitarbeiter** des Fachbereiches Lebensmittelmikrobiologie, dass sie mich so freundlich aufgenommen haben, für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre. Ich danke speziell **Dr. A. Weiß** für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit, ihre Anleitung, Diskussionsbereitschaft und Motivation; **Simone** ebenso für die praktische, als auch moralische Unterstützung; sowie **Yasemin, Helen** und **Markus** für die vielen konstruktiven Gespräche, ihre Stärkung und einiges mehr.

Für ihr stets offenes Ohr möchte ich auch **Denise, Kirsten** und **Claudia**, sowie **Marcus** fürs Anspornen danken. Schließlich geht ein letzter großer Dank an die, die mich von Anfang an begleitet, an mich geglaubt und sich mit immerwährendem Interesse nach meinen Experimenten erkundigt haben - meine **Familie**.

**Vielen Dank für alles!**

„Die verstehen sehr wenig, die nur das verstehen, was sich erklären lässt.“

Marie von Ebner-Eschenbach