

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
LEHRSTUHL FÜR TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE

# Wachstum und Physiologie der Mikroflora in Getreidefermentationen

Georg Wolfrum

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zu Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktor Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Roland Meyer-Pittroff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Antonio Delgado

Die Dissertation wurde am 19.11.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 13.05.2003 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND INDIZES .....	IV
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 DER METABOLISMUS DER MILCHSÄUREBAKTERIEN .....	1
1.2 DER SAUERTEIG.....	5
1.3 MODELLBILDUNG .....	8
1.4 ZIELSETZUNG.....	9
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
2.1 MATERIAL .....	10
2.1.1 Chemikalien .....	10
2.1.2 Kulturmedien.....	10
2.2 ORGANISMEN.....	12
2.3 KULTIVIERUNG UND STAMMHALTUNG DER ORGANISMEN.....	12
2.4 GERÄTE.....	13
2.5 BESTIMMUNG DES SPEKTRUMS DER VERGÄRBAREN KOHLENHYDRATE.....	13
2.6 MESSUNG DER ZELLDICHTE .....	14
2.7 HPLC .....	14
2.7.1 Die Anlage .....	14
2.7.2 Probenvorbereitung.....	15
2.7.3 Durchführung.....	15
2.8 FERMENTATIONSANLAGEN .....	15
2.9 ATP-MESSUNG.....	16
2.10 ENZYMATISCHE BESTIMMUNG DER GLUCOSE UND FRUCTOSE.....	17
2.11 VERWENDETE MATERIALIEN BEI DEN VERSUCHEN MIT MESSUNG DES CO <sub>2</sub> -DRUCKES 18	
2.12 SPEZIELLE METHODEN UND VERSUCHSAUFBAUTEN.....	18
2.12.1 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf verschiedene Ethanolkonzentrationen Durchführung .....	18
2.12.2 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf Milchsäure.....	18
2.12.3 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf unterschiedliche Acetatkonzentrationen.....	19
2.12.4 Die Glucosekonzentration.....	19
2.12.5 Verhalten der Organismen gegenüber Fructose.....	19
2.12.6 Verhalten bei verschiedenen pH-Werten .....	19
2.12.7 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf verschiedene Temperaturen..	20
2.12.8 Verlauf einer Fermentation in industriellem Maßstab .....	20
<b>3 BERECHNUNGSMETHODEN UND MODELLE.....</b>	<b>21</b>
3.1 EIGENSCHAFTEN UND BEURTEILUNG VON MODELLEN .....	21
3.2 HARDWARE.....	23
3.3 SOFTWARE .....	24
3.4 SUBSTRATUNABHÄNGIGE WACHSTUMSKINETIK .....	24
3.5 WACHSTUMSKINETIK BEI SICH VERÄNDERNDEN BEDINGUNGEN.....	25
3.6 STRUKTURIERTE MODELLE.....	26
3.7 BESCHREIBUNG DER REAKTION AUF VERSCHIEDENE EINFLUSSGRÖßEN.....	27

3.7.1	<i>Zellmasse</i> .....	27
3.7.2	<i>Stoffwechselprodukte</i> .....	27
3.7.3	<i>Nährstoffe</i> .....	31
3.7.4	<i>Temperatur</i> .....	33
3.7.5	<i>Der pH-Wert</i> .....	34
3.7.6	<i>Sauerstoff</i> .....	35
3.7.7	<i>Salz</i> .....	36
3.7.8	<i>Intrazelluläre Konzentrationen</i> .....	36
3.8	GEMISCHTE POPULATIONEN .....	37
3.9	UNABHÄNGIGKEIT DER EINFLUßGRÖßEN.....	37
3.10	BERECHNUNGSMETHODEN .....	38
3.10.1	<i>Integration von Systemen gewöhnlicher Differentialgleichungen</i> .....	38
3.10.2	<i>Optimierungsalgorithmus</i> .....	39
3.10.3	<i>Interpolierverfahren</i> .....	40
3.10.4	<i>Anmerkung zu steifen Gleichungssystemen</i> .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
4.1	BESTIMMUNG DES SPEKTRUMS DER VERGÄRBAREN KOHLENHYDRATE.....	42
4.2	BESTIMMUNG DER ENTSTEHENDEN STOFFWECHSELPRODUKTE .....	43
4.3	KORRELATION ZWISCHEN OD UND KBE .....	44
4.4	BESTIMMUNG DER SÄUERUNGSAKTIVITÄT IM NÄHRSUBSTRAT .....	45
4.5	ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR MESSUNG DES FERMENTATIONSVERLAUFES IN GEMISCHTEN POPULATIONEN .....	47
4.6	DER VERLAUF VON FERMENTATIONEN MIT GEMISCHTER POPULATION .....	51
4.7	VERGLEICH DER LABORFERMENTATIONEN MIT EINER FERMENTATION IM INDUSTRIELLEN MAßSTAB .....	54
4.8	VERHALTEN DER ORGANISMEN GEGENÜBER NÄHRSTOFFEN .....	56
4.8.1	<i>Die Reaktion der Organismen auf Glucose</i> .....	56
4.8.2	<i>Die Reaktion der Organismen auf Maltose</i> .....	59
4.8.3	<i>Die Reaktion der Organismen auf Fructose</i> .....	59
4.8.4	<i>Die Reaktion der Organismen auf Pentosen</i> .....	62
4.8.5	<i>Komplexe Medienbestandteile</i> .....	64
4.9	DER PH-WERT .....	68
4.10	REAKTION DER ORGANISMEN AUF DIE ENTSTEHENDEN STOFFWECHSELPRODUKTE..	74
4.10.1	<i>Die Reaktion der Organismen auf Ethanol</i> .....	74
4.10.2	<i>Die Reaktion der Organismen auf Lactat</i> .....	75
4.10.3	<i>Die Reaktion der Organismen auf Acetat</i> .....	83
4.11	DAS VERHALTEN DER ORGANISMEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN.....	88
4.12	DER EINFLUß VON SAUERSTOFF.....	98
4.13	IONENSTÄRKE .....	101
4.14	ATP.....	102
4.15	MODELLE ZUR BESCHREIBUNG DES HETEROFERMENTATIVEN STOFFWECHSELS.....	103
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>110</b>
5.1	DISKUSSION DER ENTWICKLUNG EINER MEßMETHODE ZUR BEOBACHTUNG DES FERMENTATIONSVERLAUFES IN GEMISCHTEN POPULATIONEN .....	111
5.2	DAS VERHALTEN DER ORGANISMEN IN FERMENTATIONEN MIT GEMISCHTEN POPULATIONEN .....	111
5.3	FERMENTATION IN INDUSTRIELLEM MAßSTAB .....	112
5.4	DER EINFLUß DER NÄHRSTOFFE AUF DIE ORGANISMEN .....	112
5.5	DER PH-WERT .....	118

5.6	DER EINFLUß DER ENTSTEHENDEN STOFFWECHSELPRODUKTE AUF DIE ORGANISMEN 120	
5.7	DER EINFLUß DER TEMPERATUR AUF DIE ORGANISMEN .....	124
5.8	DER EINFLUß DES SAUERSTOFFS AUF DIE ORGANISMEN .....	126
5.9	DER EINFLUß DER IONENSTÄRKE AUF DIE ORGANISMEN .....	127
5.10	DER ATP-POOL INNERHALB DER ZELLEN.....	127
5.11	MODELL ZUR BESCHREIBUNG DES HETEROFERMENTATIVEN STOFFWECHSELS.....	128
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>133</b>

# Verwendete Abkürzungen und Indizes

## Abkürzungen

ATP		Adenosintriphosphat
$C_a$	[mMol/l]	Konzentration der Substanz a
DF	[]	Degrees of Freedom
KBE	[]	Koloniebildende Einheiten
mse	[]	mean square error
OD	[]	Optische Dichte
pH	$-\log(a(\text{H}_3\text{O}^+))$	pondus hydrogenii; $a(\text{H}_3\text{O}^+)$ : Aktivität der Hydronium-Ionen
RSS	[]	Residual Square Sums
T	[°C]	Temperatur
X	[]	Zellmasse (optische Dichte)
$Y_{a/b}$	[]	Ausbeutekoeffizient a pro b
$Y_{a/X}$	[mMol]	Ausbeutekoeffizient a pro Zellmasse
$\mu$	[h <sup>-1</sup> ]	Wachstumsrate
A	[]	Asymptotic Level
$\lambda$	[h]	Dauer der Lag-Phase

## Indizes

ace	Acetat
eth	Ethanol
fru	Fructose
glu	Glucose
lac	Laktat
mal	Maltose
x5p	Xylulose-5-Phosphat

# 1 Einleitung

## 1.1 *Der Metabolismus der Milchsäurebakterien*

Die Bedeutung einer Gruppe von Mikroorganismen ist kaum zu quantifizieren und nur schwer zu vergleichen mit der anderer Mikroorganismen. Dennoch ist die Bedeutung der Milchsäurebakterien für den Menschen unbestritten. Dies begründet sich zum einen auf die Tatsache, daß Milchsäurebakterien als natürliche Flora des menschlichen Körpers unverzichtbar sind. Das andere wichtige Feld auf dem Milchsäurebakterien für den Menschen sich als ungemein nutzbringend erwiesen, ist bei der Verarbeitung von Lebensmitteln zur geschmacklichen Verbesserung und/oder Haltbarmachung. Eine reiche Palette von Lebensmitteln geht auf die Säuerung durch Lactobacillen zurück.

Die Systematik der Milchsäurebakterien war im Laufe der Zeit einem steten Wandel unterworfen. Dies hängt sicherlich auch mit der intensiven Erforschung dieser Gruppe von Organismen zusammen. Heute wird die Gruppe der Milchsäurebakterien in der Familie der Lactobacteriaceae zusammengefaßt (Schlegel 1981). Eine grundlegende Einteilung in die Gattungen Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus wurde bereits von Orla-Jensen (1913) vorgeschlagen. Diese Gattungen sind noch heute die Wichtigsten der Lactobacteriaceae (Axelsson 1998). Weitere Vertreter sind: Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactococcus Lactosphaera, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus und Weissella. Die Gattung Bifidobacterium wird heute nicht mehr zu den Lactobacillen gerechnet (Axelsson 1998).

Des Weiteren wachsen Milchsäurebakterien nur auf komplexen Nährböden mit verschiedenen Vitaminen und Aminosäuren (Schlegel 1981), (Zuniga 1993). Durch die Spezialisierung auf nährstoffreiche Standorte haben sie sich zu Organismen mit eingeschränktem Stoffwechsel entwickelt (Schlegel 1981). Man geht davon aus, daß Milchsäurebakterien ein nur gering ausgeprägtes Regulationssystem besitzen. Lactobacillen in Sauerteig sind teilweise hoch spezialisiert auf diese ökologische Nische (Axelsson 1998).

Der Kohlenhydratstoffwechsel der Milchsäurebakterien führt bei homofermentativen Organismen nahezu ausschließlich zu Milchsäure. Sie verwenden zur Energiegewinnung die Glykolyse. Bei heterofermentativen Organismen entstehen dabei Milchsäure, CO<sub>2</sub> und Ethanol oder Acetat aus Glucose. Dieser Abbauweg wird 6-Phosphogluconat/Phosphoketolase-Weg genannt. Beide Abbauwege werden im Folgenden näher besprochen.

Der Transport vieler Ionen und Metaboliten in die Zelle geschieht mit Hilfe der Proton motive force. Diese wird durch eine membran-lokalisierte ATPase erzeugt. Das Ausschleusen von Endprodukten kann unter anderem zur Proton motive force beitragen, wobei Adenosintriphosphat (ATP) eingespart wird (Axelsson 1998). Der Transport der Zucker in die Zelle erfolgt im Wesentlichen durch Proton motive force-abhängige Systeme oder Phosphotransferase-Systeme, die Phosphoenolpyruvat verbrauchen (Axelsson 1998).

Der Anspruch der Milchsäurebakterien an das Medium ist ausgesprochen hoch. Dies deutet darauf hin, daß diese Organismen eine Vielzahl von Substanzen nicht selbst synthetisieren können, sondern darauf angewiesen sind, diese aus dem Nährmedium aufzunehmen. Es ist anzunehmen, daß Lactobacillen ein nur schwach ausgeprägtes Regulationssystem besitzen. Der Stoffwechsel dieser Organismen ist nicht vollständig geklärt. Der am Stoffumsatz gemessen bedeutendste Stoffwechselweg ist der Glucosestoffwechsel. Die daran beteiligten Stoffwechselschritte sind in ihrer Abfolge bekannt. Jedoch wurden bisher kaum Versuche unternommen, diese Vorgänge dynamisch zu betrachten und sie in Zusammenhang mit anderen Zellfunktionen zu bringen.

Der Glucosestoffwechsel der Milchsäurebakterien kann in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Der homofermentative Stoffwechsel, der auch als Glykolyse oder Embden-Meyerhof-Parnas-Weg bezeichnet wird (Schlegel 1981) und der heterofermentative Stoffwechsel. Da Milchsäurebakterien jeweils einen der beiden Stoffwechselwege überwiegend betreiben, kann diese Familie entsprechend in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zumindest manche homofermentative Lactobacillen besitzen zusätzlich die enzymatische Ausstattung zur heterofermentativen Milchsäuregärung (Tseng 1992) (Finlayson 1986). Ein Umschalten des Stoffwechsels wird bei hohen pH-Werten (bis 7,5) beobachtet, die in Getreidefermentationen selten vorkommen.

Homofermentative Organismen bilden aus Glucose mehr als 80 % Lactat (Tseng 1992). Der Rest verteilt sich auf verschiedene Nebenprodukte wie Acetat, Acetoin oder Diacetyl (Tseng 1992). In Abbildung 1.1-1 ist der homofermentative Abbau der Glucose schematisch dargestellt.

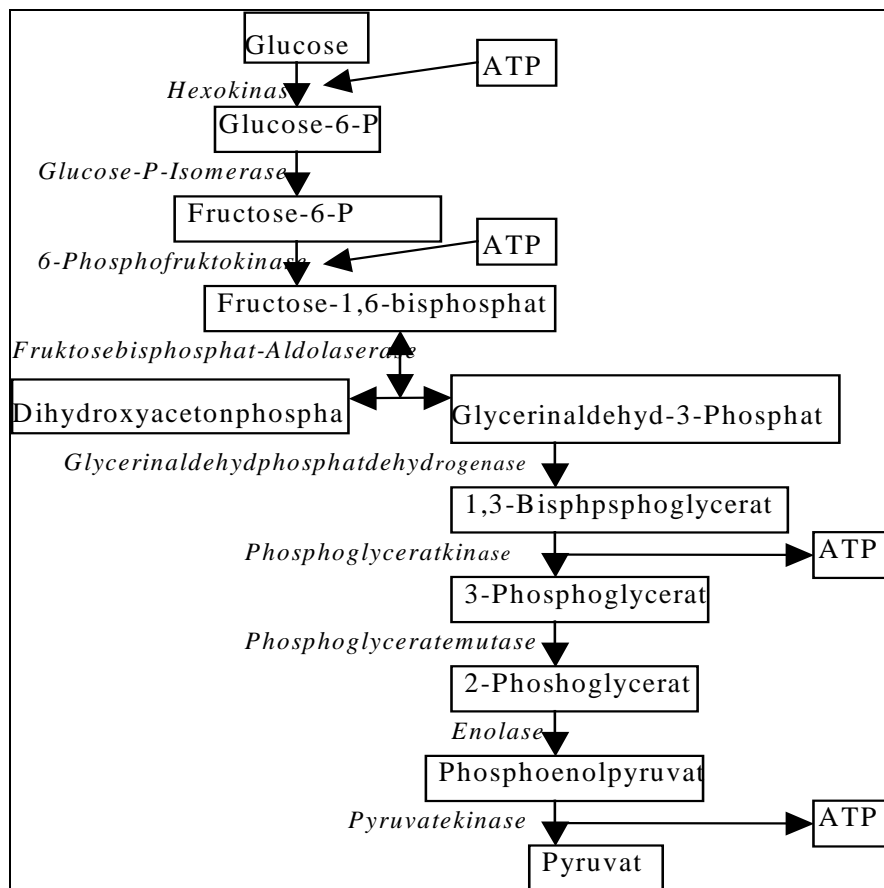


Abbildung 1.1-1 Der Fructose-1,6-bisphosphat-Weg

Im Vergleich zum Fructose-1,6-bisphosphat-Weg ist der Pentosephosphat-Weg, den die heterofermentativen Organismen benutzen um Glucose zur Energiegewinnung abzubauen in der Natur weniger verbreitet. Den entsprechenden Organismen fehlen die Hauptenzyme des Fructose-1,6-bisphosphat-Weges, Aldolase und Triosephosphat-Isomerase (Schlegel 1981). Der Abbauweg ist in Abbildung 1.1-2 dargestellt.



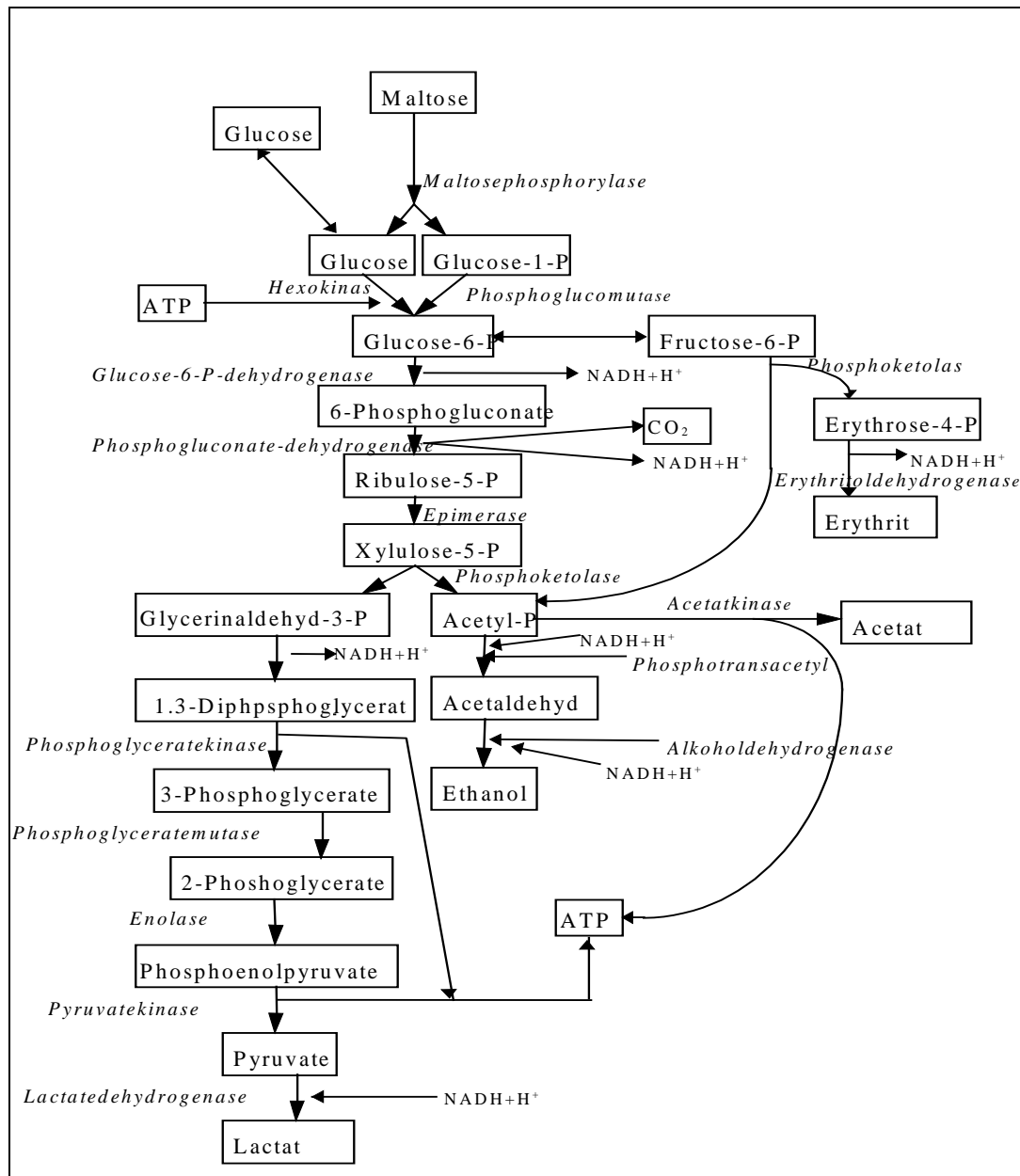
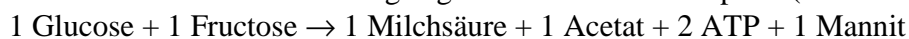


Abbildung 1.1-2 Der Heterofermentative Stoffwechsel

Die Nettoreaktion dieses Abbauweges lautet:



oder bei Vorhandensein eines geeigneten Elektronenakzeptors (z.B. Fructose):



Geeignete Elektronenakzeptoren verbessern somit die Energieausbeute für die Organismen.

Das Verhalten der Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselweges, vor allem bei Veränderungen des pH-Wertes, wurde von Tseng (1992) und Kunoyawa (1973) untersucht. Diese Untersuchungen reichen jedoch nicht aus, um die Vorgänge mathematisch zu beschreiben, da nur Tendenzen aufgezeigt werden, woraus keine quantitativen Zusammenhänge abgeleitet werden können.

Eine Besonderheit mancher heterofermentativer Organismen ist die Ausschüttung von Glucose bei Vorhandensein großer Mengen Maltose. Diese Glucoseausschüttung, die verschiedentlich beschrieben wird (Neubauer et al 1994), konnte bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen unter den angewendeten Bedingungen nicht beobachtet werden. Da zudem die verwendeten Medien meist mehr Glucose als Maltose enthielten, war diese physiologische Besonderheit nicht Gegenstand der Betrachtung.

Auch in der Verwertung von Pentosen unterscheiden sich heterofermentative von homofermentativen Organismen. Manche Pentosen können von einigen heterofermentativen Lactobacillen verwertet werden. Da dabei die beiden Reduktionsäquivalente zu Beginn des Glucosestoffwechsels nicht gebildet werden, entsteht Acetat als Stoffwechselendprodukt.

Wie bereits erwähnt, kann bei Lactobacillen von einem nur gering ausgeprägten Regulationssystem ausgehen. In gewissen Grenzen sind jedoch Anpassungsvorgänge beobachtet worden. So untersuchten z.B. Citti et al (1967) die Adaption an verschiedene Zucker bei *Streptococcus lactis*.

## **1.2 Der Sauerteig**

Es ist schwierig, die erste Verwendung von Sauerteig durch den Menschen zu datieren. Man kann jedoch vermuten, daß seit der Mensch Getreidemehl zu Teig verarbeitet, dieser auch gesäuert wurde, da der Vorgang spontan einsetzt, wenn der Teig nur ein gewisse Zeit liegen bleibt. Wahrscheinlich wurde die Säuerung des Teiges sehr früh zufällig entdeckt. Diese Hypothese wird durch historische Funde untermauert. Die Säuerung von Teig ist historisch belegt für Ägypten und Griechenland seit 1800 vor unserer Zeitrechnung (Rothe et al. 1973). Etwa auf den gleichen Zeitraum wird der Fund eines gesäuerten Fladens datiert, der in Österreich gefunden wurde (Stokar 1956). Spätestens seit dieser Zeit bis heute spielt die Säuerung von Teig aufgrund seiner vielfältigen positiven Wirkung eine große Rolle für die menschliche Ernährung.

Die Säuerung der Teige erfüllt verschiedene Aufgaben:

- Verbesserung der Wasseraufnahme der Pentosane und Schleimstoffe im Roggenmehl (Hammes und Vogel 1997).
- Inaktivierung der  $\alpha$ -Amylase und  $\beta$ -Amylase
- Förderung der Bildung von Aromaprekursoren
- Ausbildung eines sauren Geschmacks
- Gasbildung

Früher war die Gasbildung der Heterofermentativen Organismen einer der Hauptzwecke der Teigsäuerung. Durch die Verwendung von Hefe trat diese Funktion mit der Zeit jedoch in den Hintergrund

- Antimikrobielle Wirkung (Hammes und Vogel 1997)
  - Geschmack (Hammes und Vogel 1997)
  - Textur und Prozeßfähigkeit (Hammes und Vogel 1997)
- (Böcker 1995),(Gänzle et al 1997)

Als Rohstoffe für die Bereitung von Sauerteig dienen im wesentlichen Roggen- und Weizenmehl, wobei die Säuerung vor allem bei Roggenmehl von Bedeutung ist. Roggen- bzw. Weizenmehl besteht zum Großteil aus der für die meisten Organismen nicht abbaubaren Stärke. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 1.2-1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.2-1 Chemische Zusammensetzung von Roggen und Weizenmehl

	<i>Roggenmehl (Type 815)</i>	<i>Weizenmehl (Type 405)</i>
Stärke	77,5 %	84,2 %
Protein	9,6 %	11,7 %
Lipid	-	1,0 %
Unlösliche Pentosane	3,8 %	-
Lösliche Pentosane	1,4 %	-
Mineralst. (Asche)	0,82 %	0,41 %

(Belitz und Grosch 1987)

Auch ohne Beteiligung von Mikroorganismen finden im Teig bereits Umsetzungen durch die getreideeigenen Enzyme statt. Diese Umsetzungen betreffen vor allem Kohlenhydrate und Proteine und sind stark pH- abhängig. Wichtige Enzyme und deren Verhalten gegenüber dem pH-Wert sind in Tabelle 1.2-2 aufgeführt.

Tabelle 1.2-2 Enzymaktivitäten im Roggen

	<i><math>\alpha</math>-Amylase</i>	<i>Glucoamylase</i>	<i>Protease</i>
pHopt	5,5-6,0	-	3,8-4
pHmin	4,5	4,5	2
relative Aktivität bei pH 3,5	0	-	80%

(Gänzle et al 1997)

Einige der oben genannten positiven Wirkungen im Teig werden bereits durch eine pH-Absenkung erzielt. Andere sind nur durch den Einsatz von Mikroorganismen zu erreichen.

Die Säuerung des Teiges kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden:

- Spontane Säuerung
- Zugabe von Sauerteig aus der letzten Führung
- Zugabe von Starterpräparaten
- Zugabe von getrocknetem Sauerteig
- Zugabe von Milchsäure

In den ersten drei Fällen spricht man von traditionellen Sauerteigen oder von direkter Teigführung. Diese Verfahren sind anerkannt und bewährt und führen zu guten Backergebnissen. Der Nachteil der direkten Teigführung ist jedoch der damit verbundene Arbeits- und Zeitaufwand. Bei Zugabe von getrocknetem Sauerteig spricht man von indirekter Teigführung.

Die spontane Säuerung der Teige durch die in der natürlichen Mehlflora vorhandenen Mikroorganismen ist die traditionelle Methode der Sauerteigherstellung. Sie hat den Nachteil, daß sie stark vom verwendeten Rohstoff abhängig ist, und daher das Ergebnis der Fermentation nur sehr schwer im Voraus abgeschätzt werden kann. Daher ist die Verwendung von Sauerteig aus der letzten Führung eine weit verbreitete Praxis, die zu größerer Sicherheit und konstanteren Produktionsbedingungen führt. Die Verwendung von Starterpräparaten schließlich ermöglicht die größtmögliche biologische Sicherheit und die gleichbleibenden Bedingungen bei der Herstellung von Sauerteig. Die Herstellung von getrockneten Sauerteigpräparaten weicht von der herkömmlichen Teigführung ab. Der getrocknete Sauerteig wird als Zusatz zum Brotteig verwendet und kann unter Bedingungen fermentiert werden, die von der klassischen Sauerteigführung abweichen. Dieser Sauerteig wird auch als Typ II-Sauerteig oder flüssiger Silosauerteig bezeichnet (Böcker 1995).

Die Säuerung kann auch durch den Zusatz von Säuren erfolgen. Dazu werden im wesentlichen Milchsäure, Essigsäure, Weinsäure und Citronensäure verwendet. Diese Methode ist in der Bundesrepublik Deutschland jedoch nicht gebräuchlich.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich im wesentlichen mit Typ II-Sauerteig. Teilweise sind die Ergebnisse jedoch auf traditionelle Sauerteige übertragbar. Typ-II-Sauerteige dienen lediglich der Säuerung des Teiges. Der Teig erfährt keinen Trieb durch Gasbildung. In traditionellen Sauerteigen sind heterofermentative Lactobacillen wesentlich am Trieb beteiligt (Gänzle et al 1997). Die Produktion von Milchsäure ist eine wesentliche Zielsetzung im Typ II-Sauerteig. Um diese zu erhöhen, ist der Einsatz Glucose-ablesender Enzyme sinnvoll, um den beteiligten Organismen die Stärke als C-Quelle zur Verfügung stellen zu können.

Die traditionelle Zubereitung von Sauerteig ist eine der wenigen Fermentationen in denen heterofermentative Lactobacillen vorherrschen. Diese Organismen scheinen für das Brotaroma vorteilhaft zu sein (Böcker 1995). Die Flora des traditionell geführten Sauerteiges besteht im wesentlichen aus folgenden Spezies:

- *L. pontis*
- *L. sanfranciscensis*
- *L. species*

Zusätzlich werden verschiedene Hefen gefunden, wie *S. cerevisiae*, *Candida milleri* und *S. exiguus* (Böcker 1995).

In Typ II-Fermentationen hat sich durch die abweichenden Bedingungen eine andere Florenzusammensetzung herausgebildet. Im wesentlichen besteht die Flora von Typ II Sauerteigen aus folgenden Spezies:

- *L. pontis*
- *L. reuteri*
- *L. species*
- *L. sanfranciscensis*

(Böcker 1995)

### **1.3 Modellbildung**

Die ersten Ansätze, mathematische Modelle in der Mikrobiologie zu verwenden stammen aus dem medizinischen Bereich (NG 1997). Erst später kamen andere Bereiche der Mikrobiologie wie Ökologie und Lebensmittelmikrobiologie dazu. In allen Bereichen wurde zunächst das Verhalten schädlicher Mikroben betrachtet. Demzufolge konzentrierten sich die Versuche zur mathematischen Beschreibung zunächst auf Abtötungskinetiken (Doßmann 1996).

Ein Paradigma der Modellierung ist, die Modelle möglichst einfach zu halten. Ein Modell, das genügend Parameter enthält, ermöglicht es, den Fehler des Modells beliebig klein zu halten. Dann besteht jedoch die Gefahr, daß die Parameter nicht an die Vorgänge im Fermenter, sondern an die Meßfehler angepaßt werden. Daher werden häufig verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Freiheitsgraden entwickelt und dann verglichen (Buchanan 1990).

Die Suche nach dem am besten geeigneten Parametersatz erfolgt immer nach dem Prinzip der Optimierung. Eine Zielfunktion (Optimalitätskriterium) wird minimiert. Dabei sind bestimmte Nebenbedingungen zu beachten. So sind z.B. manche Reaktionen nicht umkehrbar und negative Konzentrationen sinnlos. Die Zielfunktion ist eine Funktion, die quantitativ die Güte des Modells beschreibt, und dadurch den Vergleich verschiedener Modelle ermöglicht. Häufig führt die Zielfunktion auf mehrere lokale Minima. Dies führt zu dem Problem der Suche und des Erkennens eines globalen Minimums (Keil 1996). Das Gleichungssystem entsteht, indem soweit möglich bekannte Zusammenhänge eingebracht werden wie z.B. die Monod-Kinetik. Die entsprechenden Parameter werden im Laufe der Optimierung bestimmt. Häufig ist das kinetische Verhalten eines Teilbereiches jedoch nicht bekannt. In diesen Fällen muß ein Kompromiß aus vermutetem Zusammenhang, einfachster Funktion und bester Beschreibung der Daten gefunden werden. Dieser Kompromiß hängt auch von der Verwendung des Modells ab.

## **1.4 Zielsetzung**

In dieser Arbeit sollte das Verhalten der Organismen in Getreidefermentationen untersucht werden. Dazu sollte zunächst eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die wesentlichen Vorgänge in den Fermentationen mit einer gemischten Population mit einfachen Mitteln beobachten zu können. Um das Verhalten der Organismen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen erklären zu können war geplant die Reaktion der Organismen auf verschiedene Einflußgrößen zu messen und daraus kinetische Parameter abzuleiten.

In der Literatur finden sich einige Modelle, die das Verhalten von Mikroorganismen beschreiben. In der überwiegenden Zahl berücksichtigen diese Modelle die Vorgänge im Inneren der Zellen nicht. Die Modelle in denen versucht wird Stoffwechselwege in allen Details abzubilden (Keil 1996) erfordern die Erhebung einer ausreichenden Menge von Meßdaten, die zudem eine hohe Genauigkeit aufweisen müssen. Die oben beschriebenen Stoffwechselwege bestehen jedoch aus zu vielen Einzelschritten, als daß diese alle berücksichtigt werden könnten. Daher wurde der Versuch unternommen ein vereinfachtes Stoffwechselschema zu verwenden, das nur noch die wesentlichen Schritte, insbesondere die Verzweigungsstellen enthält. Daraus sollte ein Modell entstehen, das auf einer Vielzahl von Vereinfachungen beruht. Es bildet jedoch eine Grundlage, die getestet und diskutiert werden kann, um sie weiter zu verfeinern und die Genauigkeit zu erhöhen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Lediglich Trypsin wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Perchlorsäure von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

#### 2.1.2 Kulturmedien

Tabelle 2.1-1 Zusammensetzung des Homohiochii Mediums

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
<i>Trypton (Pepton aus Casein pankratisch verdaut)</i>	10 g
Fleischextrakt	2 g
Hefeextrakt	7 g
Natriumgluconat	2 g
Natriumacetat-Trihydrat	5 g
Diammoniumhydrogencitrat	5 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,5 g
Cystein-HCl	0.5 g
Tween 80	1 ml
Aqu. Dest.	900 ml
pH	5,4
	Autoklavieren
Glucose	28 g
Aqu. Dest.	90 ml
	Autoklavieren
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	200 mg
Mangansulfat-Monohydrat	100 mg
Eisensulfat-Heptahydrat	50 mg
Aqu. Dest.	10 ml
	Sterilfiltrieren

Die Bestandteile Trypton bis Tween 80 werden mit Aq. dest. auf 900 ml aufgefüllt, der pH mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 5,4 eingestellt und 20 min. bei 121°C autoklaviert. Art und Menge des Zuckers wurde in den Versuchen variiert. Als Standard wurden 28 g Glucose verwendet. Diese Menge wurde mit Aq. dest. auf 90 ml aufgefüllt und getrennt von den restlichen Medienbestandteilen autoklaviert. Die Metallsalze wurden in 10 ml Aq. dest. gelöst und sterilfiltriert zugegeben um ein Ausfallen während des Autoklavierens zu verhindern.

### Spicher

Die Herstellung des Spicher-Mediums erfolgte gemäß des Homoihiochii-Mediums. Die Medienbestandteile Trypton bis Tween 80 wurden jedoch nicht in Aq. dest sondern in Kleieextrakt gelöst.

Tabelle 2.1-2 Zusammensetzung Kleieextrakt

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Roggengrieskleie	40 g
Malzmehl	2 g
Trypsin (1:250)	0,8 g
H <sub>2</sub> O dest (50 °C)	+ 1 l

Zu den Bestandteilen des Kleieextrakts werden 1 l Aq. dest. gegeben. Bei 50 °C wird 24 h inkubiert. Die Feststoffe werden durch Zentrifugieren abgetrennt, und der flüssige Überstand verwendet. Falls die Messung der optischen Dichte erfolgte, mußte nach dem Autoklavieren das fertige Medium nochmals zentrifugiert werden.

Zur Ermittlung des Zuckerspektrums wurde ein Medium wie in Tabelle 2.1-3 beschrieben verwendet.

Tabelle 2.1-3 Zusammensetzung des Mediums für die Zuckertests

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Fleischextrakt	1 g
Pepton aus Fleisch	5 g
Hefeextrakt	3,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x3H <sub>2</sub> O	2.6 g
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	100 mg
MnSO <sub>4</sub> x4H <sub>2</sub> O	50mg
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	50 mg
Cystein-HCl	0,1 g
Tween 80	0,25 g
Bromkresolrot	0,1 g
H <sub>2</sub> Odest.	250 ml

Festen Medien wurden 15 g AgarAgar zugesetzt. Wurde Spicher-Medium AgarAgar zugesetzt, konnte auf das Zentrifugieren verzichtet werden.



## **TypII-Teig**

Einige Versuche wurden in unsterilem Medium durchgeführt. Dies bestand aus Roggengrießkleien und Leitungswasser. Es wurde verwendet, um die Bedingungen in der industriellen Produktion möglichst realistisch nachzuahmen. Dieses Medium konnte nicht autoklaviert werden, da dies eine Verkleisterung und damit eine Verfestigung des Mediums verursacht hätte. Um den Gehalt an Fremdkeimen im Medium möglichst gering zu halten, wurden die Kleie in Wasser mit 50 °C suspendiert, wodurch ein Teil der natürlichen Flora des Mehles abgetötet wird. Das Mischungsverhältnis war in Fermentationen im 3- bzw. 5- Liter-Maßstab 20 % Kleie und 80 % Wasser. Die Viskosität in diesen Ansätzen war sehr hoch. Daher mußte in den Fermentationen in 300 ml Maßstab dieses Verhältnis verändert werden, um eine gleichmäßige Durchmischung des Mediums zu gewährleisten. Das Verhältnis Kleie zu Wasser wurde deshalb auf 15 % Kleie und 85 % Wasser abgeändert.

## **2.2 Organismen**

Alle verwendeten Organismen wurden von Müller (1995) aus industriell produzierten Teigen isoliert. Die Zuordnung der Stämme zu den verschiedenen Arten wurde von Müller (2000) übernommen. Die Zuordnung war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in allen Fällen eindeutig. Daher sind hinter manchen Stämmen mehrere Bezeichnungen angeführt. Folgende homofermentative und heterofermentative Organismen wurden verwendet.

homofermentativ

TMW 1.661 *L. amylovorus*

TMW 1.664 *L. amylovorus*

TMW 1.685 *L. amylovorus*

TMW 1.652 *L. amylovorus*

heterofermentativ

TMW 1.109 *L. pontis*

TMW 1.655 *L. panis*, *L. pontis*, *L. oris*

TMW 1.678 *L. pontis*

TMW 1.686 *L. panis*, *L. pontis*, *L. oris*

TMW 1.692 *L. panis*, *L. pontis*, *L. oris*

## **2.3 Kultivierung und Stammhaltung der Organismen**

Die Stämme wurden in Spicher-Medium bei 40 °C gezüchtet. Bei Kultivierung auf Agar-Platten wurde anaerob bebrütet, wobei mit 80 % Stickstoff und 20 % CO<sub>2</sub> begast wurde. Bei längerer Lagerung wurden die Stämme bei -85 °C in Spicher-Medium mit 20 % Glycerin gelagert.

## 2.4 Geräte

Spektraflour (Tecan)

Kleine Zentrifuge: Sigma 112 Drehzahl 13000 min<sup>-1</sup>

Kühlzentrifuge: Hermle Z 233 MK Beschleunigung: 18400 g

Große Zentrifuge Hermle Z

Photometer Novaspec II von Pharmacia Biotec

pH-Meter von Knick pH-Meter 765 Calimatic

## 2.5 Bestimmung des Spektrums der vergärbaren Kohlenhydrate

Durchführung:

Um die Organismen auf die Fähigkeit zur Vergärung verschiedener Zucker zu testen, wurde ein modifizierter API-50 CH-Test durchgeführt. Abweichend vom Verfahren der Firma Bio-Merieux wurden die Kulturen von Agar-Platten genommen und nicht aus Flüssigkultur. Die Tests wurden in handelsüblichen Mikrotiterplatten durchgeführt. Eine positive Reaktion wurde durch den Umschlag des pH-Indikators Bromkresolrot von rot - violett nach gelb angezeigt, der auf die Säurebildung der Organismen reagiert.

Herstellen der Zuckerlösungen:

Die Reaktion auf folgende 23 verschiedene Zucker wurde getestet, die entsprechend Tabelle 2.5-1 eingewogen wurden.

Tabelle 2.5-1 Einwaagemengen zur Ermittlung des Zuckerspektrums

L(+)-Arabinose	2,01 g	p-Arbutin	2,01 g
Na-Gluconat	2,01 g	Galaktose	2,01 g
Fructose	2,01 g	Mannit	2,01 g
D(+)-Glucose	2,01 g	Sorbit	2,01 g
D(-)-Mannose	2,01 g	D(-)-Ribose	2,01 g
Lactose	2,01 g	D(+)-Xylose	2,01 g
Melibiose	2,01 g	Trehalose	2,01 g
Maltose	2,01 g	Melezitose	2,01 g
Saccharose	2,01 g	Raffinose	2,01 g
Gentibiose	2,01 g	N-Acetyl-D-Glucosamin	2,01 g
Äskulin	2,01 g	Amygdalin	2,01 g
D-Salicin	2,01 g		

Die jeweilige Zuckerlösung wurde in Mikrotiterplatten zu Medium pipetiert und beimpft. Die Farbe des Mediums wurde nach 24 h, nach 72 h und nach einer Woche festgehalten.

## 2.6 Messung der Zelldichte

### Koloniebildende Einheiten (KBE)

Die Zahl der Koloniebildenden Einheiten wurden auf die übliche Methode durch Verdünnen und Ausplattieren ermittelt. Als Verdünnungsmedium wurde 0,85 % -ige NaCl-Lösung verwendet. Die Platten wurden bei 40 °C anaerob bebrütet. Gewertet wurden Platten, deren Koloniezahl zwischen 30 und 300 lag.

Die Optische Dichte in den Nährmedien wurde mit einem Photometer Novaspec II von Pharmacia Biotec bestimmt. Die Wellenlänge betrug 578 nm. Es wurde festgestellt, daß bei optischen Dichten über 0,3 bei *L. pontis* TMW 1.109 der angezeigte Wert zu niedrig war. Daher wurden Proben, die über diesem Wert lagen mit sterilem Medium verdünnt und die optische Dichte entsprechend dem Verdünnungsfaktor errechnet. Für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 lag die optische Dichte ab der verdünnt werden mußte Wert bei 0,5.

Bei Messungen im Spektraflour traten ähnliche Probleme auf. Die Linearitätsgrenzen lagen hier mit 0.5 für *L. pontis* TMW 1.109 und 0.8 für *L. amylovorus* TMW 1.661 etwas höher. Allerdings war es nicht möglich, die Proben zu verdünnen, so daß Fermentationen oberhalb der genannten Werte nicht verfolgt werden konnten.

### Unterscheidung der Organismen

Nah verwandte Organismen einfach, schnell und quantitativ zu unterscheiden, ist mit herkömmlichen Methoden nicht möglich. Verschiedentlich wurde versucht, Nährböden zu entwickeln, die eine einfache Unterscheidung ermöglichen (Zuniga 1993), (Martenska 1998). Im vorliegenden Fall war dies leider nicht möglich. Ein weiterer Ansatz, die Trennung von Organismen durch isoelektrische Focusierung durchzuführen (z.B. Jaspers und Overmann 1997), ist für die zur Modellierung benötigte Datenmenge zu aufwendig. Zudem ist die Quantifizierung bei dieser Methode schwierig. Eine PCR-Technik, die eine quantitative Bestimmung der Zellmasse erlaubt, wurde von Martin Müller [2000] entwickelt. Zum Zeitpunkt der Fermentationen stand diese jedoch nicht als Methode zu Serienanalyse zur Verfügung.

## 2.7 HPLC

### 2.7.1 Die Anlage

Die gesamte Anlage sowie die Software zur Auswertung der Chromatogramme stammt von der Firma Gynkotec-HPLC, Germering. Sie besteht aus folgenden Komponenten:

- Degasser: DEG 503
- Autosampler Gina 50
- Pumpe: M480
- Säulenofen: Peltier-Kolonnen thermostat STH 585
- Säulen Polyspher OA KC von Merck
- UV-Detektor: 160 S
- RI-Detektor: Shodex RI-71
- Software: Chromeleon 4.12 A Build 301

## 2.7.2 Probenvorbereitung

Um die Trennsäule zu schonen, mußten die Proteine aus den Proben entfernt werden. Dazu wurde 1 ml Probe auf 50µl Perchlorsäure gegeben und die Proteine bei 4 °C 24 h lang gefällt und durch 30 min Zentrifugieren bei 18400g abgetrennt. Bei Proben aus den Plempefermentationen mußte zunächst eine flüssige Phase abgetrennt werden. Dazu wurden die Proben 10 min. bei 5000min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Längeres Zentrifugieren hat die Ausbildung von Konzentrationsgradienten in der flüssigen Phase zur Folge. Dies führt zu ungenauen Meßergebnissen.

## 2.7.3 Durchführung

Als Fließmittel wurde eine 5mMolare wässrige Schwefelsäurelösung verwendet, der 0,4 g/5l Natriumacid zugesetzt wurde, um die biologische Sicherheit des Fließmittels zu gewährleisten. Die Flußrate betrug 0,4 ml/min. Der Säulenofen wurde auf 70 °C geregelt.

## 2.8 Fermentationsanlagen

Die Fermentationsanlagen sowie die Software zur Steuerung derselben stammen von der Firma B. Braun, Melsungen. Drei verschiedene Anlagen kamen zum Einsatz.

### ■ BIOSTAT<sup>®</sup> MD Typ M5

Dieser Fermenter besteht aus einem Glas-Doppelwandgefäß mit einem Arbeitsvolumen von 5 l. Durch den Deckel des Fermenters ragen Sensoren zum Messen der Temperatur, des pH-Wertes und des Redoxpotentials in die Fermenterflüssigkeit. Zusätzlich ist ein Rührwerk zur gleichmäßigen Durchmischung des Fermenterinhalts im Deckel integriert. Eine Versorgungseinheit dient der Heizung / Kühlung, der Begasung mit Druckluft / Stickstoff, der Dosierung von Lauge / Säure und der Dosierung von Antischaummittel. Eine digitale Meß- und Regeleinheit (DCU) dient der Messung, Regelung und Aufzeichnung der Daten des Fermenters.

### ■ BIOSTAT<sup>®</sup> MD Typ M2

Dieser Fermenter ist baugleich zum oben genannten Fermenter. Jedoch beträgt das Arbeitsvolumen bei diesem Grät nur 2 l. Zudem besitzt er keine Elektrode zur Messung des Redoxpotentials, dafür jedoch eine Sauerstoffelektrode.

### ■ BIOSTAT<sup>®</sup> Q

In dieser Anlage werden 4 Glasfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 0,25 l parallel betrieben. Die Versorgungseinheit und die zugehörige digitale Meß- und Regeleinheit sind analog zu BIOSTAT<sup>®</sup> MD Typ M2 aufgebaut, jedoch in 4-facher Ausfertigung. Dadurch können die vier Fermentationseinheiten unabhängig voneinander betrieben werden. Die Fermentationsgefäße werden bei dieser Anlage auf einem an die Versorgungseinheit angeschlossenen Metallpodest aufgestellt, in dem sich die Motoren für die Rührwerke befinden. Die Kraftübertragung erfolgt durch magnetische Koppelung.

Alle Fermentationsgefäße samt Einbauten sind autoklavierbar. Die Meßelektroden wurden vor jedem Autoklavieren kalibriert. Die pH- und Redoxelektroden durch die einschlägigen Kalibrierlösungen, die Sauerstoffelektroden wurden mit Nullstromgel auf 0% und durch 10 min. begasen mit Druckluft auf 100 % eingestellt.

Um den pH-Wert nach dem Autoklavieren steril einstellen und konstant halten zu können, wurden 2M NaOH und 1M Phosphorsäure verwendet. Die Probenahme erfolgte über Spritzen.

Die Aufzeichnung der gemessenen Daten erfolgt über die von Firma B. Braun Melsungen gelieferte Software MFCS/win Version 1.1 Service Pack 2.

## **2.9 ATP-Messung**

Die Messungen des Intrazellulären Gehaltes an ATP wurden mit dem Enzymkit „ATP Bioluminescence Assay Kit HS II“ von Boehringer Mannheim durchgeführt.

Vorbereitend waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- 0,5 ml Probe 2 min. bei 13000 min<sup>-1</sup> zentrifugieren um die Zellen abzutrennen
- Überstand abgießen
- 0,5 ml Tris-Puffer 1 100 °C zugeben
- 2 min. bei 100 °C die Zellen aufschließen
- in Eis rasch abkühlen
- 2 min. bei 4 °C und 18400 g zentrifugieren, um Zellen abzutrennen
- Die Proben wurden bei -20 °C gelagert
- Die meisten Proben mußten mit Tris-Puffer 2 verdünnt werden um den Meßbereich nicht zu überschreiten.

Zusammensetzung der Puffer:

- 1,21 g TRIS-base
- 1,58 g Tris-HCl
- 0,3 g EDTA (nur für Tris-Puffer 1)

Vor jeder Messung wurden Kalibriermessungen mit Standards durchgeführt. Eine Ausgleichsfunktion der Form

$$y = a \cdot x^b \tag{2-1}$$

wurde den Meßwerten angepaßt und zur Ermittlung der Konzentrationen verwendet. Der Einfluß der Hitzebelastung der Proben kann vernachlässigt werden, wie aus Abbildung 2.9-1 hervorgeht. Hier wurden Proben mit gleicher Ausgangskonzentration einmal unbehandelt vermessen und einmal vor der Messung einer Hitzebehandlung ausgesetzt die Proben beim Zellaufschluß erfahren. Im Diagramm ist zu erkennen, daß sich die Punkte in den beiden Fällen kaum verschieben.

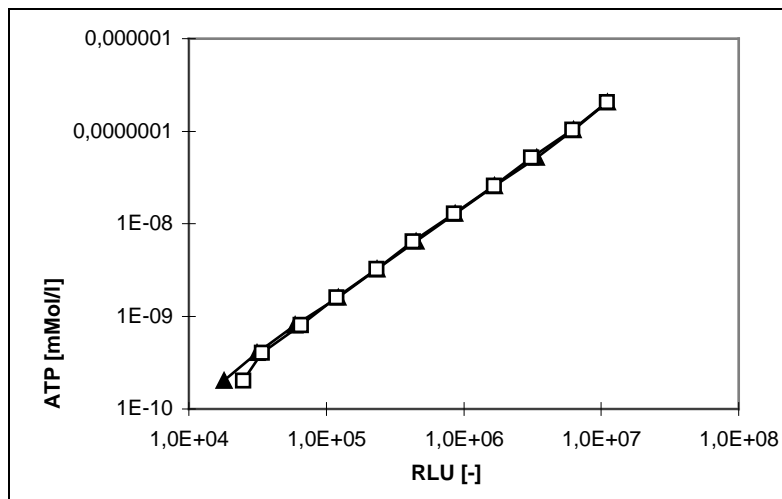


Abbildung 2.9-1 ATP-Messung in Proben gleicher Konzentration mit (▲) und ohne (□) Hitzebelastung.

Die aus einer Anpassung an diese Werte resultierenden Koeffizienten unterscheiden sich nur marginal wie in Tabelle 2.9-1 ersichtlich.

Tabelle 2.9-1 Kalibrieren der ATP-Messung

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
unbehandelt	4 · 10 <sup>-15</sup>	1,095	0,998
behandelt	7 · 10 <sup>-15</sup>	1,099	1,000

## 2.10 Enzymatische Bestimmung der Glucose und Fructose

In einigen Fällen war die enzymatische Bestimmung von Fructose notwendig. In diesen Fällen wurde der kombinierte D-Glucose/D-Fructose-Kit der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Der Test wurde modifiziert, so daß er anstatt in Küvetten in Mikrotiterplatten und somit in kleineren Volumina durchgeführt werden konnte. In eine Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 µl ATP/NADP-Lösung, 90 µl Puffer und 10µl Probe pipettiert. Nach Schütteln wurde die Extinktion  $e_1$  gemessen. Da die zu pipettierenden Volumina der Enzymlösung zu klein gewesen wären, wurden diese Lösungen zunächst 1:1 mit sterilfiltriertem H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt. Von den resultierenden Lösungen wurden zunächst 2µl Enzymlösung 1 mit Hexokinase und GPD zupipetiert. Nach Schütteln wurde die Extinktion  $e_2$  gemessen. Nach Zugabe von 2µl Enzymlösung 2 mit Phosphoglucoseisomerase und erneutem Schütteln wurde die Extinktion  $e_3$  gemessen. Die Extinktionsdifferenz für Fructose berechnet sich zu  $\Delta e_{\text{Fructose}} = e_3 - e_2$ . Mit Hilfe von  $e_1$  kann der Glucosegehalt bestimmt werden. Damit kann der aus der HPLC erhaltene Wert überprüft werden.

## **2.11 Verwendete Materialien bei den Versuchen mit Messung des CO<sub>2</sub>-Druckes**

Bei diesen Versuchen wurden zum Teil von den vorhergehenden Ausführungen abweichende Geräte und Parameter verwendet, da diese Versuch in den Labors der UTC in Compiègne (Frankreich) durchgeführt wurden.

HPLC: Abweichend kam hier eine höhere Flußrate von 0.6 ml/min zum Einsatz. Das Fließmittel war ebenfalls eine wäßrige Lösung von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jedoch in einer Konzentration von 200µl/l. Die Trennsäule wurde auf 60 °C temperiert.

Die Fermentationsanlage bestand aus einer temperierbaren Haube in der ein Mehrfach-Magnetrührer untergebracht ist. Auf diesem Rührer werden drei gläsernen Fermentationsgefäße aufgestellt. Das Nutzvolumen beträgt je 100 ml das gesamte Volumen beträgt 480 ml. Der pH-Wert und der Überdruck im Kopfraum wurden online aufgezeichnet.

## **2.12 Spezielle Methoden und Versuchsaufbauten**

### **2.12.1 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf verschiedene Ethanolkonzentrationen Durchführung**

Um die Reaktion der Organismen auf das Stoffwechselprodukt Ethanol zu untersuchen, wurden 24 Fermentationen in Mikrotitermaßstab durchgeführt. Zusätzlich erfolgten 20 Fermentationen in Eppendorfgefäßen, bei denen bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen zu zwei Zeitpunkten die Zunahme der Zelldichte über die optische Dichte und die Veränderungen der Konzentrationen mittels HPLC gemessen wurden.

### **2.12.2 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf Milchsäure**

Das Verhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661 gegenüber Milchsäure wurde in 192 Kleinfermentationen in Mikrotiterplatten untersucht. Die Konzentration der Milchsäure wurde in folgenden Abstufungen variiert: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 375, 500 mMol/l. Um den Anteil der undissoziierten Säure zu variieren, wurde jede Konzentration in mehreren Ansätzen getestet, in denen der pH-Wert in folgenden Abstufungen vorlag: 3,0; 3,4; 3,8; 4,2; 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2.

Vier Fermentationen im 300 ml-Maßstab wurden durchgeführt, um das Verhalten von *L. pontis* TMW 1.109 gegenüber Milchsäure zu untersuchen. Die Fermentationen erfolgten bei 40 °C in Spicher-Medium. Das Medium enthält bereits geringe Mengen Milchsäure. Zusätzlich wurde in drei Ansätzen 40 mMol/l, 80 mMol/l und 120 mMol/l Milchsäure zugegeben. Außerdem wurden auf Mikrotiterplatten 192 Kleinfermentationen bei verschiedenen Milchsäurekonzentrationen und pH-Werten durchgeführt, insbesondere um die

Wirkung von dissoziierter und nicht dissoziierter Säure zu eruieren. Dabei kamen die gleichen Abstufungen zum Einsatz wie für *L. amylovorus* TMW 1.661.

### **2.12.3 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf unterschiedliche Acetatkonzentrationen**

Für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 und *L. pontis* TMW 1.109 wurden jeweils 192 Mikrotiterfermentationen durchgeführt. Die verwendeten Acetatkonzentrationen waren: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 375, 500 mMol/l. Die Abstufung des pH-Wertes war: 3,0; 3,4; 3,8; 4,2; 4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2.

Für *L. pontis* TMW 1.109 kann die Reaktion auf steigende Acetatsmengen ausserdem durch Zugabe unterschiedlicher Fructosemengen untersucht werden, da dadurch Acetat gebildet wird. In diesem Zusammenhang wurden 8 Fermentationen im 300 ml Maßstab durchgeführt mit Fructosemengen zwischen 0 und 200 mMol/l.

### **2.12.4 Die Glucosekonzentration**

*L. pontis* 1.109 wurde in 4 verschiedenen Ansätzen in Homohiochii-Medium mit Glucosekonzentrationen von 2,0; 4,0; 6,5 und 9,0 g/l fermentiert. In Spicher-Medium wurde die Glucosekonzentration in 4 Fermentationen auf 0, 0; 3,5; 7,0; 14,0 g/l eingestellt. Zusätzlich wurden Mikrotiterfermentationen auf Homohiochii und Spicher durchgeführt. *L. amylovorus* 1.661 wurde in verschiedenen Mikrotiterfermentationen auf das Verhalten gegenüber Glucose getestet.

### **2.12.5 Verhalten der Organismen gegenüber Fructose**

Das Verhalten von *L. pontis* 1.109 wurde in 10 Fermentationen mit 300 ml Volumen untersucht. 4 davon wurden in Homohiochii-Medium und 6 in Spicher durchgeführt. Die Fructosemenge wurde im Bereich 0 - 200 mMol/l variiert. Zusätzlich wurde in Mikrotiterfermentationen das Verhalten von *L. pontis* 1.109 und *L. amylovorus* 1.661 bei verschiedenen Fructosekonzentrationen im Beisein von Glucose ermittelt.

### **2.12.6 Verhalten bei verschiedenen pH-Werten**

Um das Verhalten der Organismen gegenüber verschiedenen pH-Werten zu testen wurden mit *L. pontis* 1.109 und mit *L. amylovorus* 1.661 je 5 Fermentationen in 300 ml Maßstab durchgeführt. Zusätzlich wurden Gemische der Stämme fermentiert, um Verschiebungen der Population beobachten zu können. Um eine feinere Rasterung zu erreichen, wurden zusätzlich Kleinstfermentationen auf Mikrotiterplatten durchgeführt.



### **2.12.7 Bestimmung der Reaktion der Organismen auf verschiedene Temperaturen**

Zur Bestimmung der Reaktion der Organismen *L. pontis* 1.109 und *L. amylovorus* 1.661 auf unterschiedliche Temperaturen wurden 18 Fermentationen durchgeführt. Der Temperaturbereich von 28 °C bis 52 °C wurde abgedeckt. Die Fermentationen wurden durch Zugabe von 2 molarer NaOH pH-statisch gehalten. Die Versuche wurden mit der Fermentationsanlage Biostat Q durchgeführt. Das Verhalten einer Fermentation in industrieller Produktion wurde in 3 Ansätzen untersucht, in denen Roggenkleie als Substrat diente und ein Organismengemisch entsprechend der industriellen Fertigung eingesetzt wurde.

### **2.12.8 Verlauf einer Fermentation in industriellem Maßstab**

Um einen Vergleich mit Fermentationen in industriellem Maßstab durchführen zu können, wurden während einer Produktionsfermentation in industriellem Maßstab Proben entnommen. Die Proben wurden aufbereitet, der pH-Wert gemessen und eine HPLC-Analyse von Metaboliten durchgeführt

## 3 Berechnungsmethoden und Modelle

### 3.1 Eigenschaften und Beurteilung von Modellen

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Modelle, die teilweise mit sehr verschiedenen Techniken erstellt wurden und sehr unterschiedlichen Zwecken dienen. Die Modelle werden nach ihren jeweiligen Eigenschaften voneinander unterschieden und eingeteilt. Verschiedene Einteilungskriterien werden von Characklis (1983) aufgeführt.

beschreibend / vorhersagend  
strukturiert / unstrukturiert  
nicht-segregiert / segregiert  
deterministisch / stochastisch  
kontinuierlich / nicht kontinuierlich

Welcher Ansatz und welche Technik auch immer gewählt wird, um verschiedene Modellgleichungen oder Parametersätze für Modelle bewerten und vergleichen zu können, ist ein Maßstab zur Bewertung der Modelle notwendig.

Die erste stark subjektive Beurteilung der Modelle erfolgt durch Betrachtung der errechneten Graphen. Dies ist als Plausibilitätskontrolle zu empfehlen. Andererseits können natürlich wirkliche Vergleiche von Modellen nur mit Hilfe geeigneter Maßzahlen durchgeführt werden. Daher ist das auch etwas abfällig als „chi-by-eye-Methode“ (Press et al 1994 c) bezeichnete Verfahren nur anzuwenden als Ergänzung zu statistischen Verfahren.

Die wohl am häufigsten verwendete Methode zur Beurteilung der Modellgüte ist die Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Diese Methode geht davon aus, daß das beste Modell jenes ist, für das die Wahrscheinlichkeit am größten ist, die gemessenen Werte zu erhalten. Dies ist gleichbedeutend mit der Annahme, daß das Modell mit der geringsten Summe der Fehlerquadrate (Residual Sum of Squares : RSS) am besten ist. Eine nähere Begründung dafür ist in Press et al (1994 c) gegeben. Die Berechnung erfolgt gemäß Gleichung (3-1).

$$RSS = \sum_{i=1}^N [y_i - y(x; a_1 \dots a_M)]^2 \quad (3-1)$$

N: Anzahl der Datenpunkte

M: Anzahl der Parameter

$a_1 \dots a_M$ : zu optimierende Parameter

$(x_i; y_i)$ : Gemessener Wert

(Press et al 1994 c), (Mühlbach 1988)

Die Größenordnungen der verschiedenen Meßwerte unterscheiden sich z.T. erheblich. Dies muß bei der Berechnung berücksichtigt werden, da sonst der Einfluß der Meßfehler nicht ihrer Bedeutung entspricht. Beispielsweise hat eine um 5 mmol/l höhere Konzentration häufig nur einen geringen Einfluß auf das System. Ein pH-Wert, der um 5 Einheiten höher ist, jedoch

sehr wohl! Daher wurden die Fehler berechnet als Prozentsatz des Bereiches in dem sich die jeweilige Größe bewegt.

Da Meßreihen mit unterschiedlicher Anzahl von Meßpunkten auftreten können, muß gewährleistet sein, daß die Modelle auch bei verschiedenen Werten für N vergleichbar sind. Daher wird der mittlere quadratische Fehler (mean square error : mse) eingeführt.

$$mse = \frac{RSS}{N} \quad (3-2)$$

Dadurch erhält man eine geeignete Maßzahl zur Beurteilung verschiedener Modelle.

Eine Möglichkeit zu ermitteln, ob ein Modell mit einem zusätzlichen Parameter zu einer Verbesserung führt oder ob lediglich die Meßfehler angepaßt werden, ist der t-Test. Dazu werden für ein Modell die Parameter angepaßt und deren 95% Konfidenz-Intervall nach der Student t-Methode ermittelt (Precht 1987) (Press et al 1994 d). Liegt 0 oder 1 im Konfidenzbereich des Parameters kann das Modell vereinfacht werden (Zwietering et al. 1990).

Der F-Test dient in der Statistik zum Vergleich zweier Varianzen. Er kann somit auch zur Beurteilung von Modellen herangezogen werden. Um den F-Test, anwenden zu können muß zunächst das 'general model' berechnet werden. Darunter versteht man ein fiktives Modell, das bei jedem Wert des veränderten Parameters genau den Mittelwert der erhaltenen Meßwerte liefert.

Berechnung des 'general model', als Reihe von Mittelwerten, nach Zwietering et al (1991)

$$\bar{\mu}_m(i) = \sum_{j=1}^m \frac{\mu(i, j)}{m} \quad (3-3)$$

m : Anzahl der Wiederholungen

$\mu_m(i, j)$  : maximale Wachstumsrate bei Wert i des variierten Parameters; Wiederholung j

$\mu_m(i)$  : mittlere Wachstumsrate bei Wert i des variierten Parameters

Das 'general model' ist also lediglich ein Modell, bei dem angenommen wird, daß die Mittelwerte der Messungen das reale Verhalten des Systems wiedergeben.

Eine Abschätzung des Meßfehlers erfolgt durch Berechnung des RSS des general models nach Gleichung (3-4) (Zwietering et al 1991).

$$RSS_1 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m [\mu_m(i, j) - \bar{\mu}_m(i)]^2 \quad (3-4)$$

Im Vergleich dazu kann der RSS für ein getestetes Modell nach folgender Gleichung berechnet werden (Zwietering et al 1991).

$$RSS_2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m [\mu_m(i, j) - \tilde{\mu}_m(i)]^2 \quad (3-5)$$

Hierbei ist  $\tilde{\mu}$  die vom Modell berechnete Wachstumsrate.  $RSS_2$  wird immer größer sein als  $RSS_1$ .  $RSS_2$  setzt sich aus dem Meßfehler und dem Fehler des Modells additiv zusammen. Daher kann  $RSS_2 - RSS_1$  zur Abschätzung des Modellfehlers verwendet werden (Zwietering et al 1991). Die Güte eines Modells wird am Verhältnis zwischen Modellfehler und dem Meßfehler erkannt. Quantifizieren läßt sich dies im F-Test. Der Wert  $f$  wird folgendermaßen berechnet:

$$f = \frac{(RSS_2 - RSS_1) / (df_2 - df_1)}{RSS_1 / df_1} \quad (3-6)$$

Hierbei sind  $df_1$  und  $df_2$  die Freiheitsgrade des 'general model' und des getesteten Modells. Er berechnet sich jeweils aus der Anzahl der Meßpunkte minus Anzahl der Parameter. Dieser Wert wird mit

$$F_{df_1}^{df_2 - df_1} \quad (3-7)$$

verglichen. Modelle, für die folgende Bedingung gilt:

$$f \gg F_{df_1}^{df_2 - df_1} \quad (3-8)$$

werden abgelehnt. Die entsprechenden Werte für  $F_{df_1}^{df_2 - df_1}$  können aus Tabellen in einschlägigen Statistikbüchern (z.B. Köhler et al 1996) entnommen werden oder mit Hilfe von Computerprogrammen die statistische Auswertungen ermöglichen wie z.B. Microsoft Excel errechnet werden.

### 3.1.1.1 Sensitivitätsanalyse

Ein Mittel zur Beurteilung von Modellen und der ermittelten Parameter ist die Sensitivitätsanalyse. Dabei wird ein Parameter eines Modells variiert und die Auswirkung auf den RSS beobachtet. Hat die Veränderung eines Parameters keine oder nur geringe Auswirkung auf den RSS so ist zu untersuchen ob dieser Parameter aus dem Modell entfernt werden kann. Bleibt der RSS bei der Variation des Parameters über einen gewissen Bereich in etwa konstant so muss davon ausgegangen werden, dass der Parameter nur abgeschätzt werden kann.

## 3.2 **Hardware**

Die Hardware, die zur numerischen Arbeit zur Verfügung stand bestand aus einem handelsüblichen PC mit PentiumPro-Prozessor 200 MHz, 96 MB Hauptspeicher.

### 3.3 Software

Für Berechnungen wurden verschiedene Softwarepakete verwendet.

Für die Anpassung von substratunabhängigen Wachstumskinetiken und für statistische Auswertungen stand SigmaPlot for Windows Version 4.01 von der SPSS inc. zur Verfügung.

Um Ableitungen zu berechnen oder zur Suche nach Analytischen Lösungen für Differentialgleichungen, wurde das Computer-Algebra-Programm Maple verwendet.

Zur numerischen Lösung der Differentialgleichungen und Anpassung der Parameter, wurde ein selbst erstelltes Programm verwendet. Dieses Programm wurde mit Visual C++ 4.22 von der Microsoft Corporation erstellt. Als Hilfestellung dienten die im Quellcode vorliegenden Funktionen in „Numerical Recipes“ von Press et al. (1994 a - f).

### 3.4 Substratunabhängige Wachstumskinetik

Die einfachste Art das Wachstum von Mikroorganismen zu beschreiben, ist die Verwendung einer substratunabhängigen Wachstumskinetik. Dabei wird eine Rückwirkung der Organismen auf das Substrat nicht berücksichtigt. Die Wachstumsrate ist nur von der Zeit und/oder von der bereits gebildeten Zellmasse abhängig. Eine realistische Beschreibung der gesamten Wachstumskurve ist dadurch kaum möglich, jedoch kann die maximale Wachstumsrate und die Dauer der Lag-Phase unter verschiedenen Bedingungen gut abgeschätzt werden. Häufig wird dieser Ansatz verwendet, um response surface-Modelle zu entwickeln. Diese Modelle zeigen das Verhalten von maximaler Wachstumsrate und Dauer der Lag-Phase in Abhängigkeit zweier Einflußgrößen in einem 3-dimensionalen Diagramm.

Kinetiken, die das Wachstum ausschließlich in Abhängigkeit der Zeit und/oder der Zellmasse beschreiben, liegen zwei unterschiedliche Ansätze zugrunde. Eine einfache, pragmatische Methode ist es sigmoide Funktionen zu verwenden, die in anderen Bereichen der Wissenschaft und der Technik verwendet werden. Diese Funktionen müssen häufig reparametriert werden, um zu, den biologischen Vorgängen entsprechenden, sinnvollen und interpretierbaren Größen zu gelangen. Dabei sind die maximale Wachstumsrate, die Länge der lag-phase und die maximale Zelldichte von Bedeutung. Die am meisten verwendete Gleichung dieser Art ist die Gompertz-Gleichung (Zwietering et al. 1990).

$$y = a \cdot e^{-e^{[b-cx]}} \quad (3-9)$$

Durch Umparametrieren erhält man aus dieser Gleichung (Zwietering et al. 1990):

$$y = A \cdot e^{-e^{\left[\frac{\mu \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]}} \quad (3-10)$$

Diese Gleichung wird verwendet, um den Logarithmus der Zellzahl  $\log(N/N_0)$  zu beschreiben. In dieser Gleichung sind drei für die biologische Interpretation wichtige Parameter enthalten.

A: Die Zellzahl zum Zeitpunkt 0

$\lambda$ : Die Dauer der Lag-Phase

$\mu$ : die maximale Wachstumsrate

Ein mehr systematischer Ansatz ist die Annahme, die Wachstumsrate hänge von der Zelldichte ab. Dabei soll die Wachstumsrate mit zunehmender Zelldichte in Abhängigkeit einer Funktion abnehmen, die als Arbeitshypothese zu Grunde gelegt wird. Dadurch ergibt sich ein System aus zwei Differentialgleichungen. Die analytische Lösung dieser Gleichungen ergibt eine sigmoide Funktion. Ein bekanntes Beispiel für diesen Ansatz ist die logistische Wachstumskurve. Der Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Zellmasse wird dabei als linear angenommen (Bellgardt 1991):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{X(t)}{X_{\max}}\right) \quad (3-11)$$

Die Wachstumsrate nimmt hier mit Annäherung der Zellmasse X an die maximale Zellmasse  $X_{\max}$  ab. Dieser Ansatz wurde weiterentwickelt z.B. von Cui und Lawson (1982) oder von Frame and Hu (1988), die jeweils andere Zusammenhänge zwischen Wachstumsrate und Zellmasse vorschlagen.

Bei diesen Funktionen ist es jedoch nicht möglich, die lag-Phase zu modellieren. Dies kann man umgehen, indem man anstatt der Zelldichte den Logarithmus zur Basis 10 der Zelldichte verwendet. Herleitungen wie z.B. bei der logistischen Funktion verlieren jedoch damit ihren systematischen Hintergrund. Werden nur Meßwerte während der exponentiellen Phase beobachtet, kann eine einfache Exponentialfunktion mit der Basis 10 verwendet werden um die maximale Wachstumsrate zu ermitteln.

Die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate unterliegt einer großen Schwankungsbreite (Meijer 1995). Daher ist es nötig, die Versuchsbedingungen und insbesondere den Zustand der Organismen in den Versuchen möglichst konstant zu halten. Parallelversuche mit dem gleichen Material zum Animpfen der Medien erwiesen sich als zuverlässigste Methode.

### **3.5 Wachstumskinetik bei sich verändernden Bedingungen**

In diesen Modellen werden die Zellen als homogene Menge betrachtet, ohne interne Dynamik. Dabei wird vorausgesetzt, daß die Reaktionszeit der Zellen auf Veränderungen der Umgebung so kurz ist, daß sie vernachlässigt werden kann, oder daß die Reaktionszeit so lange ist, daß keine nennenswerte Anpassung erfolgt (Rehm 1991). Das Verhalten der Zellen wird in diesem Fall von einem Vektor bestimmt, der nur die verschiedenen Konzentrationen der im Medium gelösten Stoffe enthält:  $C=(C_{\text{glu}}, C_{\text{fru}}, C_{\text{lac}}, C_{\text{ace}}, C_{\text{eth}}, C_{\text{H}^+}, T, CX)^T$ . Jede veränderliche Größe ist eine Funktion dieses Vektors. Häufig kann jedoch der Effekt einzelner Komponenten des Vektors vernachlässigt werden. Dadurch vereinfacht sich das Gleichungssystem. Das Wachstum der Zellen kann z.B. manchmal durch die Hemmung eines einzelnen Stoffwechselproduktes beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit kann in

manchen Fällen durch Gleichung (3-12) das Wachstum bereits weitgehend beschrieben werden.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot f(Lac) \quad (3-12)$$

Entsprechend der Versuchsbedingungen müssen andere Effekte zusätzlich berücksichtigt werden, so daß je nach Randbedingungen unterschiedlich komplexe Gleichungssysteme entstehen. Bezeichnet man die Konzentrationen der relevanten Substanzen mit  $C_1 - C_n$  ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \mu_{\max} \cdot f(C_1, \dots, C_n) \\ \frac{dC_1}{dt} &= f(X, C_1, \dots, C_n) \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{dC_n}{dt} &= f(X, C_1, \dots, C_n) \end{aligned} \quad (3-13)$$

Häufig werden zur Beschreibung aller Vorgänge Polynome verwendet. Diese Modelle setzen keinerlei Kenntnisse über die Art der zu beschreibenden Vorgänge voraus und betrachten das zu untersuchende System als Black-Box. Eine Erweiterung dieses Vorgehens ist die sogenannte  $\lambda$ -Transformation (z.B. NG 1997).

### 3.6 Strukturierte Modelle

Wird der innere Zustand der Zellen im Modell berücksichtigt oder wird die Zellmasse nicht als homogen angenommen, spricht man von einem strukturierten Modell. Der Vektor, der auf das System einwirkenden Größen muß in diesem Fall erweitert werden. Die Erweiterung des Modells muß umsichtig vorgenommen werden, um nicht die Anzahl der Parameter zu groß werden zu lassen. Im vorliegenden Fall wurden zwei interne Größen in das Modell integriert. Zum einen die intrazelluläre Konzentration von ATP, als die den Zellen zur Verfügung stehende Energie, zum anderen Xylulose-5-Phosphat als Maß der intrazellulär vorhandenen C-Körper. Durch dieses Vorgehen können Modellannahmen getestet und unter Umständen falsifiziert werden.

Auf diese Weise können auch Anpassungsvorgänge beschrieben werden. Die Lag-Phase z.B. kann mit unstrukturierten Modellen nur unzureichend beschrieben werden (Bellgardt 1991). Bei intrazellulären Größen muß die Verdünnung durch Wachstum berücksichtigt werden. Das heißt, bei gleichbleibender Menge  $M$  einer Substanz verringert sich die intrazelluläre Konzentration  $C_i$  durch das Anwachsen der Zellmasse wie in Gleichung (3-14) beschrieben.

$$C_i = \frac{M}{X} \quad \frac{dC_i}{dt} = \frac{\frac{dM}{dt}}{\frac{dX}{dt}} \quad (3-14)$$

Bei allen Modellen ist es sinnvoll, die sich aus den Stoffwechselwegen ergebenden Bilanzen und andere Kenntnisse der Physiologie soweit wie möglich zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Batch-Fermentationen ohne Zulauf und Ablauf betrachtet. In Biostaten gelten zum Teil andere Gesetzmäßigkeiten, die hier nicht untersucht wurden. Dies ist gerechtfertigt, da praktisch alle Lebensmittelfermentationen Batch-Verfahren sind.

### 3.7 Beschreibung der Reaktion auf verschiedene Einflußgrößen

#### 3.7.1 Zellmasse

Die Zellmasse  $X$  wirkt sich zunächst vor allem autokatalytisch auf das Wachstum der Zellen aus.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{mit } \mu = \mu_0 \cdot f_1(\quad) \cdot f_2(\quad) \dots \quad (3-15)$$

$f_1(\dots)$  sind dabei die Einflüsse anderer Faktoren auf das Wachstum der Zellen. Das Produkt der einzelnen Funktionen gilt, wenn die Einflüsse unabhängig voneinander sind (siehe auch Kapitel 3.9). Die Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  beschreibt das maximale Wachstum unter optimalen Bedingungen. Dieser Wert ist auch innerhalb der Familie der Lactobacillen stark unterschiedlich. Es wurden z.B. für *L. plantarum* ein  $\mu_{\max}$  von  $0,35 \text{ h}^{-1}$  gefunden (Passos 1993) und für *L. Sanfranciscensis* ein  $\mu_{\max}$  von  $1,31 \text{ h}^{-1}$  (Gänzle et al 1997). Dies entspricht Verdoppelungszeiten von 2 h bzw. 0,53 h.

Die Zellmasse wirkt sich offensichtlich linear auf den Verbrauch von Nährstoffen und die Produktion von Stoffwechselprodukten aus. Intrazelluläre Konzentrationen werden wie in Kapitel 3.6 beschrieben beeinflusst.

#### 3.7.2 Stoffwechselprodukte

Der Einfluß der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Zellen wurde mit einer Vielzahl verschiedener Gleichungen versucht zu beschreiben. Die einfachste Möglichkeit, eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit zu beschreiben, ist eine lineare Verminderung von  $\mu$  mit steigender Konzentration (Ghose und Tyagi 1979).

$$\mu(C) = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{C}{C_{\max}}\right) \quad (3-16)$$



Dabei ist  $C_{\max}$  die Konzentration, bei der die Wachstumsrate auf 0 abgesunken ist. Dies wird jedoch kaum angewandt, da diese Gleichung zu wenig Parameter besitzt, um sie vernünftig an Meßdaten anpassen zu können. Durch eine Erweiterung um einen Parameter wie von Levenspiel (1980) vorgeschlagen, erhält man eine nichtlineare Gleichung.

$$\mu = \mu_{\max} \left[ 1 - \frac{[C]}{[C]_{\max}} \right]^{\alpha} \quad (3-17)$$

Ein ähnliches Vorgehen stellt die von Luong (1985) vorgeschlagene Gleichung für die Inhibition durch Ethanol dar.

$$\mu = \mu_{\max} \left[ 1 - \left( \frac{[C]}{[C]_{\max}} \right)^{\beta} \right] \quad (3-18)$$

Ebenfalls empirisch ermittelt wurde die folgende Gleichung (Wolfrum und Vogel 1998):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{1 + e^{-\text{off} \cdot st}}{1 + e^{([C] - \text{off}) \cdot st}} \quad (3-19)$$

Sie wurde entwickelt, nachdem erkannt wurde, daß die Hemmung durch Stoffwechselprodukte manchmal durch eine sigmoide Funktion am besten beschrieben werden kann. Ausgangspunkt für diese Gleichung ist die folgende, häufig verwendete sigmoide Funktion.

$$y = \frac{1}{1 + e^{-c \cdot x}} \quad (3-20)$$

Um aus der monoton steigenden Funktion eine monoton fallende zu machen, wurde sie mit der Operation  $g(x)=f(-x)$  an der Y-Achse gespiegelt. Daraus resultiert Gleichung (3-20).

$$y = \frac{1}{1 + e^{c \cdot x}} \quad (3-21)$$

Der Faktor  $\text{off}$  verschiebt die Funktion auf der X-Achse. Dieser Faktor trägt der Tatsache Rechnung, daß die Hemmung durch verschiedene Substanzen bei verschiedenen Konzentrationen einsetzt.

$$y = \frac{1}{1 + e^{c \cdot (x - \text{off})}} \quad (3-22)$$

Der Faktor  $st$  bestimmt die Steilheit der Funktion. Der Zähler mußte entsprechend geändert werden, um eine Funktion zu erhalten, die bei Konzentration 0 den Wert 1 liefert.

$$y = \frac{1 + e^{-\text{off} \cdot st}}{1 + e^{([C] - \text{off}) \cdot st}} \quad (3-23)$$

Die Produktion von Stoffwechselprodukten wird häufig in eine wachstumsbezogene und nicht wachstumsbezogene Produktbildung unterteilt, wie in Gleichung (3-24) gezeigt.

$$\frac{\partial P}{\partial t} = k_1 \cdot \frac{dx}{dt} + k_2 \cdot X \quad (3-24)$$

Ohara (1992) schlägt im Gegensatz dazu vor, die Produktbildung als Funktion der Wachstumsrate zu darzustellen:

$$\frac{\partial L a c}{\partial t} = \pi \cdot X \quad \text{mit } \pi = \frac{\mu}{\gamma + \mu \cdot \delta} \quad (3-25)$$

Die Herleitung ist analog zur Beschreibung der Glucoseaufnahme.

Ein spezielles Problem ergibt sich durch die gebildeten Säuren in ungepufferten Fermentationen. Bei sinkendem pH-Wert verändert sich der Dissoziationsgrad der Säuren. Die inhibitorische Wirkung der dissoziierten und der undissoziierten Säure kann jedoch stark unterschiedlich sein (Passos 1993). Die dissoziierte Form der Säure soll eine wesentlich geringere hemmende Wirkung besitzen. Dies wird darauf zurückgeführt, daß die undissoziierte Säure ungeladen ist und deshalb besser durch die Zellmembran diffundieren kann (Passos et al 1993), (Presser et al 1997). Die Wirkung der dissoziierten Säure wird deshalb verschiedentlich vernachlässigt (Passos 1993). Presser et al (1997) zeigen, daß die dissoziierte Säure eine sehr geringe Wirkung auf E. coli ausübt. Die maximale Konzentration bei der Wachstum gerade noch möglich ist, wird für die dissoziierte Säure mit der ca. 80-fachen Konzentration angegeben.

Der Anteil der dissoziierten Säure schwankt bei Milchsäure und Essigsäure stark im pH-Bereich, der während einer ungepufferten Fermentation durchlaufen wird. Berechnet werden kann dies durch die Henderson-Hasselbach-Gleichung (Mortimer 1987).

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{pH - pKa} \quad (3-26)$$

Der pKa-Wert ist in Medium nicht zwingend gleich dem pKa-Wert in Wasser. Da jedoch das Medium eine starke verdünnte Lösung darstellt, ist eine verschwindend kleine Differenz zu erwarten. Presser et al (1997) haben dies für verschiedene Medien bestätigt.

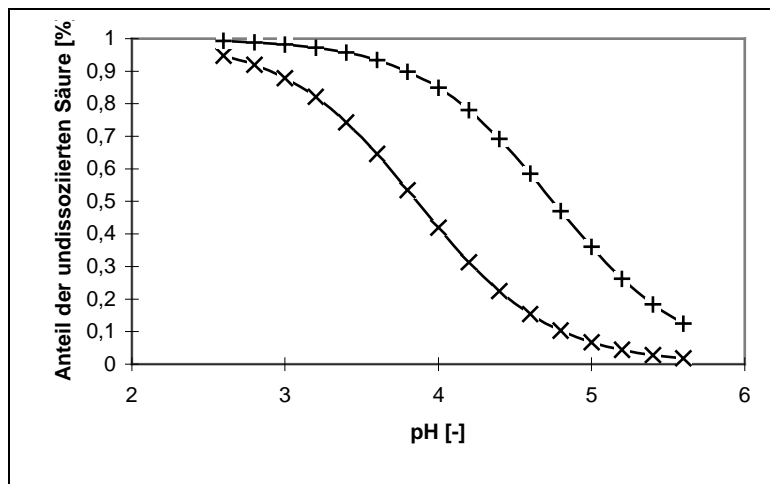


Abbildung 3.7-1 Prozentsatz der undissoziierten Säure bei Milchsäure (x) und Essigsäure (+) in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Für die Hemmung von Milchsäurebakterien durch undissoziierte Milchsäure schlägt Passos (1993) eine Beschreibung nach Levenspiel (1980) wie in Gleichung (3-27) vor.

$$f_1([HLA]) = \left(1 - \frac{[HLA]}{[HLA]_{\max}}\right)^{\alpha_1} \quad (3-27)$$

Wobei die Konstanten mit  $[HLA]_{\max} = 69 \text{ mM}$  und  $\alpha_1 = 2$  angegeben werden. Bei einer Konzentration von  $47 \text{ mMol/l}$  ist also die Teilungsrate auf nur noch  $10 \%$  abgesunken. Die Hemmung durch undissoziierte Essigsäure setzt bei *L. sanfranciscensis* erst über  $160 \text{ mMol/l}$  ein (Gänzle 1998). Bei dieser Konzentration ist die Vermehrungsrate von *L. plantarum* nach Passos (1993) bereits bei  $0$  angelangt. Überdies berichtet Passos (1993) von einem stimulierenden Effekt in geringen Konzentrationen. Vorgeschlagen wird folgende Funktion:

$$f_1([HAc]) = \left(1 + \frac{\beta_1 [HAc]}{K_m^{HAc} + [HAc]}\right) \left(1 - \frac{[HAc]}{[HAc]_{\max}}\right)^{\alpha} \quad (3-28)$$

Die ermittelten Parameter waren:  $\beta_1 = 1,5$ ,  $K_m^{HAc} = 5,8 \text{ mM}$ ,  $[HAc]_{\max} = 150 \text{ mM}$  und  $\alpha = 1,7$ .

Die Hemmung von Lactobacillen durch Ethanol in den praktisch vorkommenden Konzentrationen wird in der Literatur nicht beschrieben.

### 3.7.3 Nährstoffe

Die Konzentration der verschiedenen Nährstoffe hat ebenfalls einen erheblichen Effekt auf die Organismen. Die Nährstoffe können grob in C-Quellen (Energiequellen) und andere Nährstoffe unterschieden werden. Die im vorliegenden Fall wichtigste C-Quelle ist Glucose. Deren Konzentration hat für *L. sake* und *L. pentosus* nach Doßman (1996) nur einen geringen Einfluß. Dies deutet auf eine hohe Affinität der Organismen zu Glucose hin, was sich bei Beschreibung durch Gleichung (3-32) in einem hohen Wert für  $K_M$  äußern müßte. Fructose kann von manchen heterofermentativen Organismen als C-Quelle oder als Elektronenakzeptor zur Regeneration von  $NAD^+$  aus  $NADH + H^+$  benutzt werden. Einige heterofermentative Organismen verwenden Fructose ausschließlich als Elektronenakzeptor und setzen es quantitativ in Mannit um (Gänzle et al 1997). Dies geschieht vorwiegend zu Beginn der Fermentation (Gänzle et al 1997). Die Affinität der Organismen zu Fructose muß demnach sehr hoch sein. Die Bedeutung von Pentosen für das Wachstum wurde bisher wenig untersucht. Quantitativ spielen sie in den Medien, die in dieser Arbeit verwendet wurden eine weitaus geringere Rolle als die Hexosen. Relevant sind Ribose und Xylose. Der Einfluß anderer Substanzen wie Aminosäuren, Vitamine oder Spurenelemente wurde bisher kaum untersucht. Daher ist das Wachstumsverhalten bei Limitierung durch diese Substanzen nicht gesichert. Es ist damit zu rechnen, daß das Verhalten unterschiedlich sein wird bei Limitierung durch essentielle Nährstoffe oder durch Stoffe, die substituiert werden können.

Um die Auswirkung der vorhandenen Substrate zu beschreiben, sind nach Rehm (1991) zwei verschiedene Ansätze möglich:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(C_1) \cdot f(C_2) \cdot \dots \quad (3-29)$$

$$\mu = \min\{\mu_{S1} \cdot C_1, \mu_{S2} \cdot C_2, \dots\} \quad (3-30)$$

Die einfachste Funktion zur Beschreibung substratabhängigen Wachstums ist die Formel nach Blackman (Rehm 1992)

$$\mu = \mu_{\max} \min(1, K_B \cdot C_S) \quad (3-31)$$

Dabei handelt es sich um einen linearen Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit bis zu einer Konzentration, bei der die maximale Wachstumsrate erreicht ist und diese konstant bleibt. Die wohl größte Verbreitung hat jedoch die Formel nach Monod gefunden. Hier wird angenommen, daß das Wachstum der Zellen sich ähnlich der Substratumsetzung durch ein Enzym verhält. Zur Beschreibung wird die Kinetik nach Michaelis-Menten auf das Zellwachstum übertragen.

$$\mu = \mu_m \frac{C_S}{K_M + C_S} \quad (3-32)$$

Rehm (1991) beschreibt noch einige andere Funktionen z.B. nach Teissier und Moser und Funktionen, um diauxisches Wachstum zu beschreiben. Diese Funktionen werden nicht so häufig angewendet wie die Kinetik nach Monod.

Die Aufnahme der Substrate muß ebenfalls beschrieben werden, da die Abnahme der Konzentrationen im Nährmedium davon abhängig ist. Häufig wird angenommen, daß die Substrataufnahme in konstantem Verhältnis zur gebildeten Zellmasse steht. Dies kann durch

die Konstante  $Y_s = \frac{dX}{dS} = \text{const.}$  beschrieben werden (Rehm 1991). Dies setzt voraus, daß nicht wachsende Zellen kein Substrat aufnehmen, um Energie zur Erhaltung der Lebensfunktionen zu bilden. Daraus folgt Gleichung (3-33).

$$\frac{\partial G lu}{\partial t} = X \cdot \mu \cdot \frac{1}{Y_s} = \frac{\partial X}{\partial t} \cdot \frac{1}{Y_s} \quad (3-33)$$

Ohara (1992) schlägt im Gegensatz dazu eine von der Wachstumsrate abhängige Funktion vor wie in Gleichung (3-34).

$$\frac{\partial G lu}{\partial t} = v \cdot X \quad \text{mit } v = \frac{\mu}{\gamma + \mu \cdot \delta} \quad (3-34)$$

Diese Funktion leitet sich aus der Annahme ab, daß Wachstum und Glucoseaufnahme einer nicht kompetitiven Hemmung (Karlson 1988) unterliegen und die Michaeliskonstante vernachlässigbar klein ist. Dadurch wird ein Anstieg des Glucoseverbrauchs bei sinkender Wachstumsrate beschrieben. Ein derartiges Verhalten wird nach Rehm (1991) häufig beobachtet. In Rehm (1991) werden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen, dies zu beschreiben:

- Die beobachtete Wachstumsrate  $\mu$  wird aufgeteilt in eine wirkliche Wachstumsrate  $\mu_G$  und eine Rate des endogenen Metabolismus  $\mu_E$ , mit  $\mu = \mu_G + \mu_E$ .
- Zur wachstumsabhängigen Substrataufnahme wird eine Substrataufnahme addiert, die zur Erhaltung der Zellsubstanz notwendig ist. Hierbei ist darauf zu achten, daß bei konstanter Aufnahme zur Lebenserhaltung die Substratkonzentration negative Werte erreichen kann, falls dies im Gleichungssystem nicht entsprechend berücksichtigt wird.
- Ein anderer Ansatz teilt die Zellen  $C_X$  in sich vermehrende Zellen  $C_G$  und schlafende Zellen  $C_D$  ein. Mit  $\alpha(\mu) = C_G/C_X$ .

Der Substratverbrauch zum Aufbau von Zellmasse wird oft vernachlässigt. Ob dies zulässig ist, kann anhand der Bilanzen ermittelt werden.

Finlaysen (1986) beobachtete, daß  $Y_s$  für Glucose bei *Streptococcus* vom pH-Wert abhängt. Mit sinkendem pH-Wert wird  $Y_s$  kleiner. Das bedeutet, daß bei niedrigen pH-Werten mehr Glucose verbraucht wird, um die gleiche Zellmasse zu bilden. Dies kann durch eine Umstellung des Stoffwechsels auf einen weniger effizienten Weg verursacht werden oder durch einen höheren Energieverbrauch bei niedrigem pH-Wert z.B. zur Aufrechterhaltung des internen pH-Wertes.

Zusätzlich muß man beachten, ob verschiedene Energiequellen im Medium vorhanden sind, und ob Anpassungsvorgänge (Diauxie) im Modell berücksichtigt werden müssen. Diese Vorgänge treten bei *Lactobacillen* aufgrund ihres schwach ausgeprägten Regulationssystems nur in geringem Maße auf. Dennoch werden sie beobachtet (Citti et al 1967) und müssen prinzipiell in Betracht gezogen werden. Neubauer et al (1994) beschreiben, daß die Zuckeraufnahme von *L. sanfranciscensis* unabhängig von der Konzentration anderer Zucker ist.

### 3.7.4 Temperatur

Wie auch bei anderen Einflußgrößen werden für die Wirkung der Temperatur verschiedene Gleichungen vorgeschlagen, die von einfachen Polynomen bis zu systematischen Ansätzen basierend auf der Arrheniusgleichung reichen. Gemeinsam ist allen Ansätzen, daß die Beschleunigung aller Reaktionen durch Temperaturerhöhung genauso Rechnung getragen werden muß, wie der Erschwerung aller Lebensvorgänge bei zu hohen Temperaturen. Letzterer Effekt wird unter anderem durch die Denaturierung katalytisch wirkender Enzyme verursacht.

Der einfachste Ansatz um dies zu beschreiben, ist die Verwendung eines Polynoms. Ein kubisches Polynom wird z.B. von Doßmann (1996) verwendet.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot (a + b \cdot T + c \cdot T^2 + d \cdot T^3) \quad (3-35)$$

Doßmann (1996) führt zusätzliche Koeffizienten ein um Einflüsse von anderen Größen zu berücksichtigen die von der Temperatur nicht unabhängig sind (siehe Kapitel 3.9). Die entsprechenden Koeffizienten sind jedoch um Größenordnungen kleiner als die Koeffizienten, die direkte Abhängigkeiten beschreiben. Daher kann der Ansatz zur Beschreibung des Temperatureffektes herangezogen werden.

Die von Presser et al (1997) verwendete quadratische Funktion, bezieht als sehr einfache Funktion bereits eine physiologisch sinnvoll interpretierbare Konstante mit ein.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot (T - T_{\min})^2 \quad (3-36)$$

Die Konstante  $T_{\min}$  ist dabei die kleinste Temperatur, bei der ein Organismus noch zum Wachstum befähigt ist. Da die Funktion jedoch monoton steigend ist, kann sie eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit bei sehr hohen Temperaturen nicht beschreiben, ohne daß sie entsprechend erweitert wird. Ein Beispiel für eine derartige Erweiterung ist die von Zwietering (1991) verwendete Gleichung.

$$\mu = \left[ a \cdot (T - T_{\min}) \left( 1 - e^{b(T - T_{\max})} \right) \right]^2 \quad (3-37)$$

Gänzle (1998) verwendet für Milchsäurebakterien eine Funktion nach Gleichung (3-38).

$$\mu = a \cdot (T_{\max} - T)^b \cdot e^{-c(T_{\max} - T)} \quad (3-38)$$

Ein systematischer Ansatz kann zur Beschreibung des Einflusses der Temperatur ebenfalls gewählt werden. Ein Beispiel dafür ist in Rehm (1991) beschrieben. Hier wird zum einen die Beschleunigung der biochemischen Reaktionen und damit aller Lebensvorgänge, als auch deren Behinderung durch die bei hohen Temperaturen einsetzende Denaturierung von Proteinen mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung beschrieben Rehm (1991), Ng (1997).

$$\mu_{\max}(T) = K_1 \cdot c_{EA} \cdot e^{\frac{\Delta H_1}{R \cdot T}} \quad (3-39)$$

Dabei sind  $\Delta H_1$  die Aktivierungsenthalpie und  $T$  die absolute Temperatur. Diese Funktion beschreibt die Wachstumsgeschwindigkeit bei Temperaturen, die wesentlich unter dem Optimum liegen. Ein größerer Temperaturbereich kann nur abgedeckt werden, wenn die Denaturierung der Proteine mit berücksichtigt wird. Ein Ansatz dazu geht von einem Gleichgewicht zwischen der aktiven und inaktiven Form der Enzyme aus (Rehm 1991). Für die Inaktivierung kann die gleiche Temperaturabhängigkeit angenommen werden.

$$c_{EI} = K_2 \cdot c_{EA} \cdot e^{-\frac{\Delta H_2}{R \cdot T}} \quad (3-40)$$

Zusammen mit der Annahme eines konstanten Gehalts an Gesamtzym folgt Gleichung (3-41).

$$\mu_{\max}(T) = \frac{K_1 \cdot e^{-\frac{\Delta H_1}{R \cdot T}}}{1 + K_2 \cdot e^{-\frac{\Delta H_2}{R \cdot T}}} \quad (3-41)$$

### 3.7.5 Der pH-Wert

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Aktivität der freien  $H^+$ -Ionen. Hier wird näherungsweise die Aktivität der Konzentration gleichgesetzt. Der pH-Wert wird zum einen durch die Organismen und deren Stoffwechsel beeinflusst, zum anderen wirkt der pH-Wert stark auf die Organismen zurück.

#### 3.7.5.1 Die Veränderung des pH-Wertes durch die Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien stellen komplexe Puffersysteme dar, deren Bestandteile nicht vollständig bekannt sind. Eine analytische Berechnung der pH-Wertes in solchen Systemen ist aufwendig und aufgrund der vereinfachenden Annahmen, die man treffen muß, nur sehr ungenau. Daher wurde ein empirischer Ansatz gewählt. Das Medium wurde mit Milchsäure und Essigsäure titriert. Die gemessenen Werte wurden in einer Tabelle festgehalten und Zwischenwerte, wie in Kapitel 3.2.3 angegeben, interpoliert.

#### 3.7.5.2 Der Einfluß des pH-Wertes auf Wachstum und Stoffwechsel der Organismen

Ein niedriger pH-Wert des Mediums hat zum einen die Auswirkung, daß mehr Energie verbraucht wird um den pH-Gradienten zwischen Medium und Zellinneren aufrecht zu erhalten. Zum anderen sinkt der intrazelluläre pH-Wert ab. Dies dürfte Auswirkungen auf die Enzymsysteme der Zelle haben. Nannen et al (1991) haben gezeigt, daß Zellen versuchen den pH-Wert des Cytoplasmas konstant zu halten. Dabei wurden pH-Gradienten von bis zu 1,4 pH-Einheiten gemessen.

Um den Einfluß auf das Wachstum zu beschreiben, kommen prinzipiell alle Terme in Frage, die den Einfluß von Stoffwechselprodukten beschreiben. Dabei wird anstatt des pH-Wertes

die Konzentration der  $H^+$ -Ionen  $[H^+]$  verwendet. Entsprechend der Definition des pH-Wertes gilt:  $pH = -\log_{10}[H^+] \rightarrow [H^+] = 10^{-pH}$ . Im einfachsten Fall wird eine lineare Abhängigkeit angenommen wie in Gleichung (3-42) (Presser et al 1997).

$$\mu = c \cdot ([H^+]_{\max} - [H^+]) = c \cdot (10^{-pH_{\min}} - 10^{-pH}) \quad (3-42)$$

Passos (1993) verwendet Gleichung (3-41) um den Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Organismen zu beschreiben.

$$f_1([H^+]) = \left(1 - \frac{[H^+]}{[H^+]_{\max}}\right)^{\alpha_1} \quad (3-43)$$

Für *L. plantarum* erhielt er folgende Werte der Parameter:

$$[H^+]_{\max} = 0,43 \text{ mM}$$

$$\alpha_1 = 2,6$$

Eine gebrochen-rationale Funktion wird von Gänzle (1998) verwendet (Gleichung (3-44)).

$$\mu = \eta_{\max} \frac{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max})}{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max}) - (pH - pH_{opt})^2} \quad (3-44)$$

Diese empirische Gleichung wurde für *L. Sanfranciscensis* verwendet, und somit an einem Organismus getestet, der eine hohe Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit verwendeten Organismen aufweist.

### 3.7.6 Sauerstoff

Quantitative Beschreibungen des Einflusses von Sauerstoff auf Mikroorganismen sind in der Literatur nicht zu finden. Dies beruht zum einen darauf, daß viele Organismen durch gelösten Sauerstoff begünstigt werden und die Fermentationen insofern mit der maximal erreichbaren Sauerstoffkonzentration betrieben werden. Zum anderen ist Sauerstoff in geringen Konzentrationen schwer zu messen. Daher wurden Untersuchungen zu dieser Einflußgröße nur qualitativ durchgeführt.



### 3.7.7 Salz

Ähnlich wie Acetat, kann sich Salz in geringen Konzentrationen positiv auf das Wachstum auswirken (Passos 1993). Für *L. plantarum* wurde ein Zusammenhang nach Gleichung (3-45) vorgeschlagen.

$$f_1([NaCl]) = \left(1 + \frac{\beta_2[NaCl]}{K_m^{NaCl} + [NaCl]}\right) \left(1 - \frac{[NaCl]}{[NaCl]_{max}}\right) \quad (3-45)$$

Dabei ergab sich für die Parameter folgende Werte  $\beta_2 = 1,6$ ;  $K_m^{NaCl} = 4,47\%$ ;  $[NaCl]_{max} = 11,8\%$  (Rehm 1991)

Anstatt der Salzkonzentration werden manchmal die Wasseraktivität oder die Ionenstärke als Maß verwendet. Zur Beschreibung des Einflusses der Ionenstärke wird in Gänzle (1998) folgender Zusammenhang vorgeschlagen:

$$\mu = \mu_{max} \frac{I(I - I_{max})}{I(I - I_{max}) - (I - I_{opt})^2} \quad (3-46)$$

Ansonsten kommen alle Funktionen in Frage, die eine Hemmung durch Stoffwechselprodukte beschreiben. Als Anhaltspunkt für Milchsäurebakterien kann der Wert von ca. 4% Salz dienen, ab dem das Wachstum von *L. sanfranciscensis* unterdrückt wird (Gänzle 1998).

### 3.7.8 Intrazelluläre Konzentrationen

#### ATP

Ohara (1992) geht von einem konstanten Verhältnis  $Y_{ATP} = \Delta X / \Delta ATP$  aus. Der Wert wird mit 10 g Zellen/Mol ATP angegeben, und soll zum einen konstant sein und zum anderen unabhängig von der Art der Organismen sich in der gleichen Größenordnung bewegen. Genauere Messungen ergaben für verschiedene Organismen abweichende Werte. Für *S. faecalis* 32 g Zellen/Mol ATP, und für *L. casei* 20 g Zellen/Mol ATP (Ohara 1992). Bei höheren Wachstumsraten wurden von Sjöberg und Hahn-Hägerdal 1989 höhere ATP-Werte gemessen.

#### C-Körper

Zu Konzentrationen der verschiedenen C-Körper sind in der Literatur keine Angaben zu finden.

### 3.8 Gemischte Populationen

In einer gemischten Population ist es möglich, die Anteile der beiden Organismen am gesamten Stoffwechsel zu berechnen. Dazu setzt man die netto-Gleichungen des homofermentativen und heterofermentativen Stoffwechsels voraus:

Homofermentativ: Glucose  $\rightarrow$  2 Lactat

Heterofermentativ: Glucose  $\rightarrow$  Lactat + Ethanol / Acetat

Der Gesamtumsatz kann daher durch die einfache, lineare Gleichung (3-47) beschrieben werden.

$$\frac{dGlu}{dt} = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{dLac}{dt} + \frac{dEth}{dt} + \frac{dAce}{dt} \right) \quad (3-47)$$

Der Umsatz der Heterofermentativen Organismen berechnet sich näherungsweise durch Gleichung (3-48).

$$\frac{dGlu}{dt} = \frac{dEth}{dt} + \frac{dAce}{dt} \quad (3-48)$$

Der Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels ergibt sich dementsprechend wie in Gleichung (3-49).

$$\frac{dGlu}{dt} = \frac{\frac{dEth}{dt} + \frac{dAce}{dt}}{\frac{1}{2} \cdot \left( \frac{dLac}{dt} + \frac{dEth}{dt} + \frac{dAce}{dt} \right)} \quad (3-49)$$

Dieser Ansatz vernachlässigt Effekte wie den Verbrauch von C-Körpern für das Wachstum der Organismen. Ebenso findet die Möglichkeit der Bildung von intrazellulären Pools keine Berücksichtigung. Anzumerken ist auch, daß nur die Art des Stoffwechsels unterschieden werden kann. Organismen, die fakultativ heterofermentativ sind, tragen zu beiden Arten des Stoffwechsels bei. Dennoch kann mit der entwickelten Formel (3-49) eine gute Abschätzung durchgeführt werden.

### 3.9 Unabhängigkeit der Einflußgrößen

Die Bedingung für die Unabhängigkeit zweier Einflußgrößen wird z.B. von Harvey (1983). Angegeben. Zwei Einflußgrößen  $s$  und  $\tau$  sind dann unabhängig wenn Gleichung (3-50) gilt.

$$g(s, \tau) = g_1(s) \cdot g_2(\tau) \quad (3-50)$$

Untersuchungen, die auf die Unabhängigkeit der verschiedenen Einflußgrößen abzielen, werden hauptsächlich in polynomischen Modellen berücksichtigt. Oft sind die entsprechenden Faktoren so klein, daß diese Abhängigkeiten vernachlässigt werden können, wie z.B. bei

Doßmann (1996). Da Modelle zunächst von einfachen Annahmen ausgehen sollten, wurde im vorliegenden Fall meist die Unabhängigkeit der Einflußgrößen vorausgesetzt.

### **3.10 Berechnungsmethoden**

#### **3.10.1 Integration von Systemen gewöhnlicher Differentialgleichungen**

In den Fällen, in denen eine analytische Lösung von Systemen gewöhnlicher Differentialgleichungen nicht möglich ist oder in denen die häufige Änderung der Gleichungen die analytische Lösung als zu aufwendig erscheinen läßt, ist eine numerische Annäherung an die Lösung notwendig. In der Literatur sind verschiedene Algorithmen beschrieben, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Genauigkeit ein gegebenes Gleichungssystem lösen. Die einfachste Methode ist das Verfahren nach Euler.

$$y_{n+1} = y_n + hf(x_n, y_n) \quad (3-51)$$

Praktisch alle Verfahren zur numerischen Lösung von Differentialgleichungen wurden vom Eulerschen Verfahren abgeleitet. In der Praxis wird dieses Verfahren jedoch kaum mehr angewandt (Press et al 1994 a). Schneller und genauer ist das Verfahren nach Runge und Kutta. Bei diesem Verfahren werden mehrere Schritte des Euler-Verfahrens kombiniert (Feldmann 1989). Die Methode wird von Press et al (1994 a) auch als „Arbeitspferd“ bezeichnet. Darin kommt zum Ausdruck, wie verbreitet die Methode bei der Lösung von Gleichungssysteme ist. Lediglich Gleichungssysteme die einen nicht mehr vertretbaren Rechenaufwand verursachen zwingen zur Verwendung alternativer Lösungen. Die Geschwindigkeit dieses Verfahrens erwies sich für die verwendeten Gleichungssysteme als ausreichend. Die Genauigkeit der Berechnungen ist im Vergleich zu den Meßfehlern in den betrachteten Systemen als sehr gut zu bezeichnen. Es war daher nicht nötig auf modernere und effizientere Methoden, wie z.B. das Verfahren nach Bulirsch-Stoer oder Predictor-Corrector-Verfahren, auszuweichen, deren Implementierung einen höheren Aufwand erfordert hätte.

Die bei weitem gebräuchlichste Methode zum Integrieren von Differentialgleichungen ist die Runge-Kutta Methode 4. Ordnung wie sie von Press et al (1994 a), Feldmann (1989) oder Berg und Kuhlmann (1993) beschrieben wird. Das Gleichungssystem wird an 4 Punkten berechnet wie in Gleichung (3-52) - (3-55) gezeigt. Diese Punkte sind der Startpunkt, zwei mal bei  $x + 1/2h$  und einmal bei  $x + h$ . Der Funktionswert bei  $x+h$  berechnet sich dann nach Gleichung (3-56). Der Fehler der Näherung ist in der fünften Potenz von der Schrittweite  $h$  abhängig.

$$k_1 = hf(x_n, y_n) \quad (3-52)$$

$$k_2 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_1}{2}\right) \quad (3-53)$$

$$k_3 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_2}{2}\right) \quad (3-54)$$

$$k_4 = hf(x_n + h, y_n + k_3) \quad (3-55)$$

$$y_{n+1} = y_n + \frac{k_1}{6} + \frac{k_2}{3} + \frac{k_3}{3} + \frac{k_4}{6} + O(h^5) \quad (3-56)$$

### 3.10.2 Optimierungsalgorithmus

Zur Suche nach Extremwerten wurden eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Wesentliche Kriterien sind dabei die benötigte Rechenzeit, die Verwendung der partiellen Ableitungen der Zielfunktion und die Berücksichtigung von Randbedingungen (Keil 1996). Ein bewährtes Verfahren zur Optimierung ist das von Nelder und Mead (1965) beschriebene Simplex-Verfahren. Die Geschwindigkeit der Methode ist für die vorliegende Problemstellung ausreichend.

Wird das Minimum einer Funktion mit N unabhängigen Variablen gesucht, ist der Simplex eine geometrische Figur bestehend aus N+1 Punkten, die ein Volumen  $< 0$  aufspannen. Der Startsimplex wird gesetzt, indem ein Punkt innerhalb des Lösungsraumes zufällig bestimmt wird. Die restlichen N Punkte ergeben sich durch Addition der Einheitsvektoren multipliziert mit einem Faktor a, der empirisch ermittelt wird. Dieser Simplex bewegt sich durch den Lösungsraum auf der Suche nach einem Minimum. Dabei stehen ihm vier verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

#### Spiegelung

Der schlechteste (höchste) Punkt wird am Schwerpunkt des von den restlichen Punkten gebildeten Volumens gespiegelt und durch den dadurch erhaltenen neuen Punkt ersetzt.

#### Spiegelung und Expansion

War die Spiegelung erfolgreich, kann in der gleichen Richtung ein neuer Punkt gesucht werden, der um einen Expansionsfaktor weiter entfernt liegt. Dadurch vergrößert sich der Simplex, seine Geschwindigkeit erhöht sich.

#### Kontraktion

Falls die Spiegelung nicht erfolgreich war, wird der Simplex verkleinert. Dazu wird der Abstand des schlechtesten Punktes zu den anderen Punkten halbiert.

### Mehrdimensionale Kontraktion

Falls alle bisher beschriebenen Methoden nicht zu einem Punkt führen, der besser ist als der bisherige schlechteste Punkt wird der Simplex verkleinert indem alle Punkte auf den besten Punkt zuwandern.

Die Suche des Simplex muß an einem sinnvollen Punkt abgebrochen werden. Dazu wird ein Wert  $\epsilon$  vorgegeben für die minimale Differenz zwischen dem besten und dem schlechtesten Simplexpunkt. Wird dieser Wert vom Simplex unterschritten, wird die Suche abgebrochen (Press et al 1994 b), (Feldmann 1989). Der Wert für  $\epsilon$  kann empirisch bestimmt werden.

Bei diesem Verfahren werden Randbedingungen jedoch nicht berücksichtigt, so daß unsinnige Ergebnisse wie negative Konzentrationen auftreten können. Zudem wird die Möglichkeit vergeben, den Suchraum einzugrenzen. Dies kann manchmal verwendet werden, wenn von Konstanten die Größenordnung bekannt ist. Ein Vorschlag zur Begrenzung des Simplex ist der sogenannte Complex (Keil 1996). Bei diesem Verfahren wird der Simplex aus mehr als  $n+1$  Ecken konstruiert. Bei Überschreiten einer Grenze wird der betreffende Eckpunkt vom Simplex abgetrennt. Ein Nachteil des Verfahrens ist, daß die benötigte Anzahl von Eckpunkten nicht bekannt ist. Daher wurde ein anderes Verfahren entwickelt. Bei jedem Simplex-Schritt wird der neu gefundene Punkt auf eine Überschreitung der Grenzen überprüft. Falls er außerhalb des zulässigen Bereiches liegt, wird er genau auf die Grenze zurück verlegt. Dadurch wird die Richtung des Simplex zwar verändert, das Verfahren korrigiert jedoch nach wenigen Schritten die Richtung wieder. Andererseits bleibt die Anzahl der Simplexpunkte immer konstant. Die Anzahl der Suchschritte ist dadurch nicht begrenzt.

Es wurde beobachtet, daß der Simplex häufig die Suche abbrach, obwohl von dem ermittelten Punkt aus bei einem Neustart des Simplex wesentlich bessere Lösungen gefunden werden konnten. Es kann vermutet werden, daß der Graph der Zielfunktion eine sehr „raue“ Fläche innerhalb des Lösungsraumes darstellt, und daher eine Vielzahl von lokalen Minima entstehen. In dem verwendeten Programm wurde das Problem umgangen, indem bei jedem Optimierungslauf eine vorgegebene Anzahl an Neustarts des Simplex durchgeführt wurde.

### **3.10.3 Interpolierverfahren**

Der pH-Wert wird von zwei voneinander unabhängigen Größen, den Konzentrationen von Milchsäure und Essigsäure bestimmt. In einem Medium, in dem die sonstigen pH-relevanten Vorgänge vernachlässigt werden können, kann jeder Kombination ( $C_{lac}$ ,  $C_{eth}$ ) genau ein pH-Wert zugeordnet werden. Daher wurden zur Berechnung dieser Größe Meßwerte in Tabellen geordnet und durch ein Interpolationsverfahren in die Berechnung eingeführt.

Zu diesem Zweck wurde ein zweidimensionales Verfahren zur Interpolation benötigt. Die Grundidee des von Press et al (1994 e) übernommenen Verfahrens ist es, das Interpolieren in zwei Dimensionen aufzulösen in eine Abfolge von eindimensionalen Interpolationen. Im vorliegenden Fall wurden polynomische Interpolationsschritte gewählt.

### **3.10.4 Anmerkung zu steifen Gleichungssystemen**

Prinzipiell kann es vorkommen, daß das Gleichungssystem steifes Verhalten aufweist. Dies kann auftreten, wenn die unabhängige Variable in stark unterschiedlichen Größenordnungen auftritt (Press et al 1994 a) und die Parameter des Gleichungssystems um mehrere Zehnerpotenzen differieren. Es besteht die Gefahr, daß die numerische Lösung des Gleichungssystems nicht stabil ist. Zwei Möglichkeiten stehen zur Verfügung, um dieses Phänomen zu umgehen. Zum einen können ausgefeiltere Integrationsmethoden gewählt werden, zum anderen kann durch eine Reduzierung der Schrittweite des Integrationsverfahrens die Stabilität wiederhergestellt werden. Die letztere Methode geht zu Lasten der Berechnungsgeschwindigkeit. Da jedoch die Rechenzeiten kein kritisches Maß erreichten, konnte mit dieser Lösung gearbeitet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung des Spektrums der vergärbaren Kohlenhydrate

Von den beiden ausgewählten Stämmen *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661 wurde jeweils ein Spektrum der vergärbaren Kohlenhydrate aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1-1 dargestellt. Der homofermentative *L. amylovorus* TMW 1.661 verwertet mehr verschiedene Zucker als der heterofermentative *L. pontis* TMW 1.109. Der heterofermentative Stamm ist jedoch befähigt die Pentosen Xylose und Ribose abzubauen. Dies erfolgt aber erst nach langer Bebrütungsdauer.

Tabelle 4.1-1 Zuckerspektrum der beiden ausgewählten Stämme. Die Erhebung der mit (\*) gekennzeichneten Werte erfolgte in Schraubröhrchen.

	<i>L. pontis</i> TMW 1.109	<i>L. amylovorus</i> TMW 1.661
Cellobiose	-	+
Amygdalin	-	+
N-Acetyl-D-glucosamin	-	+
D(-)-Xylose	+ (*)	-
D(-)-Ribose	+ (*)	-
Sorbit	-	-
Mannit	-	-
Galaktose	-	+
p-Arbutin	-	+
D-Salicin	-	+
Äskulin	-	+
Gentibiose	-	-
Raffinose	+	+
Melezitose	-	-
Trehalose	-	-
Saccharose	+	+
Maltose	+	+
Melibiose	+	+
Lactose	+	+
D(-)-Mannose	-	+
D(+)-Glucose	+	+
Fructose	+	+
Na-Gluconat	-	-
L(+)-Arabinose	-	-

## 4.2 Bestimmung der entstehenden Stoffwechselprodukte

Zur genaueren Betrachtung der beiden Organismengruppen wurden zwei repräsentative Stämme ausgewählt. Dies waren der heterofermentative *L. pontis* TMW 1.109 und der homofermentative *L. amylovorus* TMW 1.661. Zunächst wurden die entstehenden Stoffwechselprodukte bestimmt und in Relation zum verbrauchten Substrat gesetzt. Die Chromatogramme, in denen das Spektrum der während einer Fermentation entstandenen Fermentationsprodukte gezeigt wird, sind in Abbildung 4.2-1 und Abbildung 4.2-2 dargestellt. Das erste Chromatogramm zeigt die Zusammensetzung des Fermentationsmediums am Ende einer Fermentation mit dem heterofermentativen *L. pontis* TMW 1.109. Deutlich sind die zu den Endprodukten gehörigen Peaks für Milchsäure, Essigsäure und Ethanol zu sehen. Im zweiten Chromatogramm ist, wie bei homofermentativen Organismen zu erwarten, nur der Milchsäurepeak ausgeprägt.

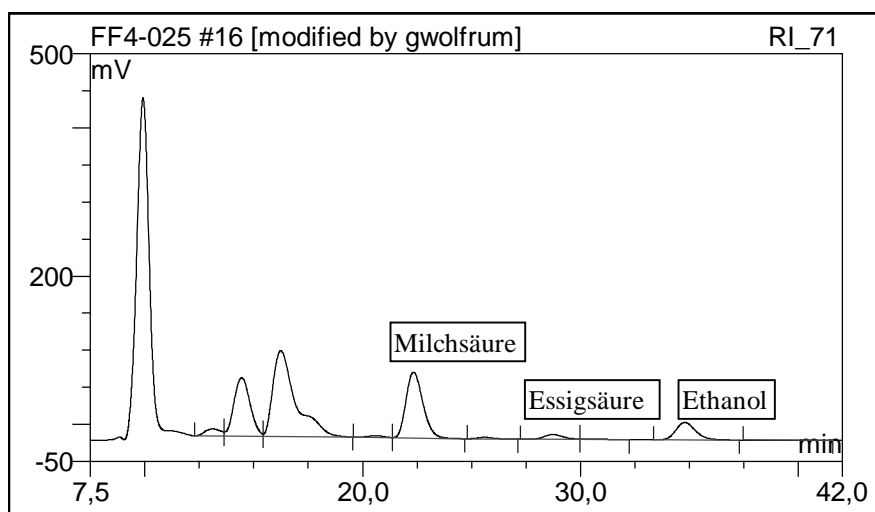


Abbildung 4.2-1 Chromatogramm von Fermentationsmedium. Ende der Fermentation, Stamm *L. pontis* TMW 1.109.

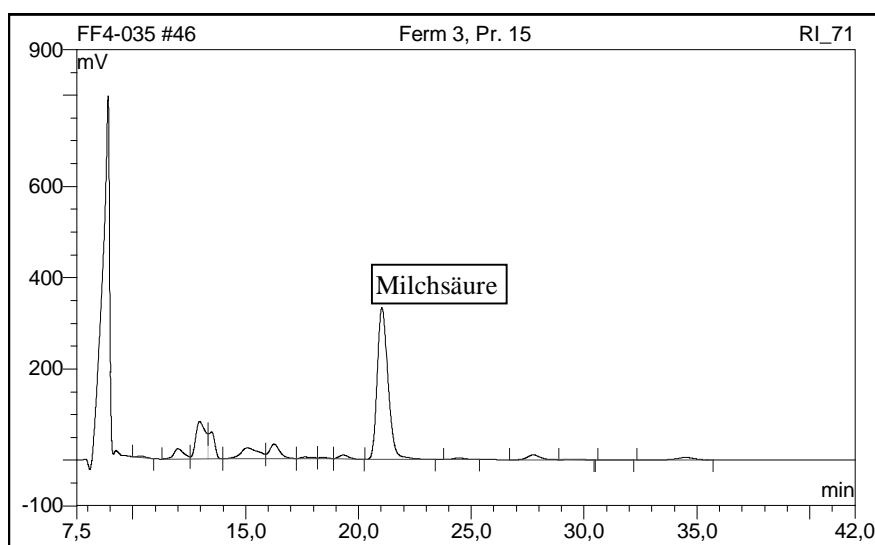


Abbildung 4.2-2 Chromatogramm von Fermentationsmedium. Ende der Fermentation, Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661.



Die quantitative Auswertung ist in Tabelle 4.2-1 zu sehen. Es ist erkennbar, daß die Ausbeute an Milchsäure pro verbrauchter Glucose  $Y_{M/G}$  mit 95,7 % und 95,9 % für beide Organismen sehr hoch ist. Deutlich ist der Unterschied in der Ausbeute an Zellsubstanz pro Glucose  $Y_{X/G}$ . Die gleiche Menge an Glucose reicht dem homofermentativen Organismus aus um nahezu die 1,6-fache Menge an Zellsubstanz zu bilden.

Tabelle 4.2-1 Die Stoffwechselprodukte der Organismen

	<i>L. pontis</i> TMW 1.109	<i>L. amylovorus</i> TMW 1.661
Glucose	96,4 mmol/l	113,19 mmol/l
Milchsäure	92,3 mmol/l	217,08 mmol/l
Essigsäure	28,57 mmol/l	--
Ethanol	66,08 mmol/l	--
Ausbeute $Y_{M/G}$	95,7 %	95,9 %
Ausbeute $Y_{X/G}$	0,037 OD/mmol/l	0,058 OD/mmol/l
Kohlenstoffwiederfindungsrate	96,9 %	95,9 %

### 4.3 Korrelation zwischen OD und KBE

Um einen quantitativen Zusammenhang zwischen der Optischen Dichte und der Anzahl der koloniebildenden Einheiten herzustellen, wurden von 10 Proben beide Werte ermittelt und einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse für die beiden Stämme *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661 sind in den Abbildung 4.3-1 und Abbildung 4.3-2 dargestellt. Dadurch ist es möglich die optische Dichte in Koloniebildende-Einheiten umzurechnen.

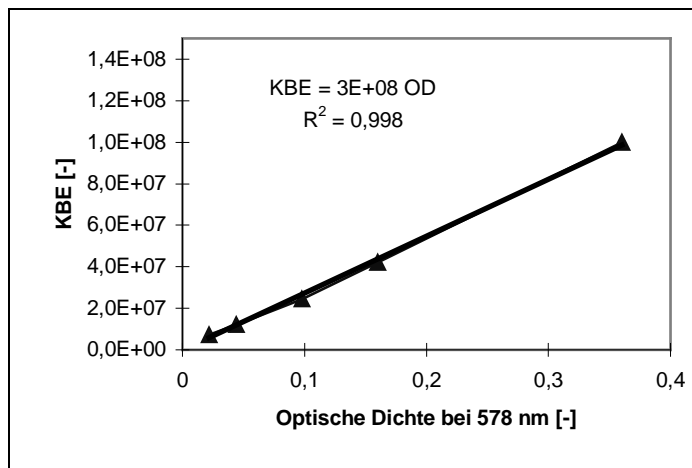


Abbildung 4.3-1 Zusammenhang zwischen Optischer Dichte und KBE für *L. pontis* TMW 1.109. Meßpunkte und Regressionsgerade. Meßpunkte(▲), Regressionsgerade(-).

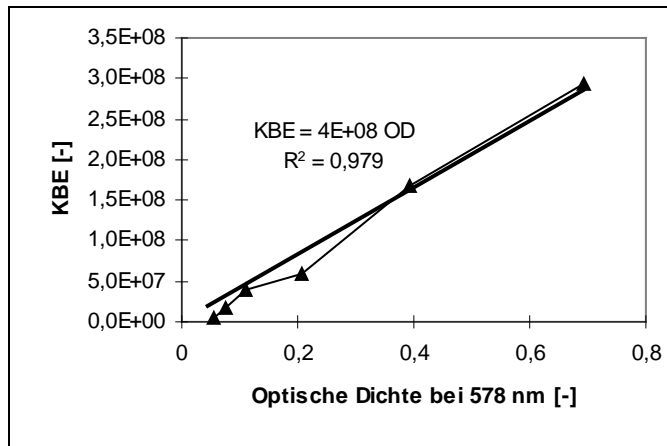


Abbildung 4.3-2 Zusammenhang zwischen Optischer Dichte und KBE für *L. amylovorus* TMW 1.661. Meßpunkte und Regressionsgerade. Meßpunkte(▲), Regressionsgerade(-).

Tabelle 4.3-1 Zusammenhang zwischen Optischer Dichte und Anzahl der Koloniebildenden Einheiten

Stamm	<i>L. pontis</i> TMW 1.109	<i>L. amylovorus</i> TMW 1.661
Steigung	$3 \cdot 10^8$ [-]	$4 \cdot 10^8$ [-]
$R^2$	0,998	0,979

Die errechneten Korrelationskoeffizienten zeigen, daß die optische Dichte analog der Anzahl der koloniebildenden Einheiten verwendet werden kann, solange sich die Kultur nicht in der Absterbephase befindet.

#### 4.4 Bestimmung der Säuerungsaktivität im Nährsubstrat

Die Absenkung des pH-Wertes durch die Organismen wurde, wie in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben, empirisch durch Titration ermittelt. In Abbildung 4.4-1 ist das Ergebnis graphisch dargestellt.

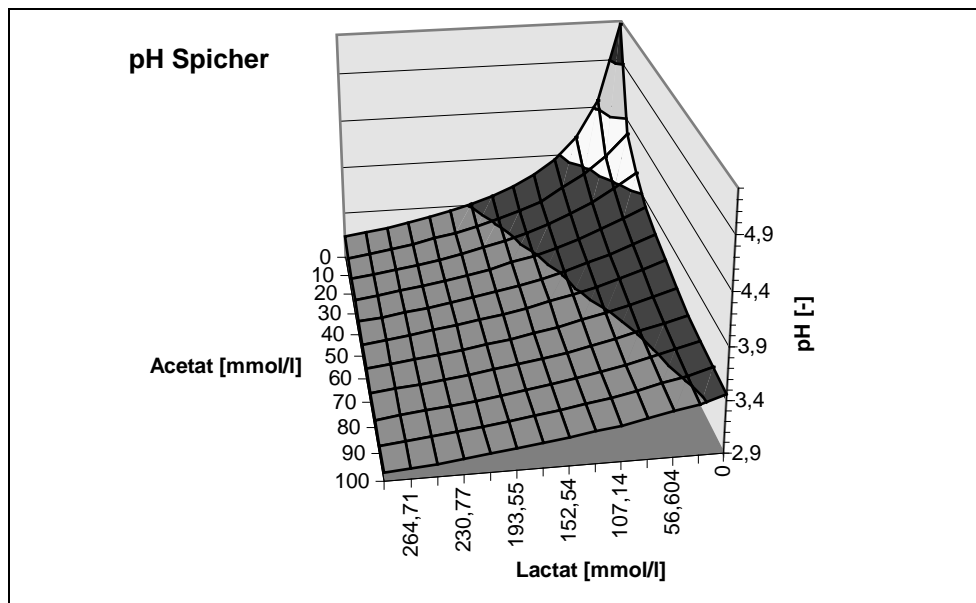


Abbildung 4.4-1 pH-Wert in Spicher-Medium in Abhängigkeit von Milchsäure und Essigsäure.

In Kleie-Medium ist die Säuerungsaktivität nicht einfach durch Titration zu bestimmen. Da dieses Medium nicht autoklaviert wird, bleibt die Aktivität der vom Getreide eingebrachten Enzyme weitgehend erhalten. Deshalb kann der pH-Wert bei einer gegebenen Milchsäuremenge nur abgeschätzt werden indem man diese mit in Fermentationen gemessenen Werten vergleicht. Entsprechende Werte werden in Abbildung 4.4-2 gezeigt.

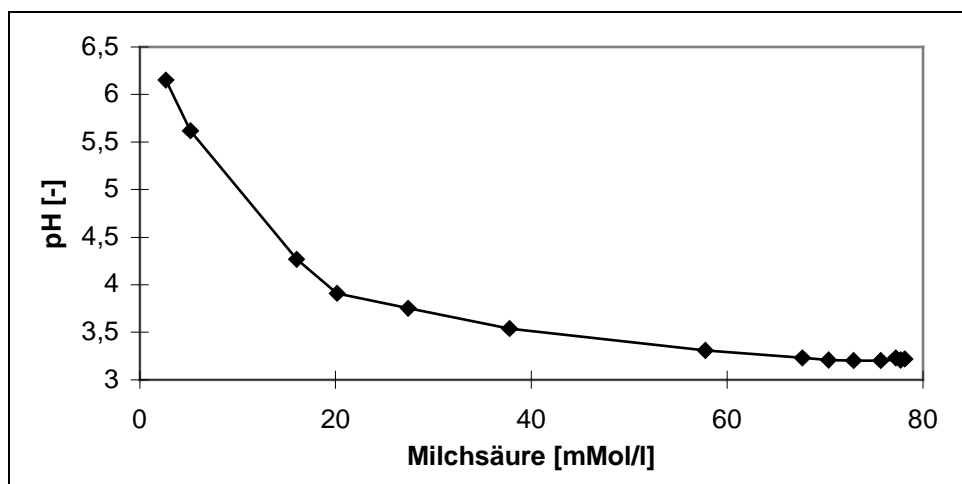


Abbildung 4.4-2 Säuerungsaktivität in Kleie medium.

In diesem Fall wurde die Anpassung einer Funktion der Interpolation vorgezogen. Es wurde eine Exponentialfunktion gewählt, die in Gleichung (4-1) angegeben ist.

$$\text{Lac} = a + b \cdot e^{-c \cdot \text{pH} + d} \quad (4-1)$$

Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 4.4-3 dargestellt. Die resultierenden Parameter sind in Tabelle 4.4-1 aufgeführt.

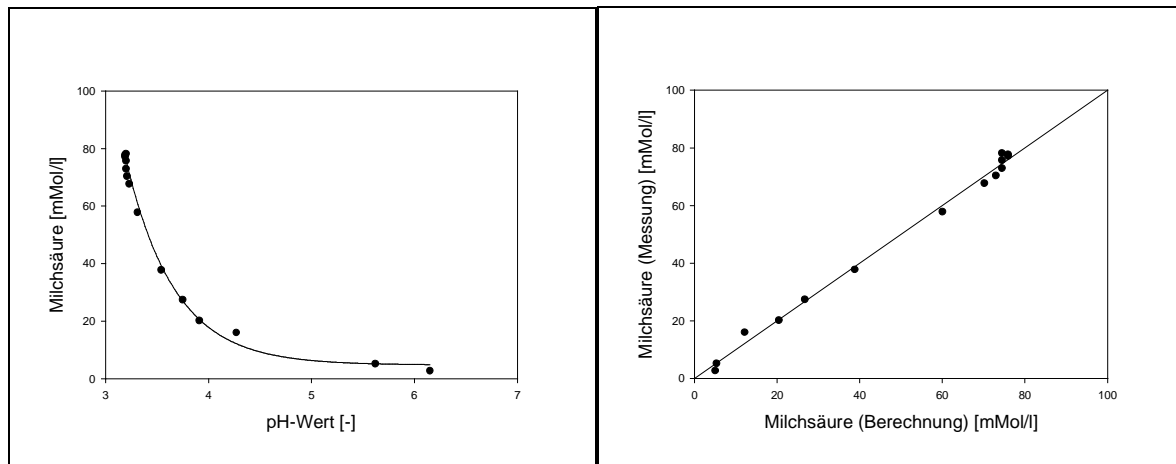


Abbildung 4.4-3 pH-Wert in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration in Kleiemedium und Vergleich der Berechnung mit der Messung.

Tabelle 4.4-1 Koeffizienten zur Beschreibung der Säuerungsaktivität in Kleiemedium

	<i>Koeffizient</i>
a	4,8 [mmol/l]
b	108 [mmol/l]
c	5,4 [-]
d	1,8 [-]

#### 4.5 Entwicklung einer Methode zur Messung des Fermentationsverlaufes in gemischten Populationen

In gemischten Populationen von heterofermentativen und homofermentativen Milchsäurebakterien besteht das Problem, daß man bei Messungen der Stoffwechselaktivität eine Meßgröße benötigt, die es ermöglicht, zwischen beiden Stoffwechselarten zu unterscheiden. Es sind daher zwei unabhängige möglichst einfach meßbare Größen notwendig.

Sind im Medium so wenige Elektronenakzeptoren vorhanden, daß die Bildung von Essigsäure vernachlässigt werden kann und ist der Verlauf der Säuerungsaktivität im Medium bekannt, dann kann aus dem Verlauf des pH-Wertes auf die gebildete Menge Milchsäure zurückgeschlossen werden. Die Titrationskurve ist Abbildung 4.4-3 zu entnehmen. Wenn es zudem möglich ist, die Fermenter gasdicht abzuschließen und den entstehenden Überdruck zu messen, hat man eine zweite on-line meßbare Größe zur Verfügung. Um dies zu verwenden, muß jedoch gezeigt werden, daß die Menge an produziertem CO<sub>2</sub> mit dem gemessenen Druck korreliert.

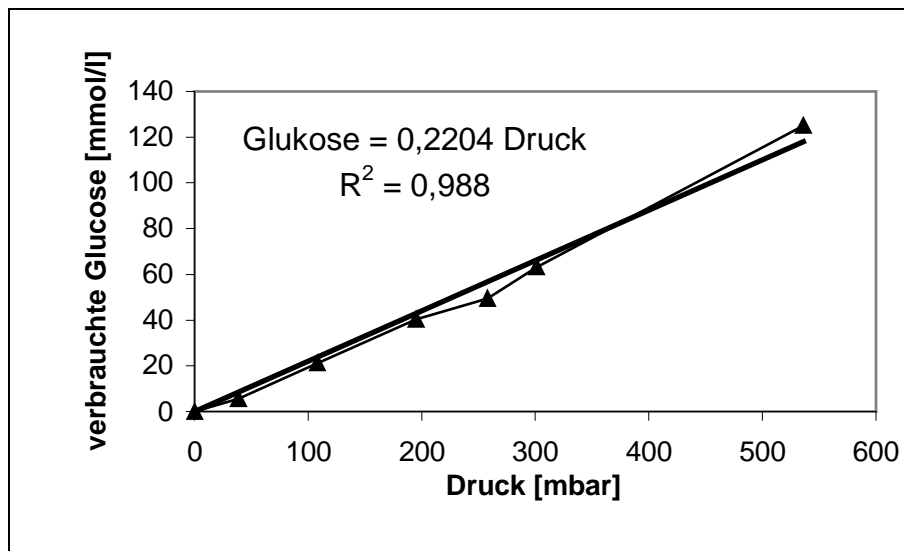


Abbildung 4.5-1 Zusammenhang zwischen dem Überdruck im Fermenter und dem Verbrauch von Glucose durch die Organismen (▲). Zusätzlich Darstellung der Korrelationsanalyse (-).

Da heterofermentative Organismen pro verbrauchtem Glucosemolekül ein Molekül  $\text{CO}_2$  produzieren, kann wie in Abbildung 4.5-1 ersichtlich einen Zusammenhang zwischen dem gemessenen Druck und der verstoffwechselten Menge Glucose hergestellt werden. Da homofermentative Organismen kein Gas bilden, wird Glucose, die von diesen Organismen verbraucht wird, nicht durch einen Druckanstieg angezeigt. In Abbildung 4.5-2 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Die Steigung der Ausgleichsgeraden beträgt:

$$0,2204 \frac{\text{mmol/l}}{\text{mbar}} .$$

Dieser Wert kann mit theoretischen Berechnungen verglichen werden. Geht man in erster Näherung davon aus, daß das allgemeine Gasgesetz gültig ist, kann aus der Fermentergeometrie ein Zusammenhang zwischen gebildetem  $\text{CO}_2$  und entstehendem Druck abgeschätzt werden. Das allgemeine Gasgesetz besagt:

$$p \cdot V = N \cdot R \cdot T \Rightarrow p = N \cdot \frac{R \cdot T}{V} \quad (4-2)$$

Temperatur  $T = 313,15 \text{ K}$

Volumen des Kopfraumes  $V = 0,38 \text{ l}$

Gesamtvolumen  $V_G = 0,48 \text{ l}$

Allgemeine Gaskonstante  $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

Nach dieser Berechnung müßte die Steigung der Geraden

$$0,1814 \frac{\text{mmol/l}}{\text{mbar}}$$

betragen. Die durch die Messung erstellte Kurve verläuft steiler als es der theoretischen Überlegung entspricht. Ein theoretisches Volumen des Fermenters errechnet sich, indem die gemessene Steigung der Gerade eingesetzt wird. Dieser Wert beträgt im vorliegenden Fall ein Volumen von  $0,58 \text{ l}$ . Dieses höhere Volumen läßt sich damit erklären, daß sich ein Teil des  $\text{CO}_2$  in der Fermenterbrühe löst. Nach dieser Überlegung muß in der flüssigen Phase ungefähr die doppelte Menge an  $\text{CO}_2$  gelöst sein wie sich im gleichen Volumen in der Gasphase befindet. In der Gasphase sind bei einem Überdruck von  $0,6 \text{ bar}$  unter Annahme der

Gültigkeit des allgemeinen Gasgesetzes 23 mMol/l enthalten. Daraus ergibt sich eine rechnerische Konzentration in der flüssigen Phase von 46 mMol/l.

Zur Überprüfung dieser Methode können die Daten verwendet werden, die offline mit Hilfe der HPLC gewonnen wurden. Legt man die in 1.2 beschriebene Stöchiometrie zugrunde, kann aus diesen Daten errechnet werden, wieviel Glucose von heterofermentativen Organismen verbraucht wurde.

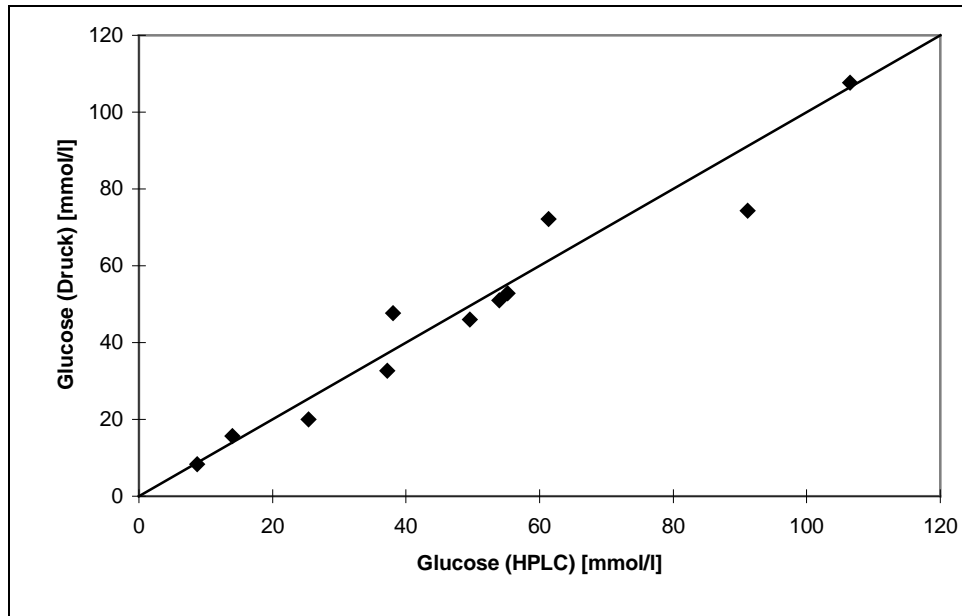


Abbildung 4.5-2 Vergleich zwischen über den Druck und durch die HPLC-Analyse ermittelten Verbrauch von Glucose durch den heterofermentativen *L. pontis* 1.109 in gemischter Population mit dem homofermentativen *L. amylovorus* 1.661

Die Werte gruppieren sich um die Winkelhalbierende in diesem Diagramm. Daran ist erkennbar, daß die Meßwerte beider Methoden in gut übereinstimmen.

In Abbildung 4.5-3 ist ein Vergleich der Titrationskurve mit Meßwerten aus Fermentationen gezeigt. Die durchgezogene Linie in dem Diagramm zeigt den durch Titration ermittelten Zusammenhang zwischen pH-Wert und Milchsäuremenge. Die Kreuze stellen Meßpunkte aus Fermentationen dar. Es ist erkennbar, daß aus den pH-Werten die Menge der Milchsäure abgeschätzt werden kann.

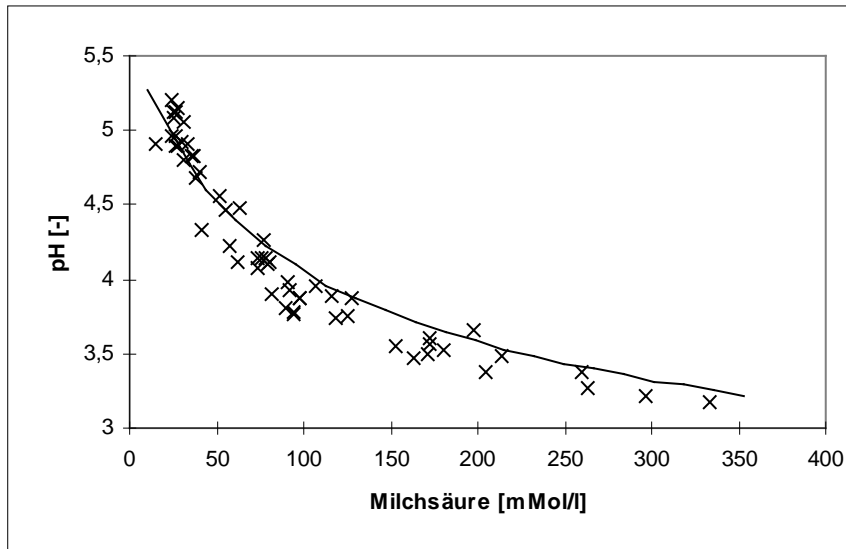


Abbildung 4.5-3 Vergleich der Titrationskurve (durchgezogene Linie) mit den in Fermentationen erhaltenen Werten (x).

Ein Teil des gebildeten  $\text{CO}_2$  löst sich im Medium und reagiert entsprechend folgender Formel:



Dadurch kann der pH-Wert des Mediums sinken und eine Abschätzung der Milchsäurekonzentration durch den pH-Wert verfälschen. Das in Abbildung 4.5-3 dargestellte Diagramm zeigt jedoch, daß die Werte aus den Fermentationen gut mit denen der Titration übereinstimmen. Der Effekt des gelösten  $\text{CO}_2$  kann somit vernachlässigt werden. Dies ist vermutlich auf den sehr großen Kopfraum über dem Medium zurückzuführen der ein vielfaches des Volumens des eingesetzten Mediums beträgt.

#### 4.6 Der Verlauf von Fermentationen mit gemischter Population

Um die Vorgänge in Fermentationen zu klären in denen eine gemischte Population aus homofermentativen und heterofermentativen Organismen beteiligt ist war es zunächst notwendig derartige Fermentationen zu beobachten. Daher wurden Versuche in Roggenkleien durchgeführt, wie sie in der industriellen Produktion im Einsatz sind. Dabei mußte die Forderung nach einem sterilem Medium für mikrobiologische Versuche aufgegeben werden. Als Inokulum wurde bei diesen Versuchen ein Organismengemisch aus industrieller Produktion verwendet. In diesen Fermentationen wurde die Konzentrationsveränderung der wesentlichen Substanzen gemessen. Zusätzlich wurde der Stoffwechsel wie in Kapitel 3.8 beschrieben untersucht.

In Abbildung 4.6-1 werden die Konzentrationsänderungen einiger relevanter Substanzen in einer derartigen Fermentation dargestellt.

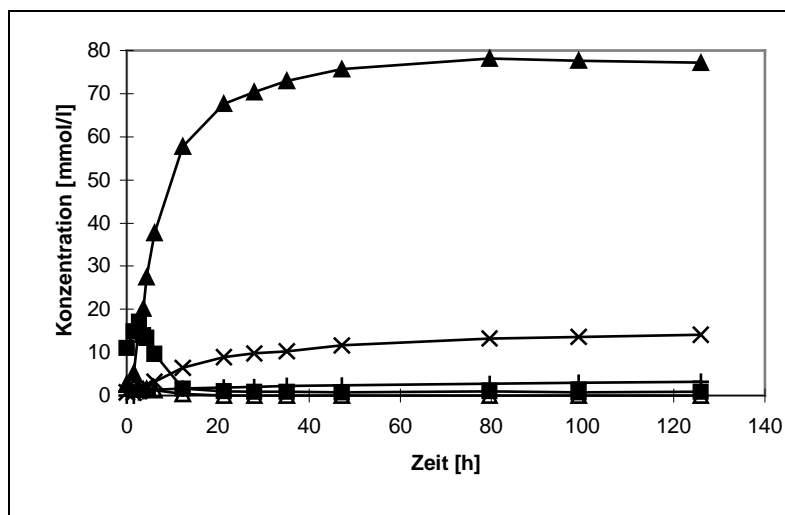


Abbildung 4.6-1 Konzentrationsverläufe während einer Fermentation in Kleiemedium.

Milchsäure(▲), Essigsäure(+), Ethanol(x), Glucose(■).

Es ist leicht zu erkennen, daß der überwiegende Prozentsatz der Umsetzungen bereits nach 24 Stunden abgelaufen ist. Kleinere Veränderungen sind jedoch auch nach bis zu 80-100 Stunden feststellbar. Da die Konzentrationsveränderungen der Substanzen, die in geringeren Mengen vorkommen, in dieser Darstellung nur schwer zu erkennen sind, ist in Abbildung 4.6-2 die gleiche Fermentation in anderem Ordinatenmaßstab dargestellt.



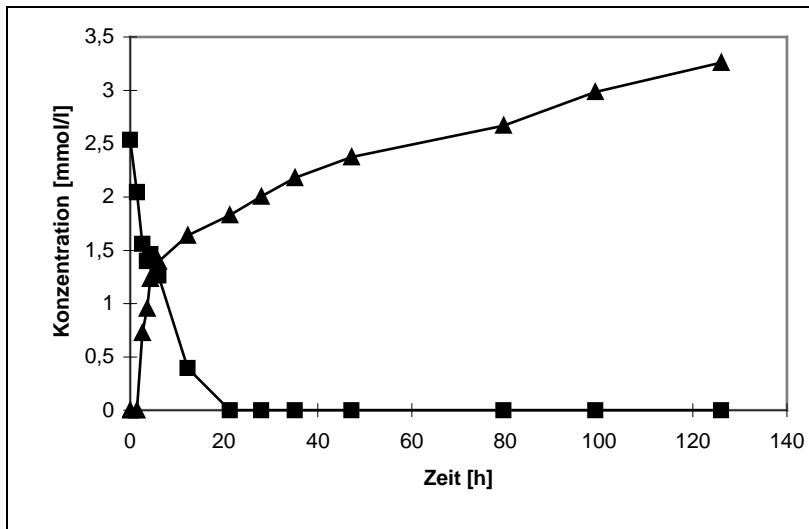


Abbildung 4.6-2 Darstellung des Maltose(■)- und Acetatverlaufes(▲)

Es ist zu erkennen, daß die Acetatbildung in der Anfangsphase sehr rasch beginnt und dann abnimmt. Jedoch kommt die Acetatbildung bis zum Ende der Fermentation nicht zum Erliegen. Der geringe Gehalt an Maltose wird rasch abgebaut und die Konzentration sinkt bis auf null ab. Es ist daher anzunehmen, daß dieser Zucker, im Gegensatz zu klassischen Sauerteigfermentationen, in den beobachteten Fermentationen nur eine sehr geringe Rolle spielt. Der Grund dafür ist die hohe Aktivität der zugesetzten Glucoamylase, wodurch Glucose zur bestimmenden Kohlenstoffquelle wird.

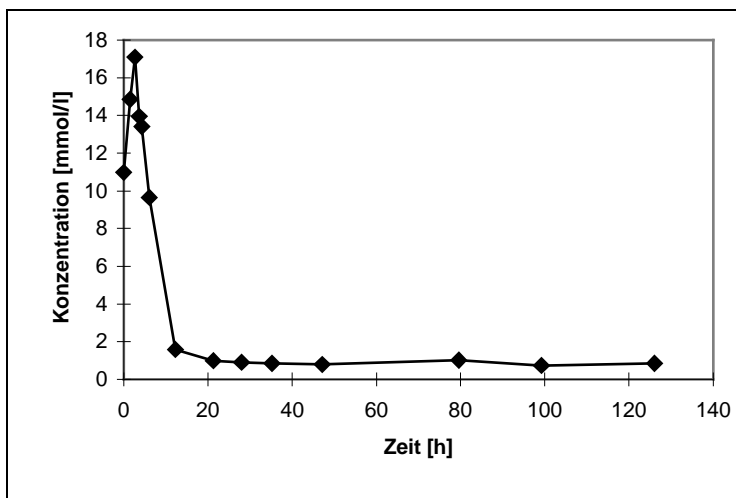


Abbildung 4.6-3 Darstellung der Glucosekonzentration in einer Kleiefermentation beimpt mit einem Organismengemisch.

Der in Abbildung 4.6-3 dargestellte Verlauf der Glucosekonzentration zeigt einen kurzen Anstieg zu Beginn der Fermentation. In dieser Phase ist die Zelldichte im Medium noch gering und die enzymatische Aktivität hoch. Daher wird in diesem Bereich mehr Glucose gebildet als verbraucht. Wie zu erkennen ist, kippt dieses Verhältnis jedoch bereits nach ca. 5 h und der Verbrauch an Glucose überwiegt. Nach ca. 30 - 40 h bleibt der Glucosespiegel in etwa konstant. Dies bedeutet, daß der Verbrauch und die Produktion von Glucose sich die Waage halten bis der Stoffwechsel der Organismen zum Erliegen kommt.

Nach Gleichung (3-49) (Kapitel 3.8) kann man den Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels am gesamten Stoffwechsel der Mikroflora errechnen. Dies ist in Abbildung 4.6-4 dargestellt. Bei steigender Temperatur geht der Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels zurück. Desweiteren ist zu erkennen, daß sich der Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels während einer Fermentation verschiebt. Dieser Prozentsatz nimmt ständig zu, während der gesamte Umfang der Umsetzungen zurückgeht.

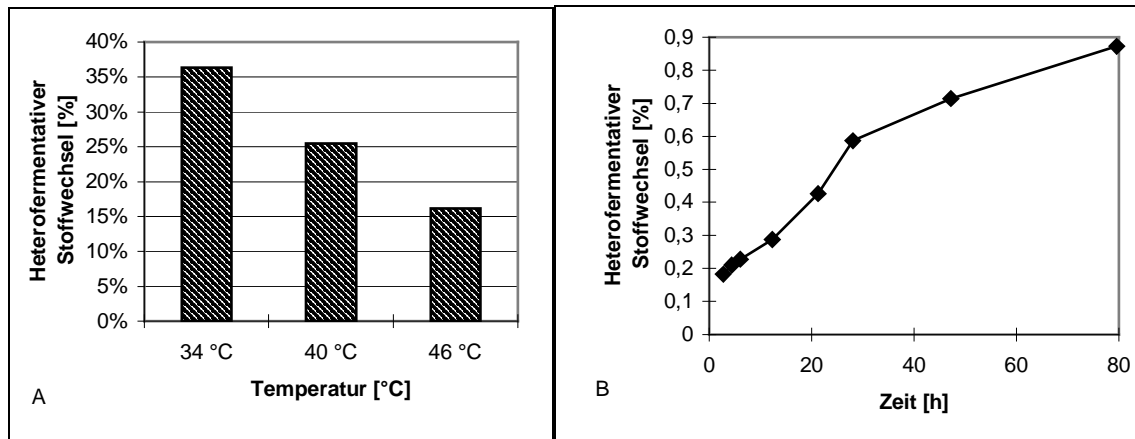


Abbildung 4.6-4 Anteil des Heterofermentativen Stoffwechsels bezogen auf die Summe der mikrobiellen Stoffumsetzungen. A: Anteil des Heterofermentativen Stoffwechsels bei verschiedenen Temperaturen. B: Verlauf des Anteils des Heterofermentativen Stoffwechsels während einer Fermentation.

Berücksichtigt man die Ausbeutekoeffizienten aus Kapitel 4.2 und nimmt an, daß dieser konstant ist, kann man auf die Bildung der Zellmasse schließen. Der Anteil der Zellmasse der heterofermentativen Organismen ist demnach bei 34°C 27%, bei 40°C 18 % und bei 46°C 11 %. Während der Fermentation steigt bei analoger Betrachtung der Anteil der Heterofermentativen Organismen an der Zellmasse von 14 % auf 78 %. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Bildung von Zellmasse gegen Ende der Fermentation nur noch sehr gering ist.

#### 4.7 Vergleich der Laborfermentationen mit einer Fermentation im industriellen Maßstab

Der Verlauf einer industriellen Fermentation wurde verfolgt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den Fermentationen im Labormaßstab festzustellen. Das Ergebnis ist in den folgenden Diagrammen dargestellt.

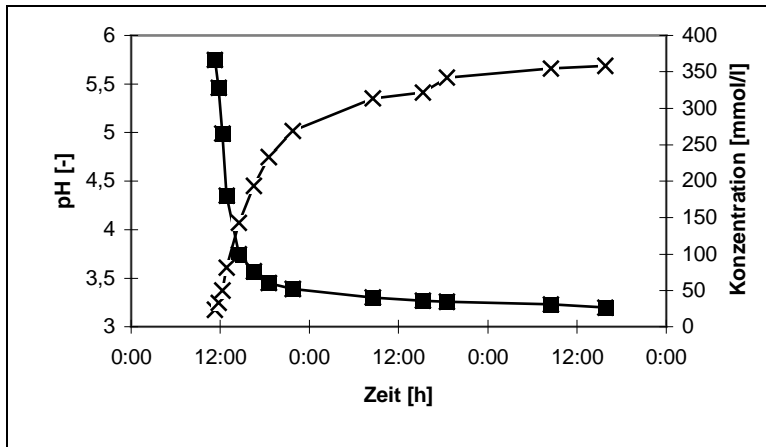


Abbildung 4.7-1 Bildung von Milchsäure und Absenkung des pH-Wertes in einer industriellen Fermentation

Aus Abbildung 4.7-1 kann man die rasche Bildung von Milchsäure und die entsprechende Absenkung des pH-Wertes erkennen. Nach ca. 24 h verlangsamt sich die Bildung von Milchsäure deutlich. In Abbildung 4.7-2 werden die Konzentrationen weiterer relevanter Substanzen dargestellt. Der Glucosespiegel steigt ebenfalls zunächst an. Der Anstieg verläuft lediglich langsamer als in der vergleichbaren Laborfermentation. Nach ca. 24 h erreicht der Glucosespiegel ein konstantes Niveau.

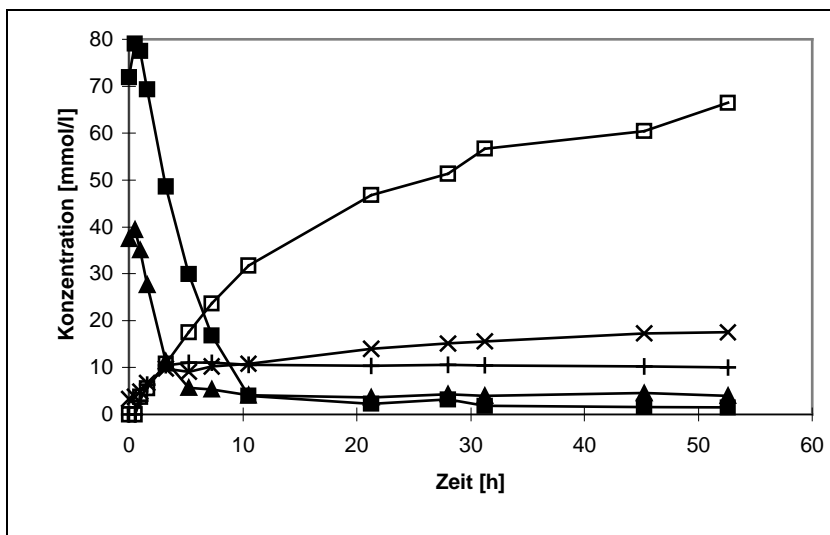


Abbildung 4.7-2 Verlauf der Konzentrationen von Glucose, Fructose und Fermentationsprodukten in einer industriellen Fermentation. Glucose(■), Fructose(▲), Mannit(+), Acetat(x), Ethanol( )

Für die industrielle Fermentation wurde ebenfalls das Verhältnis des heterofermentativen Stoffwechsels zum gesamten Stoffwechsel berechnet (Gleichung (3-49) in Kapitel 3.8). In Abbildung 4.7-3 ist zu erkennen, daß hier ebenfalls der Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels im Laufe der Fermentation ansteigt.

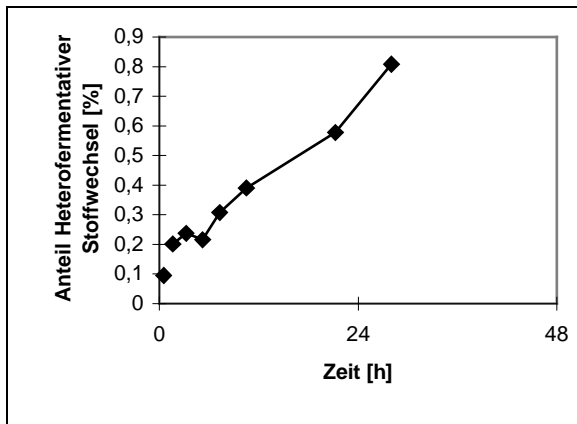


Abbildung 4.7-3 Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels in einer industriellen Fermentation.

## 4.8 Verhalten der Organismen gegenüber Nährstoffen

Um die Vorgänge in den im vorangegangenen Kapitel beobachteten Fermentationen beschreiben und erklären zu können ist es notwendig das Verhalten der Organismen gegenüber den relevanten Nährstoffen zu beobachten und die bestimmenden kinetischen Parameter zu ermitteln.

### 4.8.1 Die Reaktion der Organismen auf Glucose

Für beide Stämme wurde untersucht, wie sich die Konzentration von Glucose auf die Wachstumsgeschwindigkeit auswirkt. In Abbildung 4.8-1 ist das Wachstum von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration dargestellt. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit wurde durch Anpassung der Parameter der Funktion nach Zwietering et al. (1990)(Gl. 3.10) ermittelt. Die Glucosekonzentrationen betragen 0, 17, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 68, 119, 172 mmol/l.

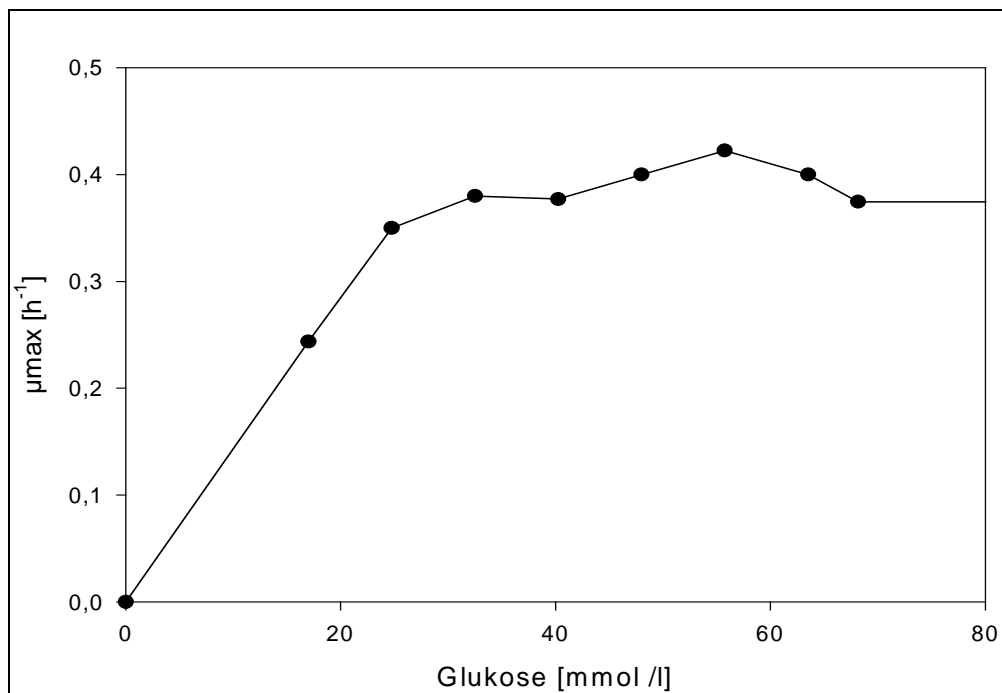


Abbildung 4.8-1 Wachstum bei verschiedenen Glucosekonzentrationen. *L. pontis* TMW 1.109.

Es ist ersichtlich, daß die Wachstumsgeschwindigkeit mit steigender Glucosekonzentration rasch ansteigt. Ab einer Konzentration von ca. 30 mmol/l Glucose verlaufen die Wachstumskurven weitgehend parallel; die Wachstumsgeschwindigkeit ist konstant (Abbildung 4.8-1). Die Glucosekonzentration spielt also in einem weiten Bereich für das Wachstum keine Rolle. Erst bei sehr geringen Konzentrationen kann Glucose das Wachstum der Organismen limitieren. Die komplexen Nährmediumzusätze des Spicher-Mediums enthalten jedoch bereits Glucosemengen, die eine Limitierung ausschließen.

Um die Limitierung des Wachstums von *L. pontis* TMW 1.109 quantitativ zu beschreiben, wurden die Parameter einer Kinetik nach Monod (Gl. 3-32) den Meßwerten angepaßt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8-2 graphisch dargestellt, die errechneten Parameter können Tabelle 4.8-1 entnommen werden.

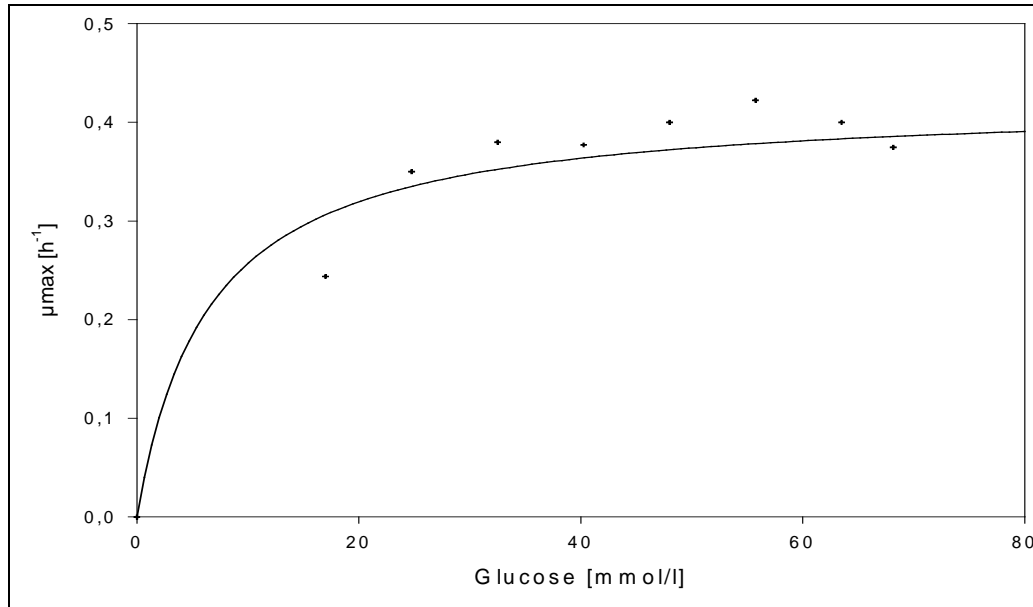


Abbildung 4.8-2 Anpassung einer Monod-Kinetik an die maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 im Vergleich zur zugesetzten Menge Glucose.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,923$

Tabelle 4.8-1 Errechnete Koeffizienten für die Beeinflussung des Wachstums von *L. pontis* TMW 1.109 durch Glucose. Annahme einer Kinetik nach Monod

Koeffizient	
$\mu_m$	0,42 [ $h^{-1}$ ]
Km	6,43 [mMol/l]

Für Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. In Abbildung 4.8-3 ist zunächst wieder die maximale Wachstumsrate für verschiedene Mengen an zugesetzter Glucose gezeigt.

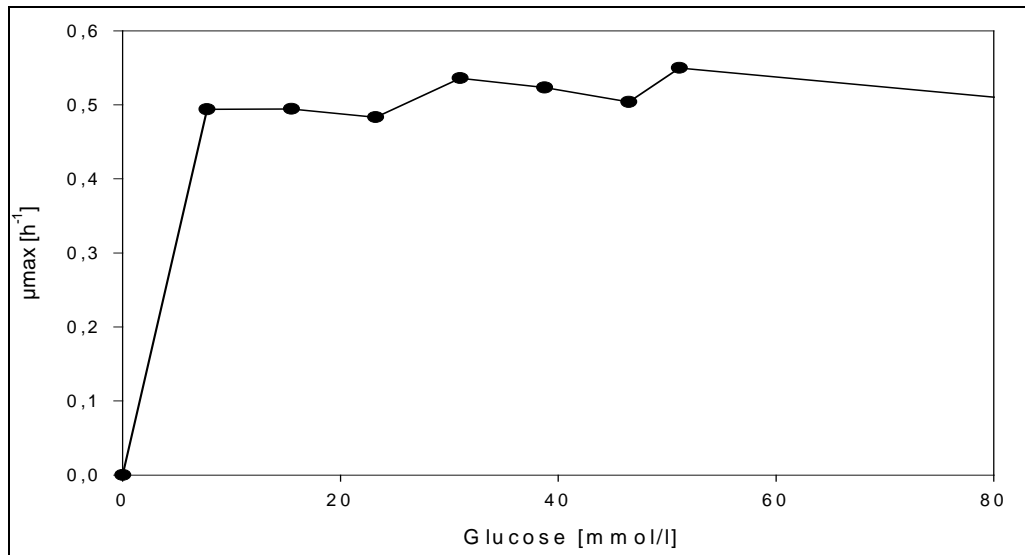


Abbildung 4.8-3 Wachstum bei verschiedenen Glucosekonzentrationen. *L. amylovorus* TMW 1.661.

Werden die Parameter der Gleichung (3-32) nach Monod an die Meßwerte angepaßt kann ein  $K_m$ -Wert für den Stamm 1.661 und Glucose ermittelt werden (Abbildung 4.8-4).

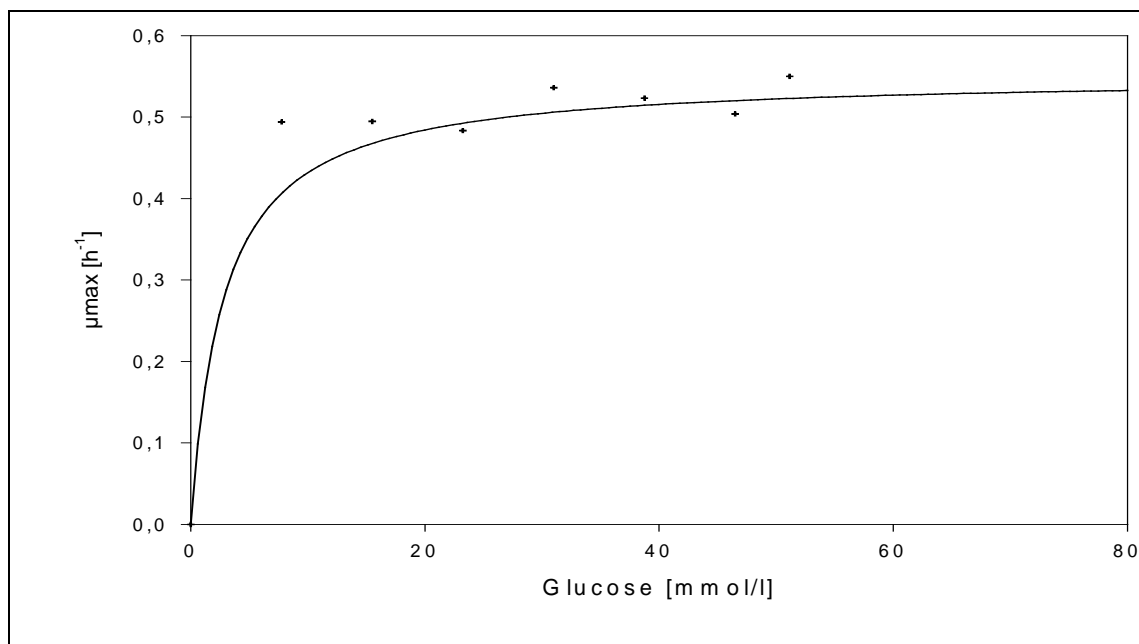


Abbildung 4.8-4 Die maximale Wachstumsrate im Vergleich zur zugesetzten Menge Glucose. *L. amylovorus* TMW 1.661.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,920$

Tabelle 4.8-2 Errechnete Koeffizienten für die Beeinflussung des Wachstums von *L. amylovorus* TMW 1.661 durch Glucose. Annahme einer Kinetik nach Monod

Koeffizient	
$\mu_m$	0,55 [ $\text{h}^{-1}$ ]
$K_m$	2,76 [mmol/l]

Die Ergebnisse für beide Stämme werden in Kapitel 5 verglichen und ihre Bedeutung für Fermentationen in gemischten Populationen diskutiert.

#### 4.8.2 Die Reaktion der Organismen auf Maltose

Maltose ist in den durchgeführten Fermentationen von untergeordneter Bedeutung. Die Konzentration im Medium ist klein und die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Amylase gering. Deshalb wurden die Auswirkungen von Maltose auf das Wachstum der Mikroorganismen nicht näher betrachtet.

#### 4.8.3 Die Reaktion der Organismen auf Fructose

Die Bedeutung von Fructose wurde in Kapitel 3.7.3 bereits erwähnt. Danach ist mit einer grundlegenden Veränderung des Stoffwechsels bei heterofermentativen Organismen zu rechnen. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, daß das Wachstum der Bakterien gleichermaßen stark beeinflusst wird. In Abbildung 4.8-5 sind die Verläufe zweier Fermentationen dargestellt, von denen eine ausschließlich Glucose und die andere ausschließlich Fructose als C-Quelle enthält. Wird Fructose als alleinige C-Quelle angeboten, wird die erheblich längere Lag-Phase von *L. pontis* TMW 1.109 erkennbar.

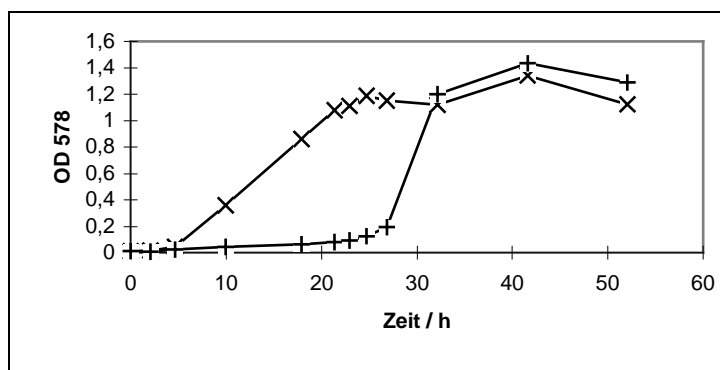


Abbildung 4.8-5 Verlauf von zwei Fermentationen unter Verwendung von *L. pontis* TMW 1.109. Ein Fermenter enthielt Glucose (x) ein anderer Fructose (+) als ausschließliche C-Quelle.

In den untersuchten Fermentationen trat Fructose nicht als alleinige C-Quelle auf, da stets Glucose der dominierende Zucker war. Daher ist es von größerer Bedeutung, das Verhalten der Organismen zu ermitteln, wenn Glucose und Fructose im Medium vorhanden sind als die Untersuchung von Fructose als einzige verwertbare C-Quelle. In Abbildung 4.8-6 ist die



maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 bei verschiedenen Fructosekonzentrationen dargestellt. Da es sich bei *L. pontis* TMW 1.109 um einen heterofermentativen Stamm handelt, der Fructose als Elektronenakzeptor nutzen kann, ist die Energieausbeute höher als bei Fermentationen ohne Fructose.

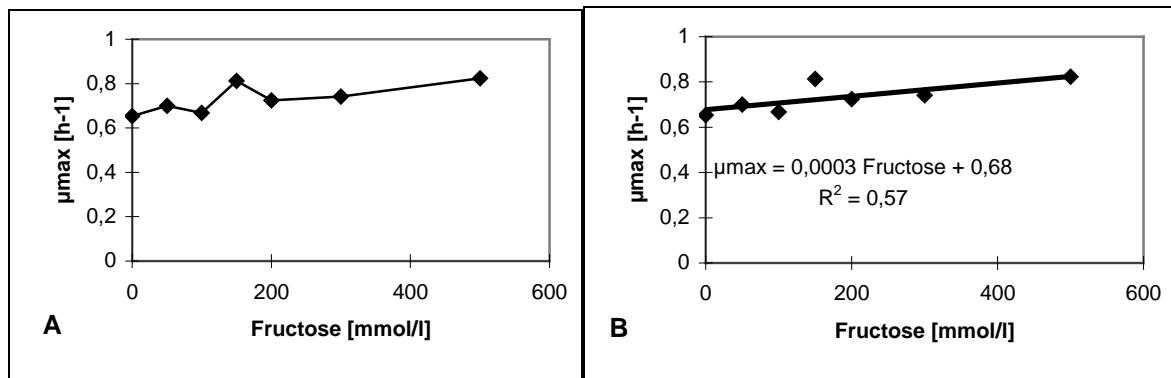


Abbildung 4.8-6 Maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 in Anwesenheit von Glucose bei steigender Fructosekonzentration. Meßwerte (A) und Regressionsanalyse (B).

Der niedrige Wert für  $R^2$  von 0,57 und die geringe Steigung der Ausgleichsgeraden von  $3 \cdot 10^{-4}$  zeigen, daß Fructose in diesem Fall keinen nachweisbaren Einfluß auf das Wachstum der Organismen ausübt. Dies bedeutet, daß ein Einfluß auf das Wachstum entweder zu gering ist um mit den verwendeten Methoden nachgewiesen werden zu können, oder, daß das Wachstum durch andere Faktoren begrenzt wird wodurch die Zellen die höhere Energieausbeute nicht zu rascherem Wachstum nutzen können.

Weiterhin wurde untersucht, in welcher Weise die Bildung von Acetat durch die Konzentration von Fructose beeinflusst wird. In Abbildung 4.8-7 wird dieser Zusammenhang graphisch dargestellt. Medien mit unterschiedlichen Konzentration an Fructose wurden mit einer konstanten Menge einer Kultur von *L. pontis* TMW 1.109 beimpft. Die Bildung von Acetat wurde durch HPLC gemessen.

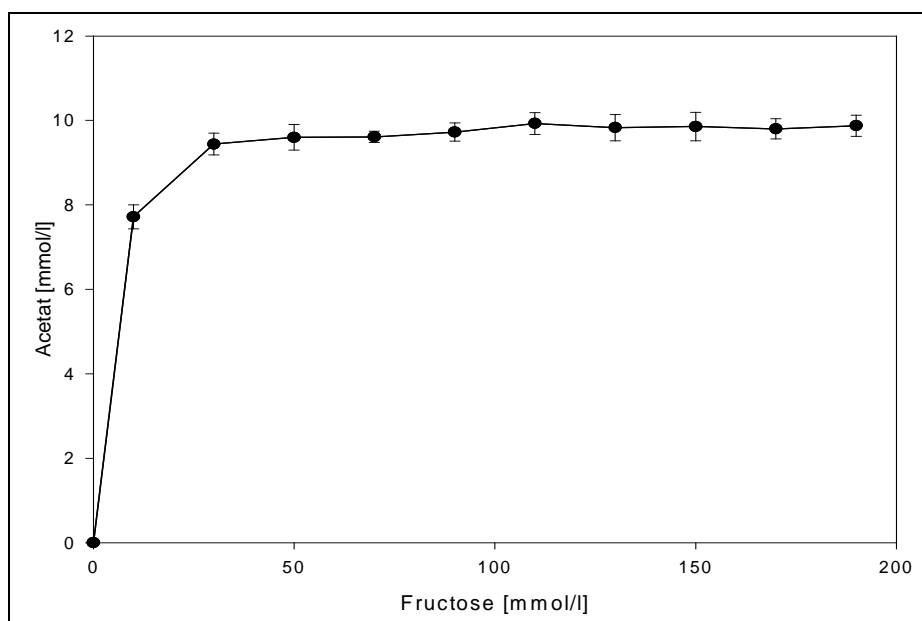


Abbildung 4.8-7 Acetatbildung durch *L. pontis* TMW 1.109 bei steigender Fructosekonzentration.

Zur Beschreibung der Verschiebung des Stoffwechsels soll diese als eine einzige enzymatische Reaktion betrachtet werden, die der Gesetzmäßigkeit nach Michaelis und Menten (Gl. 3-32) unterliegt. In Abbildung 4.8-8 ist das Ergebnis einer Parameteranpassung graphisch aufgetragen. Die dazugehörigen berechneten Koeffizienten können Tabelle 4.8-3 entnommen werden.

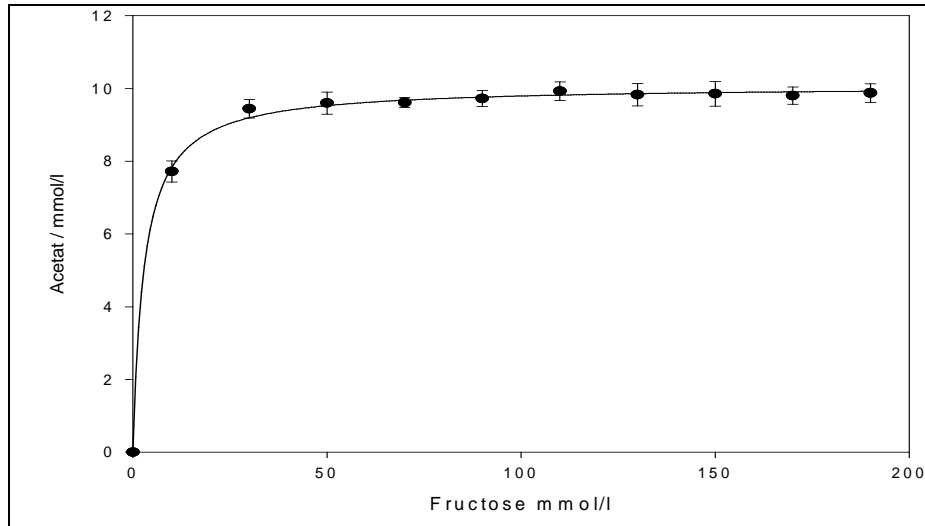


Abbildung 4.8-8 Beschreibung der Bildung von Acetat in Abhängigkeit der Fructosekonzentration durch *L. pontis* TMW 1.109. Annahme einer Kinetik nach Michaelis-Menten.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,999$

Die angenommene Kinetik beschreibt die Meßwerte gut. Aus den errechneten Werten für die Parameter läßt sich ablesen, daß die Affinität der Mikroorganismen zu Fructose hoch ist, und die Reaktion bereits bei geringen Konzentrationen in den Sättigungsbereich gerät.

Tabelle 4.8-3 Errechnete Koeffizienten für die Bildung von Acetat in Abhängigkeit der Fructosekonzentration durch *L. pontis* TMW 1.109. Annahme einer Kinetik nach Michaelis-Menten

Koeffizient	
$v_m$	10 [mmol/l]
$K_m$	2,9 [mmol/l]

Für *L. amylovorus* 1.661, mit einem homofermentativen Stoffwechsel ist Fructose nur als C- und Energiequelle nutzbar. Der Einfluß der Fructosekonzentration auf das Wachstum wurde ebenfalls in Anwesenheit von Glucose getestet. In Abbildung 4.8-9 Ist das Ergebnis dieser Messungen dargestellt. Es ist keine signifikante Veränderung der maximalen Wachstumsrate zu beobachten.

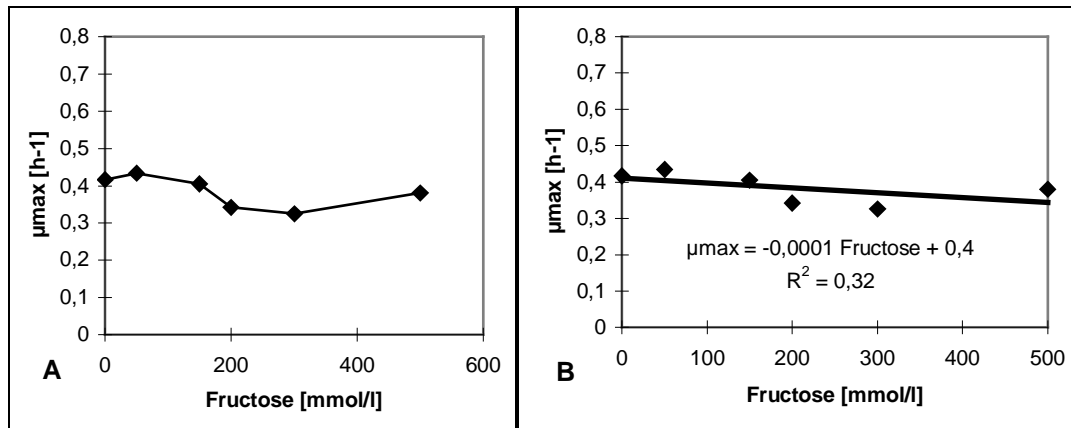


Abbildung 4.8-9 Maximale Wachstumsrate von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei steigender Fructosekonzentration (A) und Korrelationsanalyse.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden sowie  $R^2$  ist in diesem Fall noch geringer als bei dem heterofermentativen Stamm. Daher kann in diesem Versuch kein Einfluß der Fructose auf das Wachstum der Organismen nachgewiesen werden.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so kann angenommen werden, daß in einer gemischten Population von *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661 das Wachstum der beiden Stämme von der vorhandenen Fructosekonzentration kaum beeinflusst wird. Die Fructose wird hauptsächlich von *L. pontis* TMW 1.109 aufgenommen und als Elektronenakzeptor verwendet. Die Verwertung erfolgt entsprechend dem Stoffwechselschema in Abbildung 1.1-2.

#### 4.8.4 Die Reaktion der Organismen auf Pentosen

Für den Stoffwechsel von Lactobacillen können die beiden Pentosen Ribose und Xylose von Bedeutung sein.

Beim Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 konnte mit Pentosen als alleinige C-Quelle kein Wachstum festgestellt werden. Ist Glucose und zusätzlich Ribose im Medium vorhanden, wird die Wachstumsgeschwindigkeit von *L. amylovorus* TMW 1.661 kaum beeinflusst, wie in Abbildung 4.8-10a gezeigt wird. Eine genauere Auswertung mit Ermittlung der jeweiligen Werte für  $\mu_{max}$  und Berechnung der Korrelation zwischen Ribosekonzentration und maximaler Wachstumsrate ergibt eine leicht negative Korrelation. Bei hohen Ribosekonzentrationen kommt es somit zu einer geringfügigen Hemmung des Wachstums. Bei geringen Konzentrationen, die in den in dieser Arbeit untersuchten Fermentationen vorherrschen, kann diese Hemmung aufgrund der sehr geringen Steigung der Ausgleichsgeraden vernachlässigt werden. Daher wird im weiteren zur Beschreibung von Fermentationen davon ausgegangen, daß *L. amylovorus* TMW 1.661 keine Pentosen verwertet und, daß das Wachstum von *L. amylovorus* TMW 1.661 nicht durch das Vorhandensein von Pentosen beeinflusst wird.

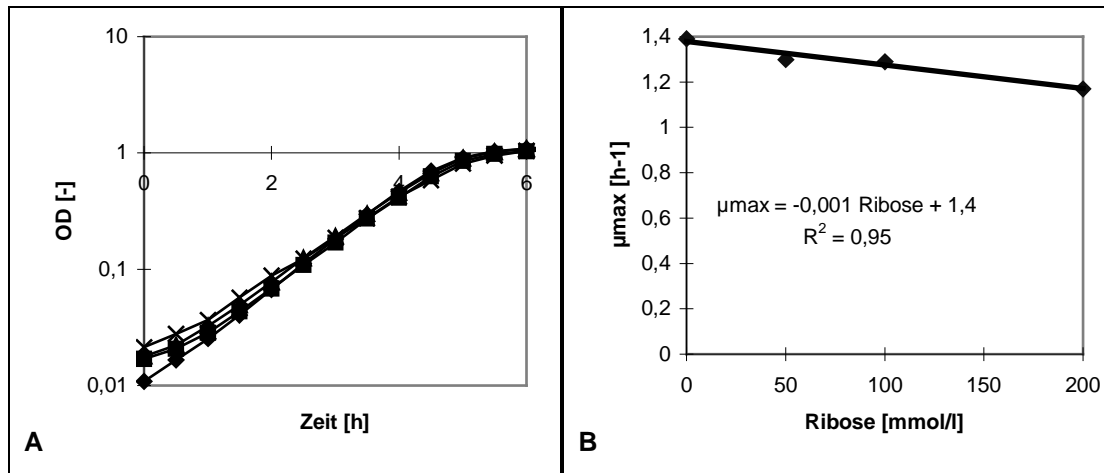


Abbildung 4.8-10 A: Wachstum von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei ansteigenden Konzentrationen von Ribose in Kombination mit Glucose. 0 mMol/l (◆), 50 mmol/l (■), 100 mMol/l (▲), 200 mmol/l (x). B: Regressionsanalyse

Der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 zeigte bei der Bestimmung des Spektrums der vergärbaren Kohlenhydrate (Kapitel 4.1) keine Reaktion auf Pentosen. Bei dem Versuch, Wachstumskurven aufzunehmen, zeigte sich ebenfalls keine Reaktion. Fermentiert man *L. pontis* TMW 1.09 in Schraubröhrchen mit Pentosen, zeigt eine Trübung nach 2 Tagen geringes Wachstum an. Die läßt vermuten, daß der Einfluß von Ribose auf das Wachstum der Organismen nur sehr gering ist. Die zur oben beschriebenen Untersuchung analoge Auswertung ist in Abbildung 4.8-11 dargestellt.

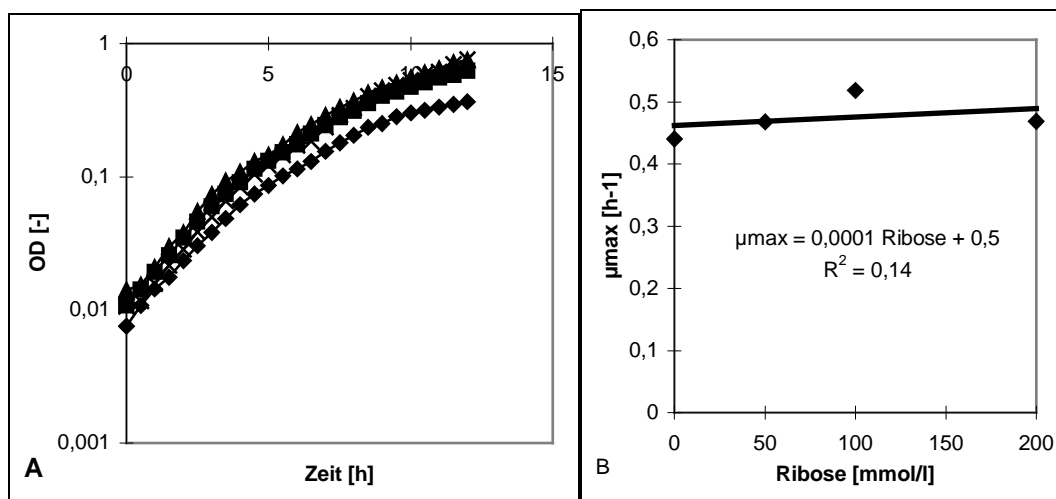


Abbildung 4.8-11 *L. pontis* TMW 1.109 Wachstumsrate bei Vorhandensein von Glucose und steigender Menge an Ribose (A) und Korrelationsanalyse(B).

Die Wachstumskurven verlaufen weitgehend parallel. Die Regressionsanalyse liefert sehr kleine Koeffizienten. Man kann also davon ausgehen, daß das Wachstum von *L. pontis* TMW 1.09 bei Anwesenheit von Glucose nicht vom Vorhandensein von Pentosen beeinflusst wird.

Das Verhalten der Stämme gegenüber Xylose ist mit dem gegenüber Ribose vergleichbar. Das Wachstum ist jedoch auf Xylose noch geringer.

#### 4.8.5 Komplexe Medienbestandteile

Als Komplexe Medienbestandteile wurden Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton und Kleieextrakt verwendet. Bei Homohiochii-Medium ohne diese Zusätze beobachtet man nach mehrmaligem Überimpfen ein Nachlassen des Wachstums. Da die Zusätze aus eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zusammengesetzt sind, ist es mit vertretbarem Aufwand nicht möglich festzustellen, welche Substanzen limitierend sind. Daher wurde alternativ der Ansatz gewählt, die Zusätze vereinfachend als eine einzelne Substanz zu betrachten. Setzt man diese Substanzen einem Medium in steigender Konzentration zu und ermittelt das maximale Wachstum von *L. amylovorus* TMW 1.661, ergibt sich das in Abbildung 4.8-12 dargestellte Ergebnis.

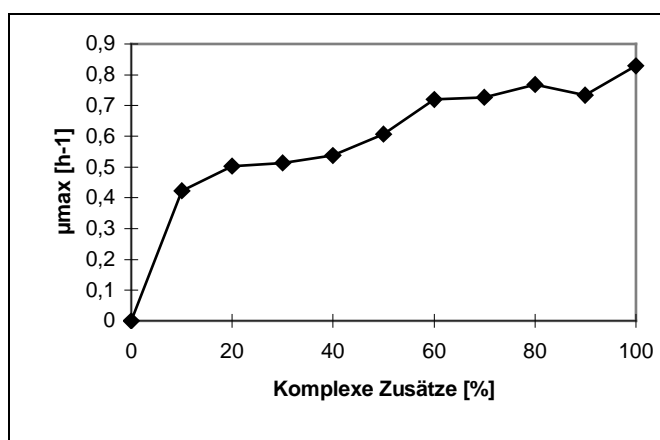


Abbildung 4.8-12 Verhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661 gegenüber komplexen Medienzusätzen.

Abbildung 4.8-13 zeigt den Versuch, dies durch eine Michaelis-Menten-Kinetik (Gl. 3.32) zu beschreiben. Durch die resultierende Funktion kann eine Abschätzung des Wachstums vorgenommen werden.

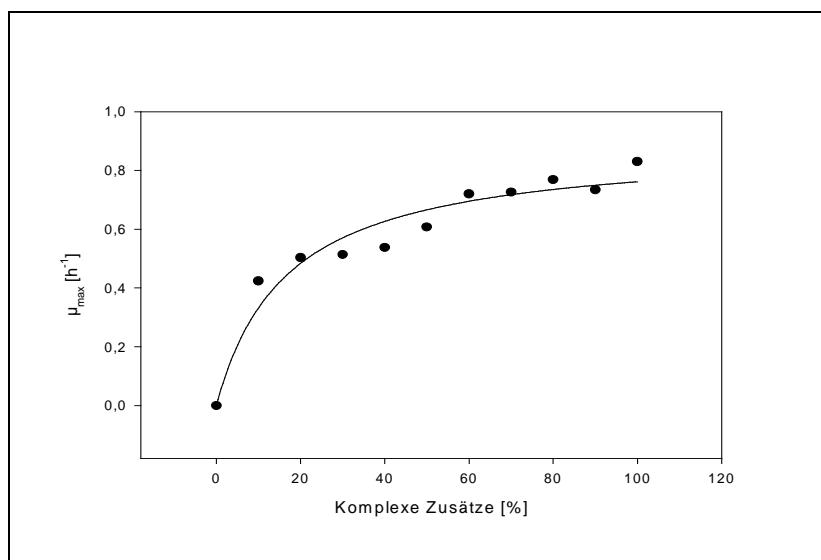


Abbildung 4.8-13 Beschreibung des Verhaltens von *L. amylovorus* TMW 1.661 gegenüber komplexen Medienzusätzen durch eine Michaelis-Menten Kinetik.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,944$

Die Koeffizienten, die aus der Anpassung resultieren, sind in Tabelle 4.8-4 zusammengefaßt.

Tabelle 4.8-4 Errechnete Koeffizienten für die Beschreibung des Wachstums von *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit der Konzentration der komplexen Medienbestandteile. Annahme einer Kinetik nach Michelis-Menten

Koeffizient	
$\mu_m$	0,89 [h <sup>-1</sup> ]
Km	16,7 [%]

Das Ergebnis des gleichen Versuchs, aber mit *L. pontis* TMW 1.09 durchgeführt, wird in Abbildung 4.8-14 dargestellt. Der Verlauf ist vom vorhergehenden mit *L. amylovorus* TMW 1.661 deutlich verschieden. Deshalb wurden in diesem Fall zwei unterschiedliche Funktionen den Meßwerten angepaßt, um festzustellen, welche zur Beschreibung des Verlaufes besser geeignet ist.

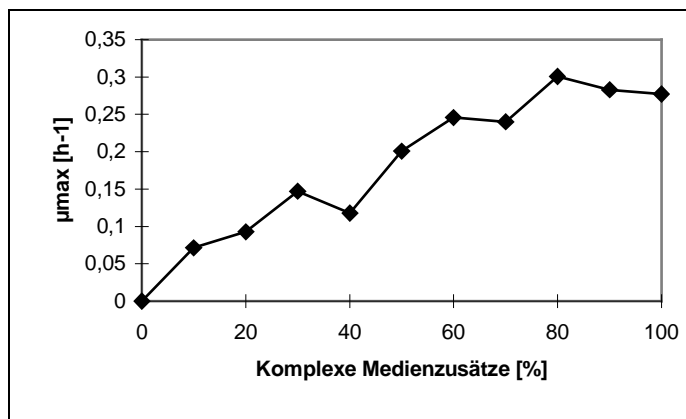


Abbildung 4.8-14 Verhalten von *L. pontis* TMW 1.09 gegenüber komplexen Medienzusätzen

In Abbildung 4.8-15 wird die Anpassung einer Michaelis-Menten-Kinetik (Gl. 3-32) an die Meßwerte gezeigt. Die einer Michaelis-Menten-Kinetik entsprechenden Parameter sind in Tabelle 4.8-5 aufgeführt.

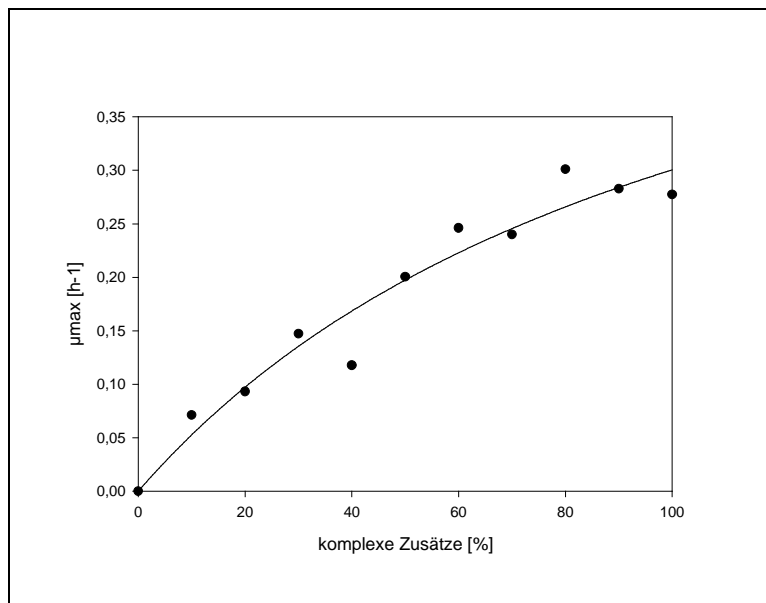


Abbildung 4.8-15 Beschreibung des Verhaltens von *L. pontis* TMW 1.109 gegenüber komplexen Medienzusätzen durch eine Michaelis-Menten Kinetik.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,946$

Der für  $K_m$  errechnete Wert ist in diesem Fall wesentlich höher als bei der vergleichbaren Messung für den homofermentativen Stamm. Dies bedeutet, daß der Stamm eine wesentlich geringere Affinität zu der limitierenden Substanz in den komplexen Nährmedienzusätzen hat.

Tabelle 4.8-5 Errechnete Koeffizienten für die Beschreibung des Wachstums von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit der Konzentration der komplexen Medienbestandteile. Annahme einer Kinetik nach Michaelis-Menten

Koeffizient	
$\mu_m$	0,63 [h <sup>-1</sup> ]
$K_m$	109 [%]

Die Abbildung 4.8-16 soll dazu dienen, einen visuellen Eindruck von der Güte der Anpassung einer Michaelis-Menten-Kinetik zu gewinnen. Dazu ist in den Diagrammen der gemessene Wert dem der Berechnung gegenübergestellt. Je enger die Punkte sich um die Winkelhalbierende gruppieren, desto besser beschreibt die angepaßte Funktion die Meßwerte.

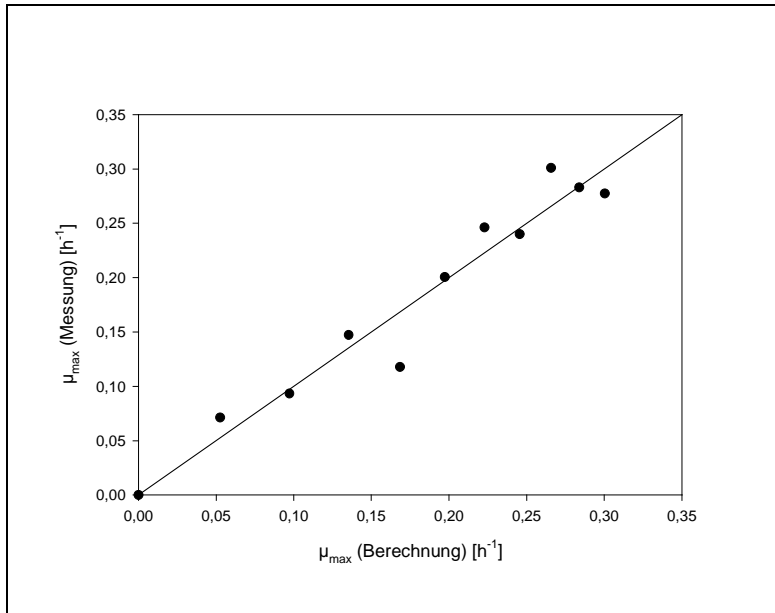


Abbildung 4.8-16 Beschreibung des Verhaltens von *L. pontis* TMW 1.109 gegenüber komplexen Medienzusätzen durch eine Michaselis-Menten Kinetik. Vergleich Berechnung-Messung.

Zum Vergleich wurde zusätzlich eine lineare Funktion (Gl. 4-3) angepaßt.

$$\mu_{\max} = a \cdot (\text{komplexe\_Zusätze}) \quad (4-3)$$

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8-17 zu sehen.

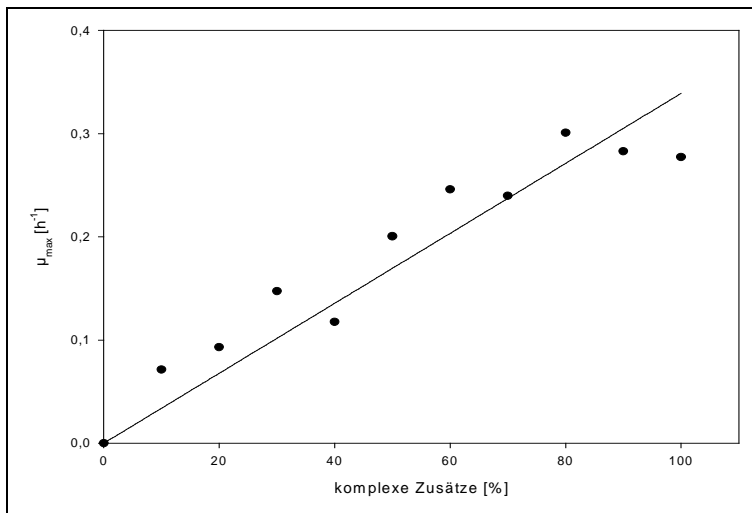


Abbildung 4.8-17 Beschreibung des Verhaltens von *L. pontis* TMW 1.109 gegenüber komplexen Medienzusätzen durch eine lineare Funktion.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,876$

In diesem Fall muß nur ein Parameter angepaßt werden. Für den Koeffizienten  $a$  wurde ein Wert von  $0,0034 \text{ [\%}^{-1}\text{]}$  errechnet.



#### 4.9 Der pH-Wert

Der pH-Wert hat einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Organismen. In Abbildung 4.9-1 und Abbildung 4.9-2 ist die Auswirkung des pH-Wertes auf die maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß beide Kurven einen ähnlichen Verlauf nehmen, die Wachstumsraten von *L. amylovorus* 1.661 sind jedoch allgemein höher. Das maximale Wachstum wird bei beiden Organismen bei einem pH-Wert von ca. 6,0 erreicht.

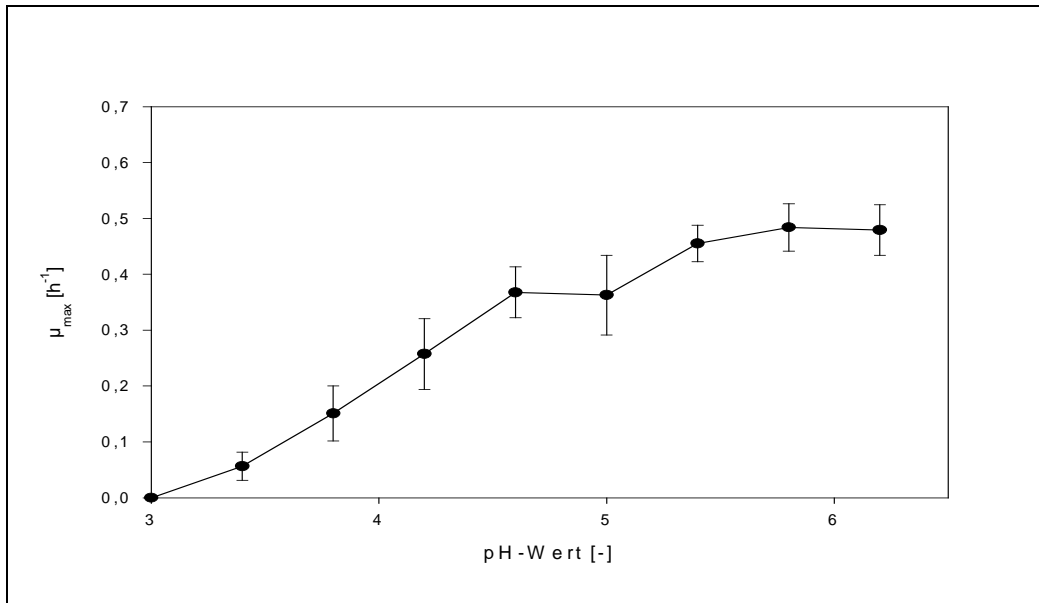


Abbildung 4.9-1 Wachstumsraten des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 Abhängigkeit vom pH-Wert in Mikrotiterfermentationen

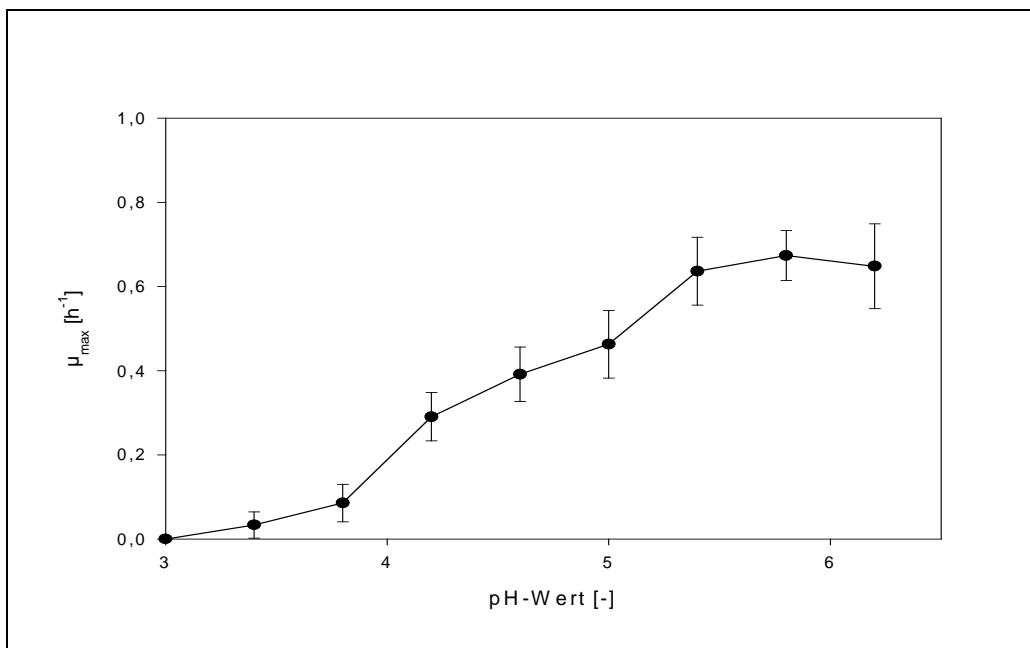


Abbildung 4.9-2 Wachstumsraten des Stammes *L. amylovorus* 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert in Mikrotiterfermentationen

In Kapitel 3.7.5 werden verschiedene Funktionen beschrieben, die verwendet werden, um das Verhalten von Organismen gegenüber dem pH-Wert zu beschreiben. Im Folgenden werden die Ergebnisse einiger Anpassungen gezeigt. Zunächst wurde *L. amylovorus* TMW 1.661 betrachtet. In Abbildung 4.9-3 wird eine Anpassung an ein Polynom 2. Grades graphisch dargestellt. Diese Funktion wurde zunächst aufgrund ihrer Einfachheit verwendet. Die daraus resultierenden Parameter sind Tabelle 4.9-1 zu entnehmen.

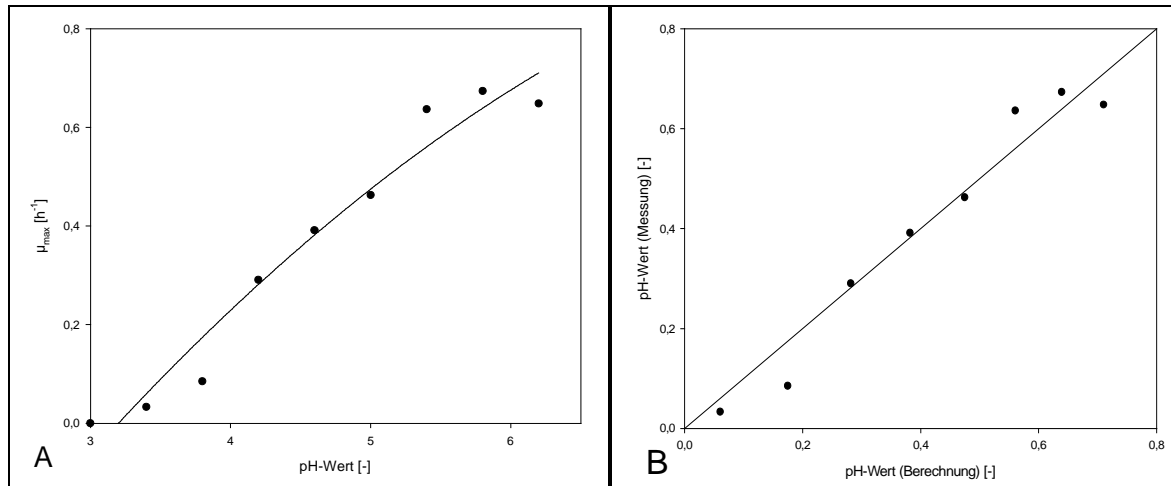


Abbildung 4.9-3 Anpassung eines Polynoms 2. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661(A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,960$

Tabelle 4.9-1 Berechnete Koeffizienten der Anpassung eines Polynoms 2. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661

Koeffizient	
a	-1,2 [h <sup>-1</sup> ]
b	0,44 [h <sup>-1</sup> ]
c	-0,022 [h <sup>-1</sup> ]

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4.9-4 die Anpassung eines Polynoms 3. Grades dargestellt. Diese Funktion enthält einen Parameter mehr und kann dadurch exakter an die gemessenen Werte angepaßt werden. Die Parameter der Anpassung sind in Tabelle 4.9-2 aufgeführt.

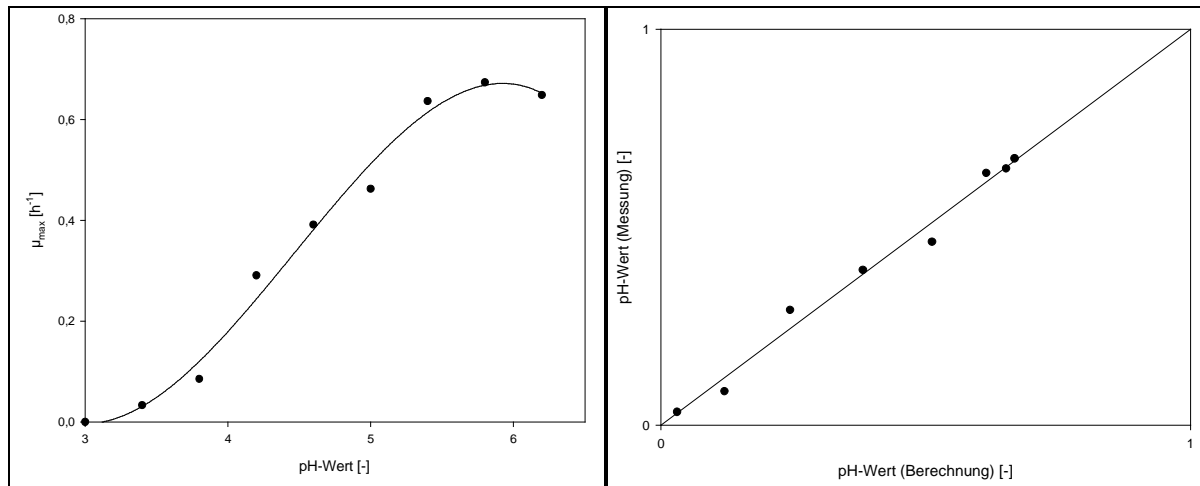


Abbildung 4.9-4 Anpassung eines Polynoms 3. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661(A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,989$

Tabelle 4.9-2 Berechnete Koeffizienten der Anpassung eines Polynoms 3. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661

Koeffizient		
A	3,6	[ $h^{-1}$ ]
B	-2,90	[ $h^{-1}$ ]
C	0,73	[ $h^{-1}$ ]
D	-0,054	[ $h^{-1}$ ]

Die Funktion nach Gompertz enthält ebenfalls 4 Parameter. Sie ist jedoch im Gegensatz zum Polynom 3. Grades monoton steigend. Eine Anpassung an diese Funktion wird in Abbildung 4.9-5 und Tabelle 4.9-3 dargestellt.

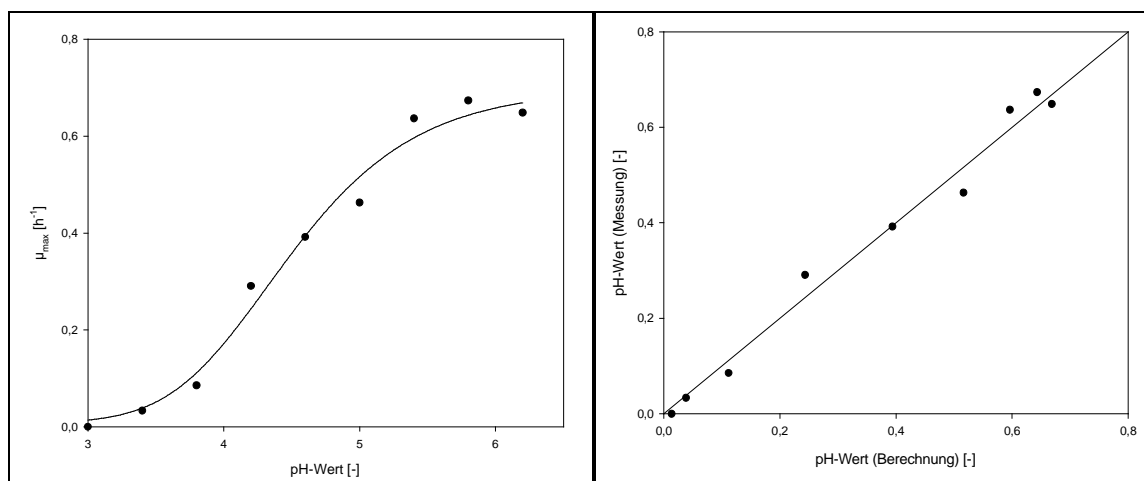


Abbildung 4.9-5 Anpassung einer Funktion nach Gompertz an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661(A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,985$

Tabelle 4.9-3 Berechnete Koeffizienten der Anpassung einer Funktion nach Gompertz an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661

Koeffizient	
A	4,53 [h <sup>-1</sup> ]
μ	2,82 [h <sup>-1</sup> ]
λ	2,82 [h]
y <sub>0</sub>	0,0075 [h <sup>-1</sup> ]

Die speziell zur Beschreibung des Wachstums von Lactobacillen bei verschiedenen pH-Werten entwickelte Funktion nach Passos enthält nur drei Parameter. Diese Anpassung ist in Abbildung 4.9-6 und Tabelle 4.9-4 dargestellt.

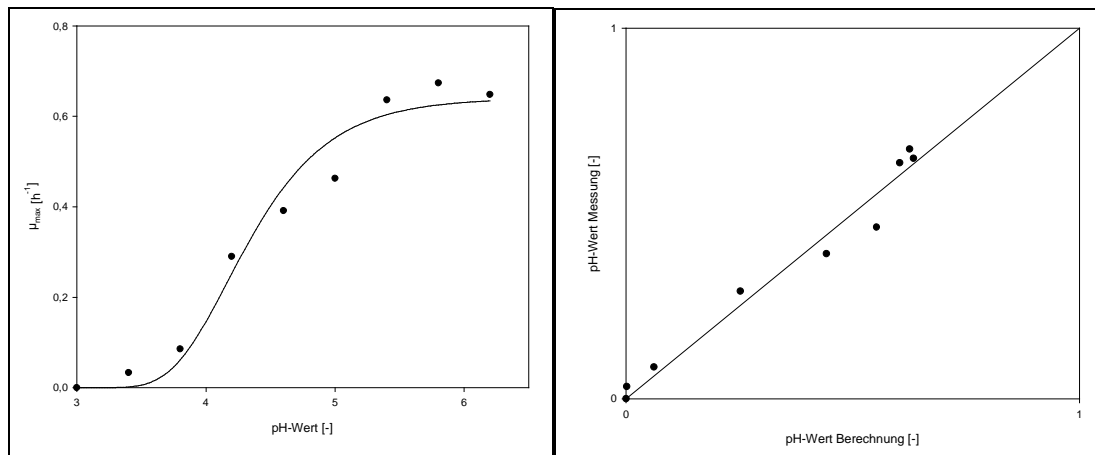


Abbildung 4.9-6 Anpassung einer Funktion nach Passos an das Wachstumsverhaltens von *L. amylovorus* TMW 1.661(A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,971$

Tabelle 4.9-4 Berechnete Koeffizienten der Anpassung einer Funktion nach Passos an das Wachstumsverhalten von *L. amylovorus* TMW 1.661

Koeffizient	
PHmin	1,82 [-]
α	220 [-]
μ <sub>0</sub>	0,64 [h <sup>-1</sup> ]

Für *L. pontis* TMW 1.109, der hier als repräsentativer heterofermentativer Stamm verwendet wird, wurden ebenfalls die entsprechenden Funktionen verwendet. Wiederum wird ein Polynom 2. Grades als einfachste Funktion verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.9-7 und Tabelle 4.9-5 dargestellt.

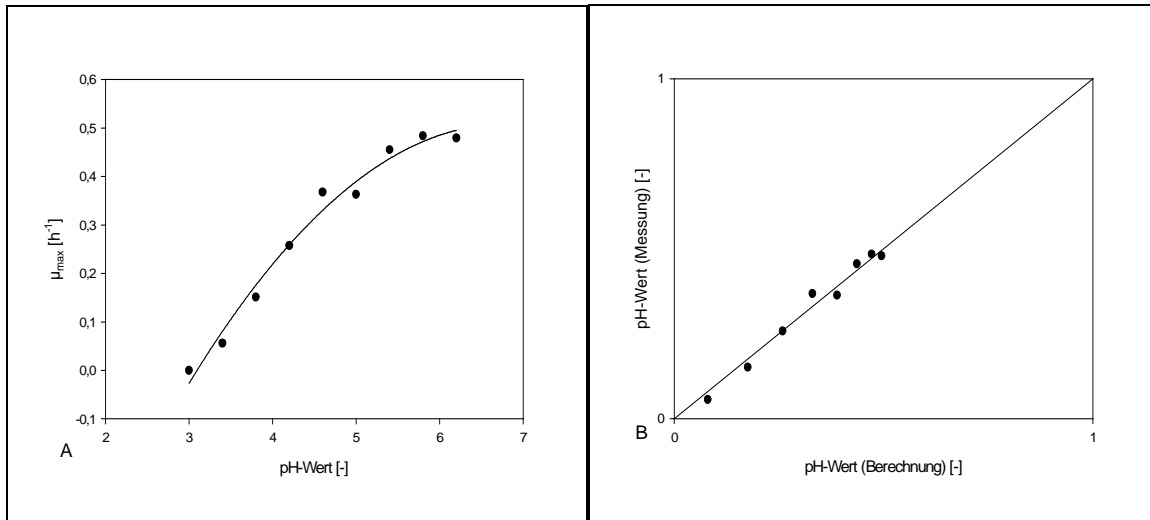


Abbildung 4.9-7 Anpassung eines Polynoms 2. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109 (A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,982$

Tabelle 4.9-5 Berechnete Koeffizienten der Anpassung eines Polynoms 2. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109

Koeffizient	
a	-1,2 [h <sup>-1</sup> ]
b	0,44 [h <sup>-1</sup> ]
c	-0,022 [h <sup>-1</sup> ]

Auch in diesem Fall bietet ein Polynom 3. Grades durch den zusätzlichen Parameter eine genauere Anpassung an die Meßwerte. Die ist in Abbildung 4.9-8 und Tabelle 4.9-6 zu sehen.

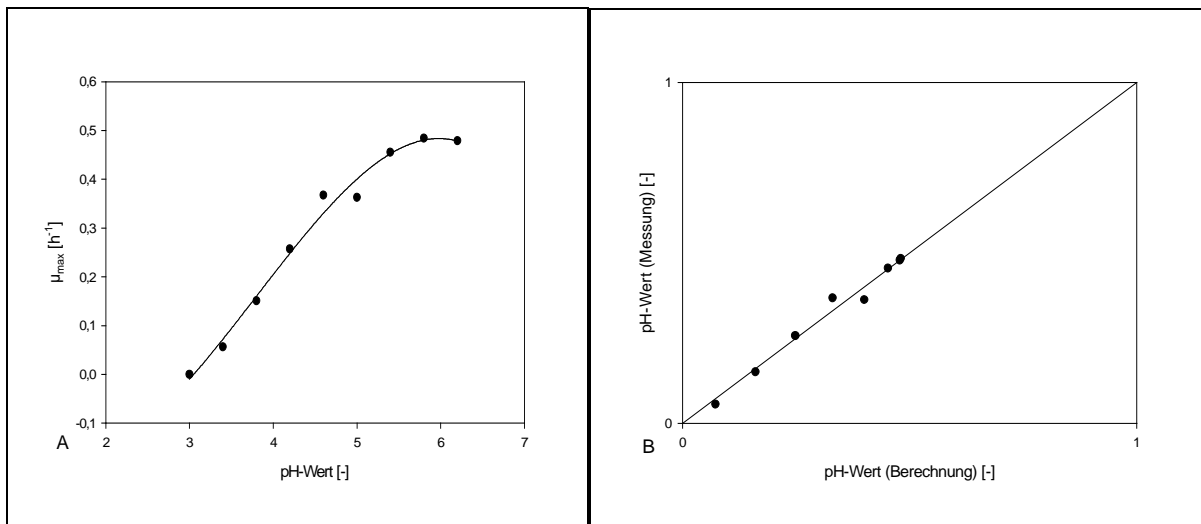


Abbildung 4.9-8 Anpassung eines Polynoms 3. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109 (A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,988$

Tabelle 4.9-6 Berechnete Koeffizienten der Anpassung eines Polynoms 3. Grades an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109

Koeffizient		
a	3,60	[h <sup>-1</sup> ]
b	-2,89	[h <sup>-1</sup> ]
c	0,73	[h <sup>-1</sup> ]
d	-0,054	[h <sup>-1</sup> ]

Abbildung 4.9-9 und Tabelle 4.9-7 entstanden unter Verwendung der sigmoiden Funktion nach Gompertz.

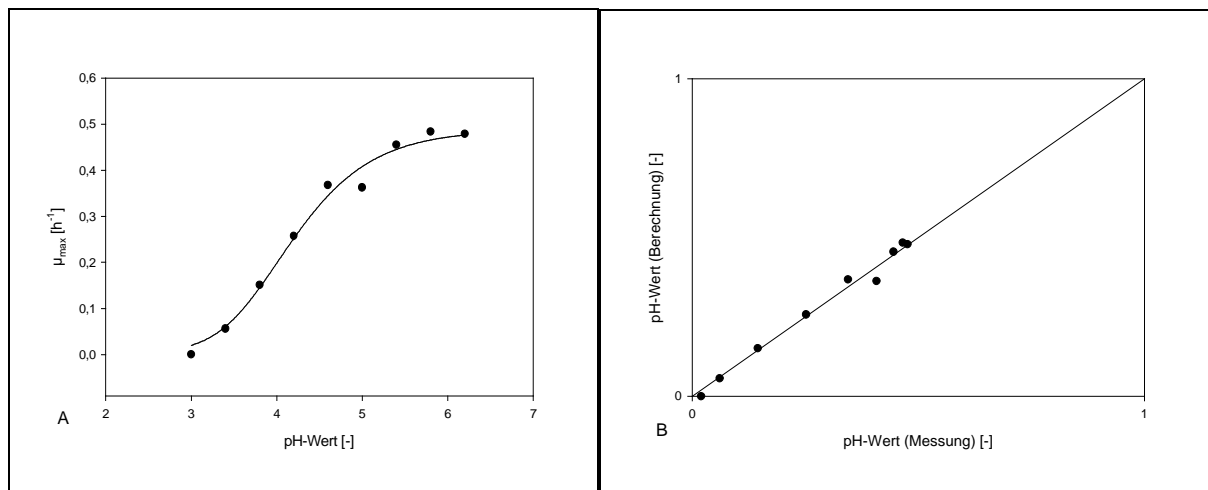


Abbildung 4.9-9 Anpassung einer Funktion nach Gompertz an das Wachstumsverhaltens von *L. pontis* TMW 1.109 (A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,987$

Tabelle 4.9-7 Berechnete Koeffizienten der Anpassung einer Funktion nach Gompertz an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109

Koeffizient		
A	4,53	[h <sup>-1</sup> ]
$\mu$	2,83	[h <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	2,81	[h]
$y_0$	0,0075	[h <sup>-1</sup> ]

Eine Anpassung nach Passos wird in Abbildung 4.9-10 A und Tabelle 4.9-8 dargestellt. Aus Abbildung 4.9-10 B kann ein Vergeich der gemessenen mit den berechneten Daten gezogen werden.

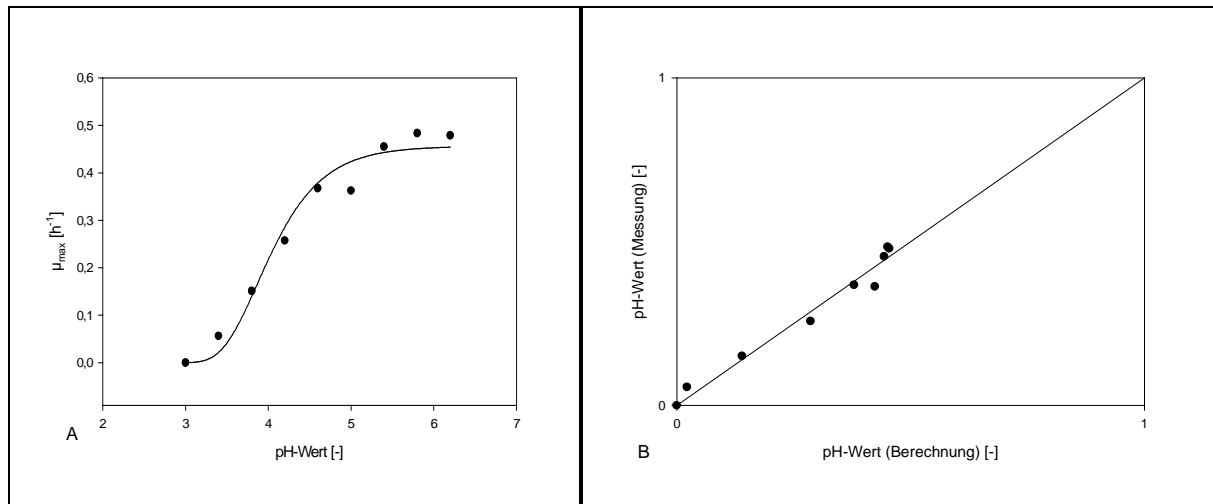


Abbildung 4.9-10 Anpassung einer Funktion nach Passos an das Wachstumsverhaltens von *L. pontis* TMW 1.109 (A) und Vergleich gemessene Werte mit berechneten Werten (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,971$

Tabelle 4.9-8 Berechnete Koeffizienten der Anpassung einer Funktion nach Passos an das Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.109

Koeffizient	
pHmin	1,82 [-]
$\alpha$	220 [-]
$\mu_0$	0,64 [ $\text{h}^{-1}$ ]

Die im Vorangegangenen ermittelten Parameter ermöglichen es nun die Reaktion der Organismen auf Veränderungen des pH-Wertes abzuschätzen. Die Eignung der verschiedenen Funktionen zur Beschreibung der Organismen und wird in Kapitel 5 eingehender diskutiert. Dort werden auch die Ergebnisse der beiden Organismen miteinander verglichen.

## 4.10 Reaktion der Organismen auf die entstehenden Stoffwechselprodukte

### 4.10.1 Die Reaktion der Organismen auf Ethanol

Wie in Abbildung 4.10-1 und Abbildung 4.10-2 zu erkennen ist, zeigen die Organismen bis zu einer Konzentration von 350 mMol/l Ethanol keine Änderung ihres Wachstumsverhaltens. Die Konzentrationen, die in Fermentationen erreicht werden, liegen, auch bei ausschließlicher Verwendung von heterofermentativen Organismen, deutlich unter diesem Wert. Daher war es nicht notwendig, die Auswirkung von Ethanol auf die Organismen weiter zu untersuchen.

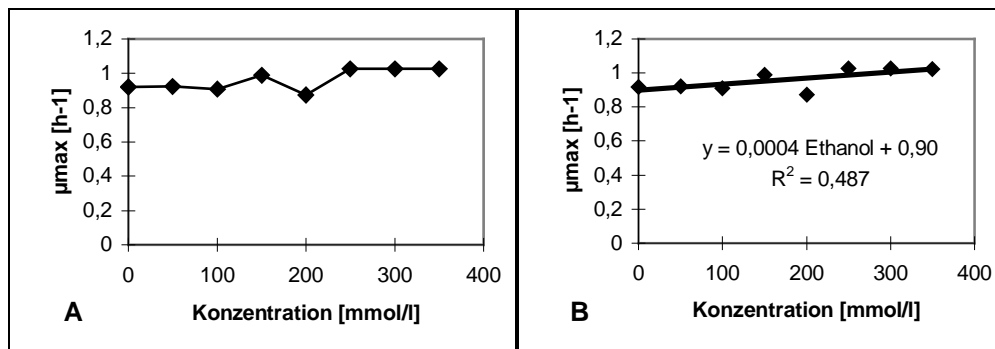


Abbildung 4.10-1 Wachstum von *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration

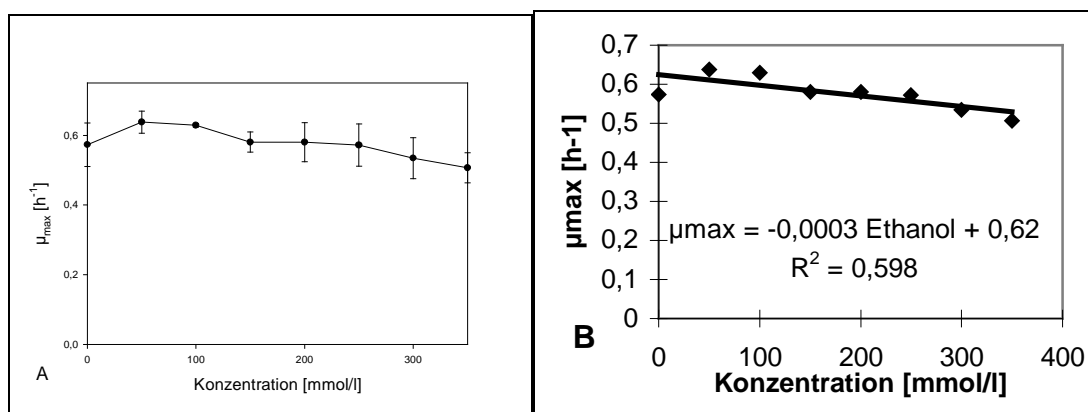


Abbildung 4.10-2 Wachstum von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration

#### 4.10.2 Die Reaktion der Organismen auf Lactat

Milchsäure ist das Hauptprodukt der Fermentation und erreicht daher hohe Konzentrationen. Es ist anzunehmen, daß von dieser Substanz eine erhebliche hemmende Wirkung auf die Organismen ausgeht. Der Rückgang der Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.661 bei einem konstanten pH-Wert von 5,4 ist in Abbildung 4.10-3 dargestellt.



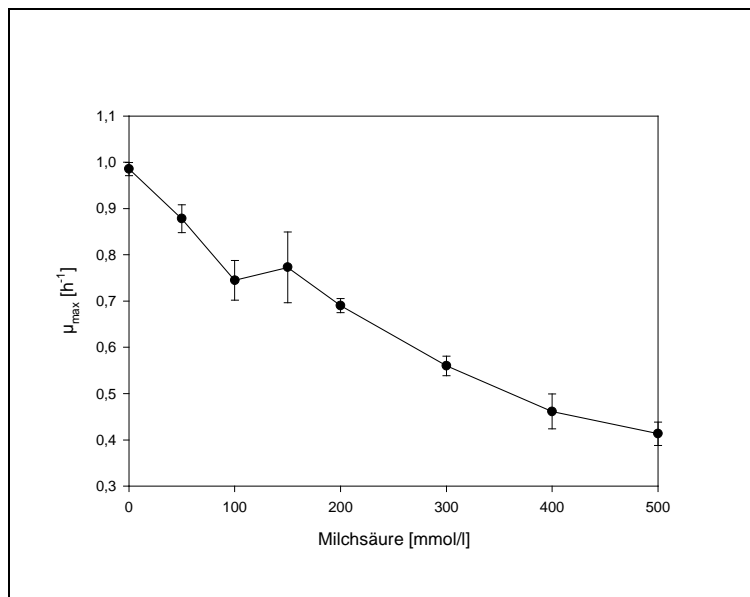


Abbildung 4.10-3 Wachstumsverhalten von *L. pontis* TMW 1.661 in Gegenwart von Milchsäure bei konstantem pH-Wert 5,4.

In pH-statischen Fermentationen bleibt der prozentuale Anteil von dissoziierter und undissoziierter Milchsäure konstant. Daher sind Daten wie in Abbildung 4.10-3 gezeigt ausreichend, um Parameter zu ermitteln, die geeignet sind, derartige Prozesse zu beschreiben. Die unterschiedlich ausgeprägte hemmende Wirkung der beiden Erscheinungsformen der Säure müssen dabei nicht berücksichtigt werden.

Betrachtet man ungepufferte Fermentationen, muß jedoch genauer differenziert werden. Da, wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, die dissoziierte und die undissoziierte Säure unterschiedliche hemmende Wirkung haben, und der Dissoziationsgrad stark vom pH-Wert abhängt, müssen die Größen pH-Wert und Milchsäurekonzentration in Kombination betrachtet werden. In Abbildung 4.10-4 ist die maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von pH-Wert und Milchsäurekonzentration dargestellt.

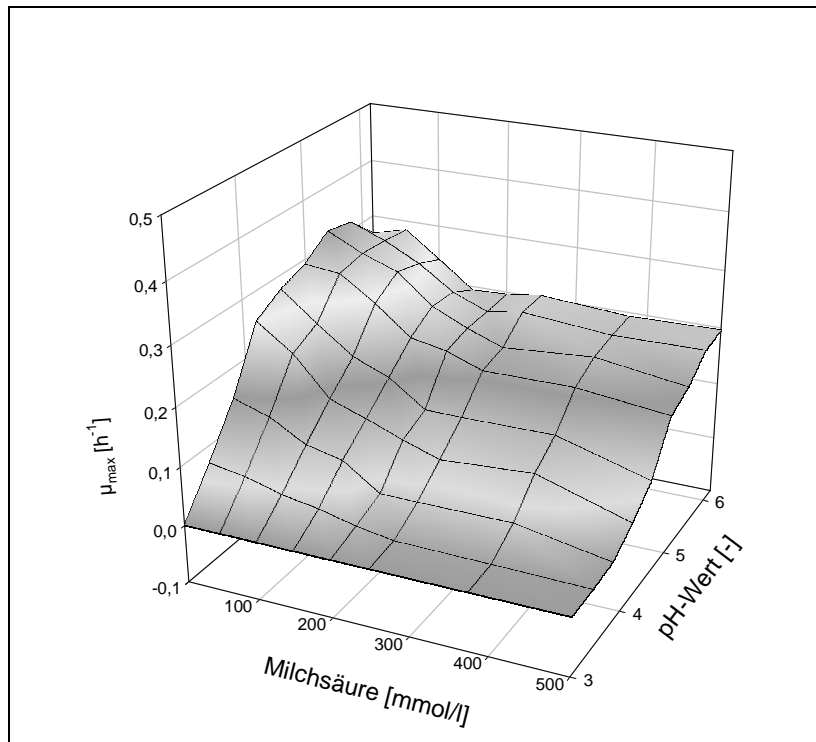


Abbildung 4.10-4 Maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit vom pH-Wert und Lactat; *L. pontis* TMW 1.109.

In diesem Fall muß eine Funktion zur Beschreibung der Daten die Größen pH-Wert, Konzentration der dissoziierten Säure und Konzentration der undissoziierten Säure enthalten. Gleichung (4-4) beschreibt dies.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(\text{pH}, \text{Lac}_{\text{diss}}, \text{Lac}_{\text{undiss}}) \quad (4-4)$$

Dadurch wird der Tatsache Rechnung getragen, daß die dissoziierte und undissoziierte Form einer Säure stark unterschiedliche Hemmwirkung ausüben können. Da jedoch der Dissoziationsgrad über die Henderson-Hasselbach Gleichung (3-26) direkt vom pH-Wert abhängt, kann ein Parameter eliminiert werden. Gleichung (4-5) enthält entsprechend nur noch zwei unabhängige Variablen.

$$\mu = \mu_0 \cdot f\left(\text{pH}, \text{Lac} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}}, \text{Lac} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}}\right) = g(\text{pH}, \text{Lac}) \quad (4-5)$$

Nimmt man an, daß die Größen unabhängig voneinander sind, folgt aus Gleichung (3-50) Gleichung (4-6).

$$\mu = \mu_0 \cdot f(\text{pH}) \cdot h\left(\text{Lac} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}}\right) \cdot k\left(\text{Lac} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}}\right) \quad (4-6)$$

Die hemmende Wirkung der undissoziierten Milchsäure wird oft vernachlässigt. Unter dieser Voraussetzung entfällt der letzte Term und es folgt Gleichung (4-7)

$$\mu = \mu_0 \cdot f(\text{pH}) \cdot h\left(\text{Lac} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}}\right) \quad (4-7)$$

Unter diesen Voraussetzungen kann  $f(\text{pH})$  durch jede Funktion, die zur Beschreibung des Einflusses des pH-Wertes geeignet ist (siehe Kapitel 3.7.5) ersetzt werden. Ebenso kann der zweite Term in Gleichung (4-6) durch eine Funktion ersetzt werden, die eine Produkthemmung durch Milchsäure beschreibt (siehe Kapitel 3.7.2). Da es für beide Funktionen  $f$  und  $h$  mehrere Möglichkeiten gibt, ergibt sich eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten. Da nicht alle berücksichtigt werden können, sollen im Folgenden einige Beispiele exemplarisch aufgeführt werden. Zunächst soll die Wirkung der dissoziierten Säure vernachlässigt werden. Es erfolgt eine Anpassung zweier Polynome 3. Grades zur Beschreibung der Hemmung durch den pH-Wert und der undissoziierten Milchsäure. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10-5 dargestellt.

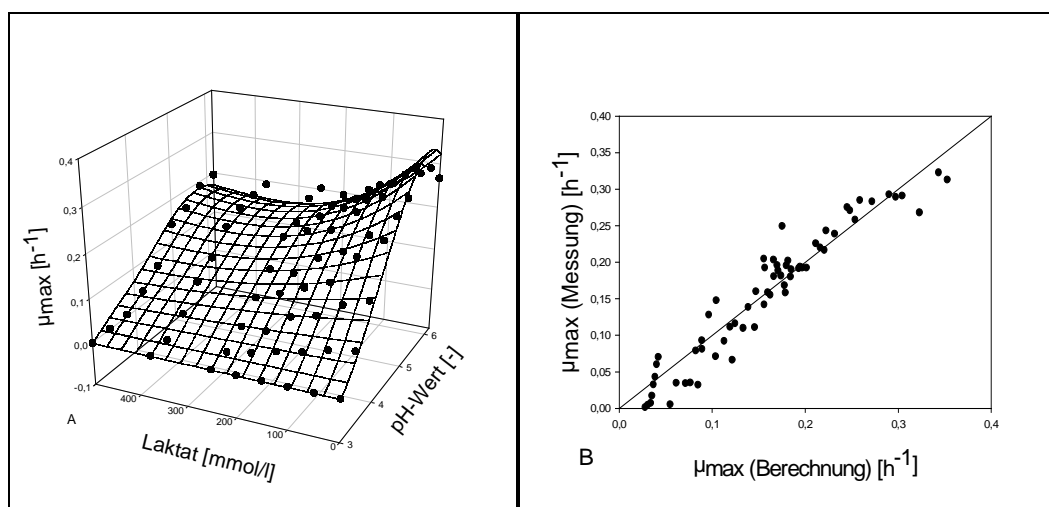


Abbildung 4.10-5 Anpassung an die maximalen Wachstumsraten von *L. pontis* TMW 1.109 bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Konzentrationen von Milchsäure. Die Hemmung durch pH-Wert und Milchsäure werden je durch ein kubisches Polynom beschrieben (A). Abbildung B zeigt den Vergleich zwischen Messung Berechnung.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,936$

Die Parameter, die durch die Anpassung erhalten werden, sind in Tabelle 4.10-1 aufgeführt. Bei diesen Funktionen kann den einzelnen Parametern keine physiologische Größe zugeordnet werden. Beispielsweise wird der pH-Wert bei dem das Wachstum maximal ist nicht durch einen Parameter in der Gleichung bestimmt, sondern muß durch Nullpunktbestimmung der ersten Ableitung der Funktion berechnet werden.

Tabelle 4.10-1 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-5

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,038	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{Lac}}$	5,1	[-]
$b_{\text{Lac}}$	-4,7	$[\text{1}/(\text{mmol/l})]$
$c_{\text{Lac}}$	1,3	$[\text{1}/(\text{mmol/l})^2]$
$d_{\text{Lac}}$	-0,11	$[\text{1}/(\text{mmol/l})^3]$
$a_{\text{pH}}$	6,2	[-]
$b_{\text{pH}}$	-0,022	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,0	[-]
$d_{\text{pH}}$	0,0	[-]

Für den im Folgenden beschriebenen Ansatz wurden zwei unterschiedliche Hemmfunktionen verwendet. Die Wirkung des pH-Wertes wird wiederum durch ein Polynom 3. Grades angenähert. Die Wirkung der Milchsäure jedoch durch die Funktion nach Levenspiel (Gl. 3-17). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10-6 dargestellt.

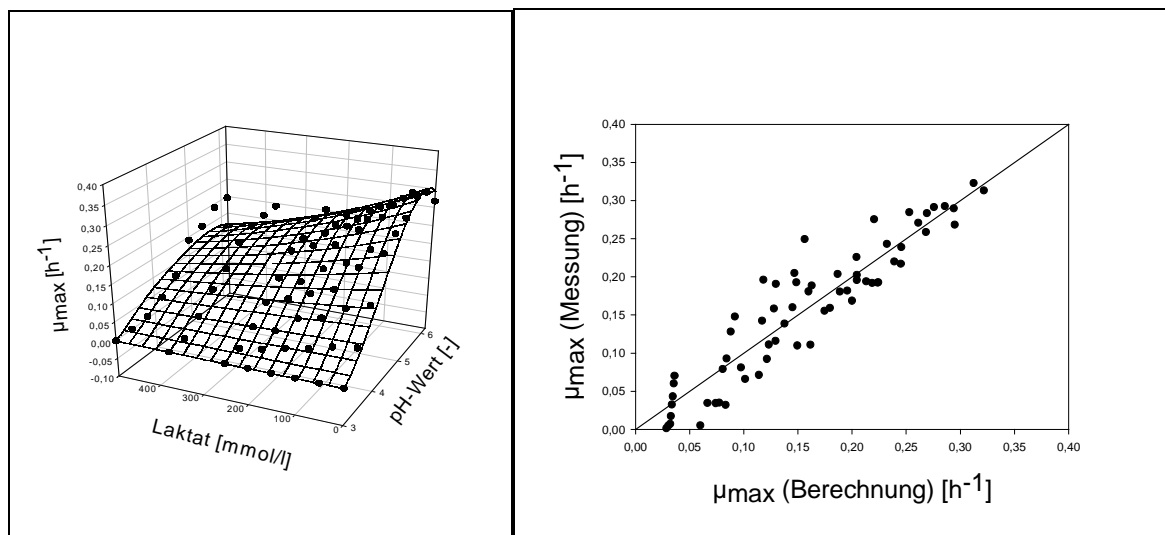


Abbildung 4.10-6 Anpassung an die maximalen Wachstumsraten von *L. pontis* TMW 1.109 bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlicher Konzentration an Milchsäure. Die Hemmung durch den pH-Wert wird mit einem Polynom 3. Grades, die durch Milchsäure mit der Funktion nach Levenspiel (Gl. 3-17) beschrieben.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,902$

Die Parameter die durch die Anpassung erhalten werden, sind in Tabelle 4.10-2 aufgeführt.

Tabelle 4.10-2 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-6

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,47	[h <sup>-1</sup> ]
$a_{\text{pH}}$	2,5	[-]
$b_{\text{pH}}$	-2,3	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,63	[-]
$d_{\text{pH}}$	-0,05	[-]
$\alpha$	$3,9 \cdot 10^4$	[-]
$C_{\max}$	$2,1 \cdot 10^6$	[mmol/l]

Um das Wachstum des heterofermentativen Stammes mit dem des homofermentativen vergleichen zu können, wurde eine analoge Untersuchung mit dem Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 durchgeführt. Abbildung 4.10-7 zeigt zunächst die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit der beiden Größen pH-Wert und Konzentration der Milchsäure.

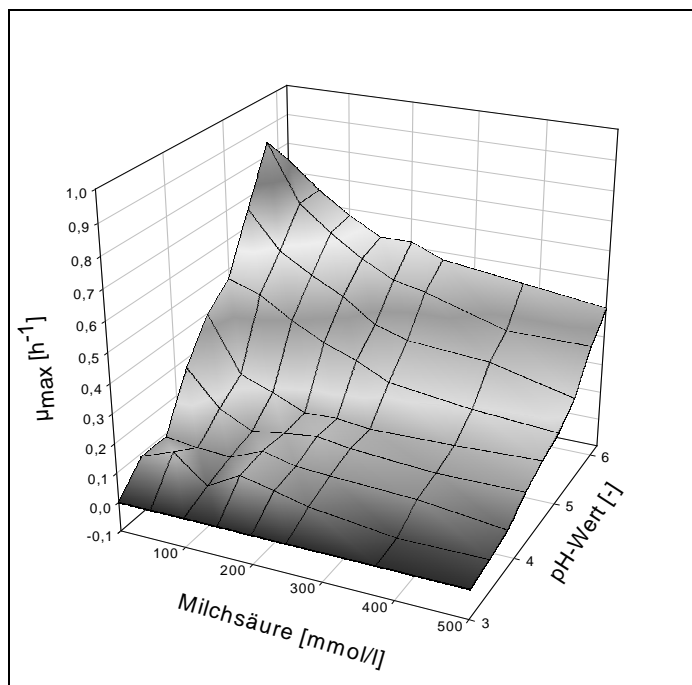


Abbildung 4.10-7 Maximale Wachstumsrate von *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert und Milchsäurekonzentration.

In Abbildung 4.10-8 A wird wiederum das Ergebnis einer Anpassung gezeigt, bei der kubische Polynome zur Beschreibung der Hemmungen verwendet wurden. In Abbildung 4.10-8 B ist zu erkennen, daß bei Wachstumsraten von ca.  $0,2 \text{ h}^{-1}$  und bei sehr hohen Wachstumsraten die Berechnung von der Messung am stärksten abweicht. In den übrigen Bereichen liefert die Anpassung recht gute Werte. Dies drückt sich in einer vergleichsweise hohen Korrelation aus.

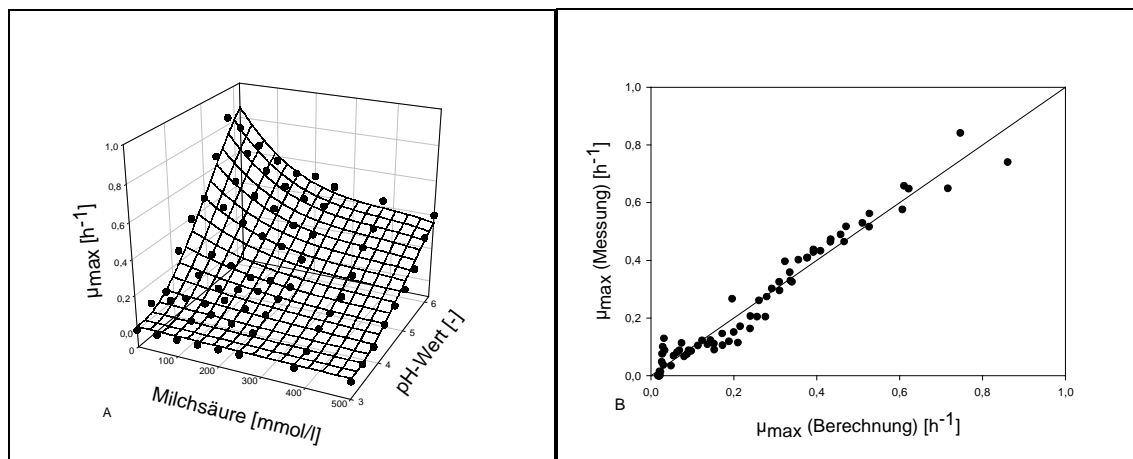


Abbildung 4.10-8 Anpassung an die maximalen Wachstumsraten von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlicher Konzentration an Milchsäure. Hemmung durch pH und Milchsäure werden je durch ein kubisches Polynom beschrieben (A) und Vergleich Messung Berechnung (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,959$

Tabelle 4.10-3 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-8

Parameter	Wert	
$m_y$	0,069	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{Lac}}$	7,1	[-]
$b_{\text{Lac}}$	-5,3	$[1/(\text{mmol/l})]$
$c_{\text{Lac}}$	1,2	$[1/(\text{mmol/l}^2)]$
$d_{\text{Lac}}$	-0,08	$[1/(\text{mmol/l}^3)]$
$a_{\text{pH}}$	5,6	[-]
$b_{\text{pH}}$	-0,021	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,0001	[-]
$d_{\text{pH}}$	0,0	[-]

In Abbildung 4.10-9 ist die Anpassung unter Verwendung eines kubischen Polynomes und der Funktion nach Levenspiel (Gl. 3-17) gezeigt.

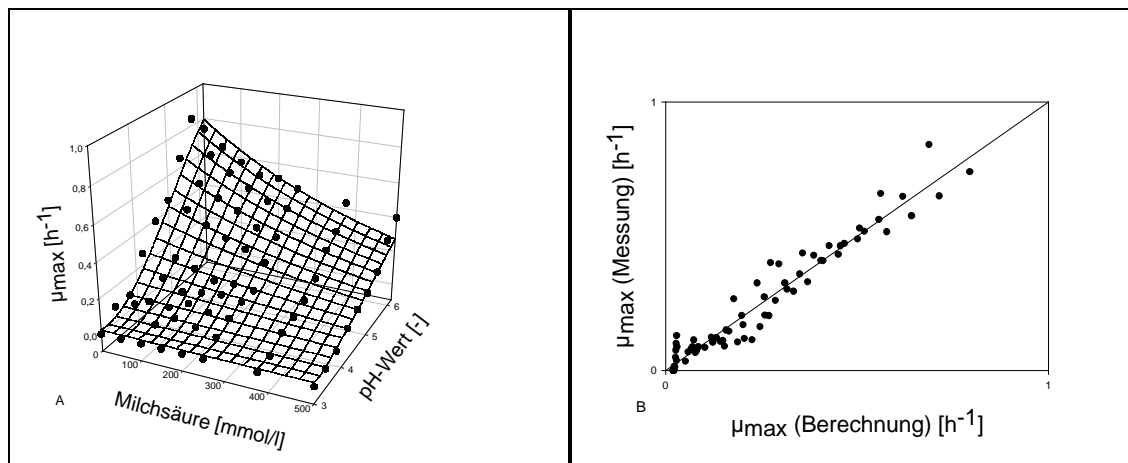


Abbildung 4.10-9 Anpassung an die maximalen Wachstumsraten von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlicher Konzentration an Milchsäure. Die Hemmung durch pH wird mit einem Polynom 3. Grades, die durch Milchsäure mit der Funktion nach Levenspiel beschrieben.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,943$

Tabelle 4.10-4 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.9-9

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,726	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{lac}}$	3,612	[-]
$b_{\text{lac}}$	-2,68	[-]
$c_{\text{lac}}$	0,618	[-]
$d_{\text{lac}}$	-0,0404	[-]
$\alpha$	$1,13 \cdot 10^5$	[-]
$C_{\max}$	$5,29 \cdot 10^7$	$[\text{mmol/l}]$

Mit diesen Parameteranpassungen steht nun eine Reihe von Funktionen zur Verfügung mit denen das Wachstum der Organismen in Abhängigkeit von pH-Wert und Milchsäurekonzentration abgeschätzt werden kann. In Kapitel 5 wird die Eignung dieser Funktionen verglichen und diskutiert.

### 4.10.3 Die Reaktion der Organismen auf Acetat

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, hängt die Bildung von Acetat stark vom Vorhandensein von Elektronenakzeptoren ab. Falls Elektronenakzeptoren vorhanden sind, steht den Organismen mehr Energie in Form von ATP zur Verfügung. Die gebildete Säure hat jedoch einen hemmenden Effekt auf die Organismen. Wachstumskurven von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei verschiedenen Konzentrationen von Acetat sind in Abbildung 4.10-10 dargestellt.

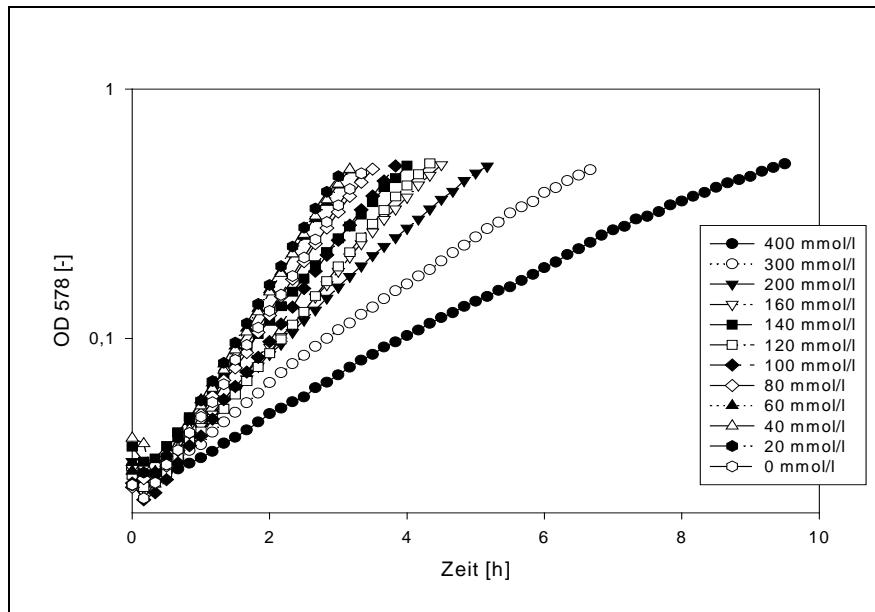


Abbildung 4.10-10 Wachstumskurven von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei steigender Acetatkonzentration.

Die daraus resultierenden maximalen Wachstumsraten zeigt Abbildung 4.10-11. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 5,4 durchgeführt.

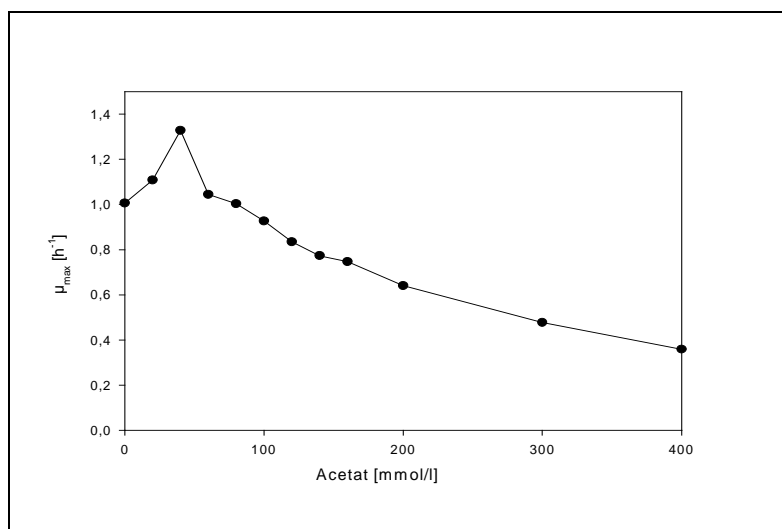


Abbildung 4.10-11 Wachstum von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei steigender Acetatkonzentration.



Nimmt man den pH-Wert als zweite Größe in die Untersuchung mit auf, kann, wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben, der unterschiedliche Dissoziationsgrad der Säure mit berücksichtigt werden. Das Ergebnis der Messungen für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 ist in Abbildung 4.10-12 abgebildet.

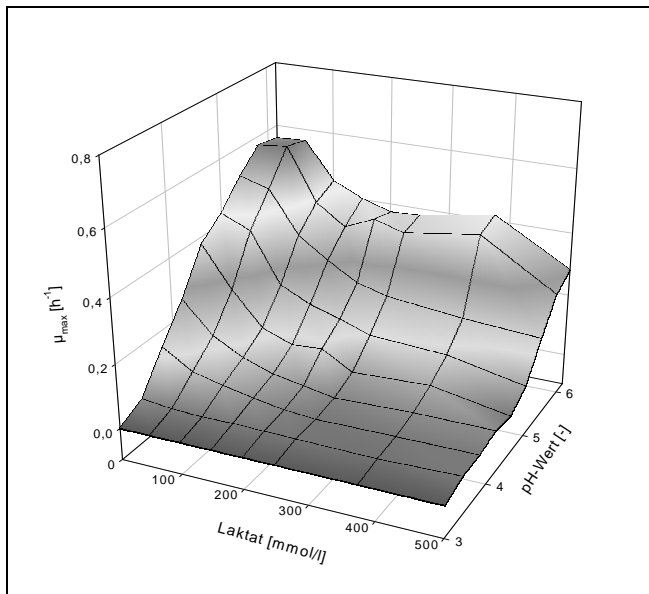


Abbildung 4.10-12 Wachstum von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von pH-Wert und Essigsäure

Entsprechend dem Vorgehen zur Untersuchung der Hemmung durch Milchsäure wurden wiederum Anpassungen an die erhaltenen Meßdaten durchgeführt. In Abbildung 4.10-13 ist eine Anpassung zu sehen, in der zwei kubische Polynome zugrunde gelegt wurden.

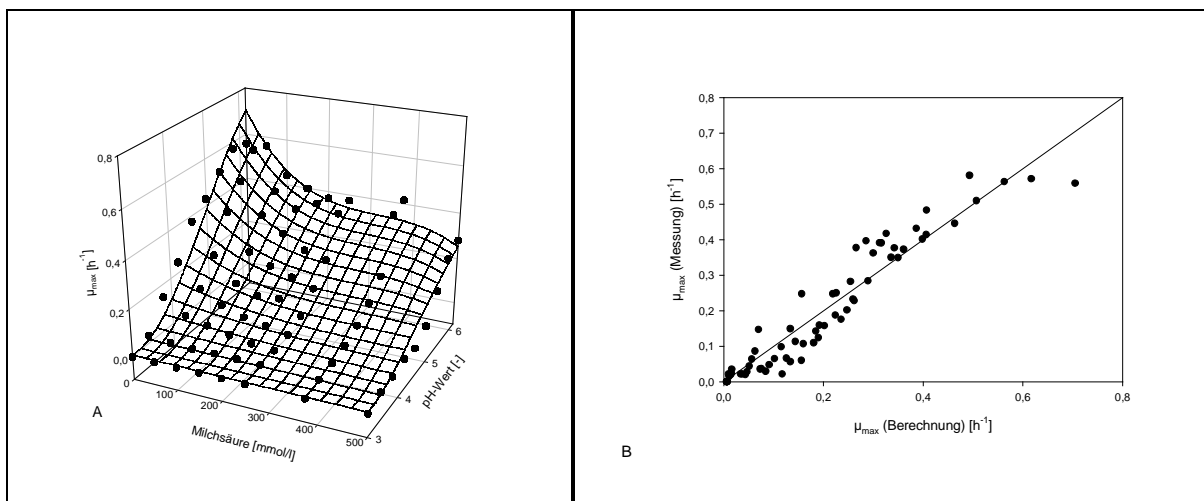


Abbildung 4.10-13 Anpassung an die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von pH-Wert und Lactat für *L. pontis* TMW 1.109 (A). Verwendung je eines kubischen Polynoms zur Beschreibung der Hemmung durch den pH-Wert und durch undissoziierte Essigsäure. Vergleich Messung und Berechnung (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,924$

Tabelle 4.10-5 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-13

Parameter	Wert	
$\mu_y$	0,0799	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{ace}}$	7,04	[-]
$b_{\text{ace}}$	-5,30	$[\text{1}/(\text{mmol/l})]$
$c_{\text{ace}}$	1,23	$[\text{1}/(\text{mmol/l})^2]$
$d_{\text{ace}}$	-0,0820	$[\text{1}/(\text{mmol/l})^3]$
$a_{\text{pH}}$	4,39	[-]
$b_{\text{pH}}$	-0,0208	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,0001	[-]
$d_{\text{pH}}$	0,0	[-]

Für die in Abbildung 4.10-14 dargestellte Anpassung wurde wiederum das kubische Polynom zur Beschreibung der Hemmung durch Acetat durch die Funktion nach Levenspiel (Gl. (3-17)) ersetzt.

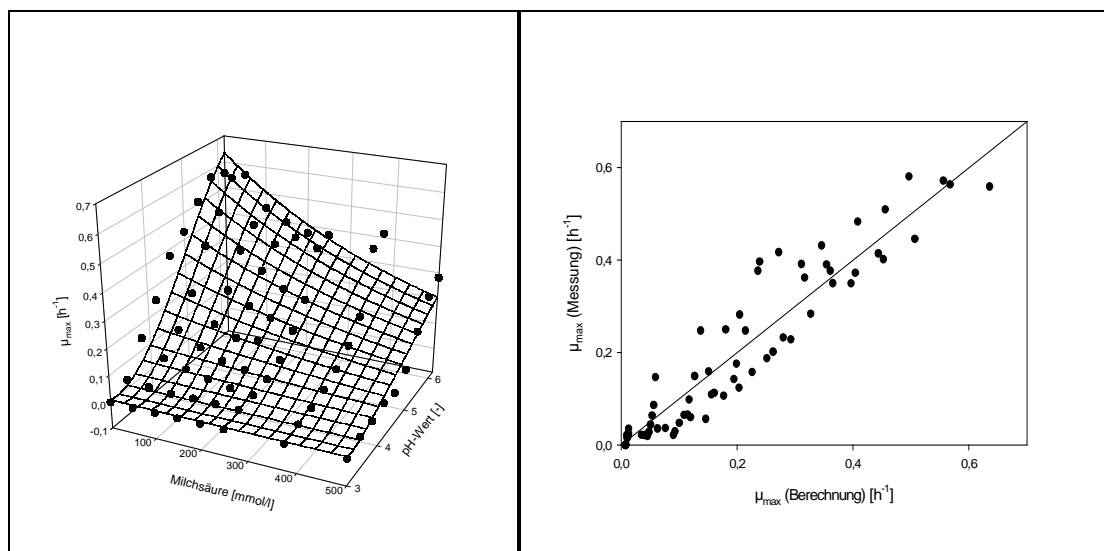


Abbildung 4.10-14 Anpassung an die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von pH-Wert und Lactat für *L. pontis* TMW 1.109. Verwendung eines kubischen Polynoms zur Beschreibung der Hemmung durch den pH-Wert und der Funktion nach Levenspiel zur Beschreibung der Hemmung durch undissoziierte Essigsäure.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,902$

Tabelle 4.10-6 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-14

Parameter	Wert	
$\mu_{\text{max}}$	0,676	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{pH}}$	3,47	[-]
$b_{\text{pH}}$	-2,59	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,599	[-]
$d_{\text{pH}}$	-0,0398	[-]
$C_{\text{max}}$	$2,80 \cdot 10^4$	$[\text{mmol/l}]$
$\alpha$	$1,23 \cdot 10^7$	[-]

Der homofermentative Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 verhält sich bei Variation der beiden Größen pH-Wert und Acetat wie in Abbildung 4.10-15 dargestellt.

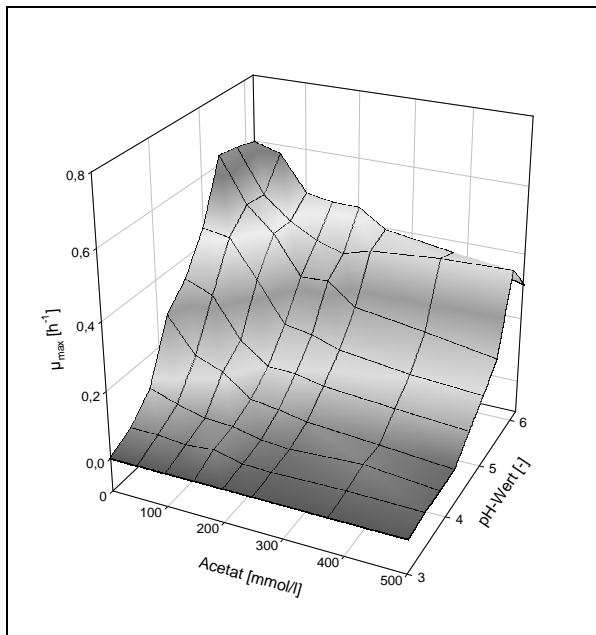


Abbildung 4.10-15 Wachstum von *L. pontis* TMW 1.661 in Abhängigkeit von pH-Wert und Essigsäure

Auch in diesem Fall wurde zunächst eine Anpassung vorgenommen, der zwei kubische Polynome zugrunde liegen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.10-16 zu sehen.

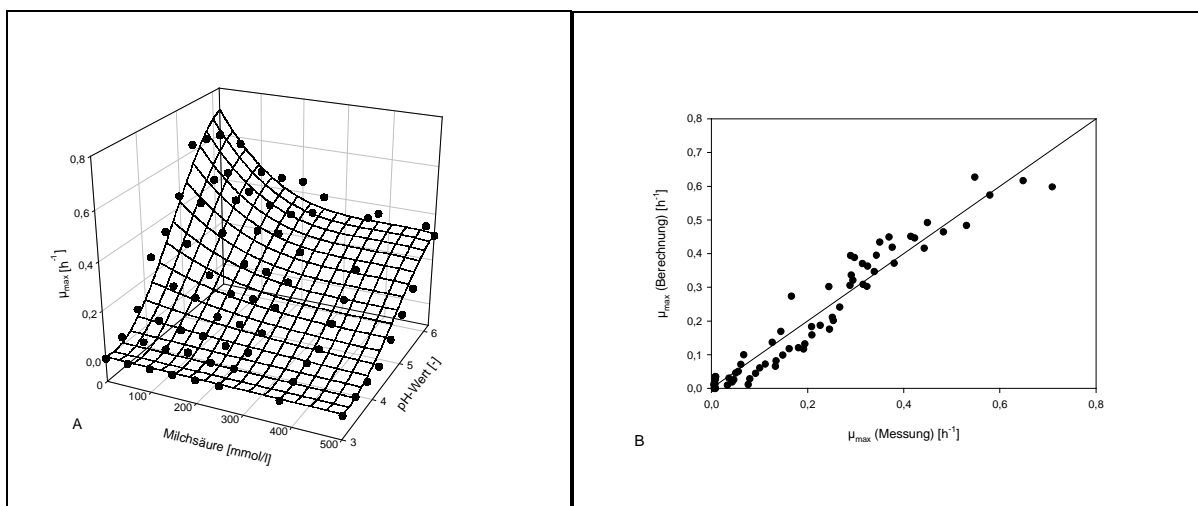


Abbildung 4.10-16 Anpassung an die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von pH und Lactat für *L. amylovorus* TMW 1.661. Verwendung je eines kubischen Polynoms zur Beschreibung der Hemmung durch den pH-Wert und durch undissoziierte Essigsäure.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,942$

Tabelle 4.10-7 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-16

Parameter	Wert	
$\mu_y$	0,0927	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{ace}}$	6,985	[-]
$b_{\text{ace}}$	-5,25	$[1/(\text{mmol/l})]$
$c_{\text{ace}}$	1,23	$[1/(\text{mmol/l})^2]$
$d_{\text{ace}}$	-0,0853	$[1/(\text{mmol/l})^3]$
$a_{\text{pH}}$	5,35	[-]
$b_{\text{pH}}$	-0,0224	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,0001	[-]
$d_{\text{pH}}$	0,0	[-]

Setzt man wiederum die Funktion nach Levenspiel (Gl. 3.17) ein, ergibt sich eine Anpassung wie in Abbildung 4.10-17 dargestellt.

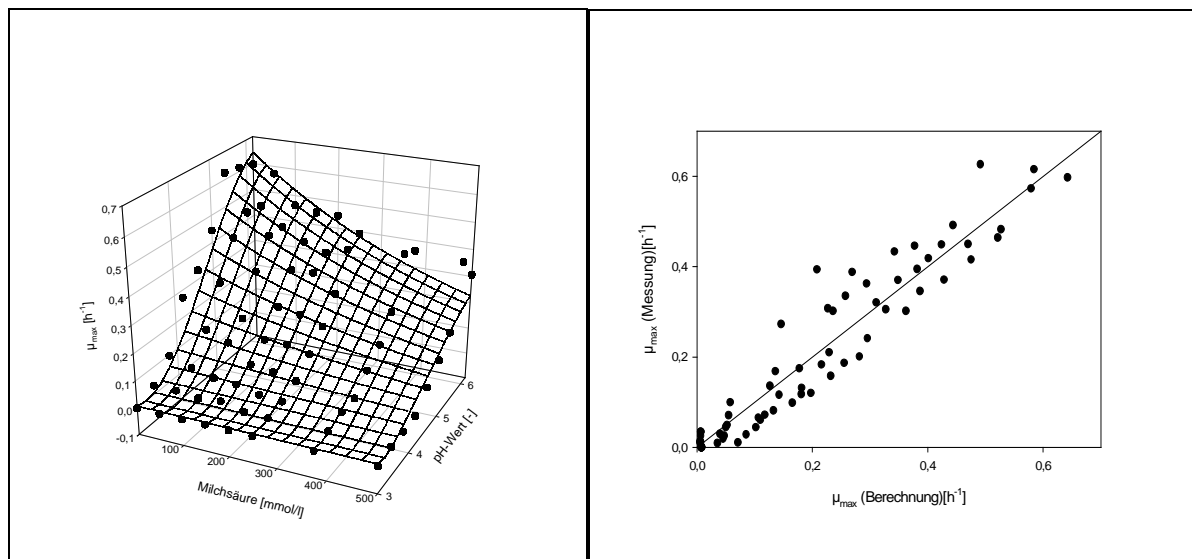


Abbildung 4.10-17 Anpassung an die maximale Wachstumsrate in Abhängigkeit von pH-Wert und Lactat für *L. amylovorus* TMW 1.661. Verwendung eines kubischen Polynoms zur Beschreibung der Hemmung durch den pH-Wert und der Funktion nach Levenspiel zur Beschreibung der Hemmung durch undissoziierte Essigsäure.

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,916$

Tabelle 4.10-8 Errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.10-17

Parameter	Wert	
$\mu_y$	0,906	$[\text{h}^{-1}]$
$a_{\text{pH}}$	3,48	[-]
$b_{\text{pH}}$	-2,60	[-]
$c_{\text{pH}}$	0,607	[-]
$d_{\text{pH}}$	-0,0419	[-]
$C_{\text{max}}$	$3,82 \cdot 10^4$	$[\text{mmol/l}]$
$\alpha$	$1,82 \cdot 10^7$	[-]

Die im Vorangegangenen entwickelten Möglichkeiten zur Abschätzung des Wachstums der Organismen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Konzentration der Essigsäure werden im Kapitel 5 eingehend diskutiert und verglichen.

#### 4.11 Das Verhalten der Organismen bei unterschiedlichen Temperaturen

Durch die im Abschnitt 2.11.7 beschriebenen Versuche wurde das Verhalten der Organismen bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Von Interesse war dabei das Wachstum der Stämme *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661 und deren Stoffwechsel. Außerdem wurde das Verhalten industriell verwendeter Startergemische bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht.

In Abbildung 4.11-1 sind Wachstumskurven von *L. pontis* TMW 1.109 bei verschiedenen Temperaturen zu sehen. In der halblogarithmischen Auftragung ist zu erkennen, daß die Steigung der Kurven in der Anfangsphase der Fermentation, in der noch keine anderweitigen limitierenden Faktoren vorhanden sind, stark von der Temperatur abhängen.

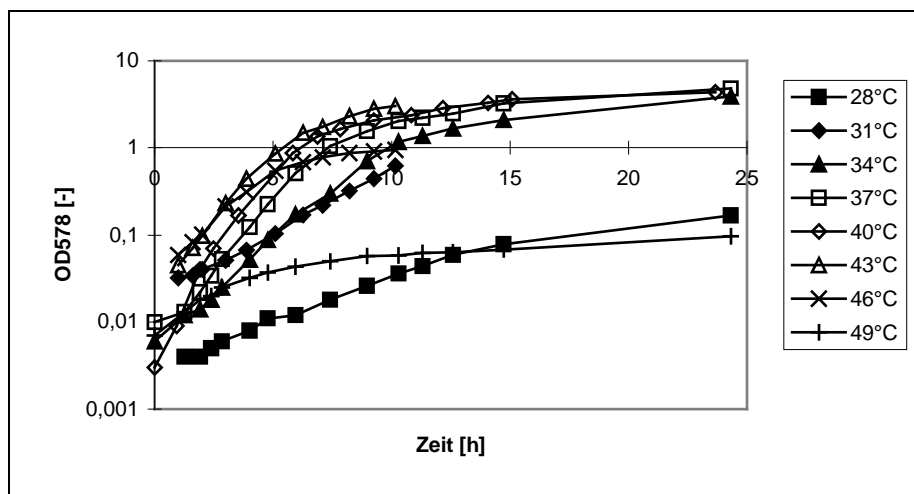


Abbildung 4.11-1 Zunahme der optischen Dichte bei einem konstantem pH-Wert von 5,4 in Spicher Medium *L. pontis* TMW 1.109). Bei 52 °C war kein Wachstum mehr meßbar.

Die gleiche Versuchsreihe wurde für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.11-2 dargestellt.

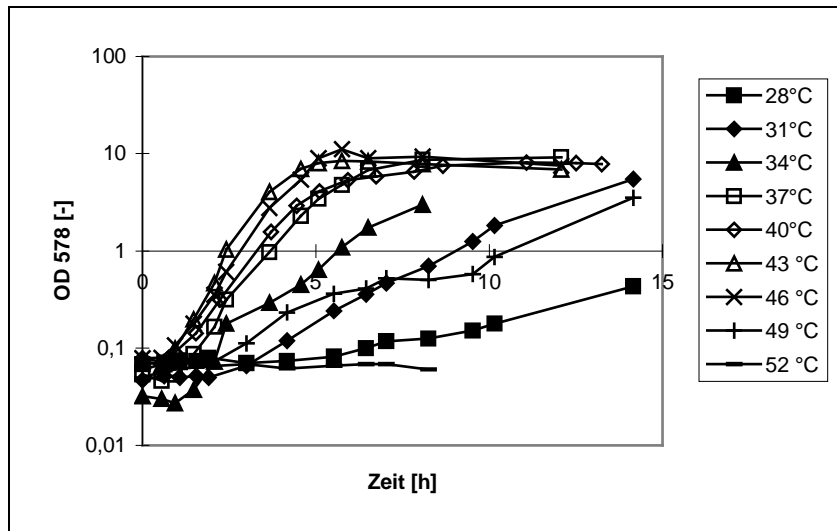


Abbildung 4.11-2 Zunahme der optischen Dichte bei einem konstantem pH-Wert von 5,4 in Spicher Medium *L. amylovorus* TMW 1.661

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde Gleichung (3-17) verwendet und die maximale Wachstumsrate ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11-1 aufgelistet.

Tabelle 4.11-1 Wachstumsraten von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur	$\mu_{max}$ , <i>L. pontis</i> TMW 1.109	$\mu_{max}$ , <i>L. amylovorus</i> TMW 1.661
29	0,26 [h <sup>-1</sup> ]	0,24 [h <sup>-1</sup> ]
31	0,35 [h <sup>-1</sup> ]	0,50 [h <sup>-1</sup> ]
34	0,69 [h <sup>-1</sup> ]	0,86 [h <sup>-1</sup> ]
37	0,70 [h <sup>-1</sup> ]	1,43 [h <sup>-1</sup> ]
40	0,81 [h <sup>-1</sup> ]	1,50 [h <sup>-1</sup> ]
43	0,78 [h <sup>-1</sup> ]	1,91 [h <sup>-1</sup> ]
46	0,67 [h <sup>-1</sup> ]	1,74 [h <sup>-1</sup> ]
49	0,36 [h <sup>-1</sup> ]	0,76 [h <sup>-1</sup> ]
52	0,00 [h <sup>-1</sup> ]	0,00 [h <sup>-1</sup> ]

Werden diese Werte graphisch, wie in Abbildung 4.11-3 und Abbildung 4.11-4 aufgetragen, wird erkennbar, daß *L. amylovorus* TMW 1.661 ein höheres aber engeres Maximum aufweist.

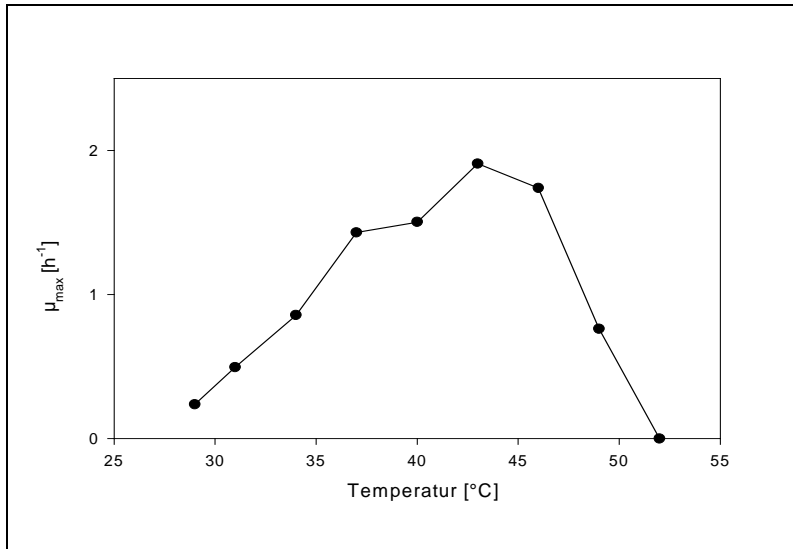


Abbildung 4.11-3 Die maximale Wachstumsrate von *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit von der Temperatur.

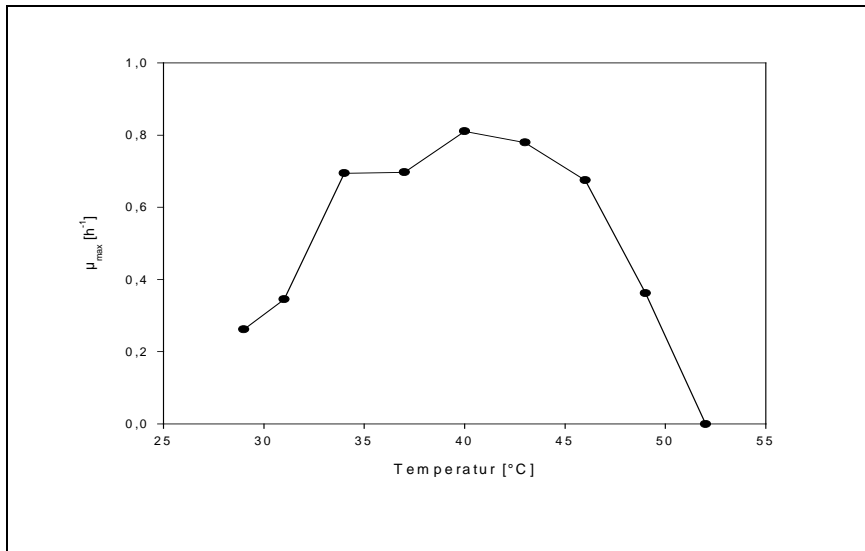


Abbildung 4.11-4 Die maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von der Temperatur.

Diese Werte wurden im folgenden Abschnitt dazu verwendet, um die in der Literatur beschriebenen Funktionen zu testen. In Kapitel 3.7.4 sind verschiedene Funktionen angegeben, die verwendet werden, um das Verhalten der Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Temperatur zu beschreiben. In Abbildung 4.11-5a ist die Anpassung an ein kubisches Polynom gezeigt. Abbildung 4.11-5b stellt einen Vergleich der gemessenen Daten und der vom polynomischen Modell errechneten Daten dar. Es ist ersichtlich, daß die Streuung bei höheren Werten zunimmt. Tabelle 4.11-2 listet die zu diesem Modell gehörigen Parameter auf.

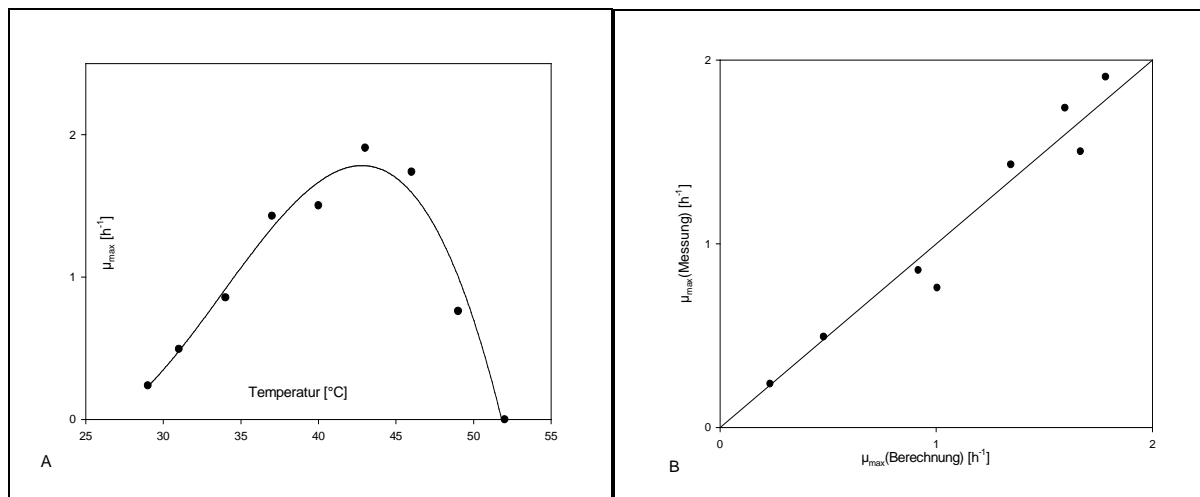


Abbildung 4.11-5 Anpassung durch ein Polynom nach Dossman. *L. amylovorus* TMW 1.661(A). Vergleich Messung-Berechnung (B)

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,962$

Tabelle 4.11-2 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-5

Parameter	Wert	
a	19,2	$[h^{-1}]$
b	-1,93	$[1/^{\circ}C]$
c	0,0616	$[1/^{\circ}C^2]$
d	-0,0006	$[1/^{\circ}C^3]$

Die gleiche Anpassung wurde für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.11-6 dargestellt. Eine Zunahme der Streuung bei höheren Wachstumsraten ist in diesem Fall nicht feststellbar.

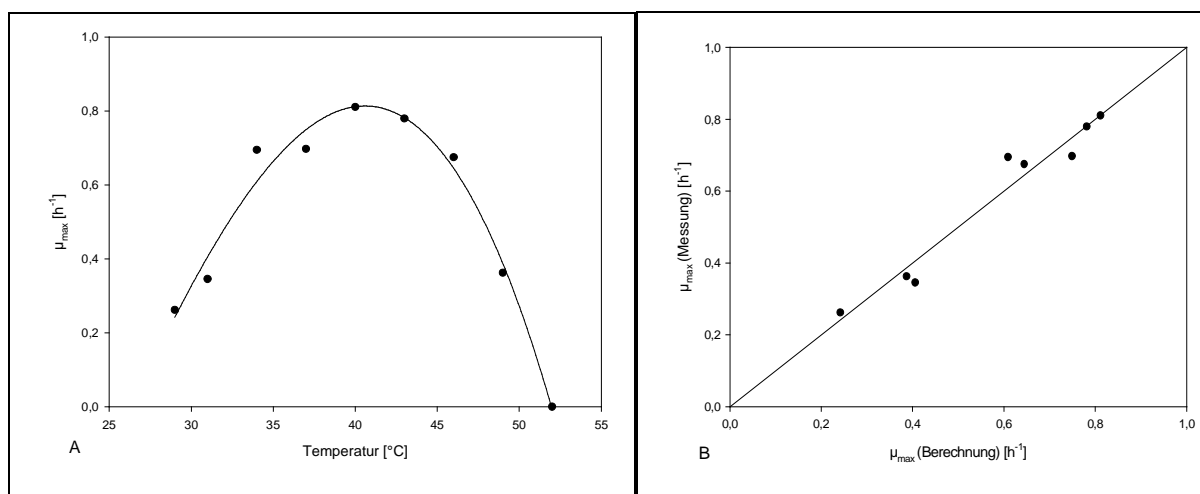


Abbildung 4.11-6 Anpassung durch ein Polynom nach Dossman. *L. pontis* TMW 1.109(A). Vergleich Messung, Berechnung (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,975$



Tabelle 4.11-3 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-6

Parameter	Wert	
a	-1.95	[h <sup>-1</sup> ]
b	-0.0101	[1/°C]
c	0.0055	[1/°C <sup>2</sup> ]
d	-0.0001	[1/°C <sup>3</sup> ]

Die Funktion (3-36) nach Bellgardt liefert ein Ergebnis wie in Abbildung 4.11-7 dargestellt. Die Korrelation ist etwas geringer als bei den vorhergehenden Anpassungen.

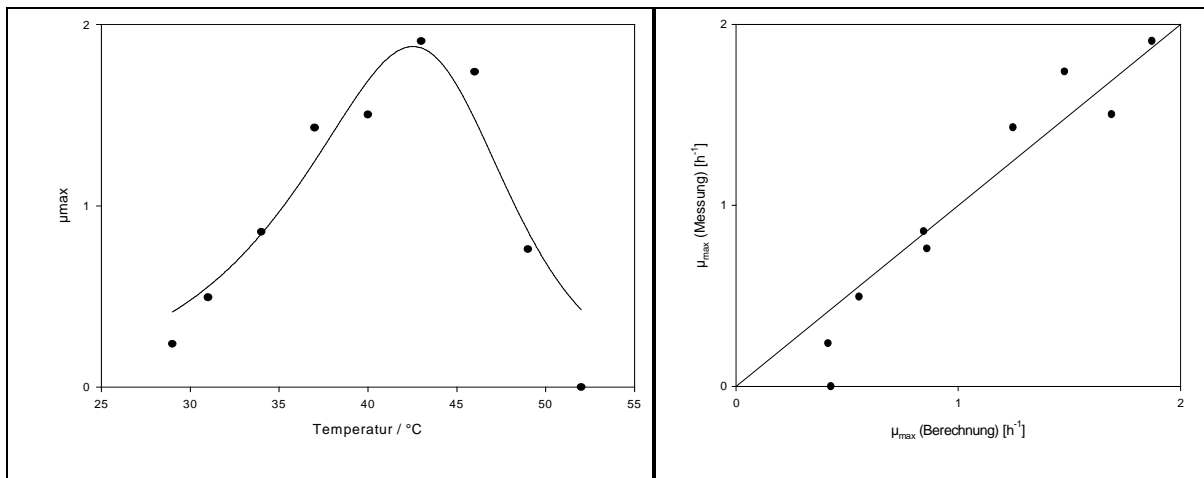


Abbildung 4.11-7 Anpassung durch die Funktion nach Bellgardt. *L. amylovorus* TMW 1.661(A). Vergleich Berechnung, Messung (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,902$

Tabelle 4.11-4 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-7

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	185	[h <sup>-1</sup> ]
K1	410	[-]
K2	$1,88 \cdot 10^8$	$10^8$ [-]
H1	111	[mol/J]
H2	3,41	[mol/J]

Die Daten, die mit dem Stamm *L. pontis* TMW 1.109 aufgenommen wurden, liefern bei Anpassung der Funktion nach Bellgardt das in Abbildung 4.11-8 dargestellte Ergebnis.

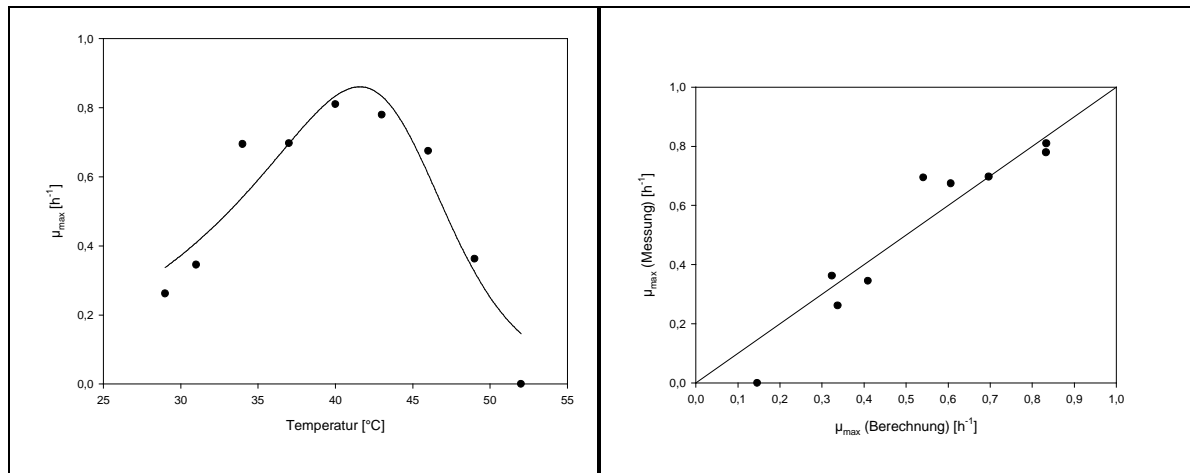


Abbildung 4.11-8 Anpassung durch die Funktion nach Bellgardt. *L. pontis* TMW 1.109(A). Vergleich Messung, Berechnung (B).

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,898$

Tabelle 4.11-5 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-8

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,079	$[h^{-1}]$
K1	0,316	[-]
K2	$3,76 \cdot 10^7$	[-]
H1	74,4	$[mol/J]$
H2	3,38	$[mol/J]$

Die Gleichung (3-38) nach Zwietering führt für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 zu einem Ergebnis wie in Abbildung 4.11-9 gezeigt.

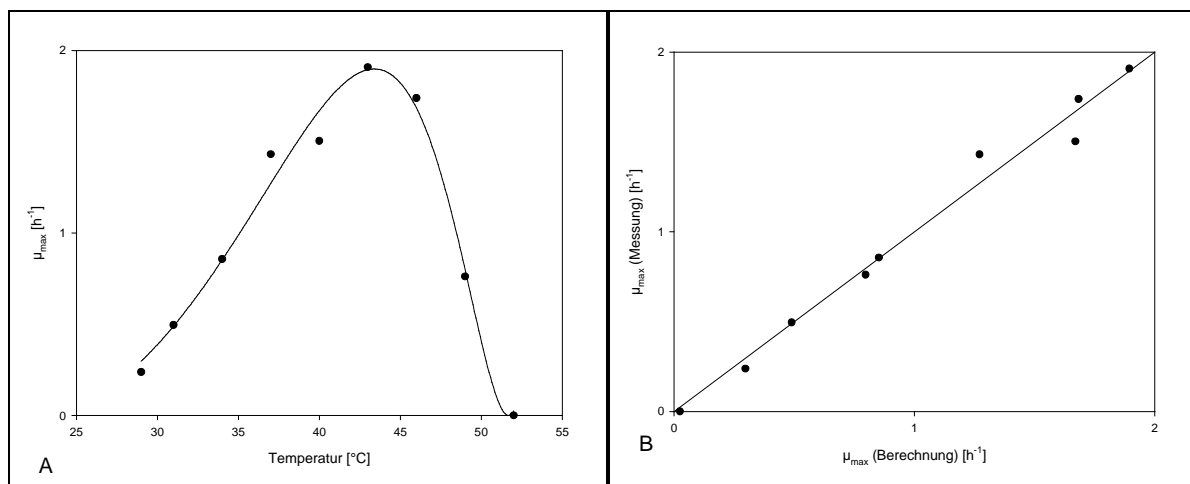


Abbildung 4.11-9 Anpassung durch die Funktion nach Zwietering. *L. amylovorus* TMW 1.661

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,983$

Tabelle 4.11-6 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-9

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,075	[h <sup>-1</sup> ]
a	0,29	[-]
b	0,20	[-]
T <sub>min</sub>	22,1	[°C]
T <sub>max</sub>	51,7	[°C]

Auch für die Ergebnisse mit *L. pontis* TMW 1.109 ist die Gleichung nach Zwietering recht gut zur Anpassung geeignet, wie in Abbildung 4.11-10 dargestellt.

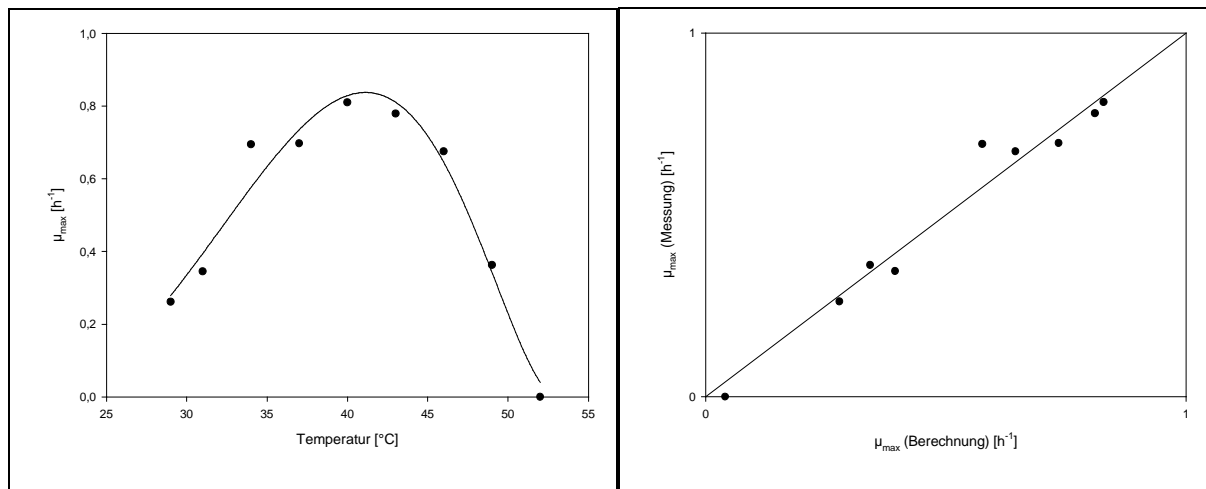


Abbildung 4.11-10 Anpassung durch die Funktion nach Zwietering. *L. pontis* TMW 1.109

Die Korrelation beträgt:  $R^2 = 0,964$

Tabelle 4.11-7 errechnete Parameter der Anpassung aus Abbildung 4.11-10

Parameter	Wert	
$\mu_{\max}$	0,056	[h <sup>-1</sup> ]
a	0,284	[-]
b	0,086	[-]
T <sub>min</sub>	20,02	[°C]
T <sub>max</sub>	53,14	[°C]

Zusätzlich wurde untersucht, ob sich Tendenzen im Glucoseverbrauch der Organismen feststellen lassen. Dazu wurde bei verschiedenen Temperaturen die gebildete Zellmasse gemessen und in Relation zur verbrauchten Glucose gesetzt. Für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 ergibt sich das in Abbildung 4.11-11 gezeigte Resultat.

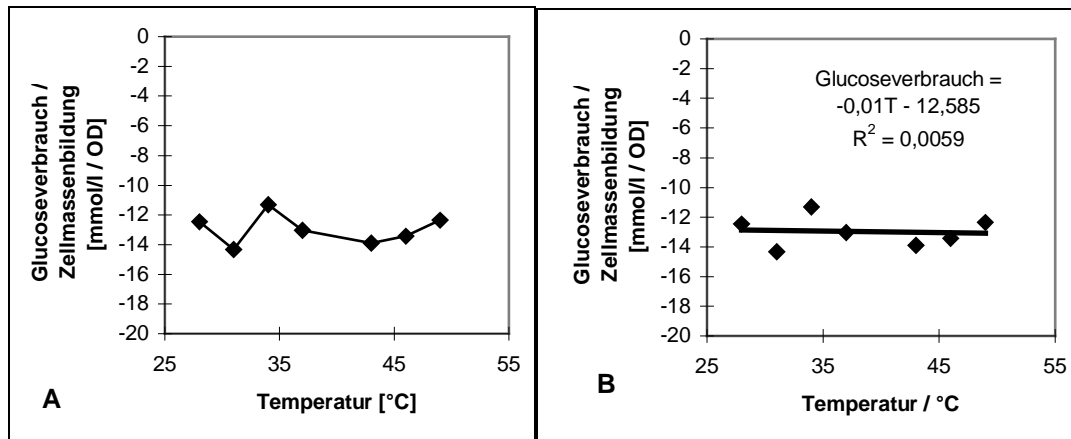


Abbildung 4.11-11 Glucoseverbrauch pro gebildeter Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur. *L. amylovorus* TMW 1.661. A: Meßwerte, B: Korrelationsanalyse.

Diese Werte zeigen keine eindeutige Tendenz. In Abbildung 4.11-12 werden die entsprechenden Ergebnisse für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 gezeigt. Hier ist ebenfalls keine eindeutige Tendenz erkennbar. In beiden Fällen bedeutet dies, daß die Zellausbeute der Organismen über einen weiten Temperaturbereich konstant ist.

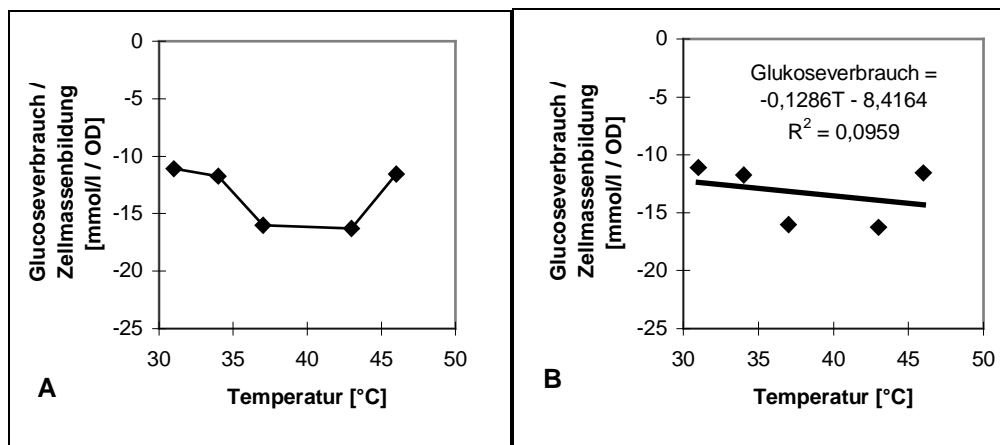


Abbildung 4.11-12 Glucoseverbrauch pro gebildeter Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur. *L. pontis* TMW 1.109. A: Meßwerte, B: Korrelationsanalyse.

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Milchsäurebildung pro gebildeter Zellmasse. Das Ergebnis ist für *L. amylovorus* TMW 1.661 ebenfalls ein Verlauf, aus dem keine eindeutige Tendenz zu schließen ist.

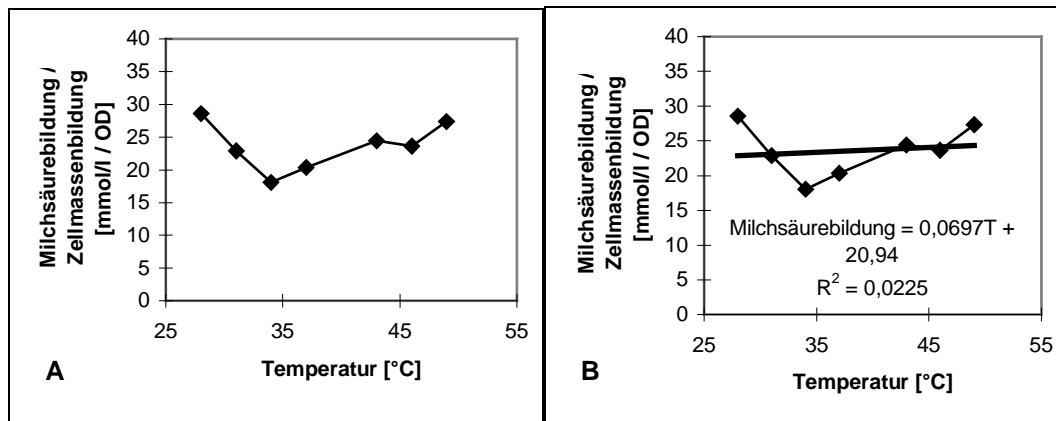


Abbildung 4.11-13 Lactatbildung pro gebildeter Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur. *L. amylovorus* TMW 1.661. A: Meßwerte, B: Korrelationsanalyse.

Der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 zeigt ähnliches Verhalten (Abbildung 4.11-14).

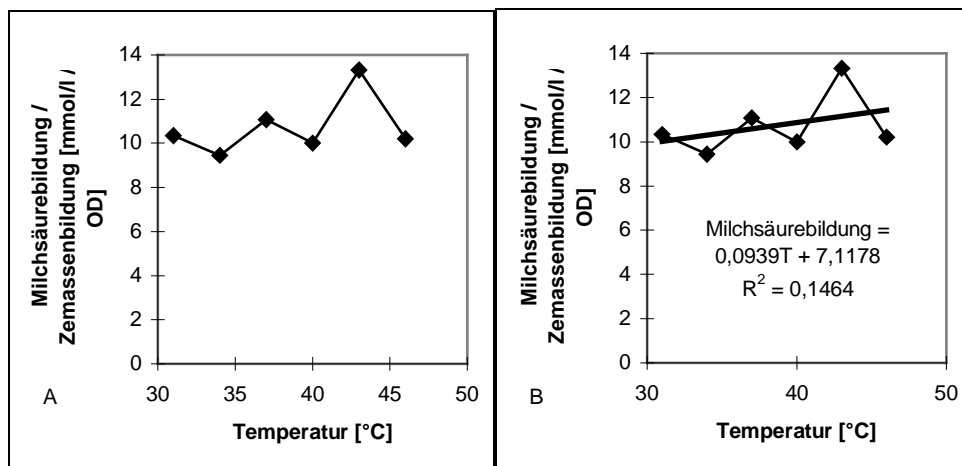


Abbildung 4.11-14 Lactatbildung pro gebildeter Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur. *L. pontis* TMW 1.109. A: Meßwerte, B: Korrelationsanalyse.

Die Milchsäurebildung ist demnach ebenso wie die Zellausbeute über einen weiten Temperaturbereich konstant.

Als letzte die Temperatur betreffende Untersuchung werden Ergebnisse von Fermentationen gezeigt, die in Kleie-Medium durchgeführt wurden. Hauptzweck derartiger Fermentationen ist die Bildung von Milchsäure. In Abbildung 4.11-15 ist zu erkennen, daß die Bildung von Milchsäure zu Beginn der Fermentation mit steigender Temperatur rascher erfolgt. Sie kommt bei 46 °C jedoch rascher zum Erliegen. Daher wird das höchste Endniveau bei einer Temperatur von 40 °C erreicht.

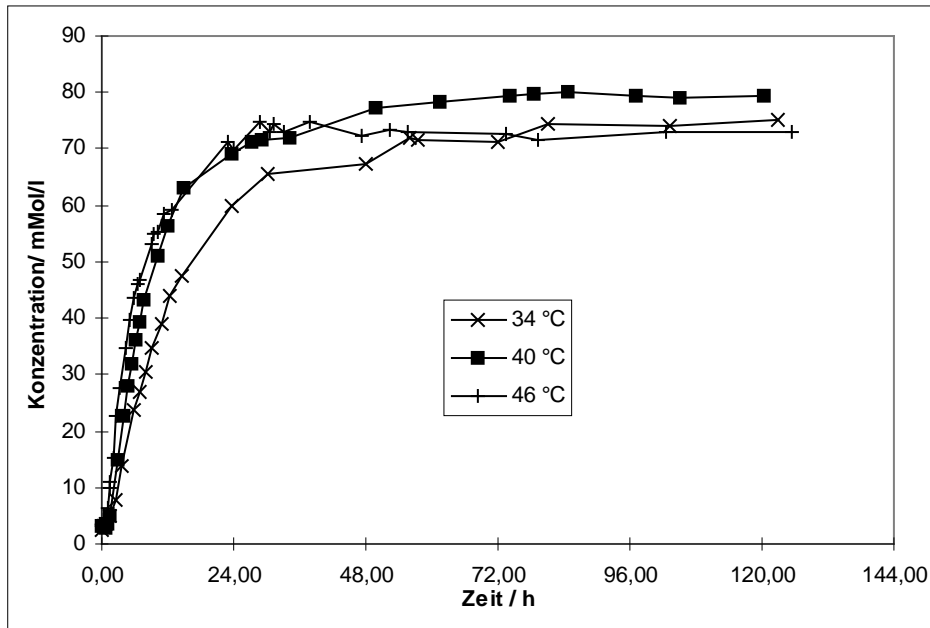


Abbildung 4.11-15 Milchsäurebildung in Kleiefermentationen mit industriell verwendetem Starter. 34 °C: x; 40 °C: ■; 46 °C: +

Eine Temperaturerhöhung führt demnach zwar zu einer rascheren Bildung von Milchsäure, die Gesamtmenge an Milchsäure sinkt jedoch bei hohen Temperaturen. Eine Steigerung der Fermentationstemperatur führt also bis 46 °C zu einer rascheren Produktion von Milchsäure, jedoch nicht zu einer höheren Gesamtmenge.

#### 4.12 Der Einfluß von Sauerstoff

Sauerstoff hat einerseits einen hemmenden Einfluß auf die Organismen, andererseits kann er den Stoffwechsel der Heterofermentativen Organismen in Richtung der Bildung von Acetat verschieben, indem Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet wird. Sobald er als Elektronenakzeptor nicht mehr vollständig umgesetzt werden kann, tauchen toxische Sauerstoffderivate (z.B.  $H_2O_2$ ) auf.

Bei Fermentationen unter dem Einfluß von Sauerstoff spielt neben der zur Verfügung stehenden Menge an Sauerstoff auch die Geschwindigkeit des Eintrags eine Rolle. Dies wird durch die Austauschfläche und die Bewegung des Mediums (Rühren, Schütteln) bestimmt. Fermentiert man in abgeschlossenen Gefäßen, in denen die gesamte Menge an Sauerstoff gleich ist, hat die Schüttelgeschwindigkeit einen wesentlichen Einfluß.

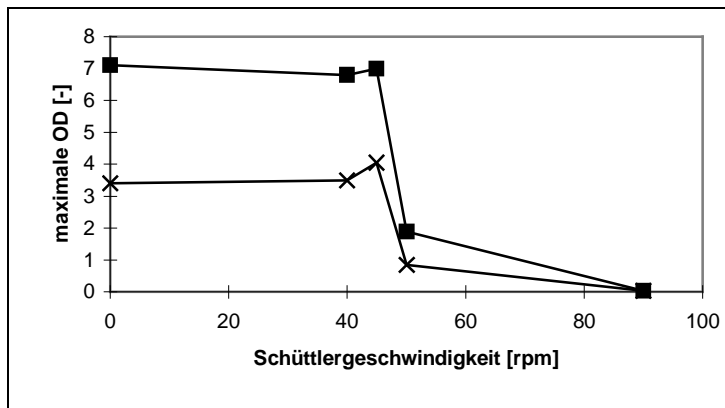


Abbildung 4.12-1 Optische Dichte nach 24 h in geschlossenen Gefäßen bei steigender Schüttelfrequenz. Verwendete Stämme: *L. pontis* TMW 1.109 (x) und *L. amylovorus* 1.661 (■).

In Abbildung 4.12-1 ist zu erkennen, daß der Sauerstoff über der Fermenterbrühe kaum einen Effekt auf die Organismen ausübt, solange er nur langsam in das Medium eingetragen wird. Die Grenze ab der Sauerstoff hemmend wirkt, ist nach Abbildung 4.12-1 sehr eng. Für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 ergibt sich ein Anstieg der OD bis kurz vor einer starken Hemmung. Dies könnte daran liegen, daß Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet wird. Die mechanische Belastung durch das Schütteln führt bei diesen Drehzahlen zu keiner Beeinträchtigung des Zellwachstums.

Werden der homofermentative und der heterofermentative Organismus in Kleinfertmentationen mit und unter Ausschluß von Sauerstoff fermentiert, ergibt sich ein Verlauf wie in Abbildung 4.12-2 gezeigt.

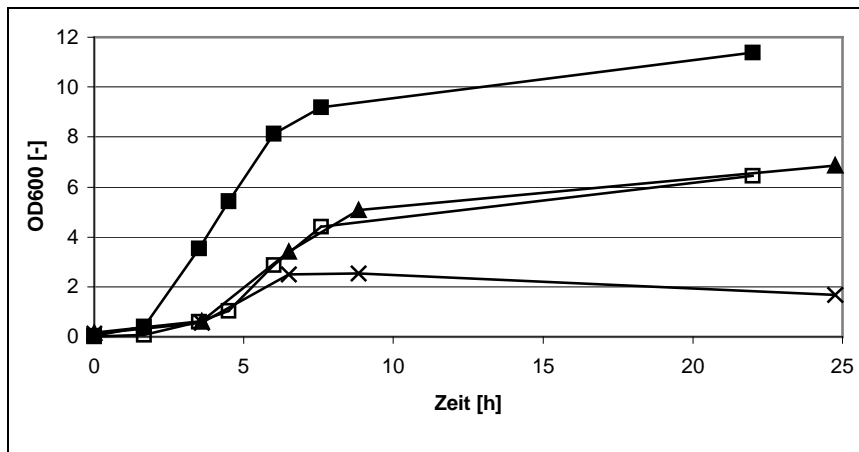


Abbildung 4.12-2 Vergleich des Wachstums aerob und anaerob für die Stämme *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* 1.661 (*L. amylovorus* 1.661 aerob: x; anaerob: ■; *L. pontis* TMW 1.109 aerob: □; anaerob: ▲;)

Man sieht hier deutlich, daß der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 von der eingetragenen Sauerstoffmenge kaum beeinflusst wird, daß *L. amylovorus* 1.661 im Gegensatz dazu einer starken Hemmung unterliegt.

In Abbildung 4.12-3 ist zusätzlich zum Wachstum der Einzelstämme und der Mischkultur die rechnerische Summe aus dem Wachstum der Einzelstämme aufgetragen. Würden die beiden Stämme in der Mischkultur unabhängig voneinander wachsen, müßte sich genau diese Wachstumskurve ergeben. Unter anaeroben Bedingungen (Abbildung B) liegt das tatsächliche Wachstum deutlich unter dieser Kurve. Unter aeroben Bedingungen (Abbildung A) ist jedoch das tatsächliche Wachstum in der Mischkultur größer als die rechnerische Summe der Einzelkulturen.

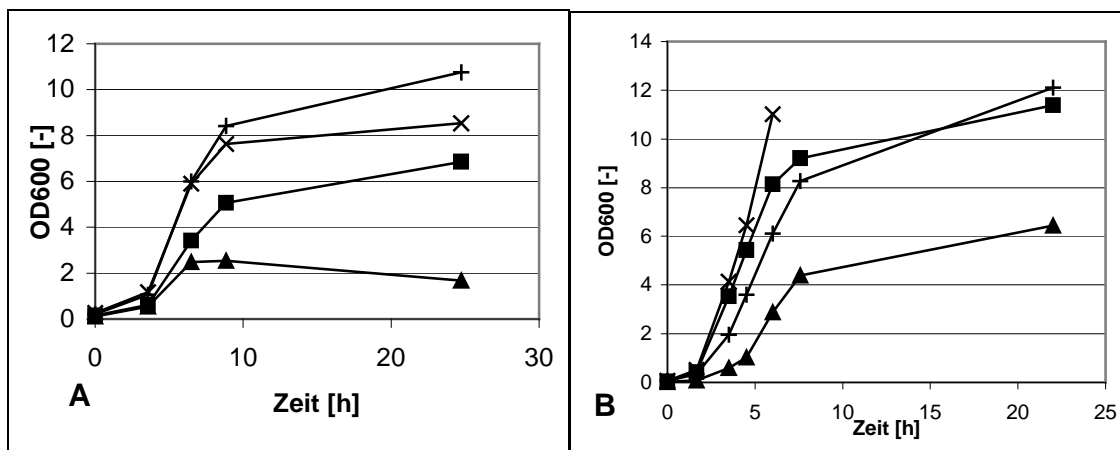


Abbildung 4.12-3 Wachstum der Stämme *L. amylovorus* TMW 1.661 (■) und *L. pontis* TMW 1.109 (▲) einzeln und in Mischkultur (+) unter aeroben (A) und anaeroben Bedingungen (B). Zusätzlich ist die rechnerische Summe der OD der Einzelkulturen aufgetragen (x).

Der Vergleich der Essigsäurebildung durch *L. pontis* TMW 1.109 mit und ohne Sauerstoff ist in Abbildung 4.12-4 dargestellt. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme bei Vorhandensein von



Sauerstoff. Bei einer Fermentation mit Sauerstoff und einer Mischkultur aus *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* 1.661 ist die Acetatbildung genauso hoch wie in der Fermentation der Reinkultur von *L. pontis* TMW 1.109.

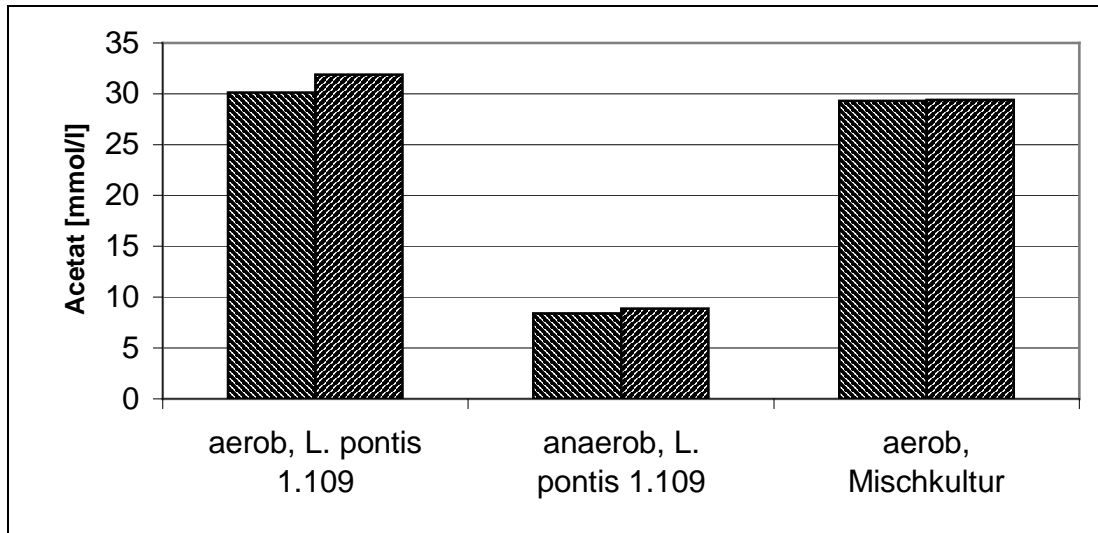


Abbildung 4.12-4 Bildung von Essigsäure mit und ohne Sauerstoff für Reinkultur und gemischte Population. Stämme *L. pontis* TMW 1.109 und *L. amylovorus* TMW 1.661.

### 4.13 Ionenstärke

Der Einfluß der Salzkonzentration auf *L. amylovorus* TMW 1.661 ist in Abbildung 4.13-1 dargestellt. Das maximale Wachstum nimmt bis zu einer Konzentration von 2,5 bis 3,0 % langsam an, um danach rasch auf null abzusinken.

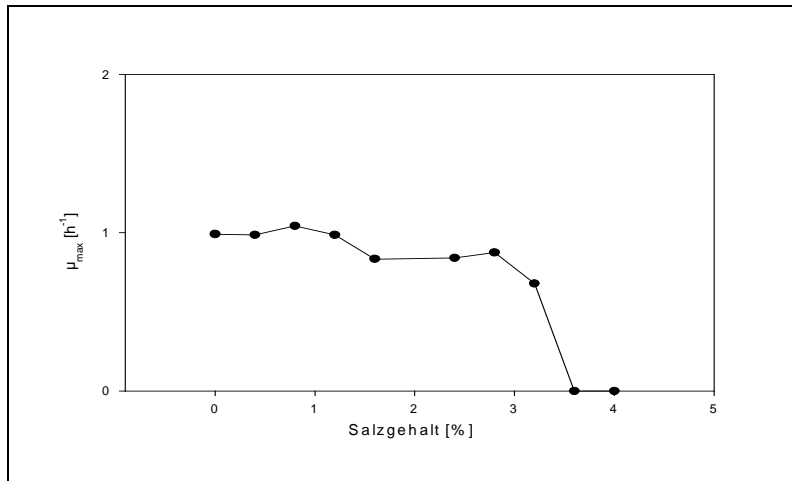


Abbildung 4.13-1 Maximale Wachstumsrate von *L. amylovorus* TMW 1.661 bei ansteigender Salzkonzentration.

Der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 ist, wie in Abbildung 4.13-2 dargestellt, wesentlich weniger empfindlich gegenüber Salz. Im relevanten Bereich bis 4 % sinkt die Wachstumsrate zwar ab, jedoch nicht vollständig auf null wie beim Homofermentativen Stamm.

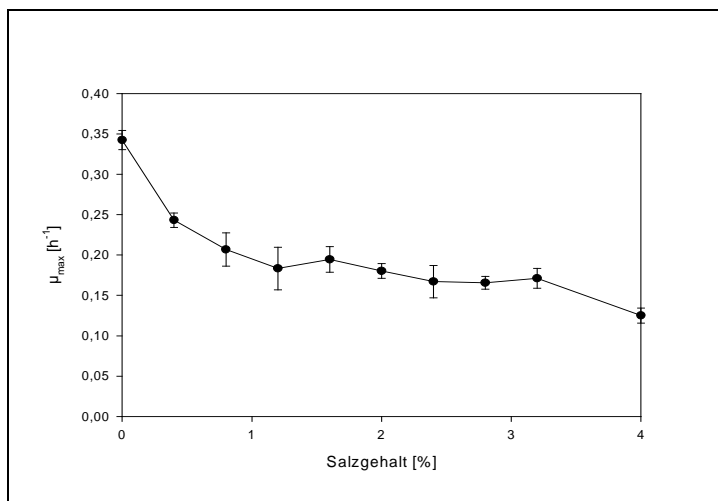


Abbildung 4.13-2 Maximale Wachstumsrate von *L. pontis* TMW 1.109 bei ansteigender Salzkonzentration.

Die Toleranz gegenüber Salz ist demnach bei Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 sehr hoch. Eine deutlich Verringerung des Wachstums ist erst bei hohen Salzkonzentrationen festzustellen. Der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 dagegen reagiert empfindlicher auf zugesetztes Salz. Eine Verringerung der Wachstumsrate ist bereits bei geringen Salzgehalten meßbar.

#### 4.14 ATP

Der ATP-Pool innerhalb der Zellen wurde in verschiedenen Fermentationen verfolgt, um seine Veränderungen während einer Fermentation zu erfassen, und seine Reaktion auf eine Veränderung des pH-Wertes herauszufinden.

Die Veränderung der ATP Konzentration während einer Fermentation ist in Abbildung 4.14-1 gezeigt. Der ATP-Wert ist bereits auf die vorhandene Zellmasse bezogen. Im Vergleich ist die Zunahme der Zellmasse anhand des Verlaufes der optischen Dichte dargestellt.

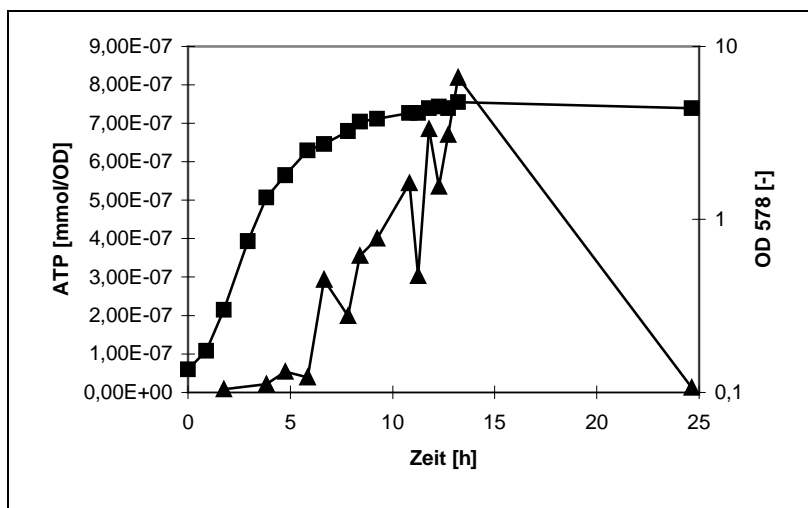


Abbildung 4.14-1 Zunahme der Zellmasse (■) und Veränderung des intrazellulären ATP-Gehaltes (▲) von *L. pontis* TMW 1.109 während einer Batch-Fermentation

Verschiedene Beobachtungen können an diesem Beispiel gemacht werden. Die ATP-Konzentration ist zu Beginn der Fermentation gering und steigt nur sehr langsam an. Nach ca. 6-8 Stunden steigt die ATP-Konzentration steil an. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Fermentation bereits am Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Der maximale ATP-Wert wird erst nach ca. 12 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fermentation in der stationären Phase. Während der stationären Phase nimmt dann der ATP-Wert bis auf einen geringen Wert ab. Bereits ohne Berechnungen wird daraus klar, daß die Höhe des ATP-Wertes und die aktuelle Wachstumsrate nicht direkt miteinander korrelieren. Somit kann das Wachstum der Zellen nicht als Funktion des ATP-Gehaltes beschrieben werden.

Das in Abbildung 4.14-2 gezeigte Diagramm zeigt Ergebnisse von Fermentation bei konstantem pH-Wert. Um die Auswirkung des pH-Wertes auf den ATP-Pool herauszufinden, wurde die

ATP-Konzentration bei drei parallel durchgeführten Fermentationen gemessen. Die Fermentationen wurden bei drei verschiedenen, jeweils konstanten pH-Werten durchgeführt.

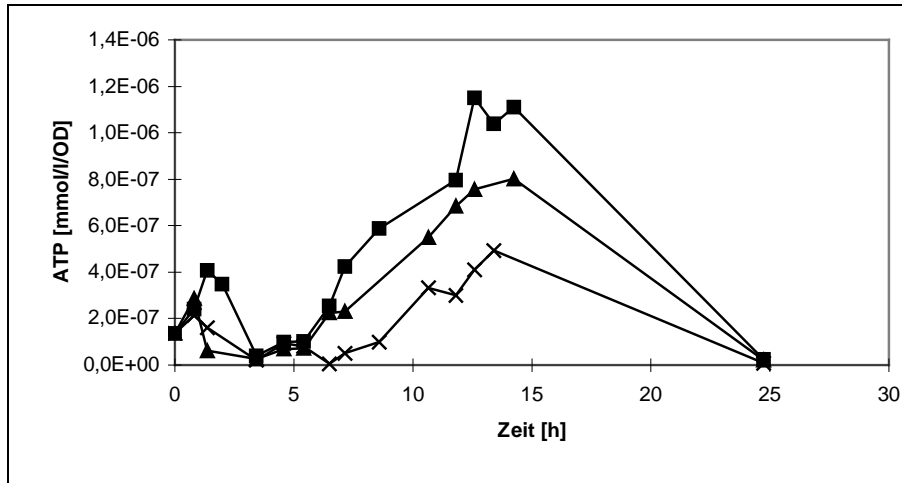


Abbildung 4.14-2 Intrazellulärer ATP-Gehalt von *L. pontis* TMW 1.109 während Batch-Fermentationen bei unterschiedlichen pH-Werten: 5,4(■) 5,0(▲) 4,6(x).

Deutlich wird dabei, daß bei sinkendem pH-Wert die intrazelluläre ATP-Konzentration ebenfalls absinkt.

#### 4.15 Modelle zur Beschreibung des heterofermentativen Stoffwechsels

Für die Beschreibung des heterofermentativen Stoffwechsels wurde ein System von Differentialgleichungen entwickelt, das die Organismen detaillierter beschreibt als die in der Literatur gefundenen Modelle. Es wurde das bekannte Stoffwechselschema aus Abbildung 1.1-2 zugrunde gelegt. Da dieses Schema zu viele Zwischenschritte enthält, mußten wesentliche Vereinfachungen vorgenommen werden. Die Anzahl der Parameter ist in einem vollständigen Modell so groß, daß es kaum mehr möglich ist, deren Werte mit entsprechenden Meßdaten genügend einzugrenzen.

Das resultierende Modell ist eine Kombination aus dem Wachstumsmodell von Monod (1949) und einem vereinfachtem Modell des Stoffwechsels der heterofermentativen Milchsäuregärung wie in Abbildung 4.15-1 gezeigt.

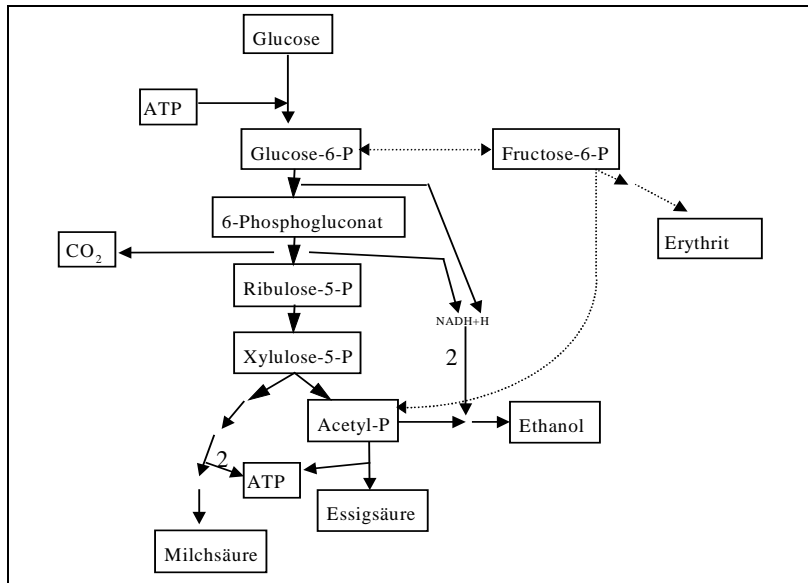


Abbildung 4.15-1 Vereinfachtes Stoffwechselschema der heterofermentativen Milchsäuregärung.

Im Folgenden sollen die für dieses Modell verwendeten Gleichungen beschrieben werden.

#### ■ Die Aufnahme der Kohlenhydrate

Als Nährstoffe standen den Organismen Glucose und Fructose zur Verfügung. Zur Beschreibung der Aufnahme beider Kohlenhydrate wurde die Michaelis-Menten-Kinetik verwendet, da es sich um Enzym-katalysierte Reaktionen handelt. Die Parameter  $v_{max_{fru}}$  und  $v_{max_{glu}}$  sind die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten und  $K_{m_{fru}}$  und  $K_{m_{glu}}$  die Michaelis-Konstanten. Die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten wirkt sich naturgemäß direkt proportional auf die aufgenommene Menge an Nährstoffen aus. In diesem Fall wird angenommen, daß die produzierten Stoffwechselprodukte nicht nur das Wachstum, sondern auch den Stoffwechsel beeinflussen. Deshalb ist ein Inhibitionskoeffizient  $i_c$  eingeführt der die Hemmung durch die Stoffwechselprodukte beschreibt. Er wird weiter unten detailliert beschrieben. Für Fructose resultiert aus diesen Annahmen Gleichung (4-8).

$$\frac{df_{ru}}{dt} = -c_{fu} \cdot v_{max_{fru}} \cdot \frac{f_{ru}}{f_{ru} + K_{m_{fru}}} \cdot i_c \quad (4-8)$$

Da ATP zur Phosphorylierung von Glucose notwendig ist, wird angenommen, daß die Aufnahme der Glucose von der intrazellulären Konzentration an ATP abhängt, wie in Gleichung (4-9) dargestellt.

$$\frac{dglu}{dt} = -c_{fu} \cdot v_{max_{glu}} \cdot \frac{glu}{glu + K_{m_{glu}}} \cdot i_c \cdot ATP \quad (4-9)$$

#### ■ Die Inhibition durch Stoffwechselprodukte

Die Konzentrationen der Endprodukte werden verwendet, um einen Inhibitionskoeffizienten zu berechnen, der den Einfluß auf Wachstum und Stoffwechsel der Organismen beschreibt. Mit

Funktion (3-23) kann, wie im Abschnitt 3.7.2 erläutert, ein linearer, ein exponentieller und ein sigmoider Verlauf beschrieben werden. Aufgrund dieser Flexibilität wurde sie für das System ausgewählt. Die Steilheit und die Charakteristik der Funktion werden durch die Koeffizienten  $stA$ ,  $offA$ ,  $stL$ ,  $offL$ ,  $stE$  und  $offE$  bestimmt. Der Inhibitionskoeffizient  $ic$  errechnet sich demnach wie in Gleichung (4-10) angegeben.

$$ic = \frac{1 + e^{-offL \cdot stL}}{1 + e^{(Lac-offL) \cdot stL}} \cdot \frac{1 + e^{-offA \cdot stA}}{1 + e^{(Ace-offA) \cdot stA}} \cdot \frac{1 + e^{-offE \cdot stE}}{1 + e^{(Eth-offE) \cdot stE}} \quad (4-10)$$

#### ■ Xylulose-5-Phosphat

Wie in Abbildung 4.15-1 gezeigt, verzweigt sich der Stoffwechselweg nach Bildung von Xylulose-5-Phosphat (X5P). Die intrazelluläre Konzentration von X5P wurde nicht gemessen, jedoch wurde eine Abschätzung berechnet, die für die weitere Berechnung zur Verfügung steht. Wird Glucose abgebaut, entsteht pro Molekül Glucose ein Molekül X5P. Pro Molekül gebildeter Milchsäure wird ein Molekül X5P verbraucht. Wird durch das Wachstum der Zellen Glucose in die Zellsubstanz eingebaut, verringert sich die Menge an X5P entsprechend des Wachstums der Zellen. Dieser Verbrauch ist proportional zum Zellwachstum. Die Proportionalitätskonstante wird mit  $con$  bezeichnet. Daraus kann die Menge der  $C_5$ -Fragmente abgeschätzt werden. Da es sich um eine intrazelluläre Konzentration handelt, muß durch den Wert der aktuelle Zellmasse geteilt werden.

$$\frac{dX5P}{dt} = \frac{-\frac{dglu}{dt} - \frac{dlac}{dt}}{cfu} - con \cdot \frac{dcfu}{dt} \quad (4-11)$$

#### ■ Produktbildung

In diesem Modell wird angenommen, daß der gesamte Stoffwechsel durch die Endprodukte inhibiert wird, somit auch die Bildung von Milchsäure. Der Vorläufer der Milchsäure in dem vereinfachten Modell ist Xylulose-5-Phosphat. Die im realen Stoffwechselweg (siehe Abbildung 1.1-2) vorkommenden Zwischenschritte wurden nicht berücksichtigt. Die Produktion von Milchsäure hängt von der Konzentration seines Vorläufers ab. Da keine Kenntnisse über den funktionalen Zusammenhang vorliegen, wird zunächst der einfachste Fall, eine lineare Funktion angenommen.

$$\frac{dlac}{dt} = cfu \cdot X5P \cdot K_L \quad (4-12)$$

Analoges gilt für die Beschreibung der Bildung der Essigsäure. Hier muß jedoch die Verschiebung des Stoffwechsels in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors berücksichtigt werden, da Fructose im Medium enthalten ist. Die Bildung von Ethanol erlaubt die notwendige Regenerierung von  $NAD^+$  wie das Schema in Abbildung 4.15-1 zeigt. In Anwesenheit von Fructose kann die Regenerierung von  $NAD^+$  durch Bildung von Mannit erfolgen. Dies ermöglicht der Zelle eine Verschiebung des Produktspektrums von Ethanol zu Acetat. Die Zelle erhält dadurch die Möglichkeit pro Molekül Glucose ein Molekül ATP zusätzlich zu bilden. Die Bildung von Acetat wird daher in Abhängigkeit von der Fructosekonzentration beschrieben.

$$\frac{dace}{dt} = cfu \cdot X5P \cdot fru \cdot Ka \quad (4-13)$$

Die Stöchiometrie des Heterofermentativen Stoffwechsels verlangt, daß die Ethanolbildung sich aus der Differenz der Lactat- und Acetatbildung errechnet. In den Fermentationen war jedoch ein Überschuß an Ethanol zu verzeichnen. Eine mögliche Ursache dafür ist der in Abbildung 4.15-1 gezeigte Seitenweg des Stoffwechsels. Der Koeffizient  $Ke$  wurde eingeführt, um dieses Phänomen zu beschreiben.

$$\frac{deth}{dt} = Ke \cdot \frac{dlac}{dt} - \frac{dace}{dt} \quad (4-14)$$

#### ■ ATP

Die Bildung eines Moleküls Milchsäure geht mit der Bildung von zwei Molekülen ATP einher. Pro Molekül Essigsäure wird ein Molekül ATP gebildet. Um die Bildung von ATP abschätzen zu können, muß zudem berücksichtigt werden, daß ein Molekül ATP verbraucht wird, um Glucose in den Stoffwechselweg einzuschleusen. Weiterhin ist Energie zum Aufbau der Zellsubstanz notwendig und die Lebenserhaltung der Zellen verbraucht Energie in Form von ATP. Die Koeffizienten  $Kg$  und  $Kl$  dienen zur Beschreibung der letztgenannten Phänomene.

$$\frac{datp}{dt} = \frac{2 \cdot \frac{dlac}{dt} + \frac{dace}{dt} - \frac{dglu}{dt}}{cfu} - \frac{dcfu}{dt} \cdot Kg - Kl \quad (4-15)$$

Wie auch bei Xylulose-5-Phosphat handelt es sich nur um eine Abschätzung, die zur weiteren Berechnung verwendet wird.

#### ■ Wachstum

Das Wachstum der Organismen wird schließlich durch eine der Monod-Kinetik angelehnten Funktion beschrieben. Allerdings wurde versucht, die Abhängigkeit von Zucker durch die Menge der zur Verfügung stehenden Energie zu ersetzen. Zusätzlich wurde die Inhibition durch die Stoffwechselprodukte berücksichtigt.

$$\frac{dcfu}{dt} = cfu \cdot \mu_0 \frac{ATP}{ATP + Kmo} \cdot ic \quad (4-16)$$

Die Gleichungen (4-8) bis (4-16) stellen ein System von Differentialgleichungen dar. Paßt man die Parameter dieser Gleichungen den gemessenen Versuchsergebnissen an, so erhält man das in Tabelle 4.15-1 dargestellte Ergebnis. Die berechneten Werte können dazu dienen, das Ausmaß der Auswirkungen der verschiedenen Effekte auf die Organismen abzuschätzen. Klar ersichtlich ist die geringe Auswirkung von Ethanol auf die Organismen. Dies drückt sich in den Koeffizienten  $offE$  und  $stE$  aus. Beide Koeffizienten wurden mit sehr hohen Werten belegt. Gleichung (3-23) nimmt mit diesen Koeffizienten Werte an, die von 1 nur unwesentlich abweichen. Im Gegensatz dazu erkennt man den wesentlich größeren Effekt von Essigsäure an

den wesentlich niedrigeren Werten der Koeffizienten  $st_A$  und  $off_A$ . Gleichung (3-23) nimmt mit diesen Koeffizienten Werte an, die von 1 deutlich abweichen. In den Fällen, in denen Kinetiken nach Monod (1949) angenommen wurden, kann die Bedeutung des Effektes anhand der Monod-Konstante abgeschätzt werden.

Tabelle 4.15-1 Die Parameter des Modells

Parameter	Wert	Parameter	Wert
$v_{maxFru}$	6,57 mmol/l h	con	0,004 mmol/l
$KmFru$	880 mmol/l	$st_A$	0,166 l/mmol
$v_{maxGlu}$	0,226 mmol/l h	KL	0,499 h <sup>-1</sup>
$KmGlu$	2,2 10 <sup>-6</sup> mmol/l	KA	0,003 l/mmol h
offL	94,9 mmol/l	KE	1,214
$st_L$	0,021 l/mmol	$K_g$	1,3 10 <sup>-5</sup> mmol
offE	151 mmol/l	KI	0,4 mmol/h
$st_E$	1,15 10 <sup>4</sup> l/mmol	$\mu_0$	0,525 h <sup>-1</sup>
offA	58,3 mmol/l	Kmo	3,2 10 <sup>-7</sup> mmol/l

Zunächst soll das Ergebnis der Anpassung anhand von Diagrammen gezeigt werden. Darin werden die berechneten Werte als Linien und die gemessenen Werte als Punkte dargestellt. Es handelt sich in diesem Fall um drei Fermentationen, in denen unterschiedliche Mengen an Fructose zugesetzt wurden, um die Auswirkung von Elektronenakzeptoren zu testen. Die Fructosekonzentrationen waren 0 (Fermentation I), 33 (Fermentation II) und 114 mMol/l (Fermentation III). Der Verbrauch von Fructose wird in Abbildung 4.15-2 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die höhere Fructosekonzentration zu einer intensiveren Aufnahme des Elektronenakzeptors führt. Der Verlauf flacht aber in beiden Fällen aufgrund der Inhibition des Stoffwechsels ab.

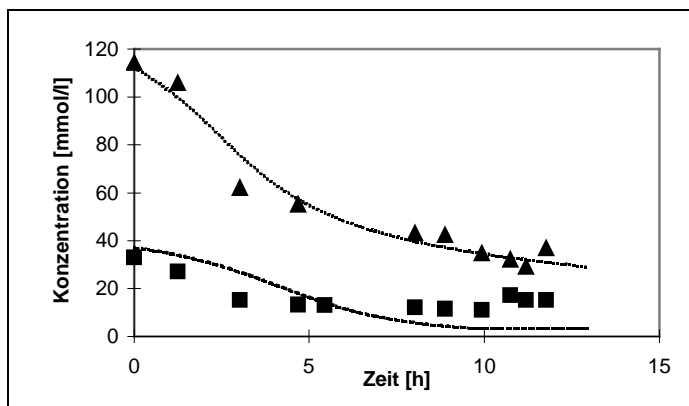


Abbildung 4.15-2 Fructoseaufnahme durch *L. pontis* TMW 1.109. Fermentation II (■ / --) und Fermentation III (▲ / .....).

Wie beschrieben, sollte die Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren die Bildung von Essigsäure intensivieren. Dies ist in Abbildung 4.15-3 gezeigt. Ohne Fructose wird kein Acetat gebildet. Wird Fructose zugegeben, ist Acetatbildung feststellbar. Erhöht man die Konzentration von Fructose, erhöht sich die Acetatbildung deutlich.



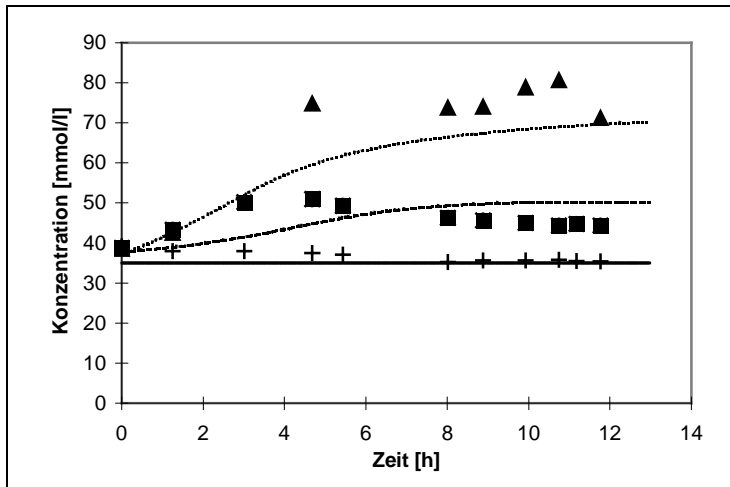


Abbildung 4.15-3 Bildung von Essigsäure durch *L. pontis* TMW 1.109. Fermentation I (+ / \_\_\_\_), Fermentation II (■ / --) und Fermentation III (▲ / .....).

Die Inhibition durch die gebildeten Stoffwechselprodukte führt zu einem Rückgang der Aufnahme von Glucose. Das Ausmaß ist je nach gebildeten Stoffwechselprodukten unterschiedlich. In Abbildung 4.15-4 ist dies dargestellt.

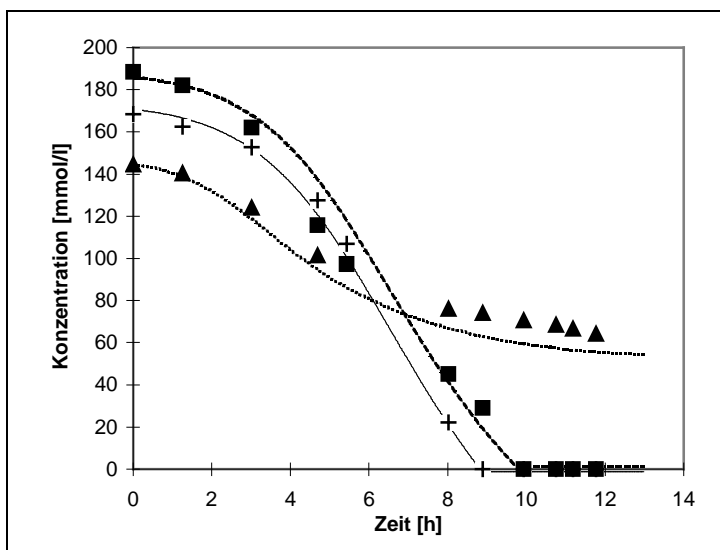


Abbildung 4.15-4 Die Aufnahme von Glucose durch *L. pontis* TMW 1.109. Fermentation I (+ / \_\_\_\_), Fermentation II (■ / --) und Fermentation III (▲ / .....).

Die entsprechende Bildung von Milchsäure wird in Abbildung 4.15-5 dargestellt.

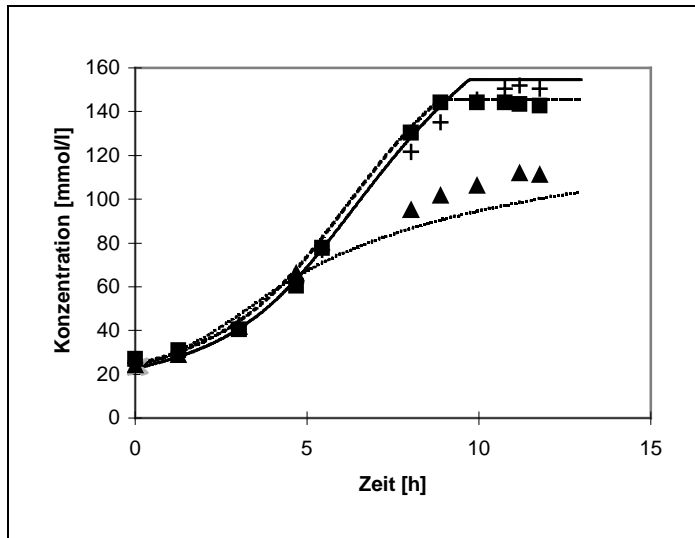


Abbildung 4.15-5 Bildung von Milchsäure durch *L. pontis* TMW 1.109. Fermentation I (+ / \_\_\_\_), Fermentation II (■ / --) und Fermentation III (▲ / .....).

Das Wachstum der Bakterien ist in Abbildung 4.15-6 dargestellt. Die Zahl der Koloniebildenden Einheiten weist eine große Streuung auf. Die Tendenz ist jedoch klar erkennbar. Die höhere Fructosekonzentration führt zu rascherem Wachstum, die gebildete Essigsäure führt jedoch in der späteren Phase der Fermentation zu einer Inhibition des Wachstums.

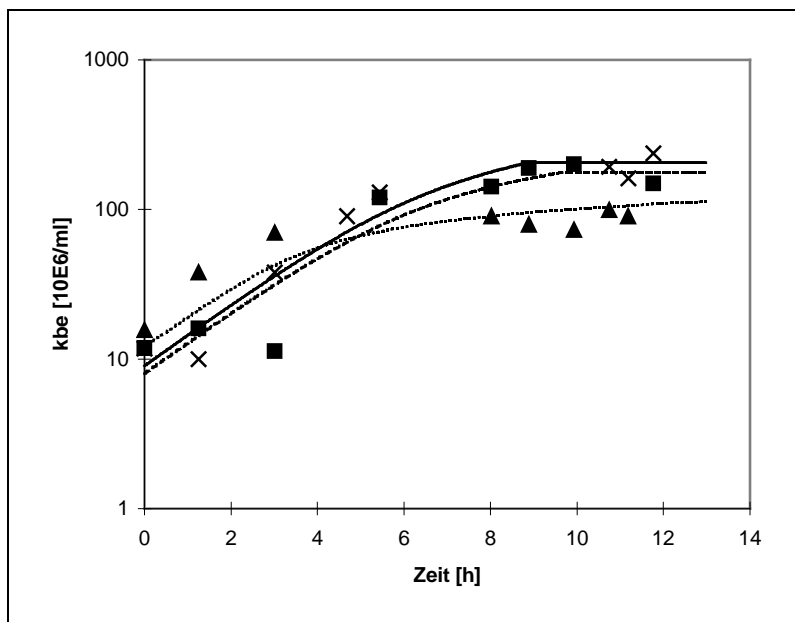


Abbildung 4.15-6 Wachstum von *L. pontis* TMW 1.109. Fermentation I (+ / \_\_\_\_), Fermentation II (■ / --) und Fermentation III (▲ / .....).

## 5 Diskussion

Die Eigenschaften von Milchsäurebakterien aus Sauerteig wurden in dieser Arbeit aus verschiedenen Richtungen beleuchtet. Es wurden unterschiedliche Ansätze gewählt, um das Verhalten zu beschreiben. Die daraus resultierenden Modelle sind in Abhängigkeit von der Problemstellung und gewünschten Wertebereichen anwendbar. Das betrachtete System hat den Hintergrund der Produktion von Milchsäure, die zur Säuerung von Brotteig verwendet wird. Aus der Mikroflora der betrachteten Fermentationen wurden zwei Stämme exemplarisch ausgewählt, die je einer der beiden vorherrschenden Gruppen zuzuordnen sind. Die Organismen, die in den betrachteten Fermentationen dominieren, sind entweder aus der Gruppe der homofermentativen oder aus der Gruppe der heterofermentativen Milchsäurebakterien. Innerhalb der beiden Gruppen weisen die Stämme ein sehr ähnliches Verhalten auf. Zwischen Organismen aus den beiden Gruppen bestehen jedoch erhebliche Unterschiede. Das Verhalten der beiden repräsentativen Stämme wurde in Abhängigkeit der wesentlichen Parameter betrachtet und mathematisch beschrieben. Dadurch wird es möglich, Verschiebungen in der Zusammensetzung der Flora und Veränderungen im Produktspektrum der stofflichen Umsetzungen zu erkennen und zu erklären.

In Systemen, in denen ein Gemisch aus Organismen der beiden Gruppen zum Einsatz kommt, müssen spezielle Methoden zur Messung und Berechnung angewendet werden, um aus dem Gesamtbild unterscheiden zu können, welche Vorgänge der jeweiligen Organismengruppe zuzuordnen ist. Zu diesem Zweck wurde ein System etabliert, in dem diese Vorgänge mit einfachen Mitteln gemessen werden können. Dabei werden die beiden einfach zu messenden Größen Druck und pH-Wert erfaßt. Unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Hautstoffwechselwege, kann auf die Vorgänge während der Fermentationen zurückgeschlossen werden.

In einer isolierten Betrachtung des heterofermentativen Referenzstammes wurde ein Modell entwickelt, in dem Wachstum und Stoffwechsel in Kombination betrachtet werden. Das Schema des heterofermentativen Glucoseabbaus wurde dazu vereinfacht und auf ein System von Differentialgleichungen abgebildet. An diesem Beispiel konnten Hypothesen getestet werden. Dies ergab Aufschlüsse über die intrazellulären Vorgänge der Organismen während Batch-Fermentationen.

## **5.1 Diskussion der Entwicklung einer Meßmethode zur Beobachtung des Fermentationsverlaufes in gemischten Populationen**

Nur wenige Größen können in Fermentationen ohne Probenahme gemessen werden. Daher ist es erforderlich, geeignete Größen zu finden, die Aussagen über die Vorgänge in den Fermentationen erlauben. Handelt es sich um eine Fermentation in der zwei verschiedene Organismen mit prinzipiell unterschiedlichen Stoffwechselwegen zum Einsatz kommen, kommt hinzu, daß man zwei Meßgrößen benötigt, die zudem nicht linear voneinander abhängig sein dürfen. Im vorliegenden Fall ist dies gelungen. Eine der beiden Größen, der durch CO<sub>2</sub> erzeugte Überdruck konnte mit einer Korrelation von 98.76 % mit der durch *L. pontis* TMW 1.109 verbrauchten Glucose in Zusammenhang gebracht werden. Dadurch kann in einer Fermentation, an der ein Gemisch aus homofermentativen und heterofermentativen Organismen beteiligt ist, ohne Probenahme gemessen werden, wieviel Glucose im heterofermentativen Stoffwechsel verbraucht wird, indem der Überdruck in einem gasdichten Fermenter gemessen wird.

Die andere der beiden Größen ist der pH-Wert. Dieser hängt in den durchgeführten Fermentationen ausschließlich von der gebildeten Milchsäure ab, da die pH-Absenkung durch Essigsäure vernachlässigt werden kann. Milchsäure wird von beiden Organismen gebildet, allerdings in unterschiedlichem Umfang, da homofermentativ pro Mol Glucose zwei Mol Milchsäure entstehen und heterofermentativ nur ein Mol Milchsäure. Die Reaktion des Mediums auf die Bildung von Milchsäure wurde durch Titration bestimmt. Dadurch kann vom pH-Wert auf die gebildete Menge Milchsäure zurückgeschlossen werden.

Dies ermöglicht es, die verwertete Glucose in ihrer Gesamtmenge zu ermitteln und zu bestimmen, welcher Anteil davon homofermentativ und welcher heterofermentativ verwertet wurde. Die Bestimmung erfolgt anhand der Annahme, daß die Menge an heterofermentativ verwerteter Glucose gleich der Menge an heterofermentativ entstandener Milchsäure ist. Dann kann durch Subtraktion der heterofermentativ entstandenen Milchsäure von der gesamten Milchsäure auf die homofermentativ entstandene Milchsäure geschlossen werden. Diese Stoffmenge ist nach den getroffenen Annahmen doppelt so groß wie die Menge der homofermentativ verwerteten Glucose.

## **5.2 Das Verhalten der Organismen in Fermentationen mit gemischten Populationen**

Es ist zu erkennen, daß die Acetatbildung in der Anfangsphase sehr rasch beginnt und dann abnimmt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Böcker (1995). Jedoch kommt die Acetatbildung bis zum Ende der Fermentation nicht zum Erliegen.

Betrachtet man den Anteil des heterofermentativen Stoffwechsels an den gesamten Umsetzungen in Fermentationen, in denen als Substrat Kleiemedium verwendet wird und die mit einem Organismengemisch beimpft wurden, so erkennt man, daß der Anteil während der Fermentation ansteigt. Das heißt der Wechsel der Bedingungen während der Fermentation beeinträchtigt den Stoffwechsel der homofermentativen Organismen stärker als den

Stoffwechsel der heterofermentativen Organismen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Analyse von Müller et al (2001) überein.

Desweiteren wurde untersucht, ob die Temperatur einen Einfluß auf das Verhältnis des heterofermentativen zum Gesamtstoffwechsel hat. Wie die in Abbildung 4.6-4 dargestellten Ergebnisse zeigen, verschiebt sich dieses Verhältnis mit steigender Temperatur zunehmend in Richtung des homofermentativen Stoffwechsel. Die homofermentativen Organismen weisen also eine höhere Temperaturtoleranz auf. Bei niedrigeren Temperaturen wird demnach ein höherer Anteil der Glucose heterofermentativ verwertet. Dies hat zum einen Einfluß auf die Ausbeute an Milchsäure pro eingesetztem Substrat, da im heterofermentativen Stoffwechsel nur halb soviel Milchsäure pro Mol Glucose gebildet wird. Zum Anderen wird sich das Aromaspektrum verändern, wenn der Schwerpunkt des Stoffwechsels auf andere Organismen übergeht.

### **5.3 Fermentation in industriellem Maßstab**

Auch bei einer Fermentation in industriellem Maßstab wurde das Verhältnis von heterofermentativen Stoffwechsel zu den gesamten Umsetzungen ermittelt. Der Verlauf ist sehr ähnlich zu dem in Labormaßstab ermittelten. In Laborfermentatationen, die pH-statisch durchgeführt wurden, konnte diese Verschiebung jedoch nicht festgestellt werden. Die Fermentationen in industriellem Maßstab werden immer ungepuffert durchgeführt. Das würde bedeuten, daß der niedrigere pH-Wert die heterofermentativen Organismen direkt oder indirekt begünstigt.

Die Verläufe der Milchsäurebildung bei den Fermentationen bei verschiedenen Temperaturen lassen erwarten, daß eine Fermentation die bei hohen Temperaturen (46 °C) startet und kontinuierlich bis 40 °C abgekühlt wird den höchsten Endwert an Milchsäure erreicht.

### **5.4 Der Einfluß der Nährstoffe auf die Organismen**

Der heterofermentative Stamm *L. pontis* TMW 1.109 verwertet im Gegensatz zum homofermentativen Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 Pentosen. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß im heterofermentativen Stoffwechsel Pentosen als Zwischenprodukte auftreten (Lim 1998). Damit stehen Stellen zur Verfügung, die ein einfaches Einschleusen von Pentosen in den Stoffwechsel ermöglichen. Nach der oxidativen Dekarboxylierung des 6-Phosphogluconates durch Phosphogluconat-Dehydrogenase entsteht mit Ribulose-5-Phosphat der erste C<sub>5</sub>-Körper im heterofermentativen Stoffwechsel. Vor der Spaltung des C<sub>5</sub>-Körpers durch Phosphoketolase wird dieser noch umgruppiert zu Xylulose-5-Phosphat (Stolz 1995). Für die beiden Pentosen Ribulose und Xylose besteht also die Möglichkeit, in den Stoffwechsel eingeschleust zu werden. Der untersuchte heterofermentative Stamm *L. pontis* TMW 1.109 konnte auf den beiden Pentosen vermehrt werden. Dies bekräftigt die beschriebene Annahme. Im homofermentativen Stoffwechsel treten keine Pentosederivate als Zwischenstufen des Glucoseabbaus auf (Schlegel 1981). Der Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 vergärt jedoch insgesamt ein breiteres Spektrum verschiedener Zucker. Diese Eigenschaft steht im Einklang mit den allgemein geringeren Ansprüchen dieses Keimes an das Medium.

## Glucose

In der Literatur wird das Verhalten von Organismen gegenüber Glucose meist durch die Kinetik nach Monod (1949) beschrieben. In Tabelle 5.4-1 sind verschiedene in der Literatur gefundene Werte für die Monod-Konstante angegeben. Es ist ersichtlich, daß die Werte generell sehr niedrig sind. Dies bedeutet eine hohe Affinität der Organismen zu Glucose.

Tabelle 5.4-1 in der Literatur gefundene Werte von Monod-Konstanten für verschiedene Organismen

<i>Organismus</i>	<i>K<sub>m</sub></i>	<i>Autor</i>
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0,010 mmol/l	O'Brien (1980)
<i>Lactococcus cremoris</i>	0,011 mmol/l	Sonnleitner (1998)
<i>Lactococcus lactis</i>	0,02 mmol/l	Sonnleitner (1998)
<i>Escherichia coli</i>	0,015 mmol/l	Postma und Roseman (1976)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,056 mmol/l	Yabanvar und Wang (1991)
<i>Streptococcus faecalis</i>	1,2 mmol/l	Ohara et al (1992)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<<28 mmol/l	Klostermaier (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,056 mmol/l	Passos (1993)

Die Anpassung einer Michaelis-Menten-Kinetik ergab für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 einen  $K_m$ -Wert von 6,4 mmol/l und für den Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 einen  $K_m$ -Wert von 2,8 mmol/l. Diese Werte sind höher als die in Tabelle 5.4-1 aufgeführten. Verglichen mit den in Fermentationen vorkommenden Konzentrationen jedoch sind sie gering. Das heißt, die Kinetik in weiten Bereichen durch eine horizontale Funktion angenähert werden kann und die Glucosekonzentration nur als limitierender Faktor berücksichtigt werden muß, wenn die Glucose bereits weitgehend von den Organismen verbraucht wurde.

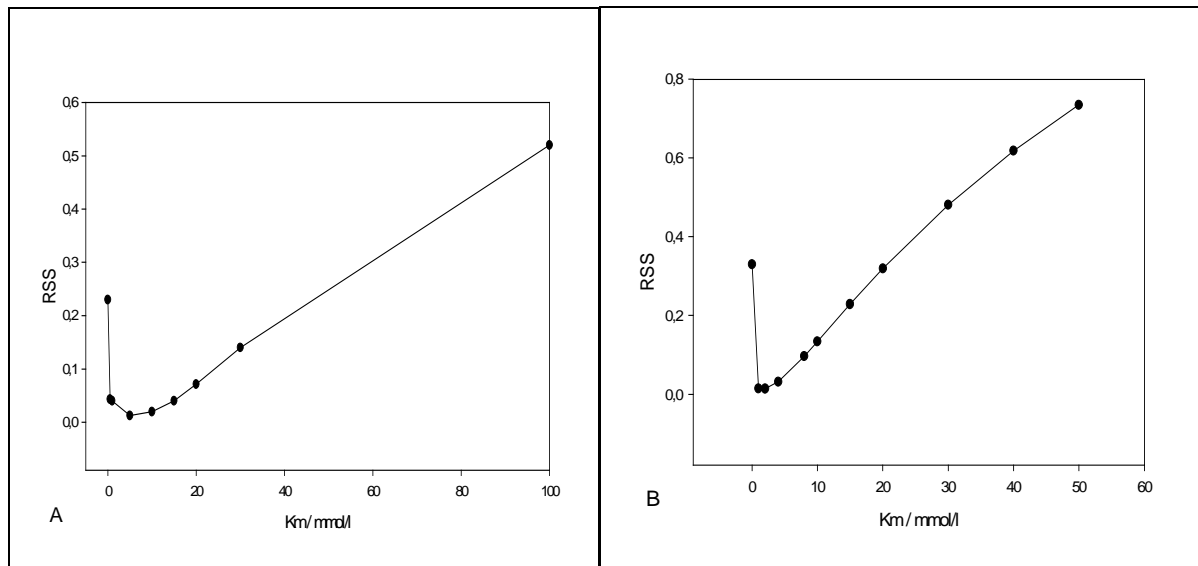


Abbildung 5.4-1 Sensitivitätsanalyse der Monod-Konstante gegenüber Glucose. Teil A: Stamm *L. pontis* TMW 1.109, Teil B: Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661

In Abbildung 5.4-1 ist die Sensitivitätsanalyse der Monod-Konstante gegenüber Glucose für beide Stämme gezeigt. In beiden Fällen sinkt die Summe der Fehlerquadrate für  $K_m$ -Werte  $> 0$  rasch ab, erreicht ein breites Minimum und steigt dann wieder an. Dies bedeutet, daß die Monod-Konstante in beiden Fällen nahe Null sein muß. Das breite Minimum bedeutet jedoch, daß sich der Wert für  $K_m$  nicht exakt bestimmen läßt, sondern nur eingegrenzt werden kann. Es ist jedoch in den meisten Fällen ausreichend, den Wert für  $K_m$  eingrenzen zu können.

Für beide Organismen bedeutet dies, daß  $K_m$  sehr kleine Werte annimmt. Daraus folgt, daß die Aufnahme von Glucose in einem weiten Bereich unabhängig ist von der Konzentration von Glucose im Medium, da für  $K_m \ll$  Glucosekonzentration die Monod-Kinetik durch eine konstante Funktion angenähert werden kann. Lediglich bei sehr geringen Konzentrationen wird das Wachstum der Organismen durch Substratmangel limitiert. Dies bedeutet, daß in Fermentationen die vorhandene Glucose bis auf geringe Mengen verwertet wird, wenn die Organismen nicht durch andere Randbedingungen gehemmt werden. Die errechneten Werte beschreiben somit eine hohe Affinität der Organismen gegenüber Glucose.

Bei Zusatz von Glucose zum Medium sind die Konzentrationen so hoch, daß eine Limitierung der Organismen durch Substratmangel nach den oben angeführten Erkenntnissen nicht auftritt. Wird der Zucker aus Stärke durch glucoseabspaltende Enzyme gebildet, liegt die Konzentration in der Anfangsphase ebenfalls deutlich über dem  $K_m$ -Wert der Organismen. Dies wurde in Kapitel 4.15 dargestellt. In der späteren Phase der Fermentation sinkt der Glucosespiegel jedoch soweit ab, daß eine Einschränkung des Wachstums in Betracht gezogen werden muß.

Der Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 bildet aus einem mmol/l Glucose eine Zellmasse von 0,058 OD. Dagegen reicht die gleiche Menge den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 nur zu einer Zellmasse, die 0,073 OD entspricht. Dies steht im Einklang mit der aus den Stoffwechselwegen leicht abzuleitenden höheren Energieausbeute der homofermentativen Organismen. Für diese Untersuchungen wurde die für den Erhaltungsstoffwechsel benötigte Glucose, wie von Mercier et al. (1992) vorgeschlagen, vernachlässigt.

Da die Parameter  $K_m$  mit denen das Verhalten der Organismen beschrieben werden kann sehr nahe zusammen liegen kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein Organismen-typ gegenüber den anderen durch eine Veränderung der Glucosekonzentration begünstigt wird. Glucoseverbrauch als Ursache einer Stoffwechselverschiebung ist somit auszuschließen.

## Fructose

Der direkte Einfluß von Fructose auf das Wachstum von *L. pontis* TMW 1.109 ist als gering einzustufen. Dies folgt aus Abbildung 4.8-6. Es ist zwar eine leicht steigende Tendenz erkennbar, und somit sollte die Wachstumsgeschwindigkeit bei hohen Konzentrationen ansteigen. Die Steigung der Ausgleichsgerade ist jedoch mit  $0,0003 \text{ h}^{-1}(\text{mmol/l})^{-1}$  sehr gering, ebenso der Korrelationskoeffizient mit  $R^2 = 0,57$ . Ein nennenswerter Anstieg kann nur über einen sehr großen Bereich von 0 bis 500 mMol/l Fructose beobachtet werden. Da dieser Organismus Fructose als Elektronenakzeptor nutzen kann und dadurch eine höhere Energieausbeute erzielt, hätte man ein Ansteigen der Wachstumsrate erwartet. Da dies nicht zu beobachten war, sind zwei verschiedene Erklärungen möglich. Der Anstieg der Wachstumsrate könnte sich zum einen unterhalb der im vorliegenden Versuch erzielten Meßgenauigkeit bewegen. Andererseits ist es möglich, daß das Wachstum durch andere

Faktoren begrenzt wird, wodurch es den Zellen nicht möglich ist die zusätzliche Energie für ein schnelleres Wachstum zu nutzen. Die Auswirkungen auf den Stoffwechsels sind jedoch getrennt davon zu betrachten.

Die Acetatbildung bei Zellen im gleichen physiologischen Zustand ist von der Fructosekonzentration in weiten Bereichen unabhängig. Unter der Annahme einer Kinetik nach Michaelis-Menten für die Bildung von Acetat für die Fructose als Substrat zu betrachten ist, kann dies quantitativ beschrieben werden. Es ergibt sich ein geringer  $K_m$ -Wert von nur 0,29 mmol/l. Dies bedeutet eine hohe Affinität des Stammes zu Fructose, um diese als Elektronenakzeptor zu benutzen. Die Sensitivitätsanalyse bezüglich des  $K_m$ -Wertes ist in Abbildung 5.4-2 zu sehen.

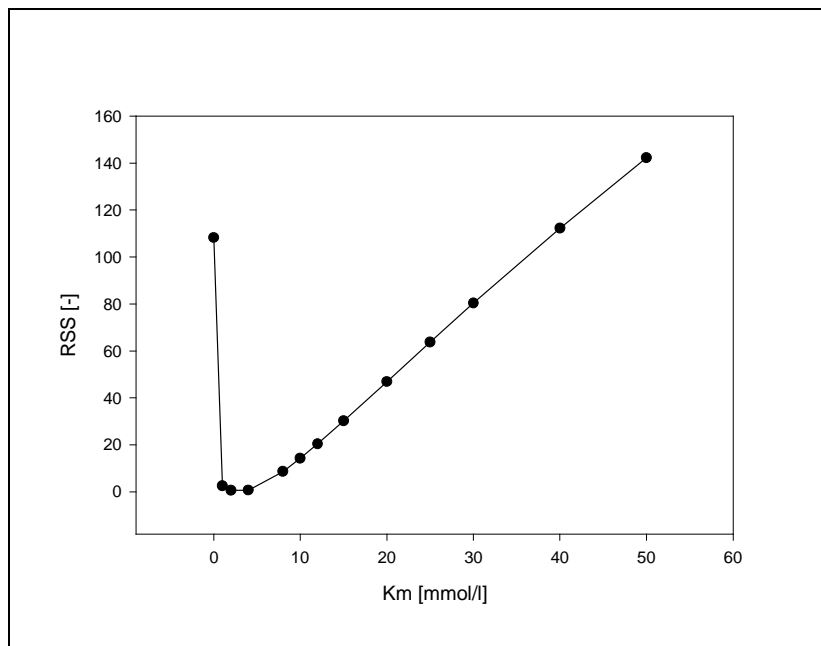


Abbildung 5.4-2 Sensitivitätsanalyse der Michaelis-Konstante für die Bildung von Acetat in Abhängigkeit der Fructosekonzentration bei Stamm *L. pontis* TMW 1.109.

Wiederum erkennt man, daß der ermittelte Wert für  $K_m$  in einem Bereich nahe Null liegen muß.

Die Versuche, in denen *L. amylovorus* TMW 1.661 in Anwesenheit von Glucose zusätzlich verschiedene Mengen an Fructose zugegeben wurden, zeigen, daß in dieser Konstellation die Fructose auf das Wachstum der Organismen keinen Einfluß ausübt. Dies ist in Abbildung 4.8-9 an der sehr geringen Steigung von  $0,0003 \text{ h}^{-1}(\text{mmol/l})^{-1}$  und dem geringen Korrelationskoeffizient  $R^2= 0,57$  klar erkennbar. Da der Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 Fructose nicht als Elektronenakzeptor nutzen kann, bleibt nur die Verwertung als Kohlenstoffquelle. Solange Glucose im Medium vorhanden ist, wird Fructose jedoch nicht verwertet.

Es bleibt festzuhalten, dass Fructose auf den homofermentativen Stamm keinen Einfluss ausübt. Der heterofermentative Stamm wird stark in seinem Stoffwechsel beeinflusst. Das Wachstum dieses Stammes ist jedoch von Fructose unabhängig.



## **Maltose**

Fermentationen, in denen Getreide oder Getreidebestandteile als Rohstoffe verwendet werden und denen keine enzymatisch aktiven Zusätze beigemischt werden, weisen als für Mikroorganismen verwertbare Kohlenstoffquelle im wesentlichen Maltose auf. Die Mengen, die dabei auftreten sind oft gering. Den vorliegenden Versuchen wurden jedoch Fermentationen zugrunde gelegt, in denen enzymatisch aktive Zusätze zum Einsatz kamen. Die zugesetzte Glucoamylase produziert große Mengen an Glucose. Dadurch tritt Maltose, die üblicherweise in Sauerteigfermentationen bestimmend ist, gegenüber Glucose als Kohlenstoffquelle soweit in den Hintergrund, daß sie vernachlässigt werden kann.

## **Pentosen**

Pentosen sind für *L. amylovorus* TMW 1.661 ohne Bedeutung, da dieser Organismus sie nicht als C-Quelle verwerten kann. Die in Abbildung 4.8-10 dargestellten Ergebnisse belegen dies. Im Gegensatz dazu zeigt *L. pontis* TMW 1.109 geringes Wachstum auf Pentosen. In Gegenwart von Glucose haben Pentosen nach den Ergebnissen in Abbildung 4.8-11 keinen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit der betrachteten Organismen.

## **Komplexe Medienbestandteile**

Der Anspruch der verwendeten Organismen an das verwendete Medium ist vergleichsweise hoch. Ohne komplexe Medienbestandteile wie Fleischextrakt, Pepton aus Casein und Hefeextrakt ist keinerlei Wachstum zu erzielen. Mit diesen Bestandteilen erreicht man ein befriedigendes Wachstum, aber nach mehrmaligem Überimpfen läßt das Wachstum nach. Lediglich ein Medium, das zusätzlich Kleieextrakt enthält, garantiert ein gutes Wachstum auch über mehrmaliges Überimpfen hinweg. Daraus ist ersichtlich wie eng diese Organismen an ihr natürliches Habitat angepaßt sind. Es muß eine Substanz geben, die von den Organismen benötigt wird, die in Getreide vorkommt, den anderen komplexen Medienzusätzen jedoch fehlt. Die komplexen Medienbestandteile bestehen aus einer Vielzahl von Einzelsubstanzen. Da die Zusammensetzung dieser Medienbestandteile nicht genauer spezifiziert ist, und aufgrund der hohen Anzahl an Einzelsubstanzen, ist eine detaillierte Betrachtung nicht möglich. Daher wurden die komplexen Medienbestandteile vereinfachend als eine einzige Substanz betrachtet.

Die Meßergebnisse für *L. amylovorus* TMW 1.661 weisen eine hohe Streuung auf. Dennoch kann aufgrund des Verlaufs des Graphen in Abbildung 4.8-12 ein Zusammenhang nach Michaelis-Menten vermutet werden. Die numerische Auswertung führt zu einem  $K_m$ -Wert von 16,7 % der maximal zugesetzten Menge. Dies besagt, daß die Affinität der Organismen nicht so groß ist wie z.B. bei Glucose, oder daß die limitierende Substanz nur in einer sehr geringen Konzentration in den komplexen Medienzusätzen vorhanden ist. Die Sensitivitätsanalyse des  $K_m$ -Wertes ist in Abbildung 5.4-3 dargestellt.

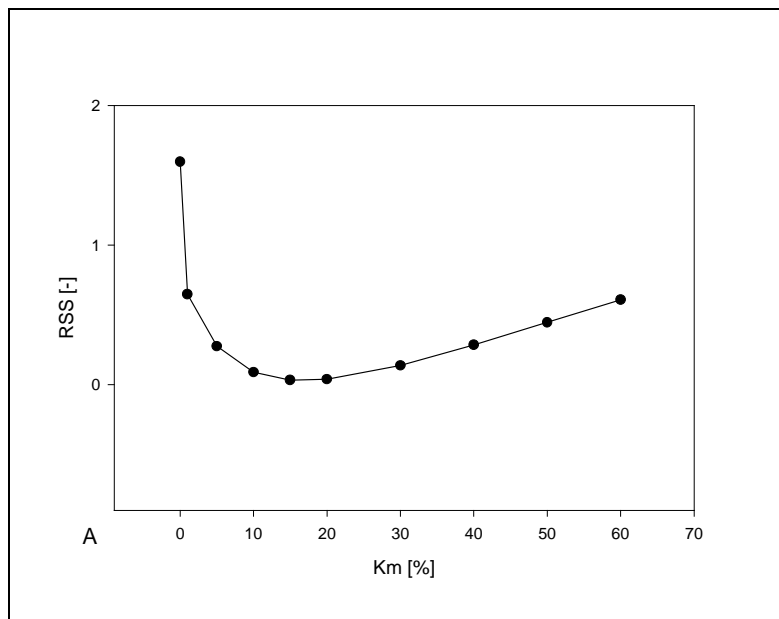


Abbildung 5.4-3 Sensitivitätsanalyse der Monod-Konstante für das Wachstum des Stammes *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit der Menge komplexer Medienzusätze.

Aus der Sensitivitätsanalyse wird deutlich, daß der Km-Wert in diesem Fall nur eine ungefähre Schätzung sein kann. Es bleibt jedoch die Aussage, daß die Affinität zur limitierenden Substanz nicht hoch ist oder diese nur in geringer Konzentration vorhanden ist. Daher ist dieser Stamm auf eine ausreichende Versorgung mit komplexen Medienbestandteilen angewiesen.

Im Fall von Stamm *L. pontis* TMW 1.109 ist aus dem Graphen in Abbildung 4.8-14 nicht eindeutig ersichtlich, welche Funktion zur Beschreibung am besten geeignet sein könnte. Daher wurde eine lineare Funktion ebenso wie eine Funktion nach Michaelis-Menten in Betracht gezogen. Die Korrelationskoeffizienten die aus den Anpassungen resultieren liegen mit  $R^2 = 0,944$  für die Michaelis-Menten-Kinetik und  $R^2 = 0,946$  für die lineare Anpassung sehr dicht zusammen. Daher sollte in diesem Fall der linearen Anpassung der Vorzug gegeben werden, da die lineare Funktion nur einen Parameter enthält und somit die Forderung nach dem einfachsten Modell (Bossel 1994) erfüllt.

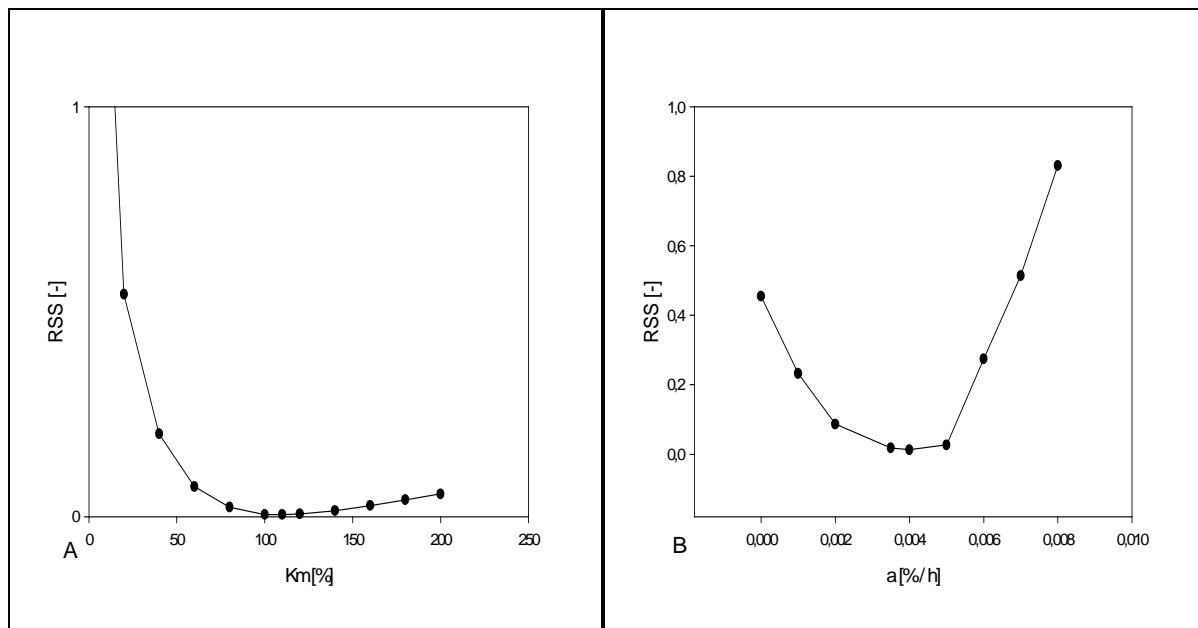


Abbildung 5.4-4 Sensitivitätsanalyse für das Wachstum des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit der Menge komplexer Medienzusätze. Teil A: Kinetik nach Monod (1949), Monod-Konstante. Teil B: Lineare Kinetik, Steigung.

Die in Abbildung 5.4-4 dargestellte Sensitivitätsanalyse spricht ebenfalls für die Verwendung der linearen Funktion. In Teil A der Abbildung ist ersichtlich, daß ein Km-Wert kaum exakt bestimmt werden kann. Die Steigung einer linearen Funktion ist dagegen wesentlich besser zu bestimmen, wie in Teil B der Abbildung zu sehen ist.

In jedem Fall ist die Affinität des homofermentativen Stammes gegenüber den komplexen Medienbestandteilen höher als die des heterofermentativen Stammes. Somit wird bei einem Mangel an diesen Substanzen der homofermentative Stamm begünstigt. In den durchgeführten Versuchen war dies nicht zu beobachten. Daher ist davon auszugehen, dass die verwendeten Medien die potenziell limitierende Substanzen im Überschuss enthalten. Insbesondere ist in den Industriellen Fermentationen keine Limitierung gegeben.

## 5.5 Der pH-Wert

Die Veränderung des pH-Wertes durch die gebildeten Säuren wurde durch Titration festgestellt. Wie zu erwarten, zeigt die Milchsäure eine stärkere Auswirkung auf den pH-Wert des Mediums, da sie im Vergleich zur Essigsäure die stärkere Säure ist. Die Titration des Mediums führt, wie in Abbildung 4.4-1 leicht zu erkennen ist, zu Werten, die im Vergleich zu den anderen Messungen eine sehr geringe Streuung aufweisen. Daher ist eine Interpolation der Werte gerechtfertigt.

Die Verhältnisse in Kleiemedium sind wie in Kapitel 4.4 beschrieben wesentlich komplexer. Dennoch zeigt die Abbildung 4.2-1 einen ähnlichen Verlauf wie der im Spicher-Medium gemessene pH-Wert. Wird mit dem verwendeten Organismengemisch beimpft und die Menge der verfügbaren Elektronenakzeptoren gering gehalten, so reicht der Einfluß der Milchsäure aus, um die Fermentation zu beschreiben, da in diesem Fall der Einfluß der gebildeten Essigsäure so gering ist, daß er vernachlässigt werden kann.

Bei Absenkung des pH-Wertes geht die maximale Wachstumsrate erheblich zurück. Es ist jedoch schwierig eine exakte Untergrenze zu finden, ab der kein Wachstum mehr möglich ist. Bei beiden Organismen wurde jedoch in keinem Versuch Wachstum unter einem pH-Wert von kleiner als 3,0 festgestellt. Der minimale pH-Wert unter dem kein Wachstum mehr möglich ist muß also über dieser Grenze liegen. Fermentationen die diesen pH-Wert unterschreiten scheinen damit nicht durchführbar.

Um den Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Organismen zu beschreiben wurden vier verschiedene Funktionen verwendet. In Tabelle 5.5-1 ist für alle Anpassungen das Ergebnis des F-Testes (Zwietering et al. 1994) aufgeführt. In jedem Fall gilt  $f < F$ . Damit kann aufgrund dieses Tests keine der Anpassungen abgelehnt werden.

Tabelle 5.5-1 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit vom pH-Wert

<i>Funktion</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl der Parameter</i>	<i>f</i>	<i>F</i>
Quadratisches Polynom	54	3	0,1196	2,3083
Kubisches Polynom	54	4	0,1006	2,4221
Gompertz	54	4	0,1047	2,4221
Passos (1993)	54	3	0,1965	2,3083

Tabelle 5.5-2 Korrelationskoeffizienten der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit vom pH-Wert

<i>Funktion</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
Quadratisches Polynom	0,982
Kubisches Polynom	0,987
Gompertz	0,987
Passos (1993)	0,971

Tabelle 5.5-2 zeigt die Korrelationen der vier Anpassungen. Sie unterscheiden sich nur sehr gering. Lediglich die Funktion nach Passos (1993) weicht nach unten ab. Daher sollte in diesem Fall einer einfachen quadratischen Funktion der Vorzug gegeben werden, da diese nur drei Parameter besitzt und damit die Forderung nach einem möglichst einfachen Modell erfüllt, jedoch eine bessere Korrelation aufweist als die Funktion nach Passos (1993).

Analoge Untersuchungen wurden für den homofermentativen Referenzstamm durchgeführt. Das Ergebniss der F-Tests zeigt Tabelle 5.5-3. Im Gegensatz zu den entsprechenden Resultaten des heterofermentativen Stammes konnten jedoch nicht alle Anpassungen angenommen werden. Bei Verwendung eines quadratischen Polynoms und der Funktion nach Passos (1993) gilt  $f \cong F$  oder  $f > F$ . Diese beiden Funktionen könne daher aufgrund des F-Tests abgelehnt werden. Für das kubische Polynom und die Funktion nach Gompertz gilt jeweils  $f < F$ . Daher werden diese beiden Funktionen, die einen Parameter mehr besitzen als die abgelehnten Funktionen akzeptiert.

Tabelle 5.5-3 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert

<i>Funktion</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl der Parameter</i>	<i>f</i>	<i>F</i>
Quadratisches Polynom	45	3	2,3572	2,3638
Kubisches Polynom	45	4	0,5981	2,4772
Gompertz	45	4	0,8480	2,3637
Passos (1993)	45	3	2,7263	2,4771

Tabelle 5.5-4 Korrelationen der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert

<i>Funktion</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
Quadratisches Polynom	0,960
Kubisches Polynom	0,989
Gompertz	0,985
Passos (1993)	0,971

In Tabelle 5.5-4 sind die Korrelationen der Anpassungen gezeigt. Die Werte für die beiden angenommenen Funktionen sind nahezu gleich. Eine eindeutige Entscheidung kann daher nicht gefällt werden. Der Einsatz richtet sich daher im wesentlichen nach dem zu erwartenden pH-Bereich. Im Bereich hoher pH-Werte erscheint die Funktion nach Gompertz weniger geeignet, da sie monoton steigend ist und daher eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit bei hohen pH-Werten nicht beschreiben kann. Muß im Bereich sehr niedriger pH-Werte extrapoliert werden besteht beim Einsatz eines kubischen Polynoms jedoch die Gefahr, daß negative Werte erhalten werden. In diesem Fall ist die Funktion nach Gompertz vorzuziehen.

Die kinetischen Parameter der beiden Stämme besagen in jedem Fall, dass eine Absenkung des pH-Wertes das Wachstum des homofermentativen Stammes stärker beeinträchtigt als das des heterofermentativen Stammes. Eine Absenkung des pH-Wertes kann somit eine Verschiebung des Stoffwechsels in Richtung des Heterofermentativen Stoffwechsels verursachen.

## 5.6 Der Einfluß der entstehenden Stoffwechselprodukte auf die Organismen

Die hohen Prozentsätze der Kohlenstoffwiederfindungsrate von 96,9 % bzw. 95,9 % deuten darauf hin, daß die C-Quelle nahezu ausschließlich zur Gewinnung von Energie genutzt wird. Zum Aufbau von Zellsubstanz werden nur geringe Mengen des aufgenommenen Kohlenstoffes verwendet. Bei Organismen die nur wenige Zellbausteine selbst synthetisieren können und somit auf ein besonders reichhaltiges Medium angewiesen sind, ist dies zu erwarten. Der deutliche Unterschied in der Zellausbeute zwischen homofermentativen und heterofermentativen Organismen liegt vermutlich in der besseren Energieausbeute der homofermentativen Bakterien. Pro Mol Glucose kann ein homofermentativer Organismus bis zur doppelten Menge ATP erzeugen (Lim 1998).

Die Wirkung, der von den Organismen gebildeten organischen Säuren ist stark vom vorhandenen pH-Wert abhängig. Dies wurde bereits von Eklund (1989) beobachtet. Der Grund dafür ist der unterschiedliche Dissoziationsgrad der Säuren bei verschiedenen pH-Werten. Passos (1993) erklärt die unterschiedliche Wirkung der dissoziierten und undissoziierten Säure durch die geringere Polarität der undissoziierten Säure. Diese Eigenschaft versetzt sie in die Lage, die Zellmembran einfacher zu durchdringen. Innerhalb der Zelle dissoziiert sie bei den dort herrschenden höheren pH-Werten und verringert den intrazellulären pH-Wert dadurch. Es kann jedoch nicht alleine vom pK-Wert, von dem der Dissoziationsgrad der Säure abhängt, auf die hemmende Wirkung der Säure geschlossen werden (International Commission on Microbiological Specification for Food, 1980). Dies muß für jede Säure getrennt untersucht werden. Für die beiden relevanten Säuren Milchsäure und Essigsäure wurden Messungen durchgeführt die dem Rechnung tragen. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Messungen diskutiert.

## Lactat

Bei beiden Stämmen erkennt man in Abbildung 4.10-4 bzw. Abbildung 4.10-7, daß bei hohen pH-Werten die Hemmung auch durch hohe Konzentrationen von Milchsäure nur sehr gering ist. Der Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 wächst bei einer Milchsäurekonzentration von 500 mmol/l und einem pH-Wert von 5,4 immer noch mit 40 % seiner maximalen Wachstumsgeschwindigkeit wie in Abbildung 4.10-1 zu erkennen ist. Dies spricht dafür, daß die dissoziierte Säure, die bei hohen pH-Werten vorwiegend auftritt, nur eine äußerst geringe hemmende Wirkung auf die Organismen ausübt. Bei geringeren pH-Werten ist mit abnehmendem pH-Wert eine deutliche Hemmung feststellbar.

Wie im Kapitel 4.8.2 beschrieben besteht die Möglichkeit, die hemmende Wirkung der dissoziierten Milchsäure mit in die Berechnungen einzubeziehen. Dadurch entsteht jedoch eine Gleichung mit sehr vielen Parametern. Da jedoch mathematische Modelle möglichst einfach gehalten werden sollen, wurde von diesem Ansatz Abstand genommen und lediglich der pH-Wert und die undissoziierte Milchsäure betrachtet.

In allen Fällen wurde ein kubische Polynom verwendet, um die Hemmung der Organismen durch den pH-Wert zu beschreiben. Die Hemmung der Organismen durch die undissoziierte Milchsäure wurde entweder auch durch ein kubisches Polynom oder durch die Funktion nach Levenspiel (1980) (Gl. 3.17) beschrieben.

Beide Anpassungen wurden wiederum einem F-Test unterzogen. Das Resultat ist in Tabelle 5.6-1 festgehalten. Die Kombination aus kubischem Polynom und Funktion nach Levenspiel (1980) muß nach diesen Ergebnissen abgelehnt werden, da  $f > F$  gilt. Die Kombination aus zwei kubischen Polynomen ist deutlich besser zur Beschreibung der Vorgänge geeignet.

Tabelle 5.6-1 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Milchsäurekonzentration

<i>Funktion</i> <i>pH-Wert</i>	<i>Funktion</i> <i>Lactat</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl</i> <i>der f</i> <i>Parameter</i>	<i>der f</i>	<i>F</i>
kubisches Polynom	kubisches Polynom	288	9	1,0237	1,3734
kubisches Polynom	Levenspiel (1980)	288	7	2,2773	1,3689

Die Korrelationskoeffizienten untermauern dieses Ergebnis. Für die Beschreibung durch zwei kubische Polynome erhält man einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,936$ . Die Kombination aus kubischem Polynom und Funktion nach Levenspiel führt dagegen zu einem deutlich geringeren Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,902$ . Dies kann anhand der wesentlich größeren Streuung um die Winkelhalbierende in Abbildung 4.10-8 nachvollzogen werden. Dies bedeutet, in diesem Fall ist eine Kombination aus zwei Polynomen besser zur Beschreibung der Vorgänge geeignet als eine Kombination mit einer Funktion, die Parameter enthält die physiologischen Konstanten entsprechen.

Tabelle 5.6-2 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Milchsäurekonzentration

<i>Funktion</i> <i>pH-Wert</i>	<i>Funktion</i> <i>Lactat</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl</i> <i>der f</i> <i>Parameter</i>	<i>der f</i>	<i>F</i>
kubisches Polynom	kubisches Polynom	216	9	0,8097	1,4041
kubisches Polynom	Levenspiel (1980)	216	7	0,8968	1,3998

Für den homofermentativen Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 wurden die gleichen Anpassungen durchgeführt. Das Ergebnis der F-Tests ist in Tabelle 5.6-2 aufgeführt. In diesem Fall gilt für beide Kombinationen  $f < F$ . Keine der beiden Funktionen muß daher abgelehnt werden. Wie beim heterofermentativen Vergleichsstamm ist auch hier der Korrelationskoeffizient mit 0,9591 bei Verwendung zweier kubischer Polynome höher als 0,9430 bei Verwendung der Funktion nach Levenspiel. Jedoch ist in diesem Fall der Unterschied geringer, so daß beide Anpassungen als sinnvoll verwendbar erscheinen.

## Acetat

Essigsäure wird in geringen Konzentrationen eine für manche Stämme wachstumsfördernde Wirkung zugeschrieben. Passos et al. (1993) berichten von einer positiven Wirkung einer Essigsäurekonzentration von 10 - 20 mmol/l bei *L. plantarum*. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen konnte diese Wirkung nicht nachgewiesen werden. Einzelne nach oben abweichende Meßpunkte in Abbildung 4.10-11, die in dieser Weise interpretiert werden könnten, müssen als Ausreißer gewertet werden. Ebenso wie bei der Hemmung durch Milchsäure ist in Abbildung 4.10-12 erkennbar, daß die Wirkung stark vom pH-Wert abhängig ist. Mit steigendem pH-Wert nimmt die hemmende Wirkung der Milchsäure

deutlich ab. Es kann daher wiederum davon ausgegangen werden, daß die dissoziierte Säure nur einen vernachlässigbar geringen Einfluß auf das Wachstum der Organismen ausübt. Analog zu den Untersuchungen bei Milchsäure wurden deshalb die beiden Größen Essigsäurekonzentration und pH-Wert variiert. Es wurden die gleichen Kombinationen von Funktionen getestet wie bei Milchsäure.

Die beiden F-Tests (Zwietering et al 1994) für Stamm *L. pontis* TMW 1.109 sind in Tabelle 5.6-3 dargestellt. Sie führen zur Annahme beider Ansätze. Bei Stamm *L. pontis* TMW 1.109 führen die beiden kubischen Polynome zu einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,924$  und die Kombination aus kubischem Polynom und Funktion nach Levenspiel (1980) zu einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0,902$ . Es führt also wiederum die Anpassung durch zwei kubische Polynome zu der exakteren Beschreibung der Meßwerte, jedoch werden dafür zwei Parameter mehr benötigt, so daß keinem der beiden Ansätze eindeutig der Vorzug gegeben werden kann.

Tabelle 5.6-3 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Essigsäurekonzentration

<i>Funktion</i> <i>pH-Wert</i>	<i>Funktion</i> <i>Lactat</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl</i> <i>der f</i> <i>Parameter</i>	<i>f</i>	<i>F</i>
kubisches Polynom	kubisches Polynom	216	9	0,3071	1,4041
kubisches Polynom	Levenspiel (1980)	216	7	0,3808	1,3998

Eine analoge Untersuchung wurde mit dem homofermentativen Referenzstamm durchgeführt. Die Ergebnisse der F-Tests sind in Tabelle 5.6-4 dargestellt. Hier muß jedoch das Produkt aus kubischem Polynom und Funktion nach Levenspiel (1980) zur Beschreibung des Wachstumsverhaltens abgelehnt werden, da für diesen Fall  $f > F$  gilt. Auch die Betrachtung der Korrelationskoeffizienten, die für das Produkt aus zwei kubischen Polynomen  $R^2 = 0,942$  und für das Produkt aus kubisches Polynom und Funktion nach Levenspiel (1980)  $R^2 = 0,916$  betragen, sprechen für eine Verwendung der beiden kubischen Polynome.

Tabelle 5.6-4 F-Test der Anpassungen verschiedener Funktionen an das Wachstumsverhalten des Stammes *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Essigsäurekonzentration

<i>Funktion</i> <i>pH-Wert</i>	<i>Funktion</i> <i>Lactat</i>	<i>Anzahl der Messungen</i>	<i>Anzahl der Parameter</i>	<i>f</i>	<i>F</i>
kubisches Polynom	kubisches Polynom	216	9	0,489	0,682
kubisches Polynom	Levenspiel (1980)	216	7	1,404	1,399
				1	8



## Ethanol

Der Einfluß von Ethanol kann in Fermentationen wie sie hier durchgeführt wurden vernachlässigt werden. Dies zeigt sich deutlich in Abbildung 4.10-1 und Abbildung 4.10-2. Eine signifikante Veränderung der Wachstumsrate mit steigender Ethanolkonzentration ist nicht erkennbar. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann diese Aussage bis zu einer Konzentration von 400 mmol/l gemacht werden. Dieser Wert liegt deutlich über den Konzentrationen die in den Laborfermentationen erreicht wurden. Die industriell durchgeführten Fermentationen erreichen ebenfalls deutlich niedrigere Ethanolkonzentrationen wie in Kapitel 4.15 oder bei Müller (1995) beschrieben. Bei veränderten Bedingungen wie zum Beispiel einer Fermentation, an der Hefen beteiligt sind, müßten die Untersuchungen entsprechend erweitert werden.

### 5.7 Der Einfluß der Temperatur auf die Organismen

Die Temperatur ist für die Produktion von Sauerteig jeglicher Art ein wesentlicher Einflußfaktor. Dies liegt zum einen daran, daß diese Größe vergleichsweise einfach zu beeinflussen ist, und zum anderen, daß die Temperatur große Auswirkungen auf die Organismen hat, die für die Fermentation verantwortlich sind. Das Wachstum der beiden Stämme *L. amylovorus* TMW 1.661 und *L. pontis* TMW 1.109 wurde untersucht und verschiedene Modellgleichungen an die Meßwerte angepaßt. Die daraus erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5.7-1 und Tabelle 5.7-2 zusammengefaßt. Auffallend ist bei beiden Stämmen, daß der Korrelationskoeffizient für die Anpassung einer Funktion nach Bellgardt (1991) im Vergleich zu den beiden anderen in Kapitel 4.11 verwendeten Funktionen deutlich abfällt. Im Bereich hoher Temperatur fällt auf, daß bei dieser Funktion keine maximale Temperatur angegeben werden kann, ab der das Wachstum auf null absinkt. Diese Funktion weist auch bei sehr hohen Temperaturen noch Werte über null auf, obwohl in den Experimenten eindeutig festgestellt wurde, daß beide Stämme über einer Temperatur von 52 °C kein Wachstum mehr zeigen. Dies läßt die Funktion nach Bellgardt (1991) als wenig geeignet erscheinen, um das Wachstum der Stämme in Abhängigkeit von der Temperatur zu beschreiben. Für Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 liefert die Anpassung der Funktion nach Zwietering (1991) den höchsten Wert für die Korrelation und die Temperaturgrenzen für das Wachstum stimmen gut mit den Beobachtungen überein. Die Funktion nach Dossmann (1996) liefert hier weniger geeignete Werte. Die Angabe für die minimale Temperatur, bei der gerade kein Wachstum mehr zu beobachten ist, kann hier nur annähernd gegeben werden, da die Funktion bei der angegebenen Temperatur keine Nullstelle aufweist, sondern nur ein lokales Minimum nahe Null besitzt.

Tabelle 5.7-1 Ergebnisse der Anpassungen verschiedener Modellgleichungen an das Wachstum von Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 in Abhängigkeit von der Temperatur

Funktion	$R^2$	$T_{min}$	$T_{max}$	$T_{opt}$	Anzahl der Parameter
Dossmann (1996)	0,962	(25 °C)	54,3 °C	44,2 °C	4
Bellgardt (1991)	0,902	---	---	41,7 °C	5
Zwietering (1991)	0,983	22,1 °C	51,7 °C	43,4 °C	5

Für den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 ist der Korrelationskoeffizient der Funktion nach Dossmann (1996) am höchsten. Da sie zudem die geringere Anzahl an Parametern enthält ist sie den anderen Funktionen vorzuziehen.

Tabelle 5.7-2 Ergebnisse der Anpassungen verschiedener Modellgleichungen an das Wachstum von Stamm *L. pontis* TMW 1.109 in Abhängigkeit von der Temperatur

<i>Funktion</i>	$R^2$	$T_{min}$	$T_{max}$	$T_{opt}$	<i>Anzahl der Parameter</i>
Dossmann (1996)	0,975	26,4 °C	52,0 °C	40,6 °C	4
Bellgardt (1991)	0,898	---	---	41,6 °C	5
Zwietering (1991)	0,964	20,0 °C	53,1 °C	41,1 °C	5

Generell ist auffallend, daß der Ansatz nach Bellgardt (1991) sich als am wenigsten zur Beschreibung der Meßwerte erwiesen hat, obwohl dieser auf einer in Kapitel 3.8.4 beschriebenen systematischen Herleitung beruht. Die Vorgänge sind demnach so komplex, daß sie durch empirisch ermittelte Gleichungen ebensogut oder sogar besser beschrieben werden können. In einem Punkt zeigt sich die mechanistische Gleichung nach Bellgardt (1991) jedoch überlegen. Im Bereich niedriger Temperaturen steigen die Werte der Funktionen nach Dossmann (1996) und Zwietering (1991) bei sinkender Temperatur an. Dies widerspricht allen Beobachtungen ebenso wie prinzipiellen Überlegungen. Für Extrapolationen ist daher der Ansatz nach Bellgardt (1991) vorzuziehen.

Die Untersuchung des Glucoseverbrauchs pro gebildeter Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur ergab keine meßbare Verschiebung. Für beide Organismen ist die Steigung der Korrelationsgerade nahe 0 und der Korrelationskoeffizient klein (0,0059 und 0,096). Aus theoretischen Überlegungen ist zu vermuten, daß der Glucoseverbrauch bei sehr hohen Temperaturen ansteigt, da die Organismen auf hohe Temperaturen mit der Bildung von Streßproteinen reagieren (Lehninger et al 1998). Diese Bildung ist mit einem Verbrauch nutzbarer Energie verbunden, dem keine Bildung von Zellmasse gegenüber steht. Da dieser Effekt in den Experimenten nicht nachweisbar ist, sind zwei Erklärungen möglich. Zum Einen ist es möglich, daß die Bildung von Streßproteinen so wenig ATP verbraucht, daß die Meßgenauigkeit nicht ausreichte, um den Effekt feststellen zu können. Zum Anderen könnte es sein, daß die Bildung von Streßproteinen erst bei sehr geringen Wachstumsraten einsetzt, bei denen die Messung des Glucoseverbrauchs nicht mehr in ausreichender Genauigkeit möglich ist. Dies würde bedeuten, daß die Denaturierung von Enzymproteinen einsetzt, bevor die Bildung von Streßproteinen die Organismen schützt. Die Untersuchung der Bildung von Milchsäure pro neu entstandener Zellmasse in Abhängigkeit von der Temperatur ist analog zu sehen. Die in Abbildung 4.11-13 und Abbildung 4.11-14 dargestellten Ergebnisse untermauern die oben angeführten Ergebnisse.

Die optimale Wachstumstemperatur, ebenso wie die maximale Wachstumstemperatur ist beim homofermentativen Stamm höher als beim heterofermentativen Stamm. Dies erklärt die in Kapitel 4.6 beobachtete Stoffwechsellverschiebung bei Veränderung der Temperatur.

## 5.8 Der Einfluß des Sauerstoffs auf die Organismen

Sowohl der homofermentative Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 als auch der heterofermentative Stamm *L. pontis* TMW 1.109 werden durch eine hohe Sauerstoffkonzentration gehemmt. Dies zeigt der in Abbildung 4.12-1 dargestellte Versuch. Wird in dieser Versuchsanordnung die Frequenz des Schüttlers nur um ca. 5 rpm gesteigert und dadurch der Sauerstoffeintrag geringfügig erhöht, sinkt die Menge der gebildeten Zellmasse bis auf nahezu Null ab. Die Grenze, ab der die Hemmung durch Sauerstoff einsetzt, muß demnach sehr eng sein. Der heterofermentative Stamm *L. pontis* TMW 1.109 besitzt andererseits die Fähigkeit, Sauerstoff aufzunehmen und als Elektronenakzeptor zu nutzen. Diese Fähigkeit wurde bereits für verschiedene heterofermentative Organismen beobachtet (NG 1972, Martinez-Anaya et al 1994, Stolz et al 1995, Hammes et al 1996). Dabei entsteht toxisches Wasserstoffperoxyd (Axelson 1998). Die verwendeten Organismen verfügen jedoch nicht über die weit verbreiteten z.B. von Lim (1994) beschriebenen Entgiftungsmechanismen. Eine Möglichkeit für die Organismen der Toxizität des Wasserstoffperoxyds zu entgehen, könnte in der Bildung von Pseudo-Katalase liegen (Hammes und Vogel 1995). Diese Vorgänge führten zu einer Verschiebung des Stoffwechsels in Richtung der Bildung von Acetat. Dies belegen die Fermentationen die parallel aerob und anaerob durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4.12-2 dargestellt. Im Falle der aeroben Fermentationen wurde signifikant mehr Acetat gebildet. Die geringfügige Bildung von Acetat im Fall der anaeroben Fermentationen ist auf eventuell vorhandenen Restsauerstoff und andere im Medium in geringen Mengen vorhandenen Elektronenakzeptoren zurückzuführen. Die Nutzung des Sauerstoffs durch den Stamm *L. pontis* TMW 1.109 führt zu einem Verbrauch von Sauerstoff. Daher besteht die Möglichkeit, daß dessen hemmende Wirkung verringert wird. In 4.10 wurde gezeigt, daß es eine Sauerstoffkonzentration gibt, bei der Stamm *L. pontis* TMW 1.109 nicht gehemmt wird, das Wachstum von Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 jedoch im Vergleich zur anaeroben Fermentation deutlich absinkt. In Abbildung 4.12-3 ist der Synergie-Effekt der beiden verwendeten Stämme zu erkennen. Würden die beiden Stämme in der Mischkultur unabhängig voneinander wachsen, müßte sich ein Wachstum gemäß der im Diagramm dargestellten rechnerischen Summe aus dem Wachstum der beiden einzelnen Stämme ergeben. Unter anaeroben Bedingungen (Abbildung B) liegt das tatsächliche Wachstum deutlich unter dieser Kurve. Dies ist zu erwarten, da beide Stämme um Nährstoffe konkurrieren und die Hemmung durch Stoffwechselprodukte größer ist. Unter aeroben Bedingungen (Abbildung A) ist jedoch das tatsächliche Wachstum in der Mischkultur größer als die rechnerische Summe der Einzelkulturen. Da die Bedingungen in den parallelen Ansätzen gleich waren, ist dadurch nachgewiesen, daß ein Synergie-Effekt vorliegt. Unter ansonsten gleichen Verhältnissen liegt dieser Synergie-Effekt nicht vor, wenn die Fermentationen unter Sauerstoffabschluß durchgeführt werden. Der heterofermentative Stamm *L. pontis* TMW 1.109 verbraucht den Sauerstoff und der homofermentative Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 zeigt als Indikatorstamm die Verringerung der hemmenden Wirkung an.

Der Eintrag von Sauerstoff müßte aus den oben aufgeführten Gründen zu einer höheren Energieausbeute in den Fermentationen führen. Dieser Effekt wurde bei anderen Stämmen von Paynter et al. (1997), und Klostermaier (1999) beobachtet. Die hohe Empfindlichkeit der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Organismen gegenüber Sauerstoff bedingt jedoch, daß die höhere Energieausbeute in Gegenwart von Sauerstoff nur in sehr geringem Maße genutzt werden kann. Da zudem der Sauerstoffeintrag in einen Fermenter nicht exakt dosiert werden kann, ist die Verwendung von Sauerstoff als preisgünstiger Elektronenakzeptor kein probates Mittel zur Steigerung der Ausbeute.

## 5.9 Der Einfluß der Ionenstärke auf die Organismen

Verschiedentlich wird von der positiven Wirkung von Salzen in geringer Konzentration berichtet. So fand Maloney (1977) eine positive Wirkung auf ATPasen und Otto et al. (1983) eine unterstützende Wirkung auf die Erhaltung des intrazellulären pH-Wertes. Für die verwendeten Stämme konnte jedoch keine fördernde Wirkung von geringen Salzkonzentrationen gefunden werden. Lediglich die Hemmung bei hohen Konzentrationen wurde beobachtet. Dabei ist die Reaktion der beiden untersuchten Stämme auf steigende Salzkonzentration sehr unterschiedlich. Der homofermentative Stamm *L. amylovorus* TMW 1.661 zeigt bis zu einer Konzentration von ca. 2,5 % Salz nur eine geringe Reaktion. Steigt die Konzentration weiter an sinkt die Wachstumsrate rasch auf 0 ab. Die maximale Wachstumsrate des heterofermentativen Stammes *L. pontis* TMW 1.109 sinkt demgegenüber bereits bei geringen Konzentrationen leicht ab, beträgt jedoch auch bei einer Konzentration von 4 % Salz noch ca. 1/3 des maximalen Wertes.

## 5.10 Der ATP-Pool innerhalb der Zellen

Bei der Betrachtung des Verlaufes des ATP-Wertes während einer Fermentation war es insbesondere von Bedeutung, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der momentanen Wachstumsrate und dem ATP-Wert besteht. In diesem Fall wäre es möglich gewesen, das Wachstum als Funktion des ATP-Wertes zu berechnen. Der Einfluß von Faktoren wie pH und die Konzentration der Stoffwechselprodukte würde indirekt durch die Veränderung des ATP-Pools zur Geltung kommen. In Abbildung 4.14-1 sieht man jedoch, daß dieser Ansatz zur Beschreibung des Wachstums nur bedingt geeignet ist. Man erkennt, daß die intrazelluläre ATP-Konzentration noch ansteigt nachdem die Wachstumsrate bereits deutlich zurückgegangen ist. Daher kann dieser Wert nicht zur alleinigen Beschreibung der Wachstumsrate ausreichen. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Auswirkung hemmender Substanzen nicht nur über eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels und damit durch eine Verringerung der den Organismen zur Verfügung stehenden Energie erfolgt sondern, daß das Wachstum hemmende Substanzen einen direkten Einfluß auf die Bildung von Zellmasse besitzen.

Weiterer Gegenstand der Untersuchung war das Verhalten des intrazellulären ATP-Pools bei Variation des pH-Wertes. Vergleicht man drei Batch-Fermentationen, die bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt wurden, so ergibt sich ein deutlicher Unterschied im Verlauf der intrazellulären ATP-Konzentration, obwohl das Wachstum weitgehend parallel verläuft. Das bedeutet, daß die Zellen in der Lage sind, die ungünstigeren Wachstumsbedingungen bei niedrigeren pH-Werten bis zu einem gewissen Maß durch interne Regelmechanismen auszugleichen wodurch sich der intrazelluläre ATP-Gehalt der Zellen verändert. Dies könnte im wesentlichen durch Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes geschehen.

### **5.11 Modell zur Beschreibung des heterofermentativen Stoffwechsels**

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, das Wachstum des heterofermentativen Stammes *L. pontis* TMW 1.109 kombiniert mit den wesentlichen Aspekten des Stoffwechsels der Organismen zu beschreiben. Dazu wurde zunächst das Stoffwechselschema des heterofermentativen Glucoseabbaus vereinfacht, um die Anzahl der Parameter in Grenzen zu halten. Dann wurde daraus ein System von Differentialgleichungen abgeleitet. Ähnliche Systeme wurden bereits entwickelt z.B. für homofermentative Organismen von Passos et al (1993) und Klostermaier (1999). In diesen Systemen wurden jedoch keine intrazellulären Vorgänge berücksichtigt. Das in der vorliegende Arbeit entwickelte System wurde dann an Meßdaten angepaßt. Die erhaltenen Parameter sind dazu geeignet, Aussagen über das Verhalten der Organismen zu treffen.

So wurden mit dieser Methode Ergebnisse aus Versuchen bestätigt und damit die Anwendbarkeit des Modells erwiesen. Dies konnte am Beispiel der Affinität der Organismen gegenüber Zucker und deren Hemmung durch Stoffwechselprodukte gezeigt werden. Unterschiede zur isolierten Betrachtung ergaben sich bei der Untersuchung von Fructose. Deren Aufnahme kann bei Zellen in identischem physiologischem Zustand als konstant angenommen werden. Die Fructoseaufnahme während einer Fermentation ist jedoch nur durch eine lineare Abhängigkeit von der Fructosekonzentration zu beschreiben. Dies könnte man durch einen Aufnahmemechanismus wie erleichterte Diffusion erklären. Dieser scheinbare Widerspruch könnte durch folgende Annahme geklärt werden. Die Fructoseaufnahme und Acetatbildung werden durch eine Kinetik nach Michaelis-Menten bestimmt. Während einer Fermentation ändert sich der physiologische Zustand der Zellen gegenüber Fructose in Abhängigkeit der Fructosekonzentration. Diese Hypothese muß durch weitere Versuche untermauert werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch bereits in die beschriebene Richtung. Das Modell liefert zusätzlich Abschätzungen über die intrazelluläre Konzentration von ATP und den C-Körpern. Diese können als Diskussionsgrundlage und zur Weiterentwicklung physiologischer Modelle dienen.

## 6 Zusammenfassung

Brotteig wird seit langer Zeit gesäuert. Ohne Kenntnis der Vorgänge, die zur Säuerung führen, und ohne die Gründe für die positiven Wirkungen der Säuerung zu kennen, wurden bereits früh leistungsfähige Verfahren auf empirischem Wege entwickelt. Heute ist bekannt, welche Organismen für die Säuerung verantwortlich sind und worauf die Verbesserung der Teigqualität beruht.

Traditionell wurde Teig durch spontane Säuerung oder durch Anfrischen mit Sauerteig aus der letzten Führung hergestellt. Diese Methoden sind bis heute gebräuchlich. Eine Verbesserung erzielt man indem man Reinzuchtkulturen verwendet. Dadurch wird die biologische Sicherheit erhöht und eine hohe Fermentationsleistung garantiert. Da bekannt ist, daß die wichtigsten Aspekte der Sauerteigbereitung auch durch Zugabe von Milchsäure erreicht werden können, wird heute auch ein Verfahren angewandt, bei dem in Form von getrockneten Sauerteigpräparaten die Milchsäure zugeführt wird. Dadurch kann die zeitaufwendige und risikobehaftete Fermentation zentral in großen Fermentern ablaufen, und das Endprodukt einfach gelagert und transportiert werden.

In diesen als Typ II-Fermentationen bezeichneten Fermentationen haben sich im wesentlichen zwei Gruppen von Mikroorganismen etabliert. Diese können nach ihrem jeweiligem Hauptstoffwechselweg als homofermentative und heterofermentative Organismen bezeichnet werden. Je ein repräsentativer Vertreter der beiden Gruppen wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Diese waren der heterofermentative *L. pontis* TMW 1.109 und der homofermentative *L. amylovorus* TMW 1.661.

Eine neue Methode wurde entwickelt mit der wesentliche Vorgänge während einer derartigen Fermentation beobachtet werden konnten. Mit dieser Methode wurden Verschiebungen des Stoffwechsels festgestellt. Zum einen konnte eine Zunahme des homofermentativen Stoffwechsels bei steigender Temperatur beobachtet werden. Zum anderen zeigte sich ein Rückgang des homofermentativen Stoffwechsels während einer Fermentation. Um einen genaueren Einblick in diese Fermentationen zu erhalten wurden daraufhin die Reaktion der Organismen auf einzelne Einflussfaktoren näher untersucht.

Die Untersuchung der Organismen auf ihr Verhalten gegenüber Nährstoffen zeigte in beiden Fällen eine hohe Affinität gegenüber dem Haupt-Energielieferanten Glucose. Parameter wurden ermittelt, um das Wachstum der Organismen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zu beschreiben. Es wurde nachgewiesen, daß Pentosen nur in sehr geringem Ausmaß verwertet werden. Diese Stoffgruppe kann für die dynamische Betrachtung der Vorgänge in den Fermentationen vernachlässigt werden. Fructose beeinflusst das Wachstum beider Stämme kaum. Der Stoffwechsel der heterofermentativen Organismen wird jedoch durch Fructose stark beeinflusst, da der Zucker als Elektronenakzeptor verwendet wird und sich das Produktspektrum der Fermentation ändert. Dieser Vorgang wurde untersucht und Möglichkeiten zur quantitativen Beschreibung entwickelt. Die Organismen in den beobachteten Fermentationen sind auf komplexe Nährmedienzusätze angewiesen. In den Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß die Affinität zu den für ein nachhaltiges Wachstum benötigten Stoffen gering ist, und daher auf eine ausreichende Versorgung der Organismen geachtet werden muß.

Desweiteren wurde die Hemmung der Organismen durch die entstehenden Stoffwechselprodukte untersucht. Ethanol konnte dabei vernachlässigt werden, da es in dem relevanten Bereich keine meßbare Auswirkung auf die Organismen zeigte. Anders bei den gebildeten Säuren. Diese haben eine hemmende Wirkung auf die Organismen. Dabei war jedoch eine differenziertere Betrachtung notwendig. Sowohl für Milchsäure als auch Essigsäure konnte nachgewiesen werden, daß die hemmende Wirkung im dissoziierten Zustand vernachlässigt werden kann. Um die Hemmung durch die undissoziierten Säuren beschreiben zu können, muß der pH-Wert mit berücksichtigt werden. Verschiedene Modelle wurden getestet, die dies beschreiben können. Polynomische Modelle sind in den meisten Fällen zu bevorzugen.

Sauerstoff hemmt beide untersuchten Referenzorganismen. Der heterofermentative Organismus kann jedoch Sauerstoff in geringen Konzentrationen verwerten und dadurch dessen toxische Wirkung verringern. In industriellen Prozessen kann dies in den Anfangsphasen der Fermentation eine Rolle spielen, wenn durch Mischvorgänge Sauerstoff eingetragen wurde. Die erhöhte Energieausbeute durch die Verwertung von Sauerstoff kann nicht nutzbar gemacht werden, da aufgrund dessen toxischer Wirkung auf die Organismen nur sehr geringe Mengen in den Fermenter eingebracht werden können.

Die Temperaturabhängigkeit des Wachstums beider Organismen kann gut mathematisch beschrieben werden. Dabei zeigt sich, daß der homofermentative Organismus ein höheres Temperaturoptimum besitzt als der heterofermentative.

Die Berücksichtigung der Stöchiometrie der Hauptstoffwechselwege ermöglicht es, durch die Messung einfach zu ermittelnder Größen, Rückschlüsse auf die Vorgänge in einem Fermenter zu ziehen, in dem ein Organismengemisch zum Einsatz kommt. Dadurch wird eine On-line-Beobachtung möglich.

Der intrazelluläre ATP-Pool des heterofermentativen Stammes wurde beobachtet. Dadurch konnte nachgewiesen werden, daß dieser nicht im Zusammenhang mit der aktuellen Wachstumsrate steht. Der pH-Wert des Mediums beeinflußt den intrazellulären pH-Wert erheblich.

Ein komplexes Modell wurde entwickelt, in dem intrazelluläre Vorgänge mit der Beschreibung des Wachstums der Zellen kombiniert wurde. Dies ermöglicht eine differenziertere Betrachtung der Vorgänge in einem Fermenter. Die intrazellulären Vorgänge müssen dabei zwar stark vereinfacht in das Modell einbezogen werden, dennoch können Hypothesen an einem derartigen Modell getestet werden.

## 7 Summary

The acidification of dough is known since very long time. Without a detailed knowledge of the process leading to acidification and without knowing the reasons of the positive effects of acidification mankind developed effective methods for dough acidification by empiric ways. Today the organism responsible for acidification are well known as well as the chemical effects caused by the acidification.

There are two traditional ways of producing sourdough. The spontaneous acidification by the bacteria of the flour and the usage of an inoculum from the previous fermentation. These methods are in use till today. An improvement of the sourdough-production is the usage of starter-cultures. By means of this the biological security is improved as well as the efficiency of the fermentation. As it is known today that the most important effects of the sourdough-production can be achieved by adding lactic acid, a new form of sourdough-production was developed. This procedure uses dried material from cereal fermentations. By means of this the time consuming and riskfull fermentation can be carried out in big fermentation vessels where the process control is easier and the efficiency is better. The dried product of this process can be stored for long time and easily be transported.

These fermentations are called type II fermentations. Two types of organism are considered to dominate in these fermentations. According to the respective main methabolic pathway the groups are called homofermentative and heterofermentative organism. One representative strain of each group was selected and investigated in detail.

A new method was developed to examine the main processes in the above mentioned fermentations. Using this method a metabolic shift could be observed. Increasing temperature led to a shift towards heterofermentative metabolism. During a fermentation the heterofermentative metabolism decreased. To gain a deeper insight to the fermentation the reaction of the organisms to different parameters was investigated.

The effect of the concentration of different nutrients on the organism was examined. Both strains show a strong affinity towards the main energy-supplier glucose. Parameters were determined to describe the effect on the growth of the organism. It was shown, that pentoses are consumed to a very low degree. This group of carbohydrates has not to be considered in a dynamic description of the processes during the fermentations. The influence of fructose on the growth of both strains is very low. Hence the metabolism of the heterofermentative strain is affected deeply by fructose. This process was examined and a method was developed to describe the quantities of the changes. The examined organism are strongly dependent to a sufficient supply of complex ingredients of the media. The experiments show, that the affinity of the organism to the supplements is not very high. Therefore a sufficient supply of the organism is important.

In addition the inhibition of the organism by the products of the metabolism was examined. It was shown, that the effect of ethanol can be neglected. The concentrations of ethanol used in the experiments had no measurable effect on the organism. This was different with the organic acids. These show a strong inhibitory effect on the organism. The inhibition is depending on the degree of the dissociation of the acid and therefore depending of the pH-value of the medium. For both, lactic and acetic acid it was shown that the inhibitory effect of the undissociated acid on the organism can be neglected. Therefore a mathematical



description of the effect of the organic acids has to consider the pH-value. Various models were tested to describe this. In most cases simple polynomial models were superior.

Oxygen has a strong inhibitory effect on both considered organism. The heterofermentative strain has got the ability to use oxygen as a electron-acceptor. This reduces the concentration of oxygen and therefore its toxic effect. In industrial processes this may be important at the beginning of fermentations. In this phase oxygen can be dissolved in the fermenter due to mixing-processes. The higher gain of energy for the organism can not be used because of the toxic effect of the oxygene which limits the concentration of oxygen at a very low level.

The effect of temperature on the growth of the organism can be described well by mathematical equations. The homofermentative organism show a higher optimum compared to the heterofermentative strain.

If the stoichiometry of the main metabolical pathways is considered, it is possible to get information about the state of the fermentation by simple measurements. These measurements can be made on-line.

Observations of the intracellular ATP-concentrations were made. These showed that there is no relation between the actual growth-rate and the intracellular ATP-concentration. An effect of the pH-value on the intracellular ATP-concentrations could be shown.

A complex model was developed which takes the intracellular processes into consideration. This allows a sophisticated view on the intracellular processes. The intracellular processes must be simplified for this purpose, but the model is useful to test hypotheses.

## 8 Literatur

- Axelsson, L. (1998)  
Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology  
In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, edited by Seppo Salminen
- Belitz, H.D., Grosch W. (1987)  
Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage Springer-Verlag
- Bellgardt KH (1991)  
Biotechnology Volume 4 Measuring Modelling and Control. Verlag VCH Weinheim
- Berg und Kuhlmann (1993)  
Berg und Kuhlmann (eds.) Systemanalyse und Simulation für Agrarwissenschaftler und Biologen. Eugen Ulmer, Stuttgart
- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W.P. (1995)  
Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauergetypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*.  
Getreide Mehl und Brot 49: 370-374
- Bossel, H. (1994)  
Modeling and Simulation. Vieweg Verlag Braunschweig
- Buchanan, R.L., Phillips, J.G. (1995)  
Response Surface Model for Predicting the Effects of Temperature pH, Sodium Chloride Content, Sodium Nitrite Concentration and Atmosphere on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53(5): 370 - 376.
- Characklis, W.G. (1983)  
Process Analysis in Microbial Systems: Biofilms as a Case Study in Mathematics in Microbiology edited by Bazin, M. 171 - 234
- Citti, J.E., Sandine, W.E., Elliker, P.R. (1967)  
Lactose and Maltose Uptake by *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Science* 50: 485-487.
- Cui, Q., Lawson, G.J. (1982)  
Study on models of single populations: An expansion of the logistic and exponential equation. *J. Theor. Biol.* 98:645

- Doßmann, M.V., Vogel, R. F., Hammes, W.P. (1996)  
 Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 : 334 -339.
- Eklund, T. (1989)  
 Organic acids and esters. In: Gould, G.W. (eds.). *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Science Publishers Ltd., London, pp : 160 - 200
- Feldmann, D. (1989)  
 Repetitorium der Ingenieur-Mathematik Teil 2. Verlag C. Feldmann, Hannover
- Finlayson, H.J. (1986)  
 The effect of pH on the growth and metabolism of *Streptococcus bovis* in continuous culture. *Journal of Applied Bacteriology* 61: 201-208
- Frame, K.K., Hu, W.S. (1988)  
 A Model for density dependent growth of anchorage-dependent mammalian cells. *Biotech. Bioeng* 32: 1061
- Gänzle, M.G., Häusle, S., Hammes, W.P. (1997)  
 Wechselwirkungen zwischen Laktobazillen und Hefen des Sauerteiges. *Getreide Mehl und Brot* 51:209-215
- Gänzle, M.G., Ehrmann, M., Hammes, W.P. (1998)  
 Modelling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 2616-2623.
- Ghose, T.K. and Tyagi, R.D. (1979)  
 Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotech. Bioeng.* 12: 1401 - 1420.
- Guerzoni, M.E., Sinigaglia, M., Guardini F., Ferruzzi M., Torriani S. (1995)  
 Effects of pH, Temperature, Ethanol, and Malate Concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenus*: Modelling of the Malolactic Activity. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 368-374.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1995)  
 The genus *Lactobacillus*, in *The Genera of Lactic acid Bacteria* (Wood, B.J.B., Holzappel, W.H.) Chapman and Hall London, 19 - 54.
- Hammes, W.P., Stolz, P., Gänzle, M. (1996)  
 Metabolism of Lactobacilli in traditional sourdoughs. *Adv. Food Sci. (CMTL)* 18 : 176 - 184
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1997)  
 Mikrobiologie von Sauerteig. In *Mikrobiologie der Lebensmittel: Lebensmittel pflanzlicher Herkunft*. Behr's Verlag Hamburg Seite 263-285

- Harvey, J.D. (1983)  
 Mathematics of Microbial Age and Size Distribution Mathematics in Microbiology  
 edited by Bazin, M. 171 - 234
- Jaspers, E., Overmann, J. (1997)  
 Separation of Bacterial Cells by Isoelectric Focussing, a New Method for Analysis of  
 Complex Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology, 63: 3173-  
 3181
- Kamogawa, A. Yokobayashi, K. Fukui, T. (1973)  
 Purifikation and Properties of Maltose Phosphorylase from *Lactobacillus brevis*. Agr.  
 Biol. Chem. 37: 2813-2819.
- Keil, F. J. (1996)  
 Optimierung verfahrenstechnischer Prozesse. Chemie Ingenieur Technik 68: 639 - 650.
- Klostermaier, Peter (1999)  
 Systemanalyse und Optimierung der Produktion und Verfügbarkeit von Plantaricin 1.25  
 durch *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. (1996)  
 Biostatistik, Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler, 2.  
 Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Levenspiel, O. (1980)  
 The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations.  
 Biotech. Bioeng. 22: 1671 - 1687.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1998)  
 Prinzipien der Biochemie 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Lim, D. (1998)  
 Microbiology, second edition. McGraw-Hill, Boston
- Luong, J.H. (1985)  
 Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. 27: 280 - 285.
- Maloney, P.C. (1977)  
 Obligatory coupling between proton entry and the synthesis of adenosin 5'-triphosphate  
 in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 132: 564 - 575
- Martenka, Jörn (1998)  
 Identifizierung von Laktobazillen aus Typ II - Sauerteig aufgrund physiologischer  
 Eigenschaften. Semesterarbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
- Meijer, W.C., Tacken, M., Noomen, A., Hugenholtz, J. (1995)  
 Determination of growth Parameters of Lactococci in Milk and Ultrafiltrated Milk.  
 Journal of Dairy Science 78(1): 1995

- Merseburger, T., Ehret, A., Geiges, O., Kammerer, D., Schmidt-Lorenz, W. (1995)  
Mikrobiologie der Brotteigherstellung. Mitt.Gebiete Lebensm. Hyg. 86: 286-303
- Mortimer, E. (1987)  
Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 5. Auflage
- Mühlbach, G. (1988)  
Repetitorium der Ingenieur-Mathematik Teil 3 Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik. Verlag C. Feldmann, Hannover
- Müller, M. (1995)  
Identifizierung von Laktobazillen aus einem Roggensauerteig. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie.
- Müller, M.R.A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (2000)  
Multiplex PCR for the detection of lactobacillus pontis and two related species in a sourdough fermentation. Appl Environ Microbiol, 66 (5), 2113 - 2116.
- Müller, M.R.A., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (2001)  
Monitoring the growth of Lactobacillus species during a rye flour fermentation. Food Microbiology 18, 000 - 000.
- Monod, J. (1949)  
The growth of bacterial cultures. Annu Rev. Microbiol.: 371-394
- Nannen, N.L., Hutkins R.W. (1991)  
Intracellular pH-Effects in Lactic Acid Bacteria. J. Dairy Sci. 74:741-746
- Nelder, J.A., Mead, R. (1965)  
A Simplex Method for Function Minimization. The Computer Journal 7 : 308 - 313.
- Neubauer, H., Glaesker, E., Hammes, W.P., Poolman, B., Konnings, W.N. (1994)  
Mechanism of Maltose Uptake and Glucose Excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. Journal of Bacteriology 176: 3007 - 3012
- Ng, H. (1972)  
Factors affecting organic acid production by sourdough (San Francisco) bacteria. Appl. Microbiol. 23 : 1135 - 1159
- NG, T.M., Schaffner, D.W. (1997)  
Mathematical Models for the Effects of pH, Temperature, and Sodium Chloride on the growth of bacillus stearothermophilus in salty Carrots. Applied and Environmental Microbiology 1237 - 1243.
- O'Brien, R.W., Neijssel, O.M., Tempest, D.W. (1980)  
Glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase activity and glucose uptake rate of *Klebsiella aerogenes* growing in chemostat culture. J. Gen. Microbiol. 116: 305-314.

- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida T. (1992)  
Kinetics of growth and lactic acid production in continous and batch culture. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 37: 544-548.
- Orla-Jensen, S. (1919)  
The lactic acid bacteria. Copenhagen: Andr. Fred Host and Son. Mem. Acad. Roy. Sci., Danmark, Sext. Sci., 8 Ser. 5, 81 - 197.
- Otto, R., Brink, B., Veldkamp, H. Konnings, W.N. (1983)  
The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol.* 12: 341 - 345
- Passos, F.V., Flemming, H.P., Ollis, D.F., Hassan H.M., Felder R.M. (1993)  
Modelling the cucumber fermentation: growth of *Lactobacillus plantarum*. *J. Industr. Microbiol.* 12 : 341 - 345
- Passos, F.V., Flemming, H.P., Ollis, D.F., Felder R.M., McFeeters, R.F. (1994)  
Kinetics and modelling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 2627 - 2636
- Passos, F.V., Ollis, D.F., Flemming H.P., Hassan H.M., Felder R.M. (1993)  
Modelling the specific growth rate of *Lactobacillus plantarum* in cucumber extract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 : 143 - 150.
- Passos, F.V. (1993)  
Kinetics and modeling of cucumber fermentation. PhD. Thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. UMI Dissertation Services Order Nr. 9317127
- Payntner, M.J.B., Brown, K.A., Hayasaka, S.S. (1997)  
Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001. *Lett. Appl. Microbiol.* 24 : 159 - 165
- Precht, M. (1987)  
*Bio-Statistik Eine Eiführung für studierende der biologischen Wissenschaften.* R. Oldenburg Verlag.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994)  
Integration of Ordinary Differential Equations. In: Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (eds.). *Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press, pp. 707 - 752.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994)  
Minimization or Maximazion of Functions. In: Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (eds.). *Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press, pp. 394 - 455.

- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994)  
Modelling of Data. In: Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (eds.). Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, pp. 656 - 706.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994)  
Statistical Description of Data. In: Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (eds.). Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, pp. 609 - 655.
- Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (1994)  
Interpolation and Extrapolation. In: Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P. (eds.). Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, pp. 609 - 655.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. (1997)  
Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2355 - 2360
- Postma, P.W. and Roseman, S. (1976)  
The bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system. Biochem. Biophys. Acta. 457: 213 - 257
- Rothe, M., R. Schneeweiss, M., Ehrlich, R. (1973)  
Zur Historischen Entwicklung von Getreideverarbeitung und Getreideverzehr. Ernährungsforschung 18, Nr. 4, 249-283
- Schlegel (1981)  
Allgemeine Mikrobiologie, 6. Überarbeitete Auflage. Thime Verlag, Stuttgart.
- Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (1983)  
Molecular systematics of procaryotes. Annu. Rev. Microbiol., 37:143 - 187.
- Sjöberg A., Hahn-Hägerdal, B. (1989)  
 $\beta$ -Glucose-1-Phosphate, a Possible Mediator for Polysaccharide Formation in Maltose-Assimilating *Lactococcus Lactis*. Applied and Environmental Microbiology 55: 1549-1553
- Sonnleitner, B. (1998)  
Skriptum Wachstumsmodelle und Prozessanalyse.  
[http://www.twi.ch/st/ScriptsTeaching/Wachstum\\_MonodModell/WaMod\\_ProzAnal.html](http://www.twi.ch/st/ScriptsTeaching/Wachstum_MonodModell/WaMod_ProzAnal.html)
- Spicher, G., Stephan, H. (1999)  
Handbuch Sauerteig 5. Auflage. Behr's Verlag Hamburg
- Stokar, W. (1956)  
Der Ursprung unseres Hausbrottes. Brot und Gebäck 10, Nr. 1, 11 - 13

- Stolz, P. (1995)  
 Untersuchung des Maltosemetabolismus von Laktobazillen aus Sauerteig. Verlag Ulrich E. Grauer. Stuttgart
- Tseng, C.P., Montville, T.J. (1992)  
 Enzymatic regulation of glucose catabolism by *Lactobacillus plantarum* in response to pH shifts in a chemostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 777-781
- Vogel R.F., Müller, M., Stolz, P. Ehrmann, M. (1996)  
 Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. *Adv. Food Sci. (CMTL)*, 18 (5/6), 152-159.
- Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R.A., Steudel, U., Gänzle, M., Ehrmann, M.A. (1999)  
 Non dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 403 - 411.
- Wolfrum, G., Vogel, R. F. (1998)  
 Modelling of growth and metabolism of *Lactobacillus pontis* TMW 1.109 isolated from cereal fermentation. *Automatic Control of Food and Biological Processes, Göteborg, Proceedings*
- Wolfrum, G., Vogel, R. F. (1999)  
 Growth and metabolism of *Lactobacillus pontis* TMW 1.109 isolated from cereal fermentations described by differential equations. XVII ICC Conference Valencia 1999, Proceedings
- Yabanvar, V.M. and Wang, D.I. (1991)  
 Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. *Biotechnol.Bioeng.* 37: 544 - 550
- Zuniga, M., Pardo, I. Ferrer, S. (1993)  
 An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of food Microbiology* 18: 37-42.
- Zwietering, M.H., Jonenburger, I. Rombouts, F.M. Riet, K. (1990)  
 Modelling the Bacterial Growth Curve. *Applied And Environmental Microbiology* 56: 1875 - 1881
- Zwietering, M.H., Koos, J.T., Hasenack, B.E., DeWitt, J.C. (1991)  
 Modelling of Bacterial Growth as a Function of Temperature. *Applied And Environmental Microbiology* 57,4: 1094 - 1101.
- Zwietering, M.H.,Cuppers, de Witt, J.C., van'T Riet, K. (1994)  
 Evaluation of Data Transformations and Validation of a Model for the Effect of Temperature on Bacterial Growth. *Applied And Environmental Microbiology* 60 : 195 – 203



# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Georg Wolfrum  
geboren am: 18.11.1967  
Familienstand: ledig

## **Berufserfahrung:**

Seit 04.202 Entwicklung einer Bioinformatik Datenbank bei der Medigene AG  
10.2000 – 03.2002 Softwareentwicklung bei T-Systems.  
03.2000 - 09.2000 Softwareentwicklung bei der Digital Advertising AG.

## **Ausbildung:**

08/96 - 02/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Weihenstephan.  
01/95 - 07/96 Tätigkeit am Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozeßautomation Weihenstephan.  
11/89 - 1/95 Studium Brauwesen und Getränketechnologie. Abschluß zum Dipl.-Ing.  
11/88 - 10/89 Studium der Mathematik an der Ludwigs-Maximilians Universität in München.  
08/78 - 07/88 Gymnasium  
09/74 - 07/78 Grundschule

Ich möchte allen, die mich beim Erstellen der Arbeit unterstützt haben und allen, die dafür gesorgt haben, dass die Zeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie eine sehr schöne Zeit war, sagen:

**DANKE**