**Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II**

# Entwicklung einer Technologie zur Herstellung alternativer Fermentationsgetränke auf Würzebasis mittels selektierter und charakterisierter Laktobazillen

**Christoph Tenge**

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

**Doktor-Ingenieurs**
(Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Ulrich Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 17.11.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.12.2002 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

**I Verzeichnisse**

**1 Problemstellung ..... 1**

1.1 Einleitung ..... 1

1.2 Zielsetzung ..... 2

**2 Würzefermentation mittels Laktobazillen ..... 4**

2.1 Die Gattung *Lactobacillus* ..... 4

2.2 Für die Würzefermentation relevante Stoffwechselwege von Laktobazillen ..... 6

2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Würzeinhaltsstoffen und Fermentationsprodukten ..... 12

**3 Stammselektion und Identifizierung ..... 17**

3.1 Auswahl geeigneter Lactobacillusstämme zur Würzefermentation ..... 17

3.2 Differenzierungsmöglichkeiten für den ausgewählten Stamm SAG 07 ..... 19

**4 Untersuchungen zum Nährstoffbedarf von *Lb. amylolyticus* SAG 07 ..... 22**

4.1 Verwertung von C-Quellen ..... 22

4.2 Verwertung von Wuchsstoffen ..... 24

4.3 Verwertung von Stickstoffquellen ..... 26

4.4 Verwertung von Mineralsalzen ..... 27

**5 Festlegung der Parameter für eine reproduzierbare Fermentation von Würze mit *Lb. amylolyticus* SAG 07 ..... 29**

5.1 Variation und Optimierung relevanter Fermentationsparameter ..... 29

5.2 Scale-up Versuche zur Umsetzung der Fermentation in großtechnischem Maßstab ..... 39

5.3 Intensivierung der Fermentation durch Puffern oder pH-statische Kulturführung ..... 41

5.3.1 Intensivierung der Fermentation durch Pufferung ..... 45

5.3.2 Intensivierung der Fermentation durch pH-statische Kulturführung ..... 48

5.4 Kombinierte Fermentationen mit Laktobazillen und Gluconobacter ..... 51

**6 Filtration der Fermentationsbrühe mittels Kieselgurfiltration ..... 60**

**7 Stabilität der entstandenen Getränkebasis und Getränke ..... 67**

7.1 Trübungsneigung der Basis und der Getränke ..... 67

7.2 Einfluss der Kaltlagerung auf die kolloidale Stabilität ..... 69

7.3 Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Stabilität der Basis ..... 70

7.4 Trübungsentwicklung der unfiltrierten Basis und des unfiltrierten Getränkes ..... 71

7.5 Einfluss der Pasteurisation ..... 74

**8 Diskussion** ..... **75**
**9 Material und Methoden** ..... **88**
9.1 Mikroorganismen, Stammhaltung und Kultivierung ..... 88
9.2 Bestimmung der Stoffwechselmetabolite ..... 90
9.3 Selektion geeigneter Laktobazillenstämme ..... 92
9.4 Molekularbiologische Mikroorganismendifferenzierung ..... 92
9.5 Untersuchungen zum Nährstoffbedarf des selektierten Stammes ..... 101
9.6 Durchführung der Fermentationsversuche ..... 104
9.6.1 Optimierung der Fermentationsparameter ..... 105
9.6.2 Scale-up Versuche zur Umsetzung der Fermentation in großtechnischem Maßstab 108
9.6.3 pH-statische Fermentationen und gepufferte Fermentationen ..... 109
9.6.4 Kombinierte Fermentationen mit Laktobazillen und Gluconobacter ..... 113
9.7 Filtration und Stabilität ..... 115
9.8 Ausmischversuche ..... 120
**10 Zusammenfassung** ..... **121**
**11 Literaturverzeichnis** ..... **123**

# I Verzeichnisse

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| **AFLP** | = Amplified Fragment Length Polymorphism |
| **AT** | = Annealingtemperatur |
| **ATP** | = Adenosintriphosphat |
| **BCIP** | = 5-Bromo-4-chloro- 3-indolylphosphat |
| **bp** | = Basenpaare |
| **BSA** | = Rinderserumalbumin |
| **CIA** | = Chloroform:Isoamylalkohol |
| **$ddH_20$** | = bidestilliertes Wasser |
| **Dex** | = Dextrine |
| **DMS** | = Dimethylsulfid |
| **DNA** | = Desoxyribonucleinsäure |
| **DSMZ** | = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| **EBC** | = European Brewery Convention |
| **EDTA** | = Ethylendiamin-tetraessigsäure |
| **EMP** | = Embden-Meyerhof-Parnas |
| **FDP** | = Fuctose-1,6-diphosphat |
| **Frc** | = Fructose |
| **GG%** | = Gewichts/Gewichtsprozente |
| **Glu** | = Glucose |
| **HBW** | = Hefebank Weihenstephan |
| **HPLC** | = High Performance Liquid Chromatography |
| **Konz.** | = konzentriert |
| **Lb.** | = *Lactobacillus* |
| **Mal** | = Maltose |
| **Mat** | = Maltotriose |
| **MRS** | = Nährmedium nach de Man, Rogosa, Sharpe |
| **NAD** | = Nicotin-amid-Adenin-Dinucleotid |
| **NADH** | = Nicotin-amid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form) |
| **NBT** | = 4-Nitroblautetrazoliumchlorid |
| **o.V.** | = ohne Verfasser |
| **PCR** | = Polymerase Chain Reaction |
| **PTS** | = Phosphoenolpyruvat: Zucker PhosphoTransferase System |
| **RAPD** | = Random Amplified Polymorphic DNA |
| **RNA** | = Ribonucleinsäure |
| **Sac.** | = Saccharose |
| **SAG** | = Stammsammlung für alternative Gärungsgetränke des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, Weihenstephan |
| **ssp.** | = subspecies |
| **TMW** | = Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Weihenstephan |
| **var.** | = Variation |

## Abbildungsverzeichnis

**Kapitel 2**

Abb. 2/1: Homofermentative Milchsäuregärung

**Kapitel 3**

Abb. 3/1: Lactat- und Acetatbildung der verschiedenen Stämme

Abb. 3/2: D-Lactat- und L-Lacatbildung der verschiedenen Stämme

Abb. 3/3: Bandenmuster der verglichenen Lactobacillusarten

Abb. 3/4: Sequenziergel nach AFLP

**Kapitel 4**

Abb. 4/1: Verwertung einzelner Kohlenhydrate der Würze, pH-Wert, Lactatbildung, Zellzahl

Abb. 4/2: Kohlenhydratverbrauch unter Ausschluss jeweils eines Kohlenhydrates im Ansatz

Abb. 4/3: Zellzahl und pH nach Ende der Fermentation unter Ausschluss jeweils eines Kohlenhydrates im Ansatz

Abb. 4/4: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert, Lactat mit jeweils einem Wuchsstoff im Ansatz

Abb. 4/5: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert, Lactat unter Ausschluss jeweils eines Wuchsstoffes im Ansatz

Abb. 4/6: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat bei verschiedenen Stickstoffquellen

Abb. 4/7: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat mit jeweils einem Mineralsalz im Ansatz

Abb. 4/8: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat unter Ausschluss jeweils eines Mineralsalzes im Ansatz

**Kapitel 5**

Abb. 5/1: pH–Verläufe der Fermentationen mit Temperaturen von 46, 47, 48, 49 und 50°C

Abb. 5/2: Verlauf von DL–Lactat bei Fermentationen mit Temperaturen von 46, 47, 48, 49 und 50°C

Abb. 5/3 : Verlauf von pH und DL–Lactat bei Fermentationen mit 43°C und 53°C

Abb. 5/4: pH–Verläufe der Fermentationen von 3, 6, 10 und 12 GG % Vorderwürze

Abb. 5/5: Bildung von DL–Lactat bei den Fermentationen mit Vorderwürzen von 3, 6, 10 und 12 GG % Extrakt

Abb. 5/6: pH–Verläufe der Fermentationen mit Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 $*10^6$ Zellen/ml

Abb. 5/7: DL–Lactatbildung bei Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 $*10^6$ Zellen/ml

Abb. 5/8: pH–Werte und Lactatbildung bei Anstellzellzahlen von 2, 60 und 100 $*10^6$ Zellen/ml

Abb. 5/9: pH–Verläufe der Fermentationen mit anfänglicher Sauerstoffsättigung von 0, 25, 50, 75 und 100%

Abb. 5/10: DL–Lactatbildung bei anfänglicher Sauerstoffsättigung von 0, 25, 50, 75 und 100%

Abb. 5/11: Lactatbildung bei verschiedener kontinuierlicher Begasung

Abb. 5/12: Reproduzierbarer Fermentationsverlauf im 100 l-Maßstab
Abb. 5/13: DMS frei und DMS Precursor während der Fermentation
Abb. 5/14: Wachstumsrate in Abhängigkeit des pH-Wertes
Abb. 5/15: HCL-Verbrauch der Würzetitration (Würze 1)
Abb. 5/16: HCL-Verbrauch der Würzetitration (Würze 2)
Abb. 5/17: pH-Verlauf der gepufferten Fermentationen
Abb. 5/18: Lactat und Acetatbildung bei den gepufferten Fermentationen
Abb. 5/19: Kohlenhydratverwertung bei den gepufferten Fermentationen
Abb. 5/20: pH-Entwicklung, Lactatbildung, Carbonatdosage bei verschiedenen pH-Stabilisierungen
Abb. 5/21: Kohlenhydratverwertung der pH-stabilisierten Fermentationen
Abb. 5/22: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/23: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/24: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH- Wertes und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/25: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/26: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/27: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate
Abb. 5/28: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

**Kapitel 6**

Abb. 6/1: Druckverlauf Filtration A (einfache laufende Dosage)
Abb. 6/2: Druckverlauf Filtration B (doppelte laufende Dosage)
Abb. 6/3: Druckverläufe Filtration C (doppelte laufende Dosage und doppelte Dosiergeschwindigkeit)
Abb. 6/4: Druckverläufe Filtration E (vorherige Kaltlagerung)
Abb. 6/5: Trübungsverlauf Filtration A (einfache laufende Dosage)
Abb. 6/6: Trübungsverlauf Filtration C (doppelte laufende Dosage und doppelte Dosiergeschwindigkeit)
Abb. 6/7: Trübungsverlauf bei Filtration E (vorherige Kaltlagerung)
Abb. 6/8: Koloniezahlen nach der Kieselgurfiltration
Abb. 6/9: Koloniezahl nach der Schichtenfiltration (0,4 µ)
Abb. 6/10: Gesamtkoloniezahl nach der Schichtenfiltration (0,2 µ)

**Kapitel 7**

Abb. 7/1: Trübungsentwicklung von Getränk und Basis

Abb. 7/2: Kolloidale Stabilität des Getränks nach sauerstoffarmer Abfüllung

Abb. 7/3: Stabilität des Getränkes bei verschiedener Kaltlagerung

Abb. 7/4: Stabilität der Basis bei verschiedener Kaltlagerung

Abb. 7/6: 90°-Trübung der Basis bei verschiedenen Stabilisierungsmitteln

Abb. 7/7: 12°-Trübung der Basis bei verschiedenen Stabilisierungsmitteln

Abb. 7/8: Trübungsverlauf des unfiltrierten Getränkes bei verschiedener Kaltlagerung (90°-Messung)

Abb. 7/9: Trübungsverlauf des unfiltrierten Getränkes bei verschiedener Kaltlagerung (12°-Messung)

Abb. 7/10: Trübungsverlauf der unfiltrierten Basis bei verschiedener Kaltlagerung (90°-Messung)

Abb. 7/11: Trübungsverlauf der unfiltrierten Basis bei verschiedener Kaltlagerung (12°-Messung)

Abb. 7/12: Trübungsentwicklung nach der Pasteurisation

**Kapitel 9**

Abb. 9/1: Schema AFLP

Abb. 9/2: Maischdiagramm für 10 % Würze hell

Abb. 9/3: 3 l-Fermentationsanlage mit Steuereinheit

# Tabellenverzeichnis

**Kapitel 5**

Tab. 5/1: Verstoffwechselung der Puffersubstanzen

Tab. 5/2: Wachstumsverhalten und Salzkonzentration

Tab. 5/3: Fermentationstypen 1-3

**Kapitel 7**

Tab. 7/1: Trübungszusammensetzung von Getränk und Basis

**Kapitel 9**

Tab. 9/1: Lactobacillus-Stammsammlung für alternative Gärungsgetränke (SAG)

Tab. 9/2: Verwendeter Mikroorganismus

Tab. 9/3: Analysenparameter zur Detektion von Lactat, Acetat und Gluconaten mittels HPLC

Tab. 9/4: Analysenparameter zur Detektion von vergärbaren Zuckern mittels HPLC

Tab. 9/5: Differenzierung der einzelnen Fermentationstypen

Tab. 9/6: Filterdaten

Tab. 9/7: Variable Filtrationsparameter

# 1 Problemstellung

## 1.1 Einleitung

Viele Entwicklungen setzen die deutsche Brauwirtschaft heutzutage unter Handlungsdruck: Die Brauindustrie wird seit Jahren mit einem kontinuierlichen Rückgang des Pro-Kopf-Verbrauchs konfrontiert. Immer mehr Deutsche trinken immer weniger Bier.[1] Dies führt zu mangelnder Auslastung und Überkapazitäten bis zu 30 %[2] und damit zu einer dauernden, kräftezehrenden Vermögensvernichtung für die betroffenen Brauereien. Hinzu kommen Antialkoholkampagnen und ein eventuelles Werbeverbot für Alkohol.[3]

Es wird davon ausgegangen, dass der Bier-Inlandskonsum bis zum Jahre 2010 um rund 15 Mio. Hektoliter sinkt, bedingt durch Bevölkerungsentwicklung und verändertes Konsumverhalten. Die Bevölkerung wird älter und junge Generationen greifen immer weniger zum Bier. Neue Wege für den deutschen Biermarkt sind also gefragt.[4] Chancen bieten sich hier flexiblen Brauereien mit innovativen Vertriebswegen (Logistik-Kooperationen, Eventmarketing) und innovativen Produkten.

Der wachsende Erfolg der Biermischgetränke gibt erste Hinweise darauf. Bis zum Jahr 2006 wird ein Marktanteil von bis zu 6% für diese Getränkesparte prognostiziert.[5] Es besteht hier jedoch die Gefahr, dass durch die Biermischgetränke lediglich eine Umverteilung der Marktanteile innerhalb des Biersektors stattfindet. Der Kannibalisierungseffekt mit Bier liegt heute schon bei etwa 30 %.[6]

Es stellt sich also die Frage, in welchen Marktsegmenten Brauereien Innovationen platzieren können, ohne den Bierabsatz zu verringern. Der Getränkemarkt ist in den letzten Jahren weltweit großen Veränderungen unterworfen. Der Verbrauch an alkoholfreien Getränken ist gestiegen. Dabei haben sich aber die großen Segmente wie Erfrischungsgetränke, Fruchtsäfte oder Wasser recht unterschiedlich entwickelt - mit starker Tendenz zur Marktsättigung bei klassischen Getränkekategorien. Dagegen ist im Umfeld dieser großen Marktsegmente eine beeindruckende Dynamik entstanden. Viele innovative Segmente sind entstanden. Diese Newcomer legten in 2001 um 15, 7 % zu. Die Megatrends Wellness und Gesundheit bedingen die steigende Nachfrage nach Getränken mit Zusatznutzen, sogenannten Functional Drinks.[7]

---

[1] Vgl. Buchal, G.: Biersonderheiten. In: Getränkefachgrosshandel 6 . 2002, S. 21.
[2] Vgl. o. V.: In: Getränkemarkt Nr. 9, S. 598.
[3] Vgl. o. V.: Visionen zu Brauen und Management. In: Brauweltbrevier. Heyse, K.-U. (Hrsg.). Nürnberg 2002, S. 15.
[4] Vgl. Heyse, K.-H.: Neue Wege für den deustchen Biermarkt gefragt. In. Brauwelt Nr.31-32. 142 Jg. 2002, S. 1082.
[5] Vgl. o.V.: Bier und Cola: Musik bei den Biermischgetränken. In: Brauwelt Nr. 29 .142. Jg. 2002, S. 985.
[6] Vgl. ebenda.
[7] Vgl. Gandy, M.: Schmeckt die Zukunft funktionell? In: Getränkeindustrie Nr. 4. 2002, S. 26.

Als besonders wichtige Zusätze gelten Vitamine, Mineral- und Ballaststoffe.[1]
Functional Drinks können in intrinsische und extrinsische Functional Drinks unterteilt werden, wobei die intrinsischen Drinks die mit einem Gesundheitsaspekt bedachte Substanz in sich tragen. Extrinsische hingegen werden mit solchen Substanzen versetzt.[2] Brauereien könnten die ernährungsphysiologischen Vorteile der Bierrohstoffe und der Zwischenprodukte ausnutzen und intrinsische Functional Drinks auf dem Markt platzieren.
Ansätze[3,4], aber auch fertige Produkte[5,6] sind schon vorhanden. Strachotta legte die ersten Grundlagen und entwickelte eine Fermentation von Bierwürze mit Gluconobacter-Stämmen. Gerade der Rohstoff Malz bzw. das daraus entwickelte Zwischenprodukt Würze bietet sich aufgrund seiner ernährungsphysiologisch wertvollen Bestandteile[7] als Basis für solche Getränke an. Eine weitere Aufwertung erfolgt durch die Fermentation. Ebenso sind das biotechnologische Know-How und auch die Anlagen zur Fermentation, Ausmischung und Abfüllung der Getränke vorhanden.
Ziel dieser Arbeit ist es, eine Technologie zur Würzefermentation mit Laktobazillen zu entwickeln. Durch die Fermentation soll eine Basis entstehen, die zu vielen verschiedenen Getränken ausmischbar ist. Oberste Priorität hat die einfache technologische Umsetzbarkeit in der Brauerei.
Die Auswahl von Laktobazillen zur Fermentation bringt eine Alternative zu Getränken auf Gluconobacterbasis. Die Anwendung von Laktobazillen hat aber noch weitere Vorteile. Diese Mikroorganismen sind dem Verbraucher durch die Probiotik-Welle geläufig und als ernährungsphysiologisch wertvoll akzeptiert[8]. Auf dieser Grundlage kann eine fundierte Marketingstrategie entwickelt werden, die einen erfolgreichen Markteintritt von Getränken auf Laktobazillenbasis haben wird. Ein weiterer Vorteil der Laktobazillen-Verwendung liegt darin, dass die Mikroorganismen dem Brauer bekannt sind, nicht nur als Bierschädlinge, sondern zur biologischen Herstellung von Sauergut. Sie finden auch Anwendung in einigen Spezialbieren wie Berliner Weisse oder einigen belgischen Bieren.

## 1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine komplette Technologie zur Herstellung alkoholfreier, fermentierter Getränke auf Würzebasis zu erarbeiten.

---

[1] Vgl. Tolksdorf, M.: So schmeckt die Zukunft. In: Getränkeindustrie Nr. 10. 2001, S. 24.
[2] Vgl. Tuley, L.: Functional Foods the technical issues. In: Food Manufacture Nr. 30.32. 1995, S. 56.
[3] Vgl. Strachotta, T.: Grundlagen zur Herstellung neuartiger Getränke auf Malzbasis mit verschiedenen Mikroorganismen. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1998.
[4] Döhler GmbH: Alkoholfreie Getränke auf Basis von Cerealien. Verfahren und Mikroorganismen zu ihrer Herstellung. Offenlegungsschrift Deutsches Patentamt DE 3512814 A1 1986.
[5] Peter, S.: Alkoholfreies Erfrischungsgetränk. Schutzrecht deutsches Patentamt DE 401200C2 1996.
[6] UCN-Nahrungsmittel GmbH: Marke Scarabaeus, Au/Hallertau.
[7] Vgl. Piendl, A.: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Nürnberg 1999.
[8] Vgl. Jago, D.: New Food Products from Around the World. In: Food Engineering & Ingredients. April 2002, S. 12-13.

Hierfür müssen zunächst geeignete Mikroorganismen selektiert werden. Aus den oben erwähnten Gründen wurde die Spezies *Lactobacillus* ausgewählt. In Frage kommen jedoch nur solche Stämme, die keine biologische Gefährdung für den normalen Bierbereitungsprozess (z.B. durch Hopfentoleranz) darstellen. Des Weiteren dürfen sie keine pathogenen oder gesundheitsgefährdenden Metabolite bilden. Die Stämme sollten außerdem an das Medium Würze adaptiert sein. Es bietet sich hier eine Vielzahl von Stämmen an, die schon zur biologischen Sauergut-Herstellung in Brauereien zum Einsatz kommt. Geeignete Stämme sollen aus Sauergut isoliert werden. Hier gilt es denjenigen zu selektieren, der in Würze die höchste Produktbildungsrate für L(+)-Lactat aufweist.

Da durch die Milchsäurebildung eine ernährungsphysiologische und sensorische Aufwertung der Produkte erreicht werden soll, ist die Lactatbildung von besonderer Bedeutung. Eine Acetatbildung sollte aus sensorischen Gründen möglichst gering sein, um einen negativen Essigstich zu vermeiden.

Um den ausgewählten Stamm eindeutig charakterisieren zu können, sollen DNA-Fingerprinting-Analysen durchgeführt werden.

Die Eignung herkömmlicher Bierwürze wird mittels Fermentationsversuchen in einer synthetisch hergestellten Würze überprüft. Durch Variation der Zusammensetzung soll hierüber Aufschluss erhalten werden. Außerdem sind Aussagen über die Notwendigkeit einer Optimierung der Würzezusammensetzung zu treffen.

Für den selektierten Stamm werden dann durch Variation der Prozessparameter die optimalen Bedingungen zur Würzefermentation erarbeitet. Hierbei steht die Lactatbildung im Vordergrund. Eine Übertragbarkeit der gefundenen Parameter auf großtechnischen Maßstab wird durch Scale-Up Versuche geklärt. Eine Erhöhung der Lactatbildung durch pH-Regulation wird ebenfalls in Fermentationsversuchen untersucht. Des Weiteren werden Möglichkeiten gesucht, die Gluconobacter-Fermentation mit der Lactobacillus-Fermentation zu kombinieren, um die Vorteile beider zu nutzen.

Am Ende soll es möglich sein, mit dem Stamm reproduzierbar aus Würze eine Basis herzustellen, die dann zu Getränken ausgemischt werden kann.

Um klare Getränke herstellen zu können, muss auch eine Filtrationstechnologie für die Basis erarbeitet werden. Im Vordergrund stehen hierbei die Filterstandzeit, die Trübung und die mikrobiologische Sicherheit. Dies soll anhand von Pilotfiltrationen getestet werden.

Schließlich ist es auch wichtig, Auskunft über die chemisch-physikalische und über die mikrobiologische Stabilität der Basis und der Getränke zu erhalten. Durch forcierte Alterung und Einsatz verschiedener Stabilisierungsmittel werden diese Eigenschaften geprüft.

Es soll am Ende dieser Arbeit möglich sein, die Technologie zur Herstellung einer Getränkebasis in die Brauerei-Praxis zu übertragen. Die vielfältigen Ausmischmöglichkeiten sollen in den Brauereien selbst getestet werden, um so eigene, vielfältige Produkte für das jeweilige Unternehmen zu finden.

# 2. Würzefermentation mittels Laktobazillen

Bei der Fermentation von Würze mit Laktobazillen sind stammspezifische Eigenschaften der Laktobazillen zu beachten. Ebenfalls haben die Würzeinhaltstoffe einen Einfluss auf die Qualität der Fermentation und zusammen mit den Fermentationsprodukten eine ernährungsphysiologische Bedeutung.

## 2.1 Die Gattung *Lactobacillus*

Die Gattung *Lactobacillus* gehört zu der Familie der *Lactobacteriaceae*, den Milchsäurebakterien. Diese Gruppe ist morphologisch recht uneinheitlich. Sie schließt sowohl Kurz- und Langstäbchen als auch Kokken ein. Physiologisch lässt sich die Gruppe jedoch relativ gut charakterisieren. Alle Angehörigen sind Gram-positiv, bilden (mit Ausnahmen) keine Sporen und sind fast alle unbeweglich. Sie sind obligate Gärer und enthalten keine Häme (Cytochrome, Katalase). Trotzdem sind sie anaerob, aber aerotolerant.[1] Die Milchsäurebakterien sind auf sehr nährstoffreiche Milieubedingungen angewiesen. Ihr Bedarf an Kohlenhydraten, Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und Nukleinsäurederivaten ist nur unter solchen Bedingungen zu decken. Sie kommen daher hauptsächlich in Pflanzenmaterial sowie auf Schleimhäuten von Mensch und Tier vor.[2]

Die ersten Einteilungsversuche der *Lactobacteriaceae* gehen auf Henneberg, Löhnis und Orla-Jensen zurück.[3, 4, 5] Eine Gruppierung nach biochemisch-pysiologischen Kriterien erfolgte 1986 durch Kandler und Weiss.[6] Neue, molekularbiologische Möglichkeiten wie PCR und rRNA-Gen-Sequenzierungen lassen genauere Gruppierungen zu.[7,8]

---

[1] Vgl. Schlegel, H.-G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart 1992, S. 296.

[2] Vgl. Hammes, W. und R Vogel: The genus *Lactobacillus* In: The Lactic Acid Bacteria. Wood, B. und Holzapfel, W. (Hrsg.). Glasgow 1995, S. 19-54.

[3] Vgl. Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien .... In: Zentralblatt Bakterien und Parasitenkunde Abt. 2, 11. 1904, S. 154-170.

[4] Vgl. Löhnis, F.: Versuch einer Gruppierung der Milchsäurebakterien. In: Zentralblatt Bakterien- und Parasitenkunde Abt 2, 18. 1907, S. 97-149.

[5] Vgl. Orla-Jenson, S.: The Lactic acid bacteria. In: Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr. Naturvidensk. Og Mathem. Afd., 8 Raekk, V. 2. Andr. Fred. Host & Son. Kopenhagen 1919.

[6] Vgl. Kandler, O. und N. Weiss: Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In: Bergey´s Manuel of systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore 1986, S. 1208-1234.

[7] Vgl. Axelsson, L.: Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In:Lactic acid Bacteria. Salminen, S. (Hrsg.). Helsinki 1998, S. 2.

[8] Vgl. Ehrmann, M.: Klassifizierung und Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1994, S. 1-6.

Die Milchsäurbakterien lassen sich gegenwärtig in folgende Gruppen unterteilen:[1] *Aerococcus, Lactosphera, Carnobacterium, Vagococcus, Tetragenococcus, Melissococcus, Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Oenococcus, Leuconostoc, Weissella, Lactobacillus, Alloiococcus und Dolosigranulum*. Die Zugehörigkeit der Gattung *Bifidobacterium* ist umstritten.[2]

Das Genus *Lactobacillus* stellt unter den Milchsäurebakterien mit Abstand die größte Gruppe. Die Größe und Heterogenität der Gruppe ist auf ihre Definition zurückzuführen. Die Laktobazillen werden als stäbchenförmige Milchsäurebakterien definiert.[3] Die Unterschiede im G+C-Gehalt der DNA sind zwei mal so groß wie es normal für ein Genus akzeptiert wird.[4] Die Laktobazillen lassen sich nach Hammes und Vogel in drei Gruppen unterteilen:[5]

- Gruppe 1: *L. delbrückii*-Gruppe (obligativ homofermentativ)
- Gruppe 2: *L. casei-pediococcus*-Gruppe (facultativ heterofermentativ)
- Gruppe 3: *Leuconostoc*-Gruppe (obligativ heterofermentativ)

Alle Vertreter sind unbewegliche Stäbchen oder Kurzstäbchen. Wachstum findet meist unter anaeroben Bedingungen statt, ist aber auch unter reduziertem Sauerstoffpartialdruck möglich.[6] Grundsätzlich bestehen zwei Wege des Kohlenhydratabbaus, der homofermentative Weg resultiert überwiegend in Milchsäure, beim heterofermentativen Weg können zusätzlich noch Kohlendioxid, Ethanol und Essigsäure gebildet werden.[7]

Laktobazillen sind in der Natur weitverbreitet und haben viele Anwendungen in der Ernährungsindustrie gefunden. Sie sind die am meisten säuretolerante Gruppe unter den Milchsäurebakterien.[8]

Einige Laktobazillen findet man auf gemälzter Gerste und in Malzmaischen. Diese Gruppe wurde schon 1887 von Lindner untersucht.[9] Die häufigsten Arten, die hier auftreten, sind *Lb. delbrückii, Lb. amylovorus* und *Lb. fermentum*, alle thermophil und homofermentativ.[10] Mittels 16s-rRNA-Gen Analysen wurde noch ein weiterer Lactobacillus unterschieden: *Lb. amylolyticus*.[11]

---

[1] Vgl. Schleifer, K. H. und W. Ludwig: Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria In: The Lactic Acid Bacteria. Wood, B. und Holzapfel, W. (Hrsg.) London, 1995, S. 7-18.
[2] Vgl. Axelsson, L.: a.a.O. S. 1.
[3] Vgl. ebenda, S. 14.
[4] Vgl. Schleifer K. H. und E. Stackebrandt: Molecular systematics of procaryontes. In: Annual review in Microbiology. 1983, S. 183-195.
[5] Vgl. Hammes W. und R. Vogel: a.a.O. , S. 19-54.
[6] Vgl. Steudel, L.: Physiologische Bedeutung und molekulare Charakterisierung der Stressantwort von *Lb. pontis* und *Lb. sanfranciscensis*. (Diss.). Freising-Weihenstephan 2001, S. 3.
[7] Vgl. Schlegel, H.-G.: a.a.O. , S. 298-300.
[8] Vgl. Kashket, E. R.: Bioenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. In: FEMS Micriobiology Review 46. Dordrecht 1987. S. 233-244.
[9] Lindner, P.: Über ein neues in Malzmaischen vorkommendes Milchsäure bildendes Ferment. In: Wochenschrift für Brauerei 4, Nr. 23. 1887, S. 437-440.
[10] Vgl. Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil I Nürnberg 1994, S. 50.
[11] Vgl. Bohak, I. et al.: *Lactobacillus amylolyticus sp. nov.* , isolated from Beer Malt and Beer Wort. In Systematic and Applied Microbiology 21. Stuttgart 1998, S. 360-364.

Die Art bildet lange, gleichmäßige Stäbchen mit abgerundeten Enden, einzeln, in Paaren oder Ketten. Sie wächst gut in ungehopfter Würze und senkt den pH-Wert des Mediums bis auf Werte um pH 3. Dadurch, dass sie nicht in der Lage ist, in Anwesenheit von auch nur Spuren von Hopfen zu wachsen, ist sie als nicht bierschädlich einzustufen. Dextrine, Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose und Maltotriose werden verstoffwechselt.[1]
Diese Eigenschaften machen die Gruppe der Laktobazillen besonders interessant für die Untersuchungen in vorliegender Arbeit.

## 2.2 Für die Würzefermentation relevante Stoffwechselwege von Laktobazillen

Laktobazillen können als Stoffwechselkrüppel angesehen werden; dies ist wahrscheinlich die Folge ihrer Spezialisierung auf nährstoff- und supplinreiche Standorte. Sie benötigen Aminosäuren, Vitamine, Nukleotide und eine Kohlenstoffquelle.[2] Würze bietet aufgrund ihrer Inhaltstoffe (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Vitamine, etc.)[3] daher ein optimales Fermentationsmedium für Laktobazillen.
Wie diese Inhaltsstoffe von Laktobazillen fermentiert werden können, wird in diesem Kapitel dargestellt.

Metabolismus der Kohlenhydrate

Generell können bei Laktobazillen zwei hauptsächliche Stoffwechselwege unterschieden werden. Zum einen die homofermentative, zum anderen die heterofermentative Milchsäuregärung. Der Unterschied liegt in den Stoffwechselprodukten - bei der ersten Form wird fast ausschließlich Lactat (> 90%) gebildet, bei der zweiten entstehen noch weitere Stoffwechselprodukte wie z.B. Ethanol, $CO_2$, Acetat oder Diacetyl.[4] Eine Grenze ist aber nicht eindeutig zu ziehen. Kandler zeigt, dass vor allem bei komplexen Substraten oder Mangelzuständen auch bei homofermentativen Laktobazillen andere Stoffwechselwege ablaufen, die in alternativen Produkten resultieren.[5] Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wird den obligat homofermentativen Laktobazillen zugeordnet und zeigt auch während aller Versuche das entsprechende Stoffwechselverhalten. Deshalb wird hier nur der homofermentative Stoffwechselweg dargestellt.
Bei der homofermentativen Milchsäuregärung wird die Glucose über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg zu Lactat verstoffwechselt. Die Glucose wird mittels einer Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt.

---

[1] Vgl. Bohak, I.: a.a. O. S. 362.
[2] Vgl. Axelsson, L.: a.a. O. S. 51.
[3] Vgl. Narziß, L.: Die Technologie der Würzebereitung. Freising 1992, S. 304.
[4] Vgl. Schlegel, H.-G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart 1992, S. 298.
[5] Vgl. Kandler, O.: Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. In: Antonie von Leeuwenhoek 49. Doordrecht 1983, S. 209-224.

Der Weg geht über Fructose-6-Phosphat zur Fructose-1,6-diPhosphat, das mittels der Fructose 1,6-diPhosphat Aldolase zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat aufgespalten wird. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird durch das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und mit einem Phopsphat zur 1,3-diPhosphoglycerinsäure. Die Säure wird über weitere Glycerinsäuren zum Phosphoenolpyruvat umgebaut. Dieses wird durch die Pyruvtakinase zum Pyruvat, welches dann mittels Lactatdehydrogense zum Lactat umgewandelt wird (Vgl. Abb. 2/1). Der Energiegewinn beträgt bei diesem Vorgehen 2 ATP. Aus einem Mol Glucose entstehen theoretisch 2 Mol Lactat, ein Umrechnungsfaktor von 0,9 ist aber praxisnaher und zeigt möglicherweise, dass Kohlenstoff direkt in Biomasse umgesetzt wird.[1]

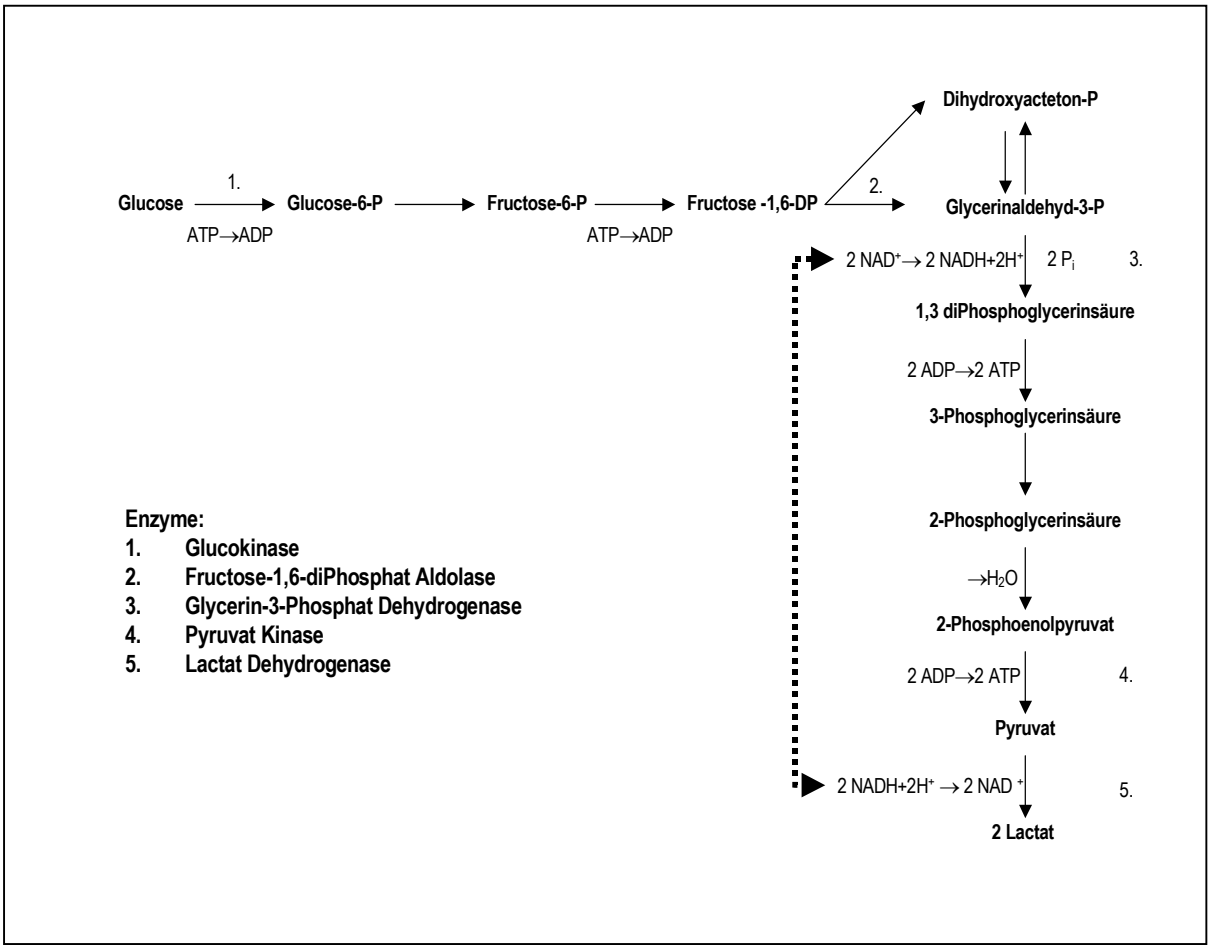



Abb. 2/1:Homofermentative Milchsäuregärung

[1] Vgl. Axelsson, L.: a.a.O.,S. 25.

Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Mechanismen zur Zuckeraufnahme in die *Lactobacillus*-Zelle:[1]

- Beim primären Transport wird das Zuckermolekül unter Energieaufwand, meist ATP, durch die Membran geschleust.
- Der sekundäre Transport wird über ein spezifisches Transportprotein gegen einen Konzentrationsgradienten gesteuert[2,3].
- Außerdem werden Zucker direkt beim Translocations-Prozess phosphoryliert, durch das sogenannte Phosphoenolpyruvat:Zucker PhosphoTransferase System (PTS).[4] Hier handelt es sich um ein komplexes Enzymsystem, welches gleichzeitig den Transport durch die Zellmembran und die Phosphorylierung des Zuckermoleküls bewirkt. Die Energie hierfür stammt aus der energiereichen Phosphatbindung des Phosphoenolpyruvats.

An Zuckern finden sich in der Würze hauptsächlich verschiedene Hexosen (Glucose, Fructose), Disaccharide (Saccharose und Maltose), ein Trisaccharid (Maltotriose) und Maltodextrine. Des Weiteren sind auch noch Polysaccharide wie ß-Glucane und Pentosane vorhanden.[5]

Glucose wird, wie oben beschrieben, als freier Zucker in die Zelle aufgenommen, dort mittels einer ATP abhängigen Glukokinase phosphoryliert und über den EMP-Weg zu Lactat umgewandelt.

Fructose wird von vielen Laktobazillen fermentiert. Sie tritt nach Isomerisierung und/oder Phosphorylierung als Glucose-6-Phosphat oder Fructose-6-Phosphat in die Glycolyse ein.[6] Mc Feeters und Chen berichten, das Fructose auch als organischer Elektronenakkzeptor fungieren kann.[7] Dies kann bedeuten, dass bei Substratüberschuss der Schwerpunkt auf Zellwachstum liegt, nicht auf Substratverstoffwechselung. Das ist besonders für natürliche Fermentationsmedien von Bedeutung, in denen Fructose, Glucose und Saccharose im Mix vorliegen.[8] Des Weiteren berichtet Gobetti von einem *Lb. brevis*-Stamm, der nur in der Lage, ist Fructose in Anwesenheit von Maltose oder Glucose zu verstoffwechseln.[9]

---

[1] Vgl. Polmann, B. und W.N. Konings: Secondary solute transport in bacteria. In: Biochem. Biophys. Acta 1183. 1993, S. 5-39.

[2] Vgl. Konings et al.: Bioenergetics and Solute Transport in *Lactococci*. In: Critical Reviews. in Microbiology. Vol 16.Issue 6. 1989, S. 419-476.

[3] Vgl. Kashket, E. und T. Wilson: Proton Motive Force in fermenting *Streptococcus Lactis*. In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 59. 1974, S. 879.

[4] Postma, P.W. et al.: Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System of Bacteria. In: Microbiological Reviews 57. 1993, S. 543-594.

[5] Vgl. Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei. 6. Aufl. Nürnberg 1995, S. 181.

[6] Vgl. Axelsson, L.: a.a.O., S. 25.

[7] Vgl. Mc Feeters, R. F. und K.-H. Chen: Utilization of Electron Acceptors for anaerobic Metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as Electron Acceptors. In: Food Microbiology 3. 1986, S. 73-81.

[8] Vgl. Flemming, H.P. et al.: The *Lactobacilli, Pediococci*, and *Leuconostocs*: Vegetable Products: In: Bacterial Starter Cultures for Food .Gilliland, S. E. (Hrsg.). Boca Raton, Fl, USA 1985, S. 97-118.

[9] Vgl. Gobetti, M. et al.: Maltose-Fructose co-Fermentation by *Lactobacillus brevis subsp. lindneri* CB1 Fructose-negative Strain. In: Applied Microbiology and Biotechnology 42. 1995, S. 939-944.

Abhängig vom Transport-Mechanismus werden Disaccharide entweder als freie Zucker oder als Zucker-Phosphat aufgenommen. Im ersten Fall werden die freien Disaccharide von spezifischen Hydrolasen in Monosaccharide aufgespalten und im EMP-Weg zu Lactat umgewandelt. Im zweiten Fall werden die Zucker über das oben beschriebene PTS-System in die Zelle aufgenommen. Sie werden dann von Phosphohydrolasen in einen Teil Zuckerphosphat und einen Teil freien Zucker aufgespalten.[1]

Saccharose wird über ein Permease-System aufgenommen und durch eine Saccharose-Hydrolase in Glucose und Fructose gespalten, die dann über die Glycolyse abgebaut werden. Es gibt aber auch Untersuchungen mit Laktokokken, die Saccharose über ein PTS-System aufnehmen und mittels Saccharose-6-Phosphat-Hydrolase in Glucose-6-Phosphat und Fructose spalten. Das System wird induziert durch Saccharose im Fermentationsmedium.[2] Lauret at al. berichten über einen vergleichbaren Stoffwechselweg von Saccharose für *Lb. sake* - Stämme.[3]

Maltose ist mengenmäßig der Hauptzucker der Würze. Die Fermentation von Maltose wurde am intensivsten für Laktokokken untersucht[4,5]: Zum einen wurde ein ATP-verbrauchender, primärer Transport-Mechanismus beobachtet.[6] Die Maltose wird durch eine Maltose-Phosphorylase in Glucose und ß-Glucose-1-phosphat gespalten. Dieses wird mittels ß-Phosphoglucomutase zur Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Bei *Lb. lactis* wird nur der Glucoseanteil zur Energiegewinnung in die Glycolyse geführt. Das ß-Glucose-6-Phosphat dient wahrscheinlich als Vorstufe zur Zellwandsynthese.[7] Bei *Lactobacillus brevis* wurde auch eine Maltose Phosphorylase endeckt.[8] Aufgrund des veränderten Endproduktprofiles (außer Lactat auch Acetat, $CO_2$ etc.) verschiebt sich der Stoffwechsel von homofermentativ zum heterofermentativen. Ehrmann und Vogel lokalisierten ein vergleichbares Enzymsystem bei Laktobazillen (*Lb. sanfranciscensis*).[9] Für diesen Stamm wurde gezeigt, dass beim Maltoseabbau ungefähr die Hälfte der dabei abgespaltenen Glucose ins Medium abgegeben und erst nach Abbau der Maltose verstoffwechselt wurde.

---

[1] Vgl. Axelsson, L.: a.a.O., S. 25.

[2] Vgl. Thompson, J. and B.M. Chassy: Uptake and Metabolism of Sucrose by *Streptococcus lactis*. In: Journal of Bacteriology 147. 1981, S. 543-551.

[3] Vgl. Lauret, Robert et al.: Carbohydrate Utilization in *Lactobacillus sake*: In: Applied and Environmental Microbiology 62. 1996, S. 1922-1927.

[4] Vgl. Konings et al.: a.a.O:, S. 419-476.

[5] Vgl. Sjöberg, A. und B. Hahn-Hägerdahl: ß-Glucose-1-Phosphat, a possible Mediator for Polysaccharide Formation in Maltose-Assimilating *Lactococcus lactis*. In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 55, No. 6. 1989, S. 1549-1554.

[6] Vgl. Thompson, J.: Sugar Transport in Lactic acid Bacteria. In: Sugar Transport and Metabolism in Gram-positive Bacteria. Reizer, J. et A. Peterkofsky. (Hrsg.). Chichester, England 1987, S. 13.

[7] Vgl.: Sjöberg, A. et al.: The influence of limiting and non limiting Growth Conditions on Glucose and Maltose Metabolism In *Lactococcus lactis ssp. lactis* Strains. In: Applied Microbiology and Biotechnology 42. 1995, S. 931-938.

[8] Vgl. Hüwell, H. et al.: Maltose Phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Purification, Characterization and Application in a biosensor for Orthophosphat. Enzy. Microb. Technil. 21. 1997, S. 413-420.

[9] Vgl. Ehrmann, M. und R. Vogel: Maltose Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and hetrerologous Expression of the Key Enzymes, Maltose Phosphorylase and Phosphoglucomutase. In: FEMS Microbiology Letters 169. 1998, S. 81-86.

Eine hohe Maltoseaufnahme kann zur Bildung von Glucose führen, die die Umwandlungsrate der Glucohexokinase übersteigt. Um einen intrazellulären Glucoseüberschuss zu vermeiden, wird die Glucose über den oben beschriebenen Mechanismus ausgeschieden.[1]

Trisaccharide wie Maltotriose und Oligosaccharide werden bei den meisten Milchsäurebakterien über spezifische Permeasen in die Zelle aufgenommen. Sie werden vor der Phosphorylierung von den entsprechenden Glycosidasen gespalten und treten so in den Stoffwechsel ein.[2] Kontula et al.[3] und Jaskari et al.[4] zeigten eine Verstoffwechselung von ß-Gluco-Oligosacchariden durch *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* und *Lactocossus lactis*.

Verschiedene Laktobazillen weisen auch amyloyltische Eigenschaften auf [5,6]; hieraus kann geschlossen werden, dass noch vorhandene, größere Stärkeabbauprodukte verstoffwechselt werden. Giraud et al. berichten über einen *Lb. plantarum*, der Rohstärke direkt fermentiert.[7] *Lb. amylovorus* produziert extrazelluläre Amylasen, die Stärke abbauen.[8] Von diesen Amylasen werden, wenn auch nur eingeschränkt, Dextrine verstoffwechselt.[9]

Metabolismus der Proteine

Die Stickstofffraktionen einer Bierwürze setzen sich wie folgt zusammen: Hochmolekualere Stickstoffverbindungen 22%, mittelmolekularere Stickstoffverbindungen 18%, niedermolekulare Stickstoffverbindungen 60%.[10] Der Anteil an Aminosäuren soll ca. 20-25% am Gesamtstickstoff betragen.[11]

Der hohe Anteil an verfügbaren Aminosäuren kommt dem Stoffwechsel der Milchsäurebakterien entgegen, da sie nur eine geringe Fähigkeit besitzen, Aminosäuren zu synthetisieren.[12]

---

[1] Vgl. Neubauer, H. et al.: Mechanism of Maltose Uptake and Glucose Excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. In: Journal of Bacteriology Vol. 176. No.10. 1994, S. 3007-3012.
[2] Vgl. Kandler, O.: a.a.O., S. 212.
[3] Vgl. Kontula, P. et al.: Oat bran ß-Gluco- and Xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for Lactic acid bacteria. In: International Journal of food Microbiology 45. 1998, S. 163-169.
[4] Vgl. Jaskari, J. et al.: Oat ß-glucan and Xylan Hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. In: Journal for Applied Microbiology and Biotechnology 49. 1998, S. 175-181.
[5] Vgl. Champ, M. et al.: Amylase Production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. In: Journal of Applied Bacteriology 55. 1983, S. 487-493.
[6] Vgl. Lindgren, S. und O. Refai: Amylolytic Lactic Acid Bacteria in Fish Silage. In: Journal of Applied Bacteriology 57. 1984, S. 221-228.
[7] Vgl.:Giraud, Eric et al.: Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of *Lactobacillus plantarum*. In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 60, No. 12. 1994, S. 4319-4323.
[8] Vgl. Nakamura, L.K.: *Lactobacillus amylovorus*, a new Starch Hydrolysing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. In International Journal of Systematic Bacteriology 31. 1981, S. 56-63.
[9] Vgl.:Pompeyo, C. et al: Comparison of Amylolytic Properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. In: Applied Microbiology and Biotechnology 40. 1993, S.266-269.
[10] Vgl. Narziß, L. a. a. O., S. 304.
[11] Vgl. Geiger, E.: Gärung. In: Handbuch der Brauerei Praxis. Heyse, K.-U. (Hrsg.) Hamburg 2000, S. 5.
[12] Vgl. Axellson, L.: a.a.O. S. 43.

Dabei ist der Bedarf an Aminosäuren zwischen den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich und resultiert eventuell aus Mutationen bei den Genen der Aminsäurebiosynthese.[1,2]

Am besten erforscht ist der Abbau von Stickstoffverbindungen sowie die Aufnahme von Peptiden und Aminosäuren für Milchsäurebakterien, die hauptsächlich in Molkereien eingesetzt werden, vor allem *Lactococcus lactis*. Dort spielt der Abbau des Caseins eine wesentliche Rolle für die Bildung von Textur und Aroma.[3]

Grundsätzlich besteht das proteolytische System der Milchsäurebakterien aus einer extrazellulär lokalisierten Serin-Proteinase, Transportsystemen spezifisch für Aminosäuren, Di- und Tripeptide und Oligopeptide sowie einer Vielzahl aus intrazellulären Peptidasen.[4]

Während Aminosäuren, Di-Tripeptide und Oligopeptide direkt über entsprechende Transportsysteme in die Zelle gelangen, werden größere Peptide und Proteine durch eine membrangebundene Proteinase gespalten. Diese Proteinase spaltet die Eiweißfragmente so klein, dass sie durch das Oligopeptidsystem in die Zelle aufgenommen werden können.[5] In der Zelle wiederum werden Di-, Tri- und Oligopeptide durch Peptidasen zu Aminosäuren gespalten und zur Verfügung gestellt. Von den Aminosäuren des Caseins wird nur ein sehr geringer Anteil gebraucht (ca. 1%)[6], für ein aminosäurereiches Medium wie Würze lassen sich ähnlich niedrige Werte erwarten.

Inwiefern sich die bei Laktokokken gewonnen Erkenntnisse auf Laktobazillen übertragen lassen, ist unklar. Holck und Naes berichten über ein Gen für eine membrangebundene extrazelluläre Proteinase bei *Lactobacillus casei*[7], das diese These stützt. Christensen berichtet über vergleichbare Transportsysteme bei *Lactobacillus helveticus*.[8] Aus dieser Sicht lässt sich eine Vergleichbarkeit zwischen den proteolytischen Systemen von Laktokokken und Laktobazillen bezüglich der Bestandteile und Abläufe herführen.[9]

---

[1] Vgl. Morishita, T. et al.: Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acids biosynthetic pathways. In: Journal of Bacteriology 148. 1981, S. 64-71.

[2] Vgl. Chopin, A.: Organization and Regulation of Genes for Amino Acids synthesis in lactic acid Bacteria. In: FEMS Microbiological Reviews 12. 1993. S. 21-38.

[3] Vgl. Olsen, N.: The impact of Lactic Acid Bacteria on cheese Flavour. In: FEMS Microbiological Reviews 87. 1990, S. 131-148.

[4] Vgl. Edmund, R.S. et al.: The proteolytic system of Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Venema, G. (Hrsg.) Dordrecht, Niederlande 1995. S. 91-125.

[5] Vgl. Juillard, V. et al.: The extracellular $P_1$-type proteinase of *lactococcus lactis* hydrolyzes ß-casein into more than hundred different oligopeptides. In: Journal of bacteriology 177. 1995, S. 3472-3478.

[6] Vgl. Edmund, R.S. et al.: a. a. O., S. 187.

[7] Vgl. Holck, A. und H. Naes: Cloning, sequenzing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NCDO 151. In: Journal of Genetic Microbiology 138. 1992, S. 1353-1364.

[8] Vgl. Christensen J. et al.: Sequenze Analyses, distribution and expression of an aminopeptidase-N encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ232. In: Gene 155. 1995, S. 89-93.

[9] Vgl. Edmund, R, S, et al.: a. a. O. ; S.187.

Metabolismus anderer Würzeinhaltstoffe

Über Stoffwechselwege der Laktobazillen für andere Würzeinhaltstoffe wie Polyphenole, Mineralstoffe, Spurenelemente, Purine, Pyrimidine und Vitamine wird in der Literatur sehr wenig berichtet. Zahlreiche Autoren [1,2,3] erwähnen zwar den unbedingten Bedarf dieser Wuchsstoffe für die Laktobazillen; es ist aber schwer, konkrete Ergebnisse über den Metabolismus und Aufnahmemechanismen zu finden. Auch bei der Medienevaluierung für *Lactobacillus*-Fermentationen werden Vitamine, Salze und Mineralstoffe berücksichtigt.[4,5] Eine spezielle Rolle im Stoffwechsel lässt sich aber auch aus diesen Quellen nicht ableiten.

## 2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Würzeinhaltsstoffen und Fermentations-produkten

Die ernährungsphysiologische Bedeutung des Bieres wird zunehmend diskutiert.[6] Viele der diskutierten Inhaltsstoffe sind bereits in der Würze vorhanden und die ernährungsphysiologische Wirkung lässt sich auf die in dieser Arbeit behandelten Getränke übertragen. Hauptsächlich sind dies Ballaststoffe, Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine, sekundäre Pflanzenstoffe und essentielle Aminosäuren.[7] Diese Inhaltstoffe werden durch die Rohstoffe Malz und Wasser eingebracht. Durch die Fermentation mit Laktobazillen wird zusätzlich noch Milchsäure in die Getränke eingebracht.

Die ernährungsphysiologische Bedeutung dieser Inhaltstoffe wird im Folgenden dokumentiert.

Ballaststoffe

Ballaststoffe bestehen aus Kohlenhydraten sowie aus anderen organischen Verbindungen, die durch die Enzyme des menschlichen Intestinaltraktes nicht verdaut werden können.[8] In der Bierwürze sind dies hauptsächlich aus dem Malz stammende niedere und höhere Dextrine, ß-Glucane und Pentosane. Sie liegen in einer Größenordnung von etwa 1,5 g/l vor. Die wichtigste physiologische Bedeutung der Ballaststoffe ist in ihrer Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt begründet.

---

[1] Vgl. Schlegel, H. G, a. a. O., S. 296

[2] Vgl. o. V. : Stichwort: Milchsäurebakterien. In: Biotechnologie und Gentechnik. Deckwehr, W.D. (Hrsg.). Stuttgart 1999, S. 527-528.

[3] Vgl. Axelsson, L.: a.a.O., S. 5.

[4] Vgl. Krishnan, S.et al.: Screening and selection of media components for Lactic acid production using Plackett-burma design. In: Bioprocess Engineering 19, 1998, S. 61-65.

[5] Vgl. Dermirci, A. et al.: Media Evaluation of Lactic Acid Repeated-Batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei Subsp. Rhamnosus*. In: Journal of Agricultur and food Chemistry 46. 1998, S. 4771-4774.

[6] Vgl. o.V. : Neues über Bier und Gesundheit. In Brauwelt Brevier 2002. K.U. Heyse(Hrsg.). Nürnberg 2002, S. 219-223.

[7] Vgl. Piendl, A.: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Nürnberg 1999.

[8] Vgl. Biesalski, H.-K.: Ballaststoffe. In: Ernährungsmedizin. Biesalski H.-K. (Hrsg.).Stuttgart 1999, S. 69.

Es entstehen günstigere Wachstumsbedingungen für die Darmbakterien, und es werden antikanzerogene Wirkungen auf die Colon-Zellen ausgeübt.[1] Außerdem wurde in verschiedenen Studien eine Cholesterinspiegel-senkende Wirkung festgestellt.[2] Von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung wird eine Ballaststoffzufuhr von 30 g/Tag für Erwachsene empfohlen.

Mineralstoffe und Spurenelemente

Die wichtigsten Mineralstoffe kommen in abnehmender Reihenfolge in der Würze vor: Kalium (ca. 600 mg/l), Magnesium (ca. 150 mg/l), Calcium (ca. 25 mg/l), Natrium (ca. 10 mg/l). Von den Spurenelementen sind Eisen, Zink, Mangan und Kupfer (alle ca.0.1-0,2 mg/l) zu finden. Die Elemente stammen aus dem Malz und aus dem Brauwasser.[3]

Mineralstoffe und Spurenelemente haben folgende ernährungsphysiologische Wirkung: [4, 5, 6]

Kalium als quantitativ wichtigstes intrazelluläres Kation ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Es wird zur Steuerung des Säure-Basen-Gleichgewichtes und zur Muskelkontraktion sowie zur Enzymregulation benötigt. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung schätzt einen Mindestbedarf von 2 g/Tag für einen Erwachsenen.

Magnesium spielt eine wichtige Rolle in der Eiweiß- und Nukleinsäuresynthese. Es dient als Kofaktor für viele Enzyme und hilft bei der Stressabschirmung. Membranen und Membrantransportwege werden durch Magnesium stabilisiert. Eine tägliche Aufnahme von 270-400 mg für Erwachsene wird empfohlen.

Calcium ist mengenmäßig der wichtigste Elektrolyt. Er wird zur Enzymregulierung benötigt und ist ein wichtiger Baustein für Zähne und Knochen. 800-1200 mg/Tag sollten aufgenommen werden.

Natrium ist mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und spielt bei der Muskelkontraktion eine tragende Rolle. Ferner ist es für die Regelung der Osmolalität von Bedeutung. Die Aufnahme wird mit 5 g täglich als ausreichend betrachtet, von einer Aufnahme über 10 g wird abgeraten.

Von den Spurenelementen wird Eisen für die Sauerstoffversorgung und zelluläre Energiebereitstellung benötigt. Kupfer dient wie Mangan als Kofaktor für Enzyme und Metallproteine. Zink stabilisiert die DNA und RNA, reguliert die Insulinspeicherung und ist essentiell für den Aufbau von Bindegewebe.

---

[1] Vgl. Elmadfa, I. und C. Leitzmann: Ernährung des Menschen. Stuttgart 1998, S. 160-161.

[2] Vgl. McIntosh, G.H.et al.: Barley foods and their influence on cholesterol metabolism. In: Plants in Human Nutrition, World Review Nutrition Dietetics 77. Simopoulos, A.P. (Hrsg.). 1995,S. 89-105.

[3] Vgl. Hopulele, T.: Zum Verhalten verschiedener Mineralstoffe in der Brauereitechnologie. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1972, S. 57-89.

[4] Vgl. Morlion, B.J.: Wasser, Elektrolyte und Säure-Basen-Haushalt. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H.-K. (Hrsg.) Stuttgart 1999, S. 159-166.

[5] Vgl. K. Schümann und M. Anke: Mengenelemente. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H. –K. (Hrsg.) Stuttgart 1999, S. 167-172.

[6] Vgl. Anke, M. und K. Schümann: Spurenelemente. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H. –K. (Hrsg.) Stuttgart 1999, S. 173-186.

Vitamine

Vitamine sind für den Menschen essentielle Nährstoffe, die vom Körper nicht selber synthetisiert werden können. Eine ungenügende Zufuhr kann zu schweren Erkrankungen führen. In Bier kommen fast ausschließlich die wasserlöslichen Vitamine in folgenden Größenordnungen vor: Niacin (7 mg/l), Pantothensäure (1,5 mg/l), Pyridoxin (0,6 mg/l), Riboflavin (0,35 mg/l), Thiamin (0,02 mg/l) und Folsäure (0,03 - 0,15 mg/l).[1] Diese für Bier angegebenen Werte lassen sich auch auf Würze übertragen, da sie durch die Vergärung mit Hefe eher mengenmäßig reduziert werden. Die Vitamine werden durch das Malz in das Getränk eingebracht.

Die ernährungsphysiologische Bedeutung der einzelnen Vitamine begründet sich folgendermaßen:[2]

Niacin ist Bestandteil der wichtigsten Elektronentransportkette in lebenden Zellen ($NAD^+$/NADH). Es ist vor allem bei der Glykolyse und Fettsäuresynthese und –oxidation beteiligt. Als tägliche Aufnahmemenge werden 15 mg empfohlen.

Panthotensäure ist von universeller Bedeutung in sämtlichen Auf- und Abbaureaktionen. Es wird zum Aufbau des Coenzyms A benötigt. Empfohlen wird eine Aufnahme von 10 mg /Tag.

Pyridoxin hat eine Coenzymfunktion vor allem in der Glukoneogense, es wird aber darüber hinaus für den Fettstoffwechsel und zur Immunfunktion benötigt. Die empfohlene Aufnahmemenge am Tag liegt zwischen 1,6 g und 1,8 g.

Riboflavin dient als Coenzym in allen Bereichen des oxidativen Metabolismus, in dem Glucose und Fettsäuren zur Bildung von Energie dienen. 1,5 mg/Tag ist die empfohlenen Aufnahmemenge.

Thiamin ist Coenzym im Intermediärstoffwechsel, vor allem beim Kohlenhydratstoffwechsel. Hier wird es bei Decarboxylierungen und Transketolasereaktionen benötigt. Die Zufuhr sollte auch bei etwa 1,5 mg/Tag liegen.

Folsäure wird als Coenzym für die Übertragung von Hydroxymethylgruppen und Formylgruppen benutzt. Studien zeigen, dass eine Aufnahme von Folsäure eine Risikominderung von cardiovaskulären Erkrankungen bewirkt.[3] Nach Hahn und Wolters scheint Folsäure das Vitamin zu sein, das in der Ernährung der Deutschen am wahrscheinlichsten fehlt.[4]

---

[1] Vgl. Piendl, A.: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Nürnberg 1999, S. 79-88.
[2] Vgl. Biesalski, H.-K.: Vitamine. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H.-K. (Hrsg.) Stuttgart 1999, S. 111-158.
[3] Vgl. Walker, C.: Die Auswirkungen des Brauprozesses auf den Folsäuregehalt in Bier. In Brauwelt 11. 2002, S. 350-354.
[4] Vgl. Hahn, A. und M: Wolters. Ernährungsoekologie 1. 2000, S. 215-230.

Sekundäre Pflanzenstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe sind Nahrungsinhaltsstoffe, die nicht zu den Nährstoffen zählen. In diese Gruppe fallen Polyphenole, Carotinoide, Phytosterine, Saponine etc..[1] Sie tragen dazu bei, das Krankheitsrisiko für Zivilisationserkrankungen wie Krebs oder Herz-Kreislauferkrankungen zu senken. In der in dieser Arbeit verwendeten Würze findet man hauptsächlich Polyphenole, Proanthocyanidine. Sie stammen aus dem Malz. Der Gehalt des Bieres liegt um 15-25 % höher, da hier noch phenolische Substanzen durch den Hopfen eingebracht werden.

Die Wirkung sekundärer Pflanzenstoffe ist folgende: antioxidativ, antikanzerogen, immunmodulatorisch, antimikrobiell, antithrombisch, entzündungshemmend, blutdruckregulierend, blutdruck- und glucosespiegelregulierend.[2]

Essentielle Aminosäuren

Es gibt für den Menschen acht Aminosäuren, die mit der Nahrung zugeführt werden müssen, um das Stickstoffgleichgewicht zu erhalten: Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin.[3] In einer Vollbierwürze liegen sie in folgenden Größenordnungen vor: Isoleucin 90 mg/l, Leucin 180 mg/l, Lysin 120 mg/l, Methionin in Spuren, Phenylalanin 140 mg/l, Threonin, 80 mg/l, Tryptophan 39 mg/l, Valin 135 mg/l.[4] Die Aufgaben der Aminosäuren im menschlichen Körper sind vielfältig, sie dienen als Bausteine für Enzyme, Hormone, Immunstoffe und körpereigene Proteine. Sie können auch zur Energiegewinnung über die Atmungskette herangezogen werden. Der tägliche Bedarf an essentiellen Aminosäuren ist für Erwachsene in mg/kg Körpergewicht: Isoleucin 11, Leucin 14, Lysin 12, Methionin 11, Phenylalanin 14, Threonin 6, Tryptophan 3 und Valin 14.[5]

---

[1] Vgl. Watzl B. und C. Leitzmann: Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Stuttgart 1995.

[2] Vgl. Watzl, B.: Gesundheitliche Bedeutung sekundärere Pflanzenstoffe. In: Ernährungsbericht 1996. DGE (Hrsg.). Frankfurt 1996, S. 217-232.

[3] Vgl. Fürst, P.:Proteine. In: Ernährungsmedizin. Biesalki, H.-K. (Hrsg.) Stugart 1999, S. 92.

[4] Vgl. Wagner, D. : Mälzerei und Gärungstechnologische Einflüsse auf den Aminosäuregehalt der Malze und Biere. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1969, S. 94-95.

[5] Vgl. Munro, H. und M. Crim: The Proteins and Amino Acids. In: Modern Nutrition in Health and Disease.Shils, M. und V. Young (Hrsg.).Philadelphia 1988.

Milchsäure

Durch die Fermentation mit Laktobazillen werden ca. 20 g/l Milchsäure in die Getränkebasis eingebracht. Hierbei spielt das L-Lactat die wichtigere Rolle, da nur dieses aufgrund der vorhandenen L-Lactatdehydrogenase metabolisiert werden kann.[1] Als positive Eigenschaften werden die Stärkung des Immunsystems, die Anregung der Darmaktivität sowie die Metabolisierung in der Leber, die in Interaktion mit Glucose wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung des Sättigungsgefühls beiträgt, genannt.[2] Für den Herzmuskel stellt L-Lactat ein wichtiges Substrat der Energielieferung dar.[3] Ein weiterer ernährungsphysiologischer Vorteil gilt sowohl für L- als auch D-Lactat. Sie verbessern die Resorption der Mineralstoffe im Körper. Lactat erhöht z. B. die Bioverfügbarkeit von Calcium-Ionen.[4] Auch die Löslichkeit von Magnesiumlactat ist besser als z.B. von Magnesiumcarbonat.[5]

[1] Vgl. Baltes, W.: Lebensmittelchemie. Berlin 2000, S.333.
[2] Vgl. Daniel, H. und G. Rehner: Biochemie der Ernährung. Heidelberg 1999, S. 162.
[3] Vgl. Piendl, A und I. Wagner: Physiologische Eigenschaften der organischen Säuren des Bieres. In: Brauindustrie 68. 1983, S. 1522-1554.
[4] Vgl. Schühmann, und M. Anke: a. a. O. S. 167.
[5] Vgl. Steinmetz, T.: Der Einsatz von High Value Magnesium- und Calciumzitraten. In: Getränke. 1999, S. 51.

# 3 Stammselektion und Identifizierung

Aus verschiedenen Quellen wurden hier Stämme der Spezies *Lactobacillus* zusammengetragen (vgl.9.3) und auf ihre Eignung für die Würzefermentation untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, ob bestimmte molekularbiologische Untersuchungen (vgl. 9.4) geeignet sind, die selektierten Stämme einer Art zuzuordnen und die Stämme untereinander zu differenzieren.

## 3.1 Auswahl geeigneter Lactobacillusstämme zur Würzefermentation

Es wurden die in 9.3 beschriebenen Stämme zu den Untersuchungen herangezogen. Das Hauptaugenmerk wurde auf die absolute Bildung von L(+)-Lactat gelegt.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Bildung von Lactat und Acetat untersucht.

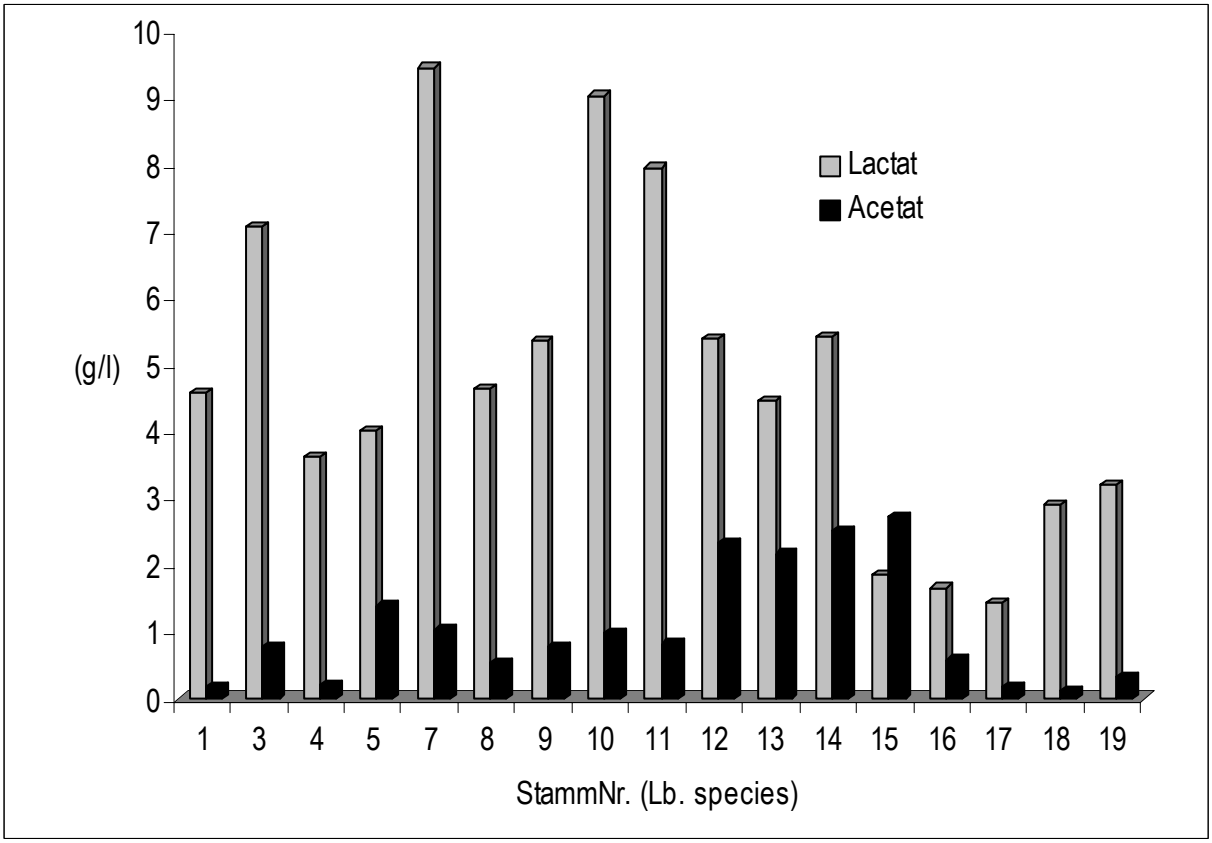



Abb. 3/1: Lactat- und Acetatbildung der verschiedenen Stämme

Aus Abbildung 3/1 ist zu ersehen, dass die Stämme SAG 07 und SAG 10 unter diesen Bedingungen die höchste Lactatproduktion aufweisen. Die Acetatbildung ist vor allem bei den Stämmen SAG 1, 4, 8, 17 und 18 gering. Aber auch die Stämme SAG 07 und 10 produzieren so wenig Acetat, dass auf der genannten Grundlage (negativer sensorischer Einfluss) akzeptable Resultate zu erwarten sind.

Daraufhin wurde der Anteil von D-Lacat bzw. L-Lactat an der Gesamtlactatmenge bestimmt:

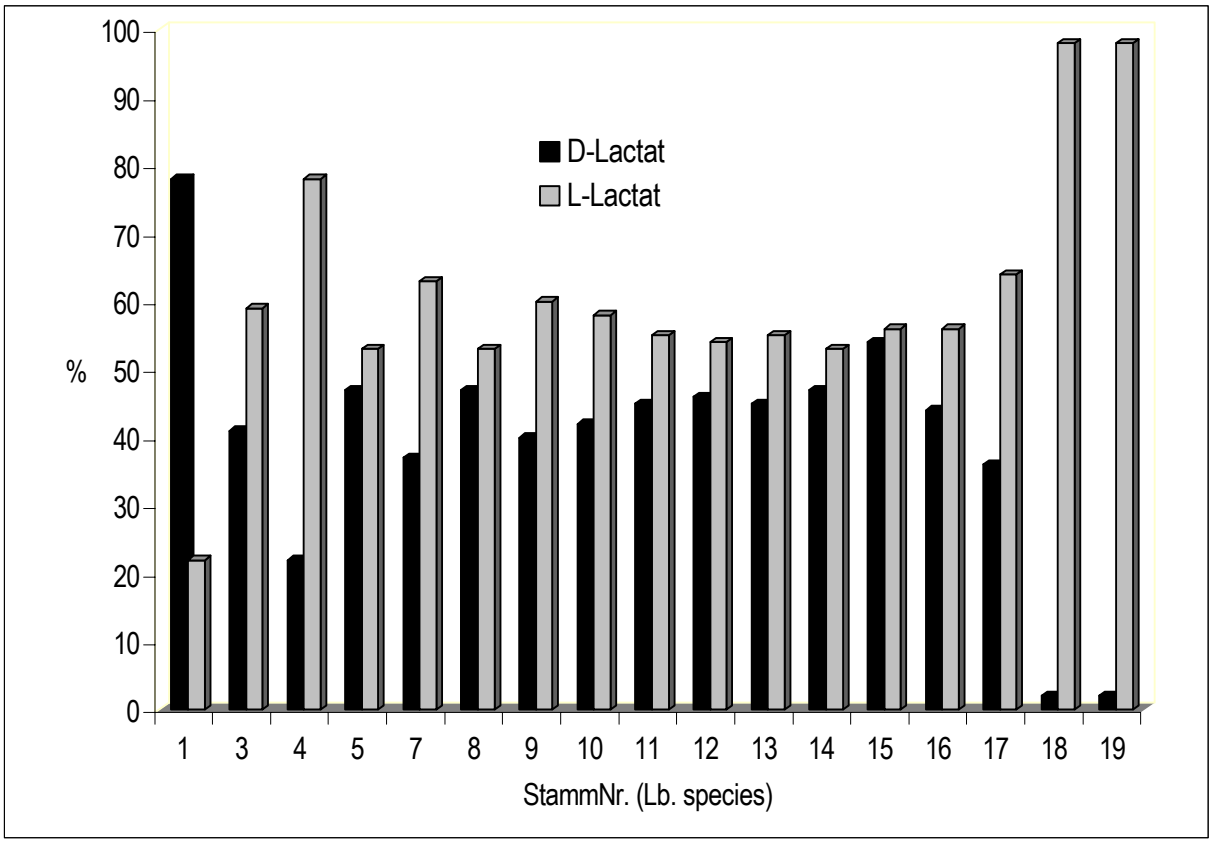



Abb. 3/2: D-Lactat- und L-Lacatbildung der verschiedenen Stämme

Zieht man die Werte der zweiten Versuchsreihe hinzu, stellt man fest, dass vor allem die Stämme SAG 18 und SAG 19 fast ausschließlich L-Lactat bilden. Die Lactatbildung ist aber im Vergleich zu den anderen Stämmen insgesamt sehr gering. Absolut gesehen sind es die Stämme SAG 07 und SAG 10, die in diesem Fermentationsmedium die höchste Ausbeute an L-Lactat aufweisen.

Ein Ziel bei der Herstellung der alternativen Gärungsgetränke ist es, eine maximale Ausbeute an ernährungsphysiologisch wertvollen Inhaltsstoffen zu erhalten. Über die Fermentation lässt sich als solcher Milchsäure, vor allem L-Lactat einbringen. Die Stämme SAG 07 und SAG 10 bringen, wie oben gezeigt, die größten Ausbeuten.

Beide weisen vergleichbare Eigenschaften auf. Aufgrund der niedrigen Acetatbildung sind bei beiden keine negativen Geschmacks- oder Geruchseindrücke durch Fermentationsprodukte zu erwarten. Um weitere Fermentationen nicht unnötig komplex zu gestalten wurde ein Mikroorganismus ausgewählt. Aus diesem Grund wird der Stamm SAG 07 für alle weiteren Versuche verwendet.

### 3.2 Differenzierungsmöglichkeiten für den ausgewählten Stamm SAG 07

Als Unterscheidungsmöglichkeiten wurden die RAPD-Methode für die Art-spezifische Differenzierung und die AFLP-Methode für die Stamm-spezifische Differenzierung geprüft. (Vgl. 9.4)

RAPD-PCR zur Art-spezifischen Differenzierung

Um festzustellen, ob die selektierten Stämme einer bestimmten Art zuzuordnen sind, wurden diese mit dem Typstamm der vermuteten Art verglichen. Ob eine Unterscheidung von anderen Arten möglich ist, wurde durch einen Vergleich der Bandenmuster mit den genotypisch nächstverwandten Arten festgestellt [1].

Nach der PCR und der elektrophoretischen Auftrennung ergaben sich im UV-Licht folgende Bandenmuster:

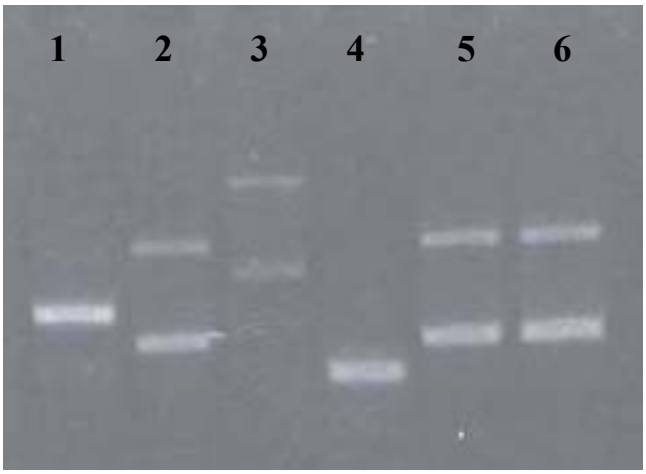



Abb. 3/3: Bandenmuster der verglichenen Lactobacillusarten

Erläuterung zur Abbildung:
Bahn 1: Bandenmuster von *Lb. delbrückii* DSMZ 20074$^{T}$
Bahn 2: Bandenmuster von *Lb. amylolyticus* DSMZ 11664$^{T}$
Bahn 3: Bandenmuster von *Lb. intestinalis* DSMZ 6629$^{T}$
Bahn 4: Bandenmuster von *Lb. crispatus* DSMZ 20584$^{T}$
Bahn 5: Bandenmuster von *Lb. amylolyticus* SAG 07
Bahn 6: Bandenmuster von *Lb. amylolyticus* SAG 10

Die Methode der RAPD konnte zur Zuordnung der isolierten Stämme zu einer Art und zur Unterscheidung von anderen Arten herangezogen werden.

Abbildung 3.3. zeigt die entstandenen Bandenmuster. Es ist zu erkennen, dass die Bandenmuster in Bahn 2, 5 und 6 identisch sind. Hiermit können die beiden Stämme *Lb. amylolyticus SAG* 07 und 10 der Art *Lb. amylolyticus* zugeordnet werden. Eine Unterscheidung von den nächsten Artverwandten ist ebenfalls möglich. Die Bandenmuster in den Bahnen 1, 3, 4 unterscheiden sich deutlich von denen der *Lb. amyolyticus* Art in Bahn 2, 5 und 6.

---

[1] Vgl. Bohak, I. et al. : *Lactobacillus amylolyticus sp. nov*. In sytematic and applied microbiology 21. Stuttgart 1998, S. 363.

AFLP zur Stamm-spezifischen Unterscheidung

Die Auswertung der DNA auf dem Sequenziergel ist in folgenden Darstellungen abgebildet:

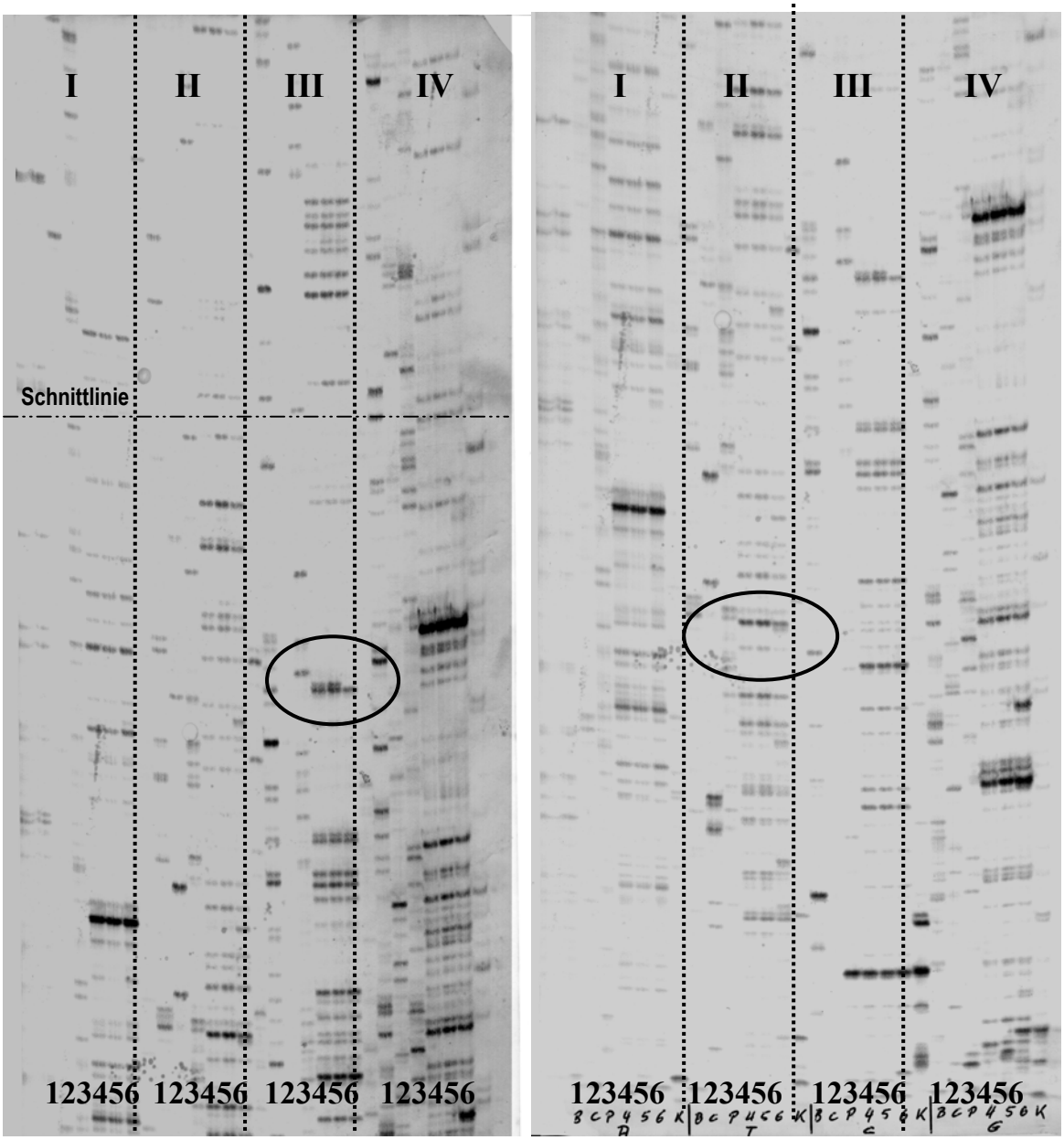



Abb. 3/4: Sequenziergel nach AFLP (links oberer Abschnitt, rechts unterer Abschnitt)

Erläuterung zur Abbildung:
Sektion I: AFLP mit spezifischem Nukleotid Adenenin
Sektion II: AFLP mit spezifischem Nukleotid Thymin
Sektion III: AFLP mit spezifischem Nukleotid Cytosin
Sektion IV: AFLP mit spezifischem Nukleotid Guanin

jeweils:
Bahn 1: DNA von *Lb. brevis*
Bahn 2: DNA von *Lb. casei*
Bahn 3: DNA von *Lb. plantarum*
Bahn 4: DNA von *Lb. amylolyticus* SAG 07
Bahn 5: DNA von *Lb. amylolyticus* SAG 10
Bahn 6: DNA von *Lb. amylolyticus* DSMZ

Die Unterscheidung einzelner Stämme voneinander ist möglich, in dem die Bandenmuster des Sequenziergels verglichen werden und dabei Unterschiede erkennbar sind. Um allerdings eine Aussage darüber treffen zu können, ob diese Unterschiede Stamm-spezifisch sind, wurden bei der Analyse auch artfremde Stämme betrachtet. Die Unterschiede in den Bandenmustern sollten wesentlich zahlreicher und deutlicher als zwischen den Stämmen einer Art sein.

Abbildung 3/4 ist in zwei Darstellungen aufgeteilt. Die rechte Seite zeigt den unteren Teil des Sequenziergels, die linke Seite den oberen. Der Schnitt zwischen den beiden Teilen erfolgt aber nicht exakt in der Mitte, so dass sich beide Teile überlappen. Der Übersicht halber ist das Sequenziergel in vier Sektionen unterteilt, in der jeweils die DNA´s nach der AFLP mit einem spezifischen Nukleotid aufgebracht sind. In den Bahnen 4, 5 und 6 sind in den Sektionen die DNA´s der untersuchten *Lb. amylolyticus* Stämme zu sehen. Die Ähnlichkeiten der Bandemuster ist groß, doch sind zwischen dem Typstamm (Bahn 6) und zwischen den beiden anderen Stämmen (Bahn 4,5) Unterschiede zu erkennen. Um diese Unterschiede deutlicher zu machen, sind in der Abbildung zwei Beispiele mit einer schwarzen Markierung eingekreist. Bei Verwendung des spezifischen Nukleotids Cytosin ist beim *Lb. amylolyticus*-Typstamm kein Signal zu sehen. Beide anderen Stämme zeigen eine deutliche Bande. Umgekehrt verhält es sich bei der AFLP mit dem spezifischen Nukleotid Thymin, hier zeigt der Typstamm ein Signal und die zwei anderen Stämme nicht. Es wird deutlich, dass sich die beiden *Lb. amylolyticus* Stämme SAG 07 und 10 genotypisch vom *Lb. amylolyticus* Stamm der DSMZ unterscheiden. Miteinander verglichen, sind die beiden Stämme SAG 07 und SAG 10 nicht zu unterscheiden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein und denselben Stamm handelt.

Eine Wertung der Unterschiede in den Bandenmustern der *Lb. amylolyticus* Stämme erfolgt im Vergleich mit den Bandenmustern artfremder Stämme. Die Unterschiede zu den artfremden Stämmen sind auch deutlich zu erkennen, bei allen verwendeten Nukleotiden entstehen signifikant andere Banden. Die Stämme von *Lb. brevis*, *Lb. casei* und *Lb. plantarum* sind in den Bahnen 1 bis 3 zu sehen. Die Signale lassen sich nicht mit denen der *Lb. amylolyticus* Stämme vergleichen. Die Unterschiede zwischen den *Lb. amylolyticus* Stämmen sind als Stamm-spezifisch zu werten, da diese zwischen den einzelnen Arten sehr deutlich sind.

Der für die weiteren Versuche verwendete Stamm SAG 07 lässt sich also *Lb. amylolyticus* zuordnen, mit der AFLP-Technik ist er als eigenständiger Stamm vom Typstamm zu unterscheiden.

# 4 Untersuchungen zum Nährstoffbedarf von *Lb. amylolyticus* SAG 07

Ziel dieser Untersuchungen war es, Erkenntnisse über das Stoffwechselverhalten von *Lb. amylolyticus* SAG 07 zu erhalten. Vor allem sollte das Stoffwechselverhalten in Würze untersucht werden, um zu überprüfen, ob konventionelle Bierwürze als Fermentationssubstrat geeignet ist. Um definierte Verhältnisse herzustellen, wurde mit einer „synthetischen Würze“ gearbeitet (vgl. Kap. 9.5). Bei den einzelnen Versuchen wurden die Inhaltstoffe verschieden kombiniert und das Stoffwechselverhalten beobachtet.

## 4.1 Verwertung von C- Quellen

Hauptbestandteil der Würze sind Kohlenhydrate. Der Verwertung bestimmter Kohlenhydrate durch *Lb. amylolyticus* kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Zunächst wurde die Verwertung einzelner Kohlenhydrate beobachtet, dann die Kombination verschiedener Kohlenhydrate.

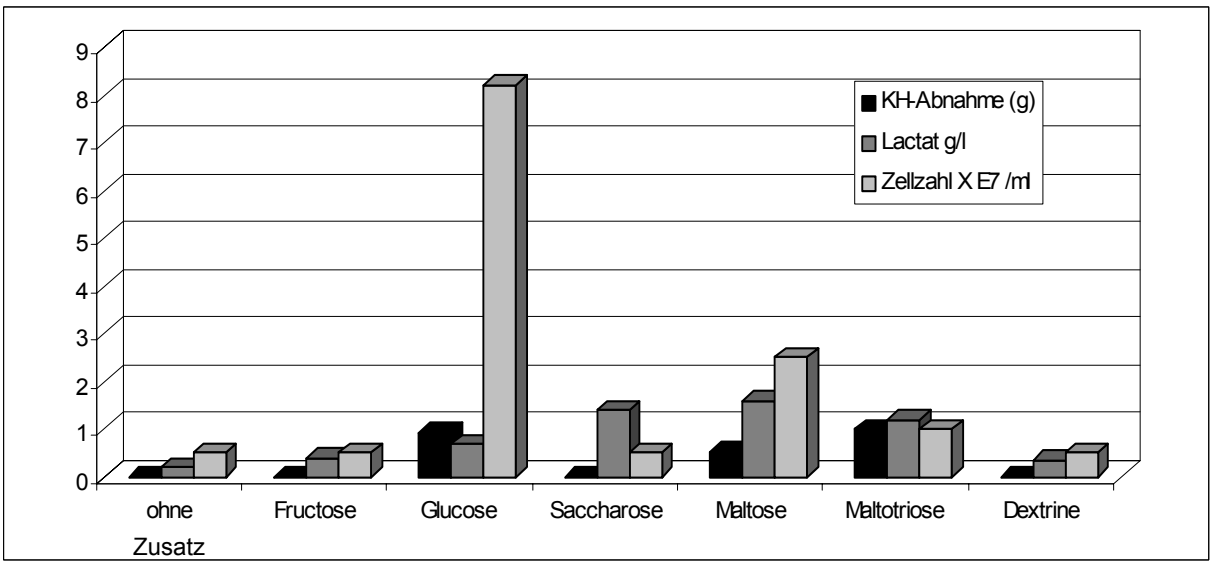



Abb. 4/1 : Verwertung einzelner Kohlenhydrate der Würze, pH-Wert, Lactatbildung, Zellzahl

Bei der Verwertung von Fructose und Dextrinen als alleinige Kohlenstoffquelle ist kaum Stoffwechselaktivität zu beobachten, sowohl die Zellzahl als auch die Lactatbildung erfahren wenig Zuwachs. Auch nehmen die zugegebenen Kohlenhydrate kaum ab. Die Werte sind mit denen des Ansatzes komplett ohne Kohlenhydrate vergleichbar. Bei Glucose und Maltose als C-Quelle ist die Stoffwechselaktivität am auffälligsten: während bei Glucose hauptsächlich Zellmasse gebildet wird (über 82 $*10^6$ Zellen/ml), wird beim Maltosestoffwechsel verstärkt Lactat gebildet. Maltotriose ist der Zucker, der am meisten aus dem Medium aufgenommen wird.

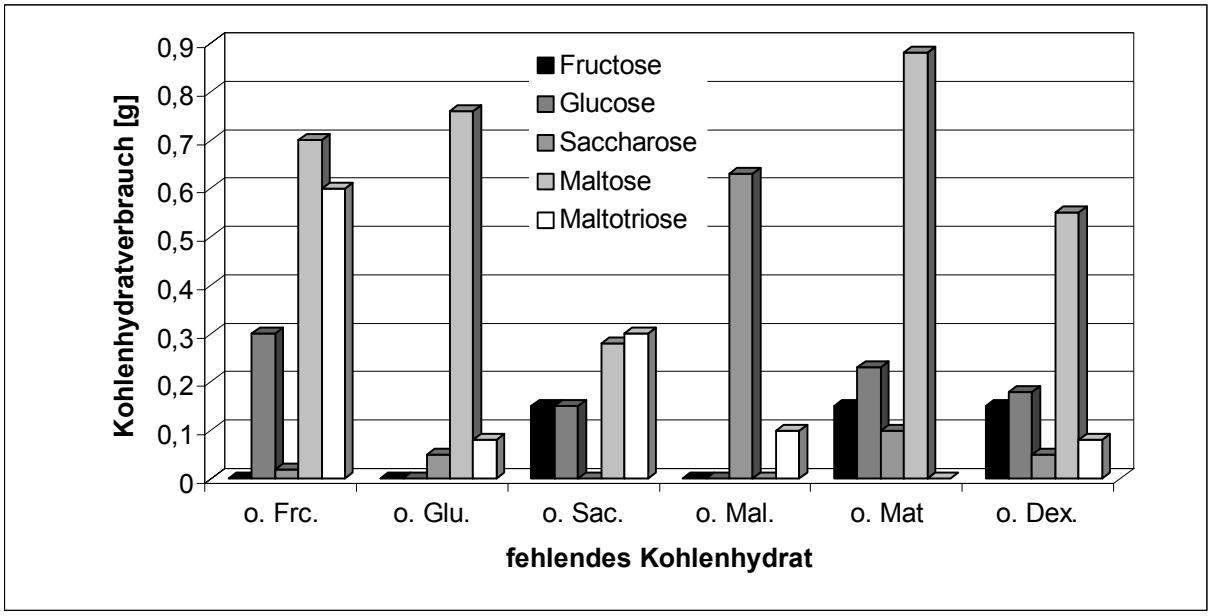



Abb. 4/2: Kohlenhydratverbrauch unter Ausschluss jeweils eines Kohlenhydrates im Ansatz

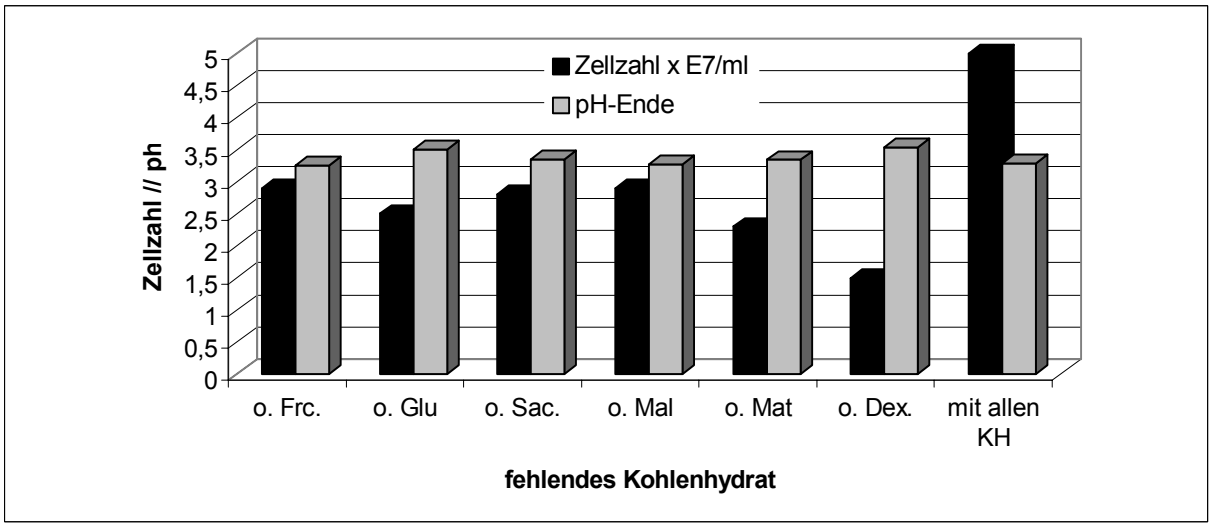



Abb. 4/3: Zellzahl und pH nach Ende der Fermentation unter Ausschluss jeweils eines Kohlenhydrates im Ansatz

Wird im Ansatz ein Kohlenhydrat ausgespart, werden die vorhanden Kohlenhydrate unterschiedlich verstoffwechselt (vgl. Abb. 4/2). Bei Abwesenheit von Fructose wird z.B. kaum Saccharose verwertet, während bei Abwesenheit von Glucose übermäßig viel Maltose (0,76 g) verwertet wird. Diese Entwicklung ist auch bei Abwesenheit von Maltotriose zu beobachten (0,88 g). Ist im Ansatz keine Maltose vorhanden, werden kaum andere Kohlenhydrate aufgenommen, allerdings ist eine hohe Saccharose-Aufnahme zu beobachten. Am ausgewogensten ist die Aufnahme der verschiedenen Kohlenhydrate bei Abwesenheit von Saccharose und den Dextrinen zu erkennen.

Auf die Stoffwechselaktivität haben die verschiedenen Zuckerzusammensetzungen wenig Einfluss. Bei allen Ansätzen war eine ähnliche pH-Entwicklung (ca. 3,3) und ein ähnliches Zellwachstum (28 *$10^6$ Zellen/ml) zu beobachten (vgl. Abb. 4/3). Eine Ausnahme bildeten die Ansätze ohne Maltotriose und die Dextrine, hier fällt die Zellzahl im Vergleich etwas ab. Bei Abwesenheit der Dextrine sind nur 15 *$10^6$ Zellen/ml gemessen worden. Das höchste Zellwachstum mit 50 *$10^6$ Zellen/ml zeigt sich, wenn alle Kohlenhydrate im Ansatz vorliegen, auch der pH-Wert sinkt mit am tiefsten (3,29).

### 4.2 Verwertung von Wuchsstoffen

In der Literatur wird immer wieder darauf hingewiesen, dass Laktobazillen einen hohen Wuchsstoffbedarf haben. Auf welche Weise die verschiedenen Wuchsstoffe der Würze verstoffwechselt werden, sollte durch Variation im Medium überprüft werden. Zunächst wurden einzelne Wuchsstoffe getestet und im Anschluss daran verschiedene Kombinationen von Wuchsstoffen.

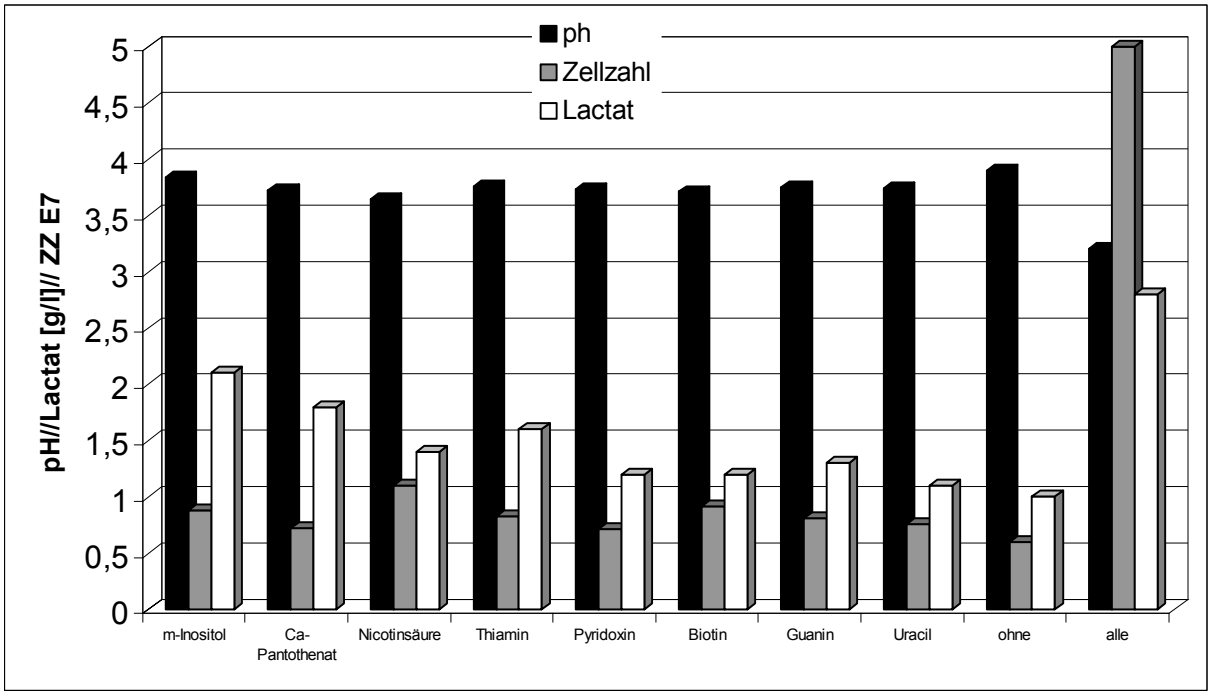



Abb. 4/4: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert, Lactat mit jeweils einem Wuchsstoff im Ansatz

Abbildung 4/4 zeigt die Entwicklung der Zellzahl, der pH-Werte und der Lactatzunahme bei Zugabe von jeweils nur einem Wuchsstoff zum Medium. Es wird deutlich, dass mit nur einem Wuchsstoff kaum Stoffwechselaktivität stattfindet. Die Werte liegen alle im Bereich der Werte, die erzielt werden, wenn keine Wuchsstoffe ins Medium gegeben werden. Es ist kaum eine Zunahme an Zellmasse zu erkennen (maximal 11,5 *$10^6$ Zellen/ml bei Nicotinsäurezugabe). Hier ist auch der pH-Wert am tiefsten gefallen, pH 3,64. Die mengenmäßig größte Lactatbildung konnte bei Zugabe von m-Inositol beobachtet werden.

Alle Werte blieben aber weit hinter den Werten zurück, die bei einer Fermentation mit allen Wuchsstoffen im Medium erreicht wurden. Die Zellzahl stieg hier bis auf 50 $*10^6$ Zellen/ml, der pH-Wert sank bis auf 3,2 und es wurden 2,8 g/l Lactat gebildet.

In Abbildung 4/5 sind die Zahlen für die Zellzahlentwicklung, den pH-Abfall und die Lactatbildung bei der Fermentation bei Aussparung eines Wuchsstoffes aus dem Medium dargestellt.

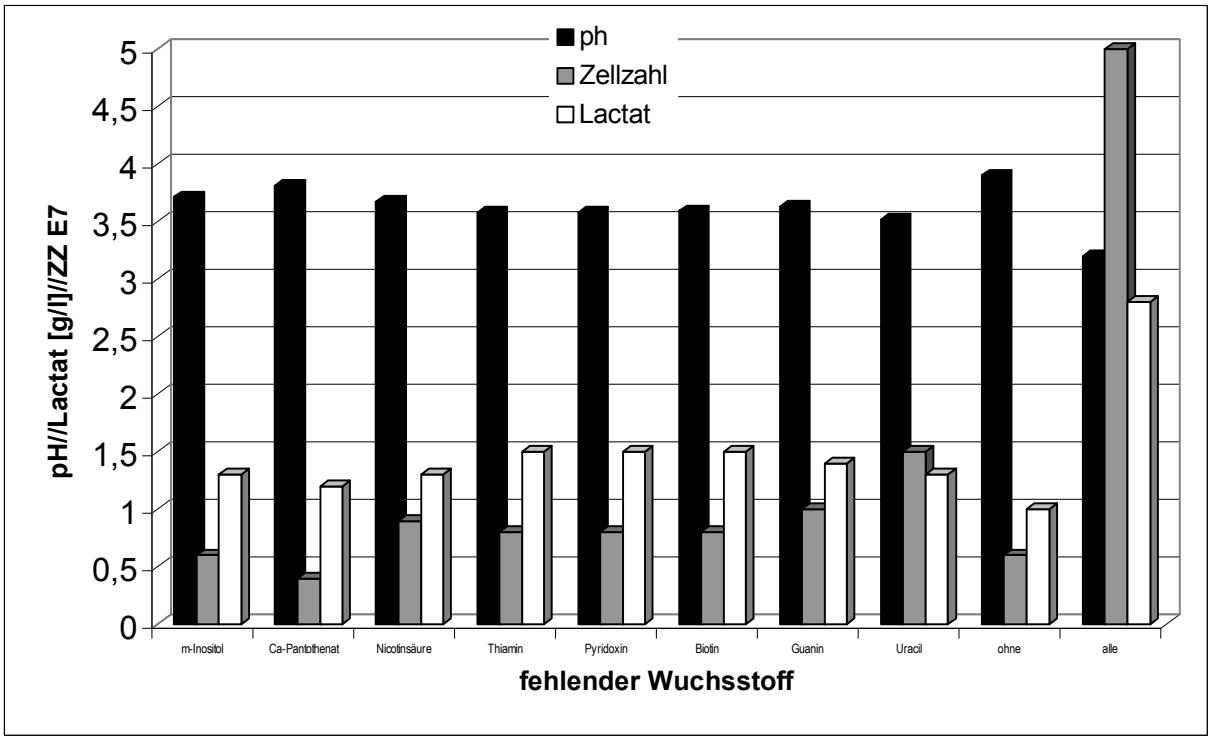



Abb. 4/5: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert, Lactat unter Ausschluß jeweils eines Wuchsstoffes im Ansatz

Auch hier ist nur eine mäßige Stoffwechseltätigkeit zu beobachten. Im Vergleich sind die Fermentationen unter Ausschluss eines Wuchsstoffes etwas intensiver verlaufen als mit nur einem Wuchsstoff im Medium, aber auch hier werden die Werte der Fermentation mit allen Wuchsstoffen nicht annähernd erreicht. Der maximale pH-Abfall (pH 3,52) wird im Ansatz ohne Uracil erreicht, wo auch die höchste Zellzahl (15 $*10^6$ Zellen /ml) erkennbar ist. Die höchste Lactatbildung (1,5 g/l) wird in den Ansätzen ohne Thiamin, Pyridoxin bzw. Biotin erreicht. Aber der Wert, ist wie erwähnt, nicht mit der Fermentation vergleichbar, in der alle Wuchsstoffe vorhanden sind.

### 4.3 Verwertung von Stickstoffquellen

Um den Bedarf an Stickstoffquellen zu überprüfen, wurde wechselweise ein Caseinhydrolysat und Pepton zu Nährmedium gegeben. Es wurde auch je ein Ansatz mit beiden und ohne eine Stickstoffquelle angesetzt. In Abbildung 4/6 sind die Ergebnisse der pH-Wert-Entwicklung, der Zellvermehrung und der Lactatbildung dargestellt.

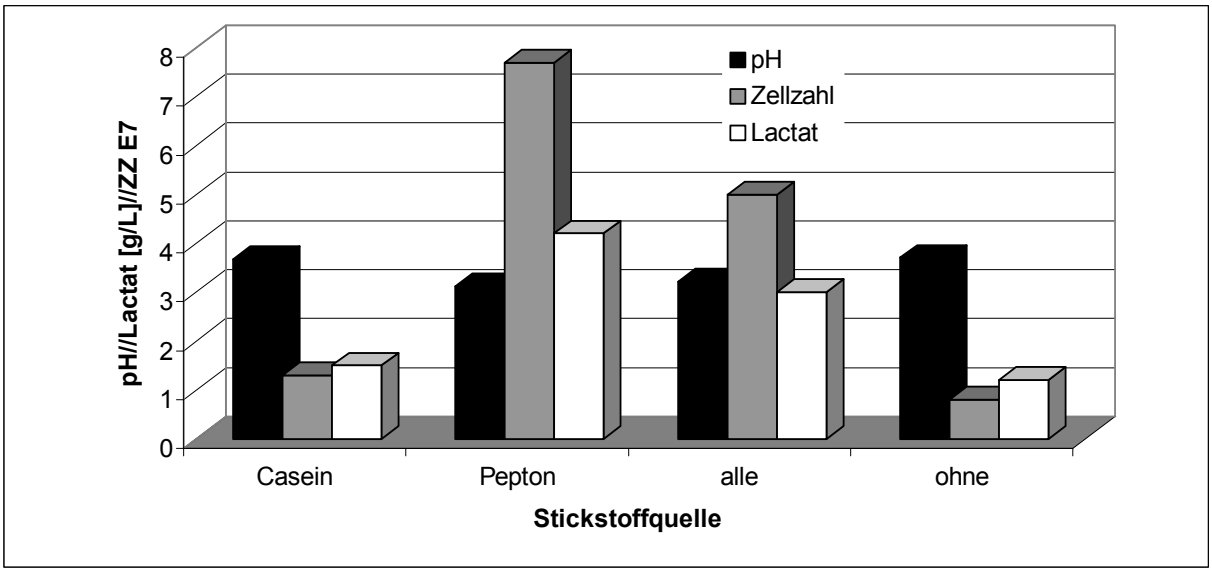



Abb. 4/6: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat bei verschiedenen Stickstoffquellen

Wie in Abbildung 4/6 deutlich zu erkennen ist, ist bei Zugabe von Pepton der höchste Zuwachs an Zellmasse (70 $*10^6$ Zellen/ml) und die höchste Lactatbildung (4,2 g/l) zu beobachten. Der pH-Abfall (bis pH 3,12) ist parallel dazu am höchsten. Auffällig ist, dass diese Werte nicht erreicht werden, wenn beide Stickstoffquellen im Medium vorhanden sind; es wurde nur ein Zellwachstum von 50 $*10^6$ Zellen/ml erreicht. Dies ist vergleichbar mit den vorherigen Versuchen (vgl. 4.2), in denen beide Stickstoffquellen vorhanden waren. Die pH-Entwicklung (pH 3,2) und die Lactatbildung (3,0 g/l) stimmen überein. Bei Caseinhydrolysat als einzige Stickstoffquelle wird keine große Stoffwechselaktivität deutlich. Die Werte unterscheiden sich nur unwesentlich von den Werten ohne Stickstoffquelle. Sie liegt für den pH im Bereich von 3,7 und für die Lactatbildung im Bereich 1,3 g/l. Lediglich bei der Zellzahlentwicklung wird ein Unterschied deutlich. Bei Zugabe von Caseinhydolysat ist ein Wachstum bis auf 13 $*10^6$ Zellen/ml im Gegensatz zu 8 $*10^6$ Zellen/ml ohne Stickstoffquelle zu beobachten.

### 4.4 Verwertung von Mineralsalzen

Das Angebot an verschiedenen Mineralsalzen wurde wie die anderen Bestandteile des Mediums auch variiert. Es wurden Ansätze mit nur einem Mineralsalz und Ansätze, in denen ein Mineralsalz fehlte, fermentiert.

Abbildung 4/7 zeigt die Entwicklung von pH, Zellzahl und Lactat in den Ansätzen mit nur einem Mineralsalz.

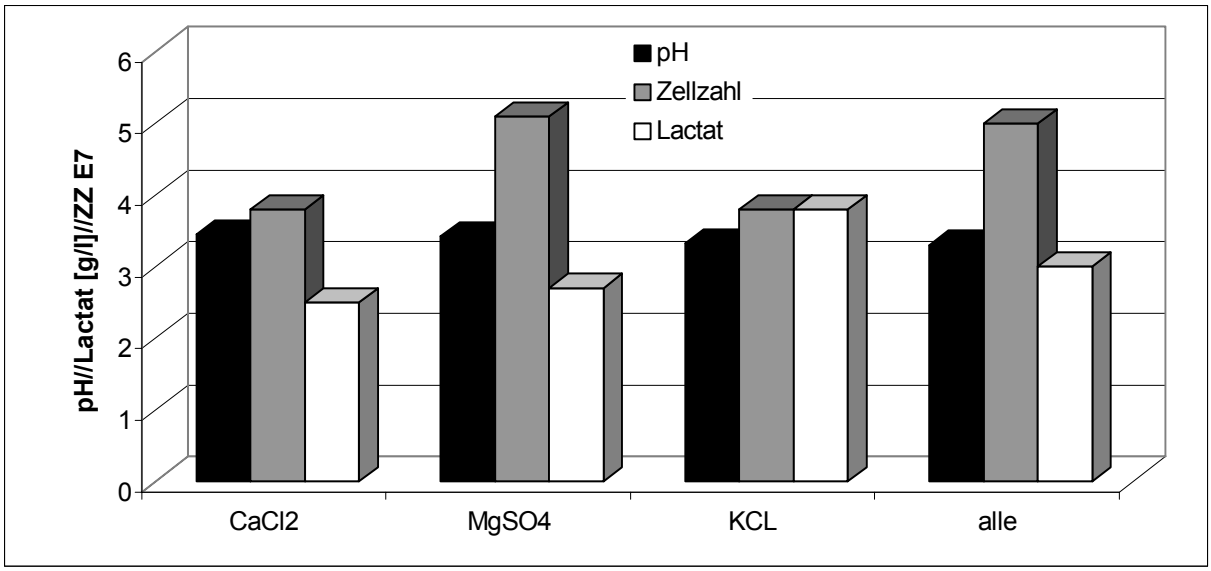



Abb. 4/7: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat mit jeweils einem Mineralsalz im Ansatz

Aus der Abbildung wird deutlich, dass bei Zugabe von jeweils einem Mineralsalz die Unterschiede zum Ansatz mit allen Mineralsalzen in Bezug auf pH-Wert und Lactatbildung nicht gravierend sind. Eine Ausnahme bildet der Ansatz mit Kaliumchlorid, hier wird sogar mehr Lactat (3,8 g/l) gebildet als im Ansatz mit allen Mineralsalzen. Die Zellzahlentwicklung ist beim Ansatz mit Magnesiumsulfat und im Ansatz mit allen Mineralsalzen vergleichbar hoch (51 $*10^6$ Zellen/ml bzw. 50 $*10^6$ Zellen/ml). Bei den anderen Ansätzen liegt die Zellzahl darunter (38 $*10^6$ Zellen/ml).

Abbildung 4/8 zeigt die Verhältnisse wenn ein Mineralsalz im Ansatz ausgespart wurde.

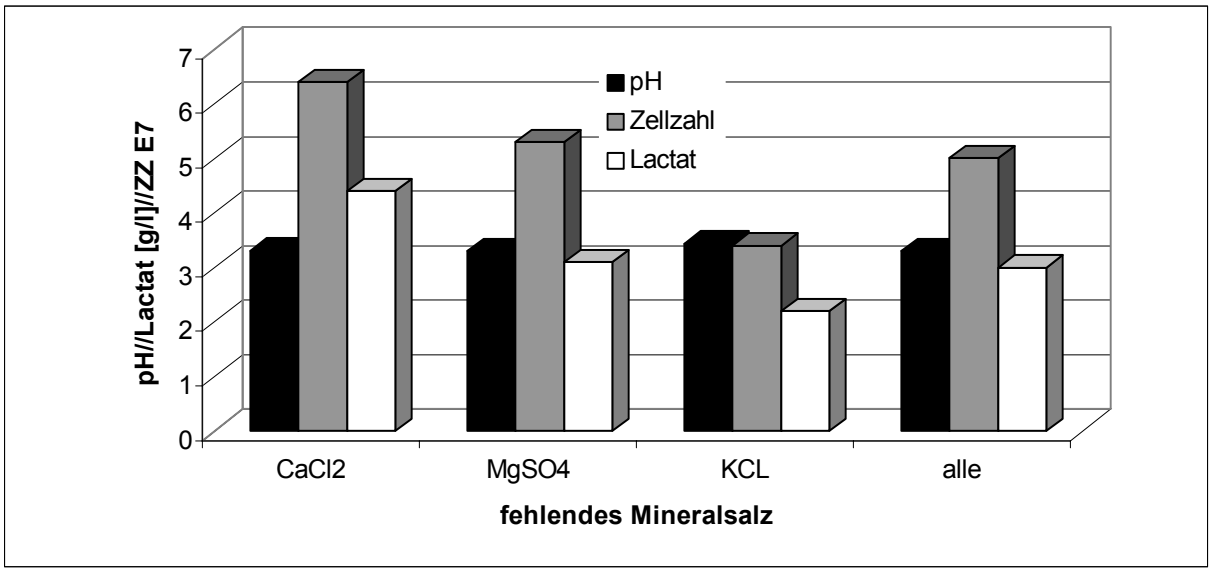



Abb. 4/8: Entwicklung von Zellzahl, pH-Wert und Lactat unter Ausschluss jeweils eines Mineralsalzes im Ansatz

Die pH-Werte haben sich in allen Ansätze vergleichbar entwickelt, sie liegen im Bereich von pH 3,3-3,4. Die Zellzahlentwicklung und die Lactatbildung verlaufen jedoch unterschiedlich. Im Ansatz ohne Calciumchlorid entwickelt sich die Zellzahl am höchsten, auf 64 $*10^6$ Zellen/ml. Auch im Ansatz ohne Magnesiumsulfat liegt sie noch knapp über der Zellzahl des Ansatzes mit allen Salzen (53 $*10^6$ Zellen/ml gegenüber 50 $*10^6$ Zellen/ml). Auch die Lactatbildung ist im Ansatz ohne Calciumchlorid am höchsten (4,4 g/l). Der Ansatz ohne Magnesiumsulfat ist mit dem Ansatz mit allen Mineralien vergleichbar, die Lactatbildung beträgt hier 3,1 g/l bzw. 3,0 g/l. Der Ansatz ohne Kaliumchlorid zeigt bei den Fermentationen immer eine geringere Stoffwechselaktivität. Die Werte lagen deutlich unter den Werten der anderen Ansätze.

# 5 Festlegung der Parameter für eine reproduzierbare Fermentation von Würze mit *Lb. amylolyticus* SAG 07

Mit dem im Kapitel 3 selektierten *Lactobacillus* sollte eine Fermentationstechnologie erstellt werden, um eine reproduzierbare Fermentation von Bierwürze zu gewährleisten.
Zunächst wurden in einer nicht pH-regulierten Fermentation die Parameter Temperatur, Substratkonzentration, Anstellzellzahl und Begasung untersucht. Ziel hierbei war es, einen möglichst zügigen Fermentationsverlauf und eine maximale Milchsäureausbeute zu erreichen. Des Weiteren wurde in Scale-up-Versuchen überprüft, ob sich die ermittelten Parameter auf großtechnischen Maßstab übertragen lassen. Eine Intensivierung der Fermentation mittels einer pH-Regulation wurde ebenfalls untersucht. Abschließend wurde eine Kombination *Gluconobacter/Lactobacillus*-Fermentation erprobt.

## 5.1 Variation und Optimierung relevanter Fermentationsparameter

Parameter Temperatur

Aufgrund von Literaturangaben (siehe 2.1) über die Temperaturoptima von homofermentativen Milchsäurebakterien wurden mit dem Stamm 07 Fermentationen im Bereich von 46°C-50°C durchgeführt. Zur Betrachtung von Randbereichen erfolgte jeweils eine Fermentation bei 43°C und bei 53°C. Die anfängliche Sauerstoffsättigung betrug 15%, bei einer Rührerdrehzahl von 180 Umdrehungen pro Minute. In Abbildung 5/1 sind die gemessenen pH–Werte der einzelnen Temperaturversuche dargestellt. Die pH–Werte der Fermentationen bei 46°C und 47°C sind nach drei Stunden am deutlichsten (im Schnitt um 0,75 Einheiten) gesunken, während bei 48, 49 und 50°C nur eine Abnahme von 0,36; 0,56; und 0,52 Einheiten erfolgt ist. Nach 20 Stunden sind die pH–Werte aller Fermentationen auf ein Niveau von 3,1–3,3 gefallen. Eine weitere Absenkung der pH–Werte in den letzten 20 Stunden, ist nur noch um durchschnittlich 0,3 Einheiten auf maximal 2,91 bei 49°C möglich. Wird der Kurvenverlauf in Abbildung 5/1 betrachtet, wird deutlich, dass bei den Temperaturen 48, 49 und 50°C die pH–Abnahmen bis zur 20. Stunde annähernd linear verlaufen. Bei 46°C und 47°C ist in den ersten drei Stunden eine etwas stärkere Abnahme zu beobachten. Zwischen der dritten und der zwanzigsten Stunde nähern auch diese Verläufe sich einer linearen Abnahme an. Nach Ablauf von 43 Stunden sind alle pH–Werte bei 2,9–3,0.

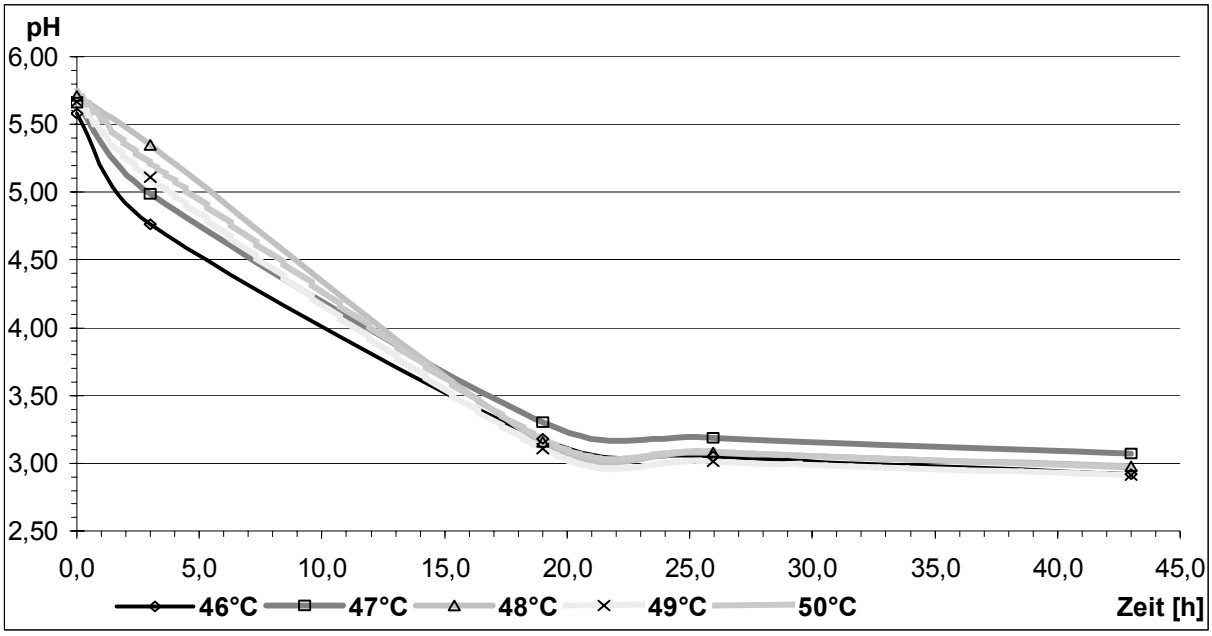



Abb. 5/1: pH–Verläufe der Fermentationen mit Temperaturen von 46, 47, 48, 49 und 50°C

Das Hauptkriterium lag auf einer größtmöglichen Produktion von DL–Lactat. In den Abbildungen 5/2 sind die Verläufe der Lactatbildung bei den Versuchstemperaturen von 46, 47, 48, 49 und 50°C dargestellt.

Die Verläufe der DL–Lactatbildung korrelieren dabei mit denen der pH-Abnahmen in Abbildung 5/1. Bei den Fermentationen mit 46°C liegt die größte Produktbildungsrate innerhalb der ersten drei Stunden. Hier werden schon Werte von 9 g/l DL-Lactat erzielt. Die Produktbildungsrate nähert sich von der dritten Stunde bis zur 20. Stunde denen der anderen Temperaturen an. Nach 25 Stunden ist bei allen Fermentationstemperaturen eine Mindestmenge von 15 g/l an DL-Lactat gebildet worden. Am Ende der Fermentationen liegen alle Werte in einem Bereich von 19,0–20,0 g/l DL–Lactat. Bei 46°C werden mit 21,5 g/l die höchsten Werte erreicht.

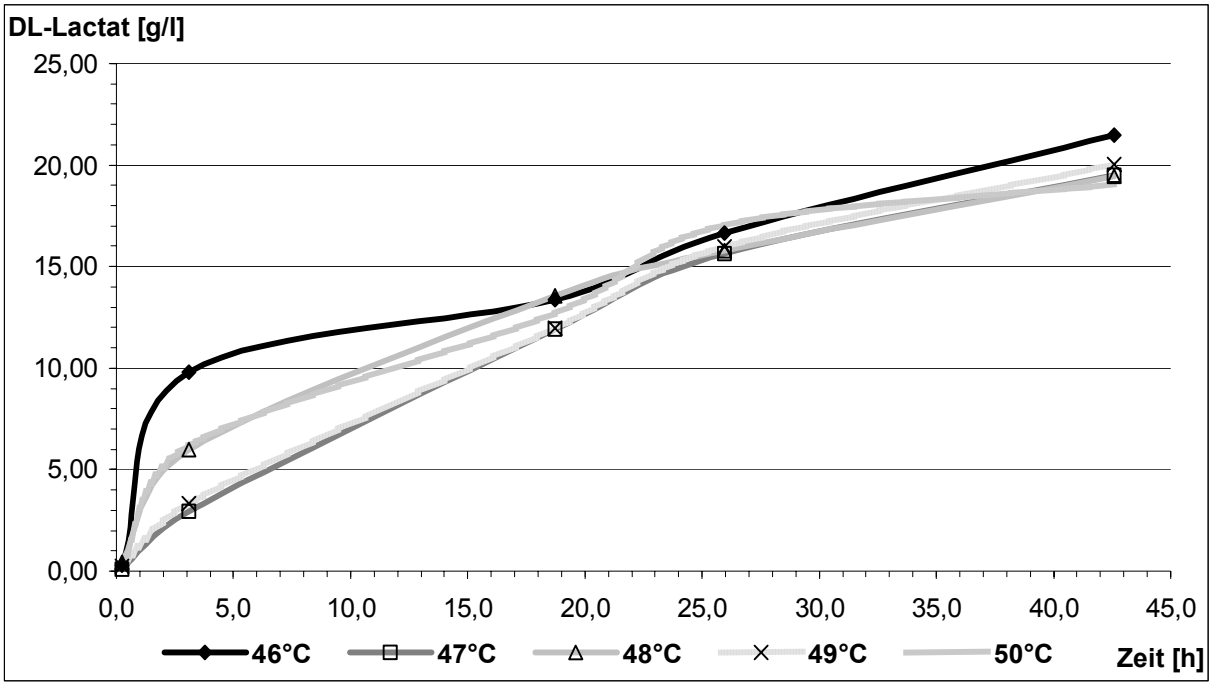



Abb. 5/2: Verlauf von DL–Lactat bei Fermentationen mit Temperaturen von 46, 47, 48, 49 und 50°C

Versuche bei 43°C und 53°C

Die wichtigsten Ergebnisse der zwei Fermentationen bei 43°C und 53°C sind in der Abbildung 5/3 dargestellt. Die gebildete Menge an DL–Lactat ist, im Vergleich zu den Versuchen mit 46°C-50°C, deutlich geringer und beträgt 14,3 g/l. Bei 53°C wird nur noch eine DL–Lactatmenge von 2,2 g/l gemessen.

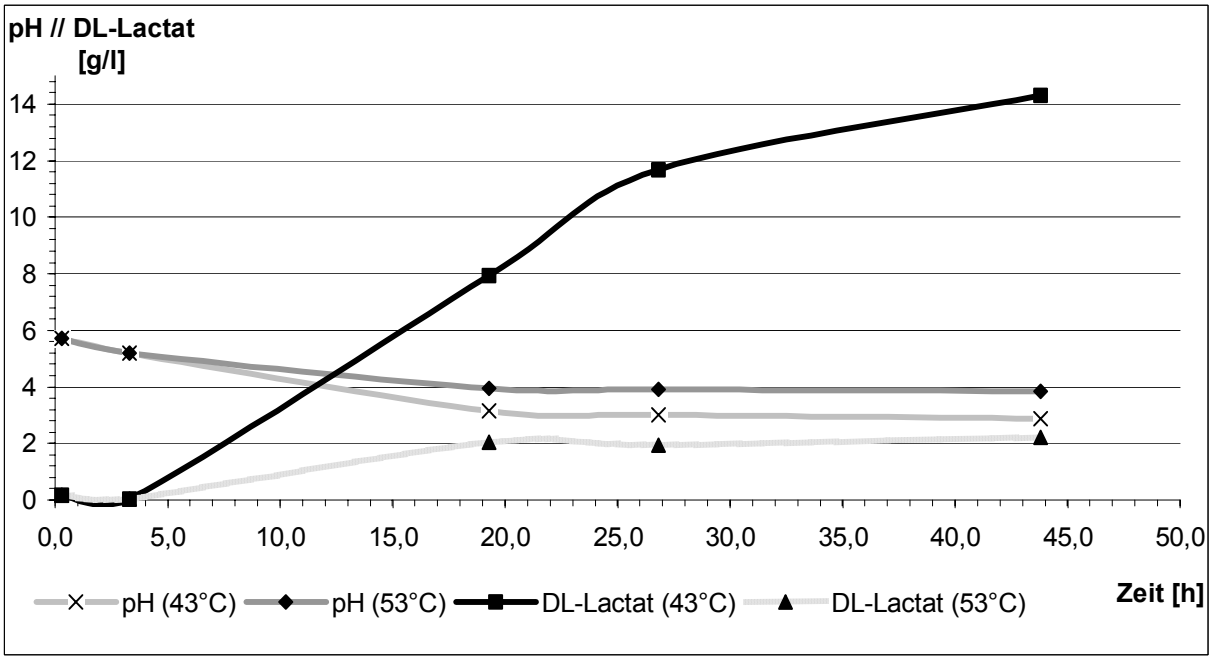



Abb. 5/3: Verlauf von pH und DL–Lactat bei Fermentationen mit 43°C und 53°C

Parameter Substratkonzentration

Es wurden Versuche mit Substratkonzentrationen von 3, 6, 10 und 12 GG % durchgeführt.

Aus Abbildung 5/4 ist ersichtlich, dass die anfänglichen pH-Werte mit zunehmender Verdünnung steigen. Es zeigt sich, dass bei einem Extraktgehalt von 6 GG % die größte absolute Abnahme erfolgt. Nach Ablauf der Fermentationen sind alle pH–Werte auf unter 3,0 abgesunken. Nur bei den Fermentationen mit 3 GG % wird keine ausreichende pH–Abnahme erzielt. Hier beträgt der pH nach 41 Stunden 3,63.

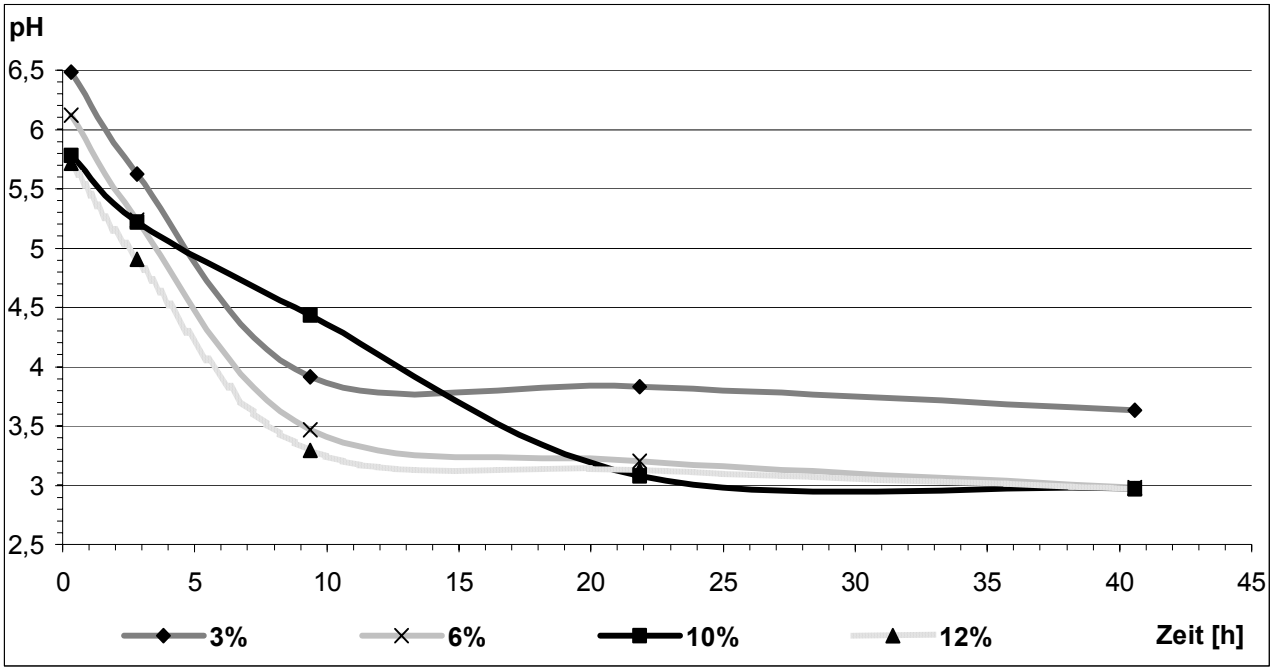



Abb. 5/4: pH–Verläufe der Fermentationen von 3, 6, 10 und 12 GG % Vorderwürze

Werden die DL–Lactatgehalte miteinander verglichen (Abbildung 5/5), so stellen sich die höchsten Gehalte bei einer Substratkonzentration von 10 GG % ein. Es werden Werte von knapp über 20 g/l erreicht. Werden die Extraktgehalte erhöht oder erniedrigt, so gehen die erzielten Endwerte entsprechend zurück. Dies geschieht um so stärker, je höher die Vorderwürze verdünnt wird. Bei 12 GG % werden noch Werte von etwa 15 g/l erreicht, während bei 6 GG % im Mittel noch 8,8 g/l gebildet werden. In den Fermentationen mit 3 GG % kommt die DL–Lactatbildung fast zum Erliegen, was sich auch in der mangelnden pH–Abnahme wiederspiegelt. Die erreichten Mengen liegen bei maximal 1,5 g/l.

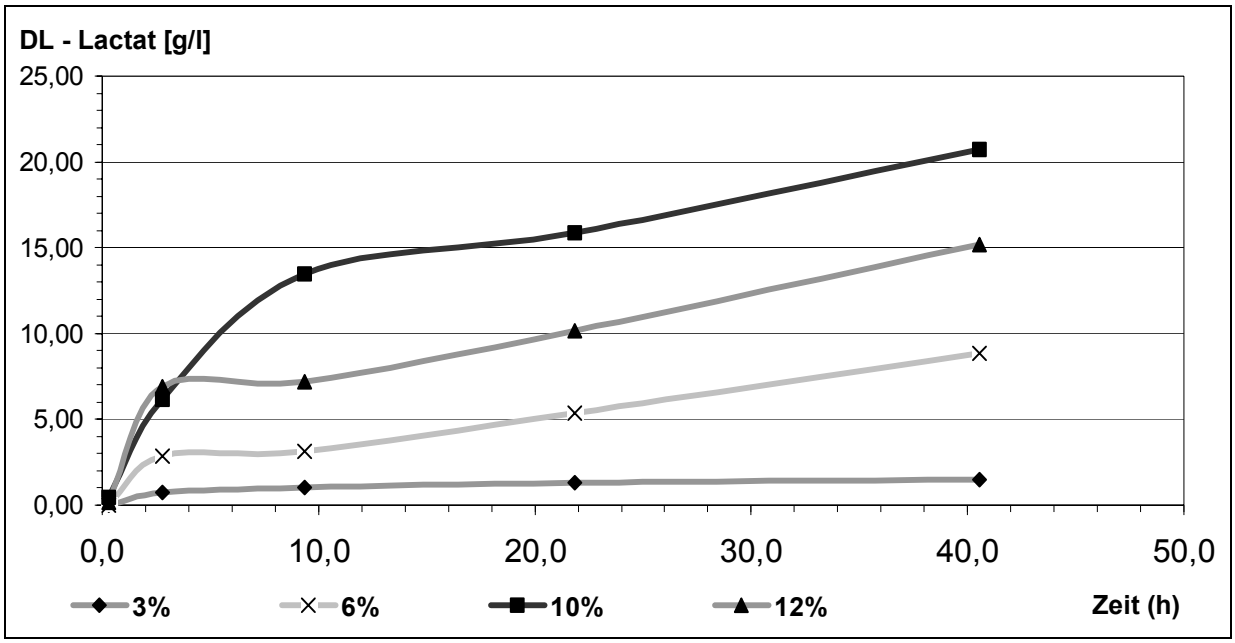



Abb. 5/5: Bildung von DL–Lactat bei den Fermentationen mit Vorderwürzen von 3, 6, 10 und 12 GG % Extrakt

Parameter Anstellzellzahl

Für den Verlauf einer Fermentation ist sowohl die Menge als auch die Aktivität der angeimpften Zellen von entscheidender Bedeutung. Sie haben besonderen Einfluss auf die Startphase, auf die zeitliche Ausdehnung der einzelnen Vermehrungsphasen, die Dauer bis zur Einstellung optimaler Milieubedingungen, auf das Einsetzen von Stoffumwandlungs- und Stoffabbauprozessen sowie auf die Menge der gebildeten Stoffwechselprodukte.

Es wurden Versuche mit Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 $*10^6$ Zellen/ml durchgeführt. Zusätzlich erfolgten Versuche in Randbereichen mit 2, 60 und 100 $*10^6$ Zellen/ml.

Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 $*10^6$ Zellen/ml

Aus der Abbildung 5/6 ist zu sehen, dass bei Anstellzellzahlen von 30 und 40 $*10^6$ Zellen/ml die schnellste pH–Abnahme erfolgt. In den ersten vier Stunden kommt es zu einer Abnahme von über einer pH–Einheit, während es bei den Fermentationen mit Anstellzellzahlen von 10 und 20 $*10^6$ Zellen/ml zu fast überhaupt keiner Veränderung kommt, bzw. bei 10 $*10^6$ sogar zu einem leichten Anstieg. Nach einer Zeit von 21 Stunden wird bei den Fermentationen mit einer Anstellzellzahl von 30 $*10^6$ Zellen/ml der niedrigste pH (3,08) gemessen, während sich die pH–Werte der anderen Fermentationen in einem Bereich von 3,4 befinden. Bei allen Anstellzellzahlen sinken die pH–Werte bis zum Ende der Fermentationen auf ein Niveau von 2,9–3,1.

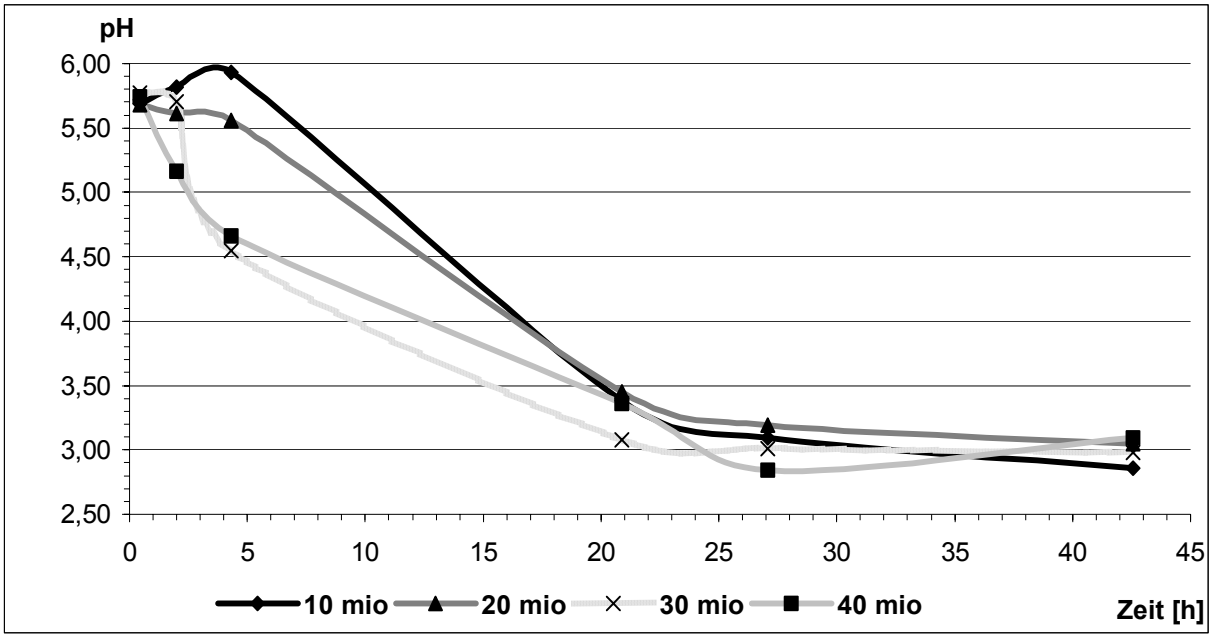



Abb. 5/6: pH–Verläufe der Fermentationen mit Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 *$10^6$ Zellen/ml

Bei der Bildung von DL–Lactat werden die höchsten Werte mit Anstellzellzahlen von 20–40 *$10^6$ Zellen/ml erreicht (Abbildung 5/7), wobei die Produktbildungsrate bei den Fermentationen mit 30 *$10^6$ Zellen/ml, von der vierten Stunde bis zur 21. Stunde am höchsten ist und anschließend gegen Null tendiert. Die Fermentationen mit Anstellzellzahlen von 10 und 20 *$10^6$ Zellen/ml, haben die höchste Produktbildungsrate im Bereich von der 21. Stunde bis zur 27. Stunde, während für die Fermentationen mit 40 *$10^6$ Zellen/ml erst ab der 27 Stunde die Phase der höchsten Produktbildungsrate einsetzt. Die Endwerte der Fermentationen mit Anstellzellzahlen von 20–30 *$10^6$ Zellen/ml liegen alle über 20 g/l und bewegen sich auf einem relativ einheitlichen Niveau von 20,5–22,5 g/l DL–Lactat.

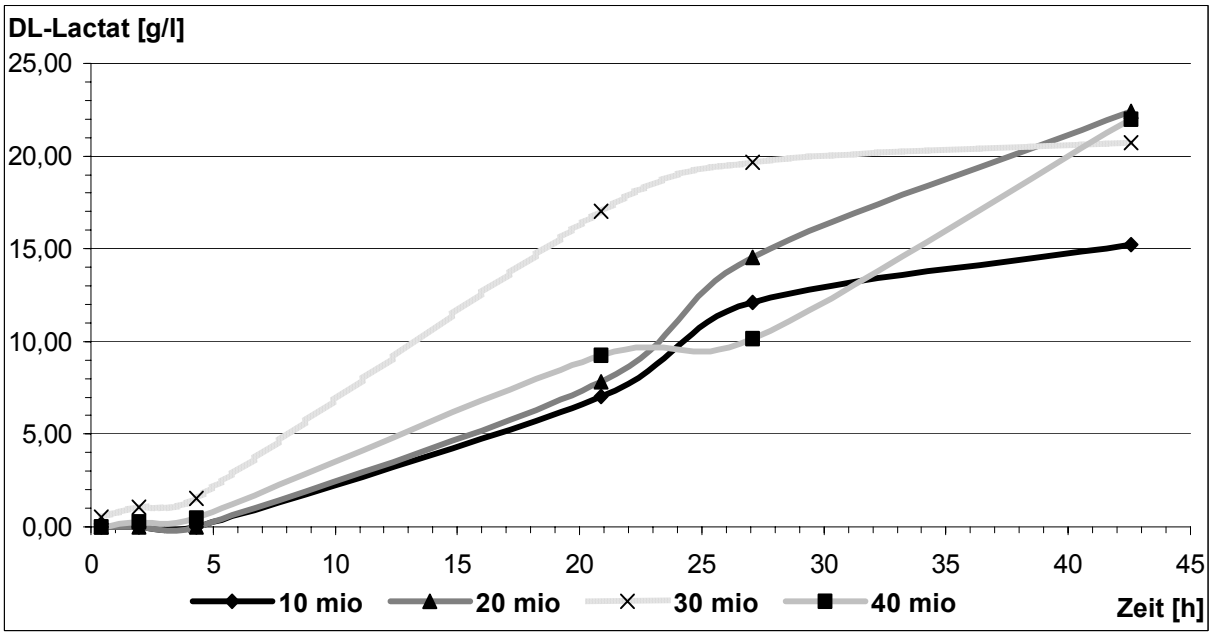



Abb. 5/7: DL–Lactatbildung bei Anstellzellzahlen von 10, 20, 30 und 40 *$10^6$ Zellen/ml

Anstellzellzahlen von 2, 60 und 100 *$10^6$ Zellen/ml

Mit diesen Fermentationen sollte das Verhalten bei extremen Bedingungen untersucht werden. Es zeigt sich, dass es sowohl bei einer sehr geringen Anstellzellzahl von 2 *$10^6$ Zellen/ml als auch bei sehr hohen Anstellzellzahlen von 60 und 100 *$10^6$ Zellen/ml möglich ist, eine Fermentation mit ausreichender pH–Senkung zu erzielen. Werte von über 20 g/l DL–Lactat, innerhalb von 40h, werden aber nur von der Fermentation mit 60 *$10^6$ Zellen/ml Anstellzellzahl erreicht. In der Abbildung 5/8 sind die entsprechenden Verläufe dargestellt.

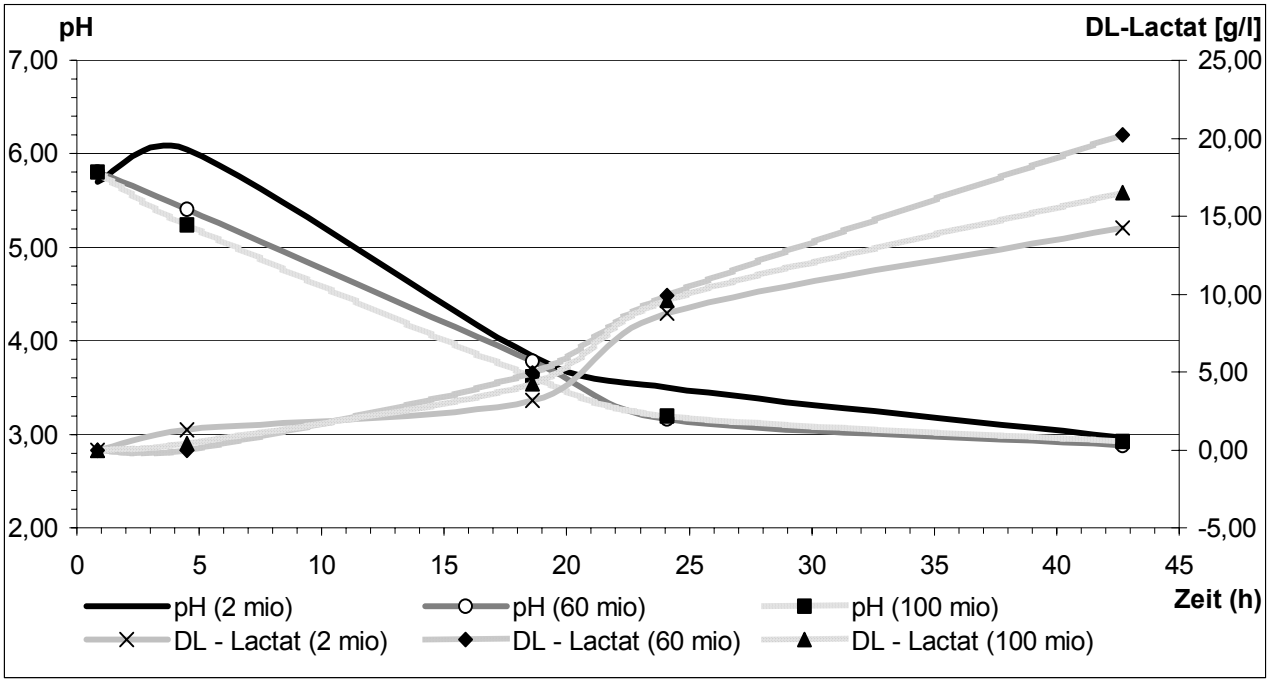



Abb. 5/8: pH–Werte und Lactatbildung bei Anstellzellzahlen von 2, 60 und 100 *$10^6$ Zellen/ml

Parameter Begasung

Bei dieser Versuchsreihe wurden einerseits Fermentationen mit unterschiedlichen Sauerstoff-sättigungskonzentrationen zu Beginn der Fermentation untersucht und andererseits Versuche mit kontinuierlicher Begasung durchgeführt.

Versuche mit einer Sauerstoffsättigung von 0, 25, 50, 75 und 100 % zu Beginn der Fermentationen

Bei diesen Versuchen sollte getestet werden, wie sich vor Beginn der Fermentationen eingestellte Sauerstoffgehalte sowohl auf den Fermentationsverlauf, als auch auf die Endwerte der Inhaltsstoffe auswirken. Die Einstellung der Sauerstoffsättigungskonzentration geschah folgendermaßen: Zuerst wurde die $pO_2$–Sauerstoffelektrode auf 100 % geeicht. Anschließend konnte durch das Einblasen von Stickstoff in das mit Sauerstoff gesättigte Substrat der gewünschte Sauerstoffgehalt eingestellt werden. Anschließend folgte das Animpfen und damit der Start der Fermentation. Für die Probenentnahme war ein geringer Überdruck im Bioreaktor nötig. Dieser wurde durch das Einblasen von Stickstoff erzeugt.

Hierdurch kam es bei keiner Fermentation zu einer Beeinflussung der Sauerstoffkonzentration, da bei der ersten Probenentnahme die Sauerstoffgehalte bereits durchweg auf 0% abgesunken waren. Die Laktobazillen haben selbst bei einer zu 100 % sauerstoffgesättigten Fermentation innerhalb von drei Stunden ein anaerobes Milieu geschaffen und sämtlichen Sauerstoff aufgezehrt.

Es werden nach 25 Stunden pH–Werte in einem Bereich von 3,2–3,3 gemessen und bei den Fermentationen mit 0% Sauerstoff lediglich pH–Werte um 3,8. Nach Ablauf von 42 Stunden sind alle pH–Werte auf ein Niveau von 3,0 abgesunken (siehe Abbildung 5/9).

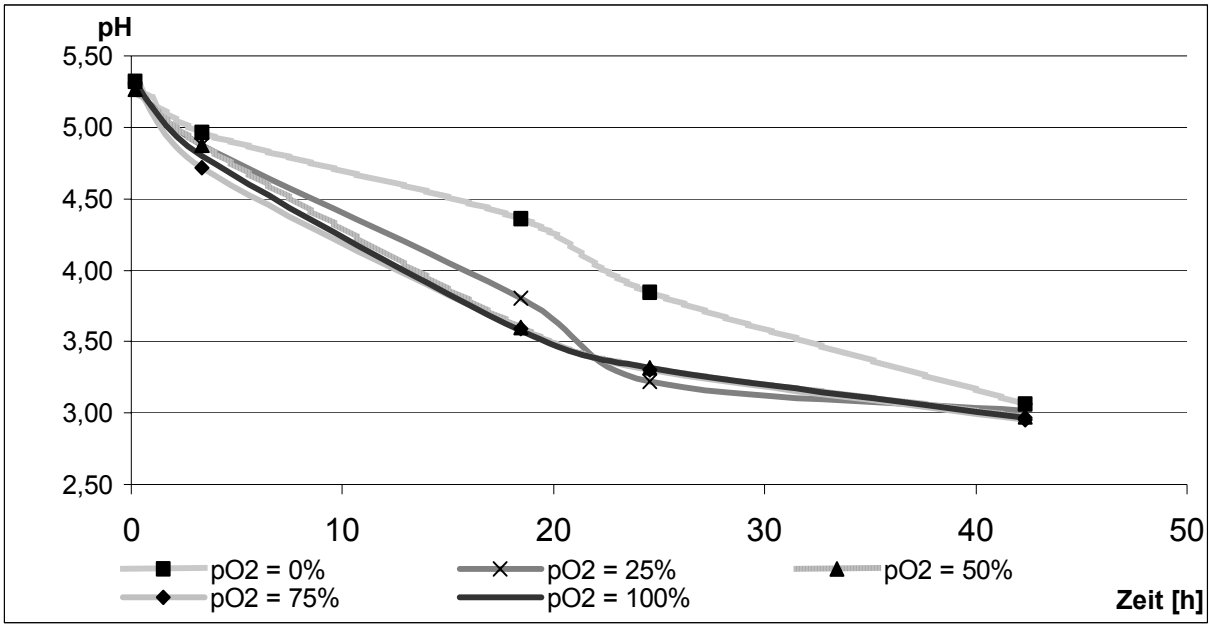



Abb. 5/9: pH–Verläufe der Fermentationen mit anfänglicher Sauerstoffsättigung von 0, 25, 50, 75 und 100 %

DL–Lactatwerte über 20 g/l lassen sich im Mittel nur bei den Fermentationen mit einer anfänglichen Sauerstoffsättigung von 100 % erzielen. Die gebildete Menge DL-Lactat sinkt mit abnehmenden Sauerstoffgehalten. Auffällig sind die erhöhten Produktbildungsraten in den letzten 20 Stunden der Fermentationen. Lediglich bei den Fermentationen mit 25 % Sauerstoffsättigung kommt es zu einem etwas anderen Verlauf. Die höchste Produktbildungsrate liegt hier zwischen der 18. und 25. Stunde.

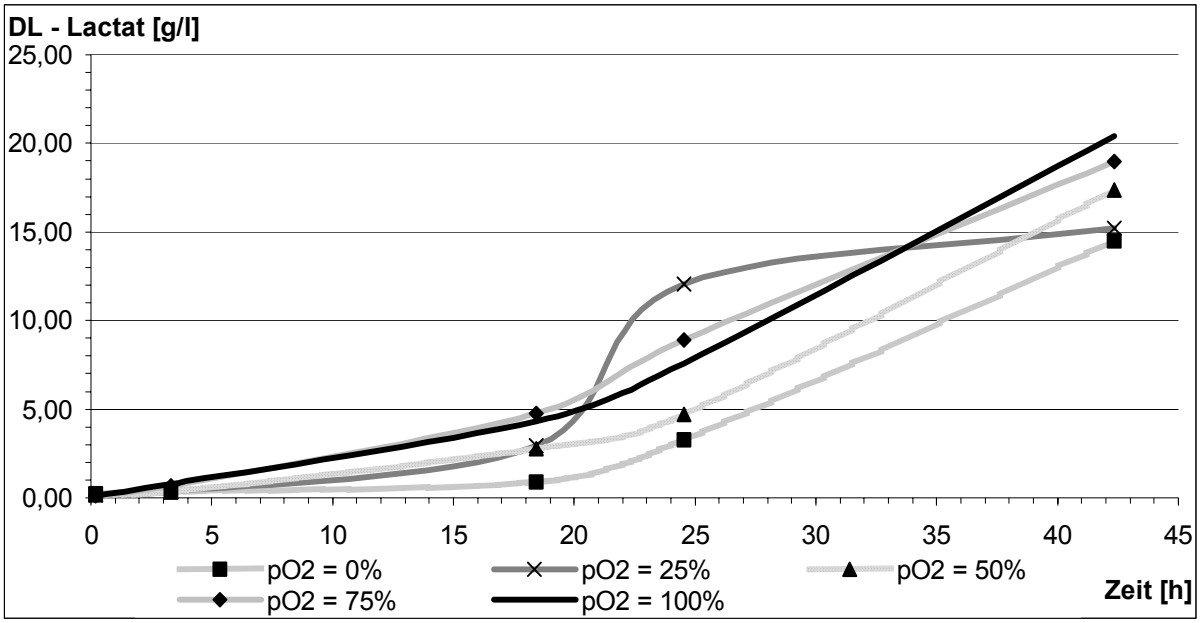



Abb. 5/10: DL–Lactatbildung bei anfänglicher Sauerstoffsättigung von 0, 25, 50, 75 und 100 %

Versuche mit kontinuierlicher Begasung

Zusätzlich wurden Versuche mit kontinuierlicher Luft-, Stickstoff- und $CO_2$-Begasung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Laktobazillen am besten mit einer kontinuierlichen $CO_2$-Begasung fermentierten. Am auffälligsten war die sehr geringe Produktbildung bei dauernder Stickstoffbegasung. Die permanent $CO_2$-begasten Fermentationen erreichten an die 20 g/l DL-Lactat, wobei die $O_2$-begasten (12 g/l) und die N2-begasten (2 g/L) deutlich zurück blieben (Vergleiche Abbildung 5/11). Es wurde deutlich, dass der Stickstoff einen negativen Einfluss auf die Fermentationsleistung der Laktobazillen hat. Dies ist auch eine Erklärung für die Ergebnisse der $O_2$-Sättigungsversuche: Die niedrigen $O_2$-Anfangsgehalte wurden alle mit $N_2$ eingestellt, so dass es zur einer schleppenden Fermentation kam.

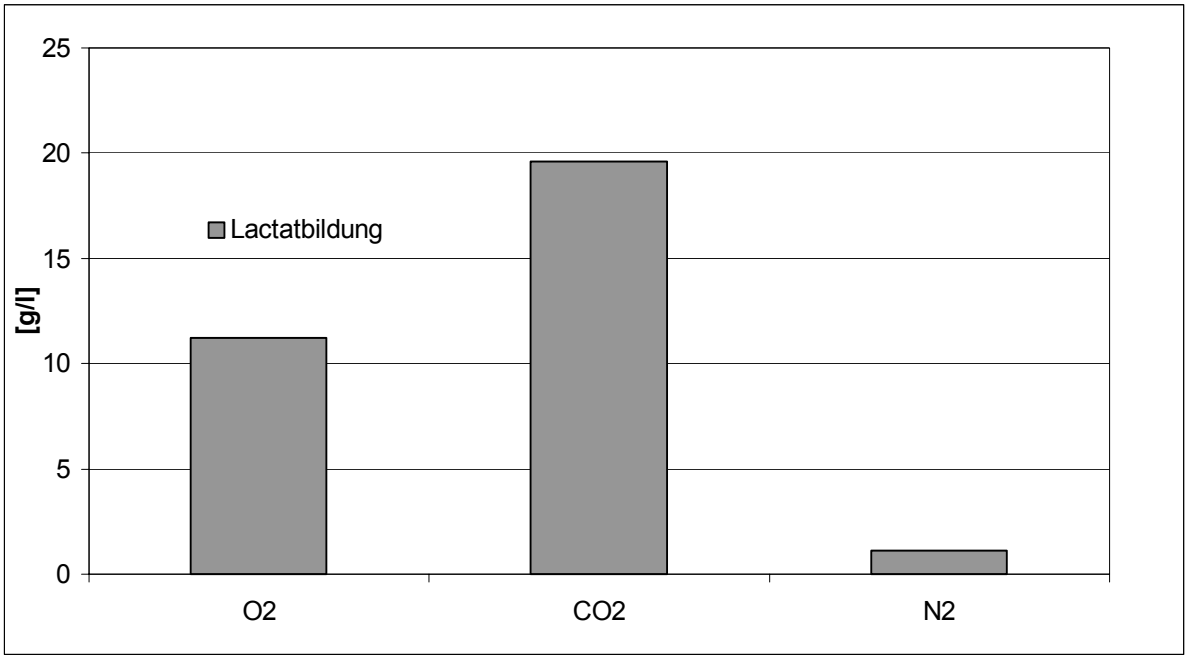



Abb. 5/11: Lactatbildung bei verschiedener kontinuierlicher Begasung

Sensorische Betrachtung

Mit den oben ermittelten Fermentationsparametern wurde eine Fermentationsbrühe hergestellt und wie in Kapitel 9.8 beschrieben ausgemischt. Die Basis hatte einen reinen, leicht würzeartigen Geruch. Der Geschmack war sauer, rein und erinnert geringfügig an Zitronensaft. Durch die Ausmischungen entstanden leichte, spritzige und erfrischende Getränke. Es wurden generell die kontinuierlich $CO_2$-begasten Fermentationsbrühen bevorzugt. Hier werden, wie bei einer $CO_2$-Wäsche bei der Bierreifung, noch unedle, flüchtige Aromen ausgetrieben. Die Stickstoff beaufschlagten Fermentationen resultierten aufgrund der schleppenden Fermentation in wenig akzeptable Produkte. Die Sauerstoff begasten wiesen eine dumpfe Note auf, die auf Oxidationsreaktionen verschiedener Würzeinhaltsstoffe hinweisen.

## 5.2 Scale-up Versuche zur Umsetzung der Fermentation in großtechnischem Maßstab

Die in 5.1 ermittelten Fermentationsparameter sind nur sinnvoll, wenn sie eine großtechnische Anwendung ermöglichen. Nach den Untersuchungen im Laborfermenter (2 l) wurden in einem 100 l Bioreaktor (Vgl. 9.6.2) hierzu die nötigen Scale-Up Versuche gemacht. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zeigen alle das selbe Bild. Mit den festgelegten Parametern lässt sich reproduzierbar der in Abbildung 5/12 dargestellte Fermentationsablauf erzielen.

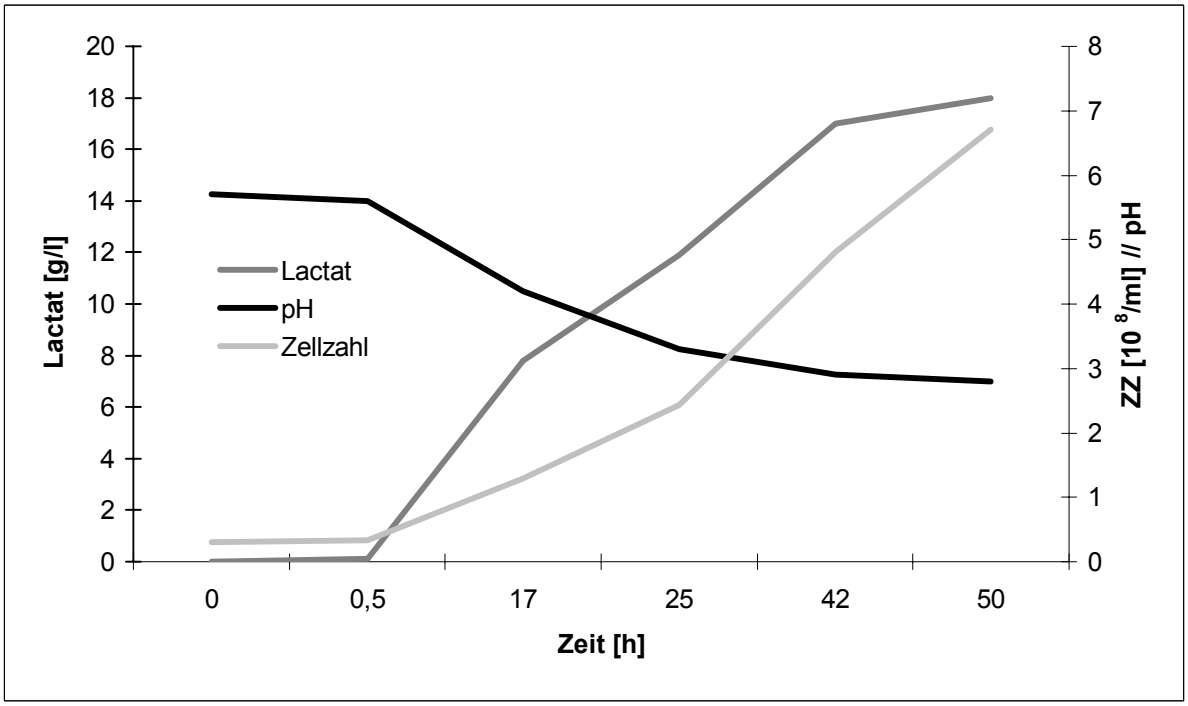



Abb. 5/12: Reproduzierbarer Fermentationsverlauf im 100 l-Maßstab

Die Fermentation wird bei einem pH-Wert = 5,7 mit einer Zellzahl von 30 $*10^6$ Zellen/ml angestellt. Während einer Fermentationsdauer von 48 h sinkt der pH-Wert auf knapp unter 3. Die Zellzahl nimmt bis etwa 700 $*10^6$ Zellen/ml zu. Bei der Fermentation werden zwischen 18-20 g/l Lactat gebildet.

Um bei den großen Maßstäben $CO_2$ zu sparen, wurden nur am Anfang der Fermentation anaerobe Verhältnisse eingestellt. Die Laktobazillen halten diese über den Fermentationsverlauf aufrecht.

Bei diesen Fermentationen wurde immer ein unangenehmer schwefliger, kohlartiger Geruch festgestellt. Die Vermutung lag nahe, dass es sich um Dimethylsulfid (DMS) handelt. DMS entsteht durch thermische Belastung aus einer aktiven Vorstufe und wird während des Würzekochens ausgetrieben. Der aktive Vorläufer entsteht wiederum aus dem im Malz vorkommenden S-Methymethionin durch hohe Temperaturen[1]. Aufgrund der kurzen Kochdauer bei der Würzeherstellung für die Fermentation ist wahrscheinlich noch genug DMS-Vorläufer vorhanden, der während der hohen Fermentationstemperaturen in DMS umgewandelt wird und das Fehlaroma verursacht.

[1] Vgl. Narziß, L. : Technologie der Würzekochung. Stuttgart 1992, S. 296.

Des Weiteren wird auch immer noch der aktive Vorläufer nachgebildet. Durch eine periodische $CO_2$-Wäsche wurde versucht das freie DMS auszutreiben. Abbildung 5/13 zeigt die Konzentrationen von freiem DMS und dem aktiven Vorläufer während der Fermentation bei periodischer $CO_2$-Wäsche.

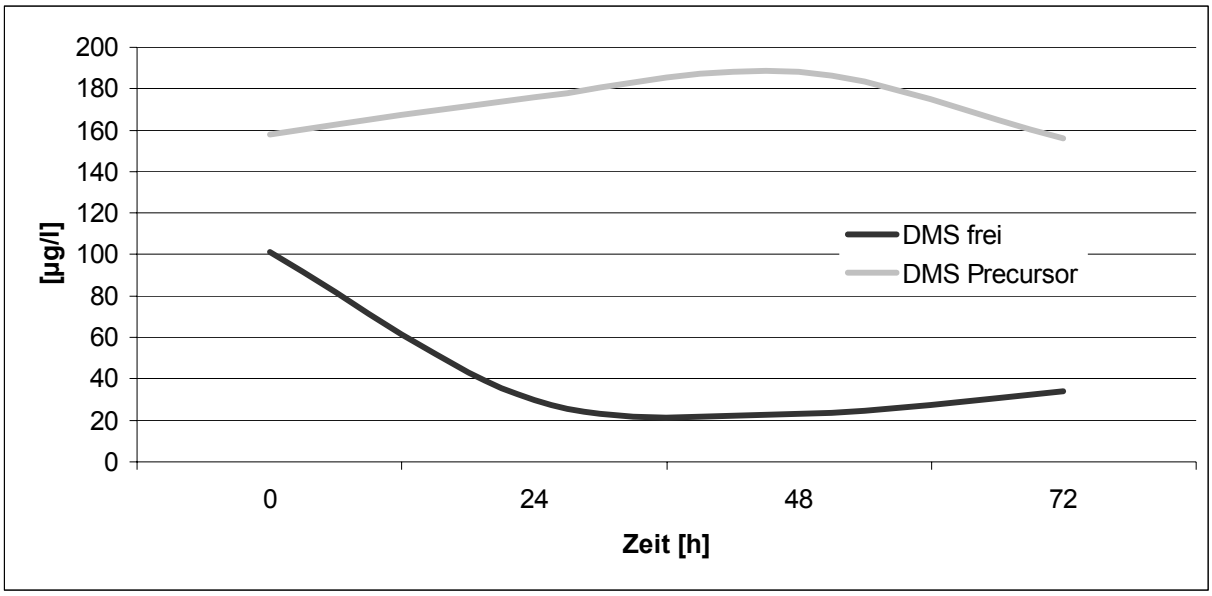



Abb. 5/13: DMS frei und DMS Precursor während der Fermentation

Durch die $CO_2$-Wäsche wird das freie DMS weit unter die Geschmacksschwelle von 50-60 ppb[1] ausgetrieben. Es wird aber auch weiterhin aktiver Vorläufer nachgebildet, der weiter zu DMS umgewandelt wird. Erst gegen Ende der Fermentation nimmt auch die Bildung des Vorläufers ab. Am Ende der Fermentation liegt der Gehalt an freiem DMS weit unter dem Geschmacksschwellenwert. Die MEBAK gibt für Ausschlagwürzen einen Richtwert für Gesamt-DMS (DMS+DMS-P) < 100ppb vor.[2] Es konnten aber bei sämtlichen Ausmischungen keine negativen sensorischen Eindrücke mehr festgestellt werden. Bei den weiteren Produktionsschritten nach der Fermentation scheint sich der DMS-Vorläufer nicht weiter in DMS umzuwandeln und hat so keinen Einfluss auf die Sensorik der Getränke.

[1] Vgl. Narziß, L. :a.a.O., S.296.
[2] Vgl. o.V.: Sudwerkkontrolle. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993, S. 20.

## 5.3 Intensivierung der Fermentation durch Puffern oder pH-statische Kulturführung

Eine erhöhte Lactatausbeute nach der Fermentation erzielt eine weitere ernährungsphysiologische Aufwertung der Getränke. Eine zusätzliche, weitere Verstoffwechslung der noch vorhandenen Kohlenhydrate bringt technologische Vorteile, wie eine Erhöhung der mikrobiologischen Stabilität mit sich. Da bei einer unregulierten Fermentation der pH-Wert der limitierende Faktor ist, stellt sich die Frage, ob durch eine pH-Regulierung eine höhere Lactatausbeute oder ein intensiverer Kohlenhydratabbau zu erreichen ist.

Grundsätzlich bieten sich zwei Möglichkeiten einer pH-Regulierung an: zum einen eine Pufferung des Systems durch Vorlage eines geeigneten Puffers, zum anderen eine pH-statische Regulierung durch Laugezugabe.

Aus einem Mol Glucose entstehen theoretisch zwei Mol Milchsäure. Bei einer Zuckerlösung mit 10 g/l (entspricht etwa einer 10 %igen Würze) müsste mit 111 mmol/l abgepuffert werden, um alle Kohlenhydrate in Milchsäure umzuwandeln. Es spielen jedoch weitere Faktoren eine Rolle, die eine einfache Berechnung unmöglich machen.

Zum einen verbrauchen die Laktobazillen einen Großteil der Kohlenhydrate für den Zellaufbau, nur etwa 45% werden zu Milchsäure. Dies ist zudem noch von den Fermentationsbedingungen abhängig (vgl. Kap. 2.2). Zum anderen besitzt Würze, bedingt durch Phosphate und Aminosäuren[1], eine eigene Pufferkapazität, die berücksichtigt werden muss. Da Milchsäure eine schwache Säure ist, muss der Lactatanteil auch bei der Pufferung berücksichtigt werden. Bei der Auswahl der Puffer müssen sensorische und lebensmittelrechtliche Ansprüche beachtet werden. Möglicherweise übersteigt die benötigte Puffermenge die Salztoleranz des verwendeten Stammes. Außerdem sollte bei optimalem Wachstums–pH gepuffert werden, um einen möglichst hohen Stoffumsatz zu gewährleisten. Aus mikrobiologischer und sensorischer Sicht sollte der pH-Wert am Ende der Fermentation zwischen 3,0 und 3,5 liegen. Es muss also nach der Pufferung noch ein weiterer pH-Abfall stattfinden. Um diese Aspekte zu berücksichtigen, sind neben den eigentlichen Fermentationen noch weitere Versuche nötig, die hier zuerst aufgeführt sind. Es muss der optimale Wachstums-pH, die maximal tolerierbaren Salzkonzentrationen des Stammes für die jeweiligen Puffer und wenn möglich die Pufferkapazität der Würze ermittelt werden. Hiermit könnte eine Vorausberechnung der Puffermengen möglich werden, was durch entsprechende Fermentationen überprüft werden soll.

[1] Vgl.:Narziß, L.: Abriss der Bierbrauerei. 6.Aufl. Stuttgart 1995, S. 236.

Bestimmung des optimalen Wachstums-pH

Eine Pufferung ist in dem Bereich am sinnvollsten, in dem die höchste Stoffwechselaktivität zu erwarten ist, denn hier werden die höchsten Stoffumsätze erreicht. Der gesuchte pH-Bereich liegt deshalb beim optimalen Wachstums-pH. Über eine Verdünnungsreihe wurde eine Wachstumskurve aufgestellt, in der der optimale Wachstums-pH abzulesen ist (Abb.: 5/14).

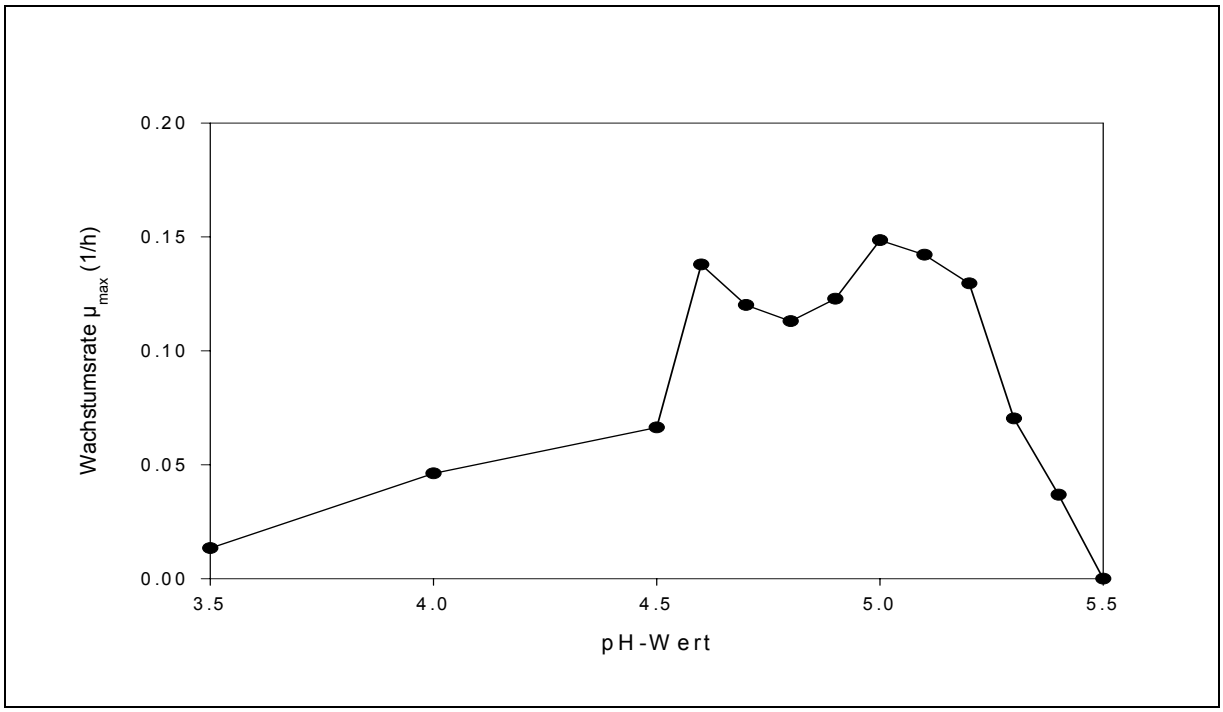



Abb. 5/14: Wachstumsrate in Abhängigkeit des pH-Wertes

In der Abbildung 5/14 ist die Wachstumsrate von *Lb. amylolyticus* SAG 07 bei verschiedenen pH-Werten abgebildet. Es lassen sich zwei Maxima erkennen. Zum einen ist bei pH 4,6 eine Wachstumsrate von 0,14 zu sehen, zum anderen ist bei pH 5,0 eine Wachstumsrate von 0,16 zu beobachten. Der Kurvenverlauf im Bereich von pH 5,0 ist aber nicht so steil wie im Bereich kleiner pH 4,6. Die Wachstumsraten verringern sich hier nicht so rapide. Generell sind im Bereich zwischen pH 4,6 und pH 5,2 die höchsten Wachstumsraten zu verzeichnen.

Überprüfung möglicher Puffersubstanzen auf ihre Verwertbarkeit und ihre maximal tolerierbare Salzkonzentration durch *Lb. amylolyticus SAG 07*

Aufgrund des oben ermittelten, optimalen Wachstums-pH müssen in Frage kommende Puffer auf ihre Eignung überprüft werden.

Die Pufferungssysteme sollen im Bereich von pH 5,0 wirksam sein, das heißt, die Säuren müssen in diesem Bereich ihren $pk_s$-Wert haben. Aus lebensmittelrechtlicher Sicht kommen hier ein Acetat-Puffer($pK_s$ 4,76) und ein Citrat-Puffer($pK_s$ 4,74)[1] in Frage. Zunächst stellt sich die Frage, ob diese Stoffe von dem *Lactobacillus*-Stamm verstoffwechselt werden und somit nicht mehr zur Pufferung zur Verfügung stehen. Außerdem muß geklärt werden, welche maximale Konzentration an Puffern vorgelegt werden kann ohne eine Wachstum der Mikroorganismen zu verhindern. Da dies auch für das entstehende Lactat zu klären ist, wurde es mit in die Versuchsreihe aufgenommen. Des Weiteren wurde auch Carbonat überprüft, da es bei der pH-statischen Fermentation zum Einsatz kam.
Hier wurde das Stoffwechselverhalten qualitativ, ob Wachstum zu beobachten war oder nicht, beurteilt.

Tabelle 5/1: Verstoffwechselung der Puffersubstanzen

| Ansatz | MRS ohne Glucose | MRS + 20 g/l Glucose | MRS + 100 mmol/l Acetat | MRS + 100 mmol/l Citrat | MRS + 100 mmol/l Acetat + 20 g/l Glucose | MRS + 100 mmol/l Citrat + 20 g/l Glucose |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Wachstum | negativ | stark positiv | negativ | negativ | stark positiv | schwach positiv |

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass bei alleiniger Zugabe der Puffersubstanzen als C-Quelle kein Wachstum stattfindet. In Kombination mit Glucose als C-Quelle ist bei Acetat ein deutliches Wachstum zu verzeichnen, bei Citrat nur ein sehr schwaches Wachstum. Bei Abwesenheit einer C-Quelle vermehren sich die Zellen nicht, bei Zugabe von Glucose zum Medium ist eine starke Vermehrung zu beobachten.
Tabelle 5/2 zeigt das Wachstumsverhalten des *Lactobacillus*-Stammes bei verschiedenen Konzentrationen des Salzes der verschiedenen Puffersubstanzen.

Tabelle 5/2: Wachstumsverhalten und Salzkonzentration

| Konzentration (mmol/l) | 802 | 703 | 666 | 555 | 444 | 333 | 296 | 198 | 88 | 59 | 39 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Acetat | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Citrat | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Lactat | - | - | - | - | - | +- | +- | + | + | + | + |
| Carbonat | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |

**- = kein Wachstum / + = Wachstum / +- = schwaches Wachstum**

[1] Vgl. Belitz, H.-D. und W. Grosch: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin 1992, S.405.

Bei einer Salzkonzentration ab 333 mol/l ist bei allen Substanzen kein Wachstum mehr zu verzeichnen. Unter dieser Grenze ist in allen Ansätzen eine deutliche Vermehrung zu erkennen. Bei Lactat wird die Trübung bereits ab 296 mmol/l schwächer.

Bestimmung des würzeeigenen Puffervermögens:

Die Fähigkeit der Würze zu puffern wurde durch Titration mit HCl ermittelt. Die Pufferkapazität der Würze ist auf verschiedene Inhaltsstoffe zurückzuführen. Die Würze wird daher nicht genau bei einem bestimmten pH-Wert puffern. Es ist hier deshalb von Interesse, wieviel Säure bis pH 3 verbraucht wird.

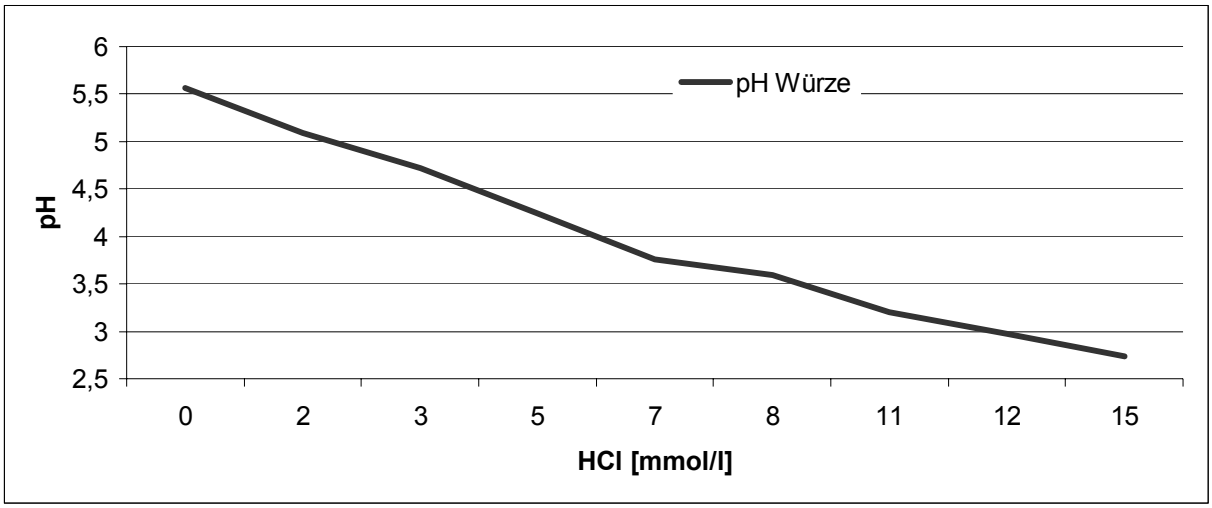



Abb. 5/15: HCl-Verbrauch der Würzetitration (Würze 1)

In Abbildung 5/15 ist die Menge HCl, die zur pH-Senkung der Würze unter pH 3 nötig ist, dargestellt. Aus der Kurve ist ersichtlich, dass nicht bei einem bestimmten pH-Wert gepuffert wird, sondern sich die Abpufferung der Säure über den gesamten pH-Bereich hinzieht. Um den pH-Wert der Würze unter pH 3 zu senken, sind etwas weniger als 12 mmol 1 N HCl verbraucht worden.

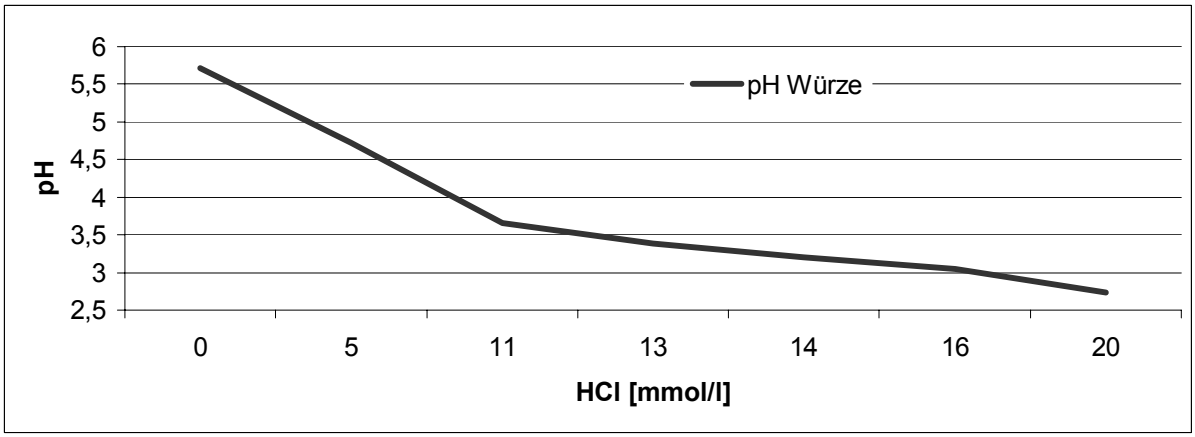



Abb. 5/16: HCl-Verbrauch der Würzetitration (Würze 2)

Dieser Versuch wurde für eine identisch hergestellte Würze wiederholt. Abbildung 5/16 zeigt den Verbrauch an HCL für diese Würze. Die pH-Wert Absenkung unter pH 3 erfolgte nach Zugabe von 17 mmol/l 1N HCL.

5.3.1 Intensivierung der Fermentation durch Pufferung

Als Puffersubstanzen kamen wie oben erwähnt Acetat und Citrat zum Einsatz. Aus den Vorversuchen geht hervor, dass Wachstum bei einer Salzkonzentration von jeweils 330 mmol/l noch möglich ist. Die Fermentation wurde deshalb mit 300 mmol/l Puffer auf pH 4,8 (optimaler Wachstumsbereich s.o.) eingestellt.

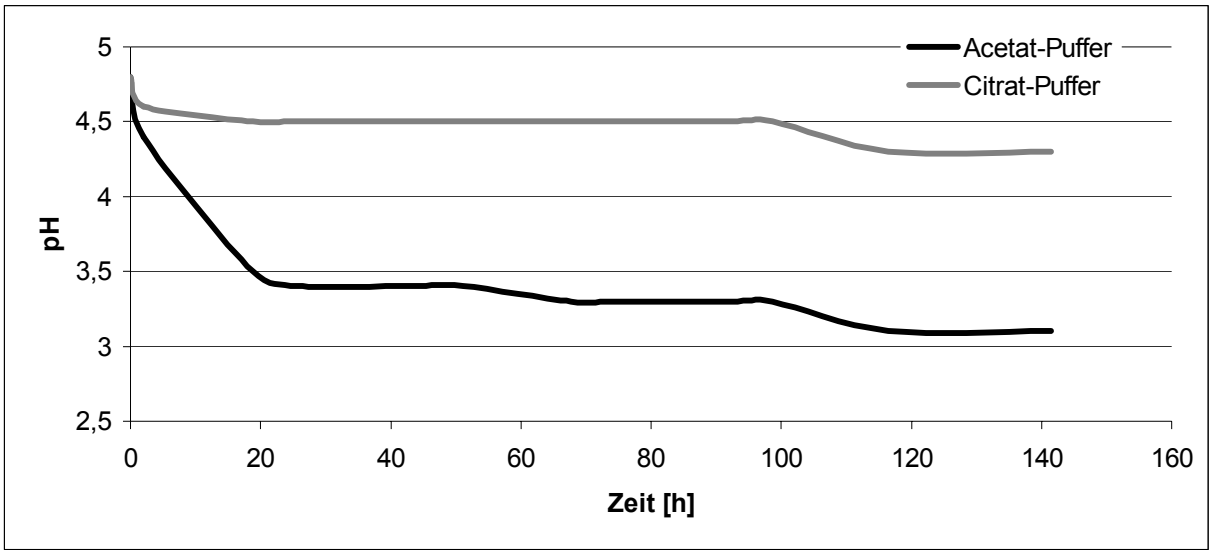



Abb. 5/17: pH-Verlauf der gepufferten Fermentationen

Beim Einsatz des Acetatpuffers findet in den ersten 20 Stunden der Fermentation ein deutlicher pH-Abfall statt. Der pH fällt von den eingestellten pH 4,8 bis etwa pH 3,4 ab. Bis zum Ende der Fermentation nach 140 Stunden sinkt der pH-Wert noch um weitere 0,4 Einheiten bis auf 3,1 ab. Die Fermentation unter Verwendung des Citrat-Puffers zeigt einen pH-Abfall von pH 4,8 auf pH 4,5 nach etwa 20 Stunden. Am Ende ist ein weiteres Absinken bis auf pH 4,3 zu beobachten. Im Vergleich hierzu ist bei der Fermentation mit Acetat der wesentlich größere pH-Abfall zu verzeichnen. Er liegt um 1,2 Einheiten höher als bei der Fermentation mit Verwendung des Citrat-Puffers. (Vgl. Abbildung 5/17).
Diese Ergebnisse spiegeln sich auch bei der Lactatbildung während der Fermentationen wieder. Diese sind in Abbildung 5/18 dargestellt.

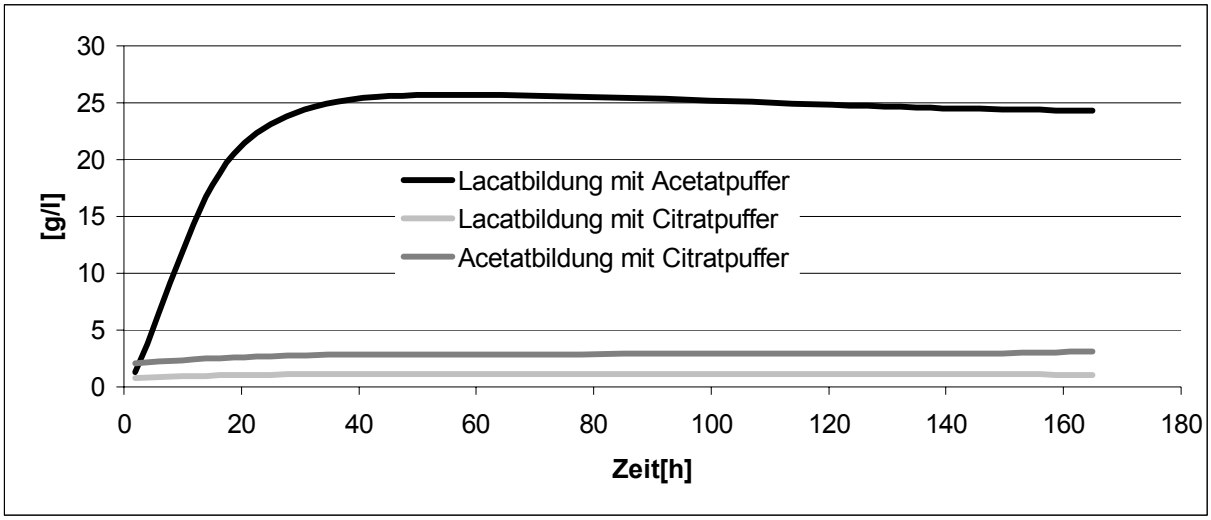



Abb. 5/18: Lactat- und Acetatbildung bei den gepufferten Fermentationen

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass eine Lactatbildung hauptsächlich bei der Pufferung mit Acetat eingetreten ist. Es wurde hier nach 43 Stunden eine Lactatkonzentration von 25,5 g/l erzielt. Gegen Ende der Fermentation fällt der Wert wieder leicht auf 24,3 g/l ab. Bei der Fermentation unter Verwendung des Citratpuffers ist nur eine geringe Lactatproduktion zu beobachten. Nach 60 Stunden sind 1,1 g/l Lactat entstanden. Dieser Wert bleibt bis Ende der Fermentation nach 165 Stunden annähernd konstant. Dem gegenüber ist bei Verwendung des Citratpuffers eine Bildung von Acetat zu erkennen. Nach ca. 50 Stunden beträgt die Konzentration von Acetat 2,9 g/l und erhöht sich bis zum Ende auf 3,1 g/l. Im Vergleich der beiden verschieden gepufferten Fermentationen ist nur bei der Acetat-gepufferten Fermentation eine deutliche Lactatproduktion zu beobachten. Bei der Citrat-gepufferten Fermentation ist hingegen kaum Lacatbildung zu verzeichnen, dafür jedoch eine leichte Acetatbildung.

Bei den gepufferten Fermentationen ist, außer der Lacatbildung, die Kohlenhydratverwertung von Interesse. Sowohl die Abnahme der Gesamtkohlenhydrate als auch die Abnahme der niederen Würze-kohlenhydrate wie Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose und Maltotriose wurden beobachtet (Analytik siehe Kap. 10).

Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in Abbildung 5/19 dargestellt.

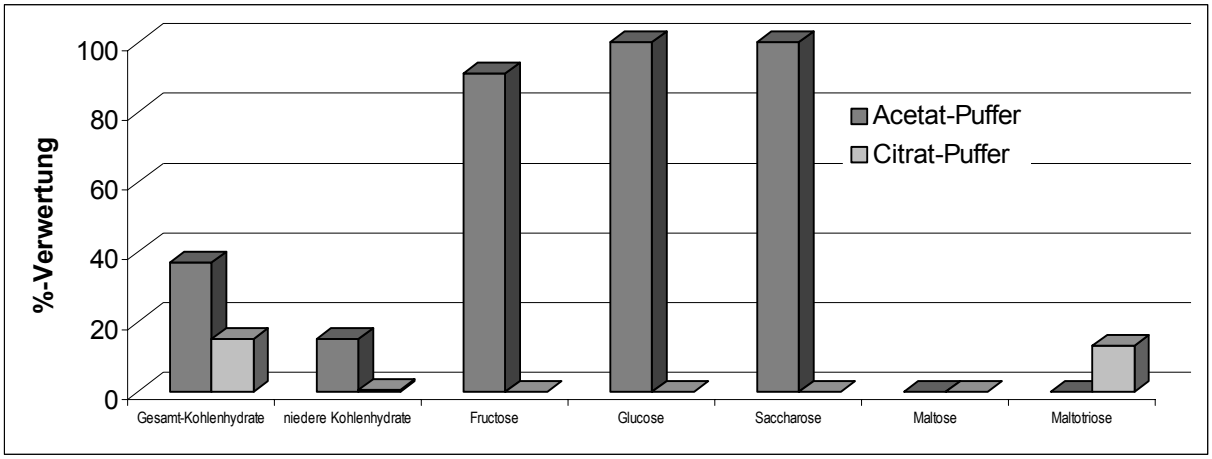



Abb. 5/19: Kohlenhydratverwertung bei den gepufferten Fermentationen

Die Gesamtkohlenhydrate erfahren bei der Fermentation mit Acetatpuffer eine deutliche Abnahme von 37 %. Bei der Citrat-gepufferten Fermentation ist die Abnahme geringer, sie beträgt nur 15 %. Bei der Betrachtung der niederen Kohlenhydrate ergibt sich ein ähnliches Bild, bei Acetatpufferung werden 15% der niederen Kohlenhydrate während der Fermentation verwertet. Die Citrat-gepufferte Fermentation verläuft fast ohne Verwertung der niederen Kohlenhydrate, lediglich Maltotriose erfährt eine Abnahme von 13 %. Die Di- bzw. Trisaccharide Maltose und Maltotriose werden bei der Acetatpufferung hingegen nicht verwertet. Hier werden Glucose und Saccharose vollständig verwertet, Fructose wird um 91 % verringert.

Sensorische Betrachtung

Neben der fermentationstechnischen Eignung der Puffer muß auch berücksichtigt werden, welchen Einfluß die Puffersubstanzen auf die sensorischen Eigenschaften wie Geruch und Geschmack des Getränkes haben. Die Proben der Acetat-gepufferten Fermentationen wiesen im Geruch und im Geschmack einen deutlichen Essigstich auf. Aufgrund der unzureichenden Fermentation waren die Proben der Citratpufferung schwierig zu beurteilen. Sie besaßen noch einen deutlichen Würzecharakter und wenig Säure, allerdings war kein Fehlaroma feststellbar, das von der Verwendung des Citratpuffers herzurühren schien. Citrat würde also ins Geschmacksprofil der Getränke passen.

5.3.2 Intensivierung der Fermentation durch pH-statische Kulturführung

Die Puffermenge genau zu berechnen, die nötig ist, um soviel Milchsäure abzufangen, dass immer noch genug gebildet werden kann, um den pH-Wert unter drei zu senken, ist sehr schwierig. Hier spielen die oben genannten Faktoren wie Eigenpufferung der Würze, Puffervermögen von Lactat etc. eine Rolle, die rechnerisch kaum erfassbar sind.

Bei einer pH-statischen Kulturführung müsste genau dann die pH-Regelung abgebrochen werden, wenn noch genug Stoffwechselaktivität für die gewünschte pH-Absenkung besteht. Dies wurde empirisch zu ermitteln versucht. Es wurden verschiedene Fermentationen durchgeführt, die unterschiedlich lange beim optimalen Wachstums-pH gehalten wurden. Die Regulation erfolgte über Zugabe von Di-Kaliumcarbonat. Als Maß für die Dauer der Regulierung wurde die Dosagemenge pro Liter Fermenterinhalt gewählt. Von Bedeutung sind auch hier wieder die Lactatbildung, der pH-Abfall und die Kohlenhydratverwertung.

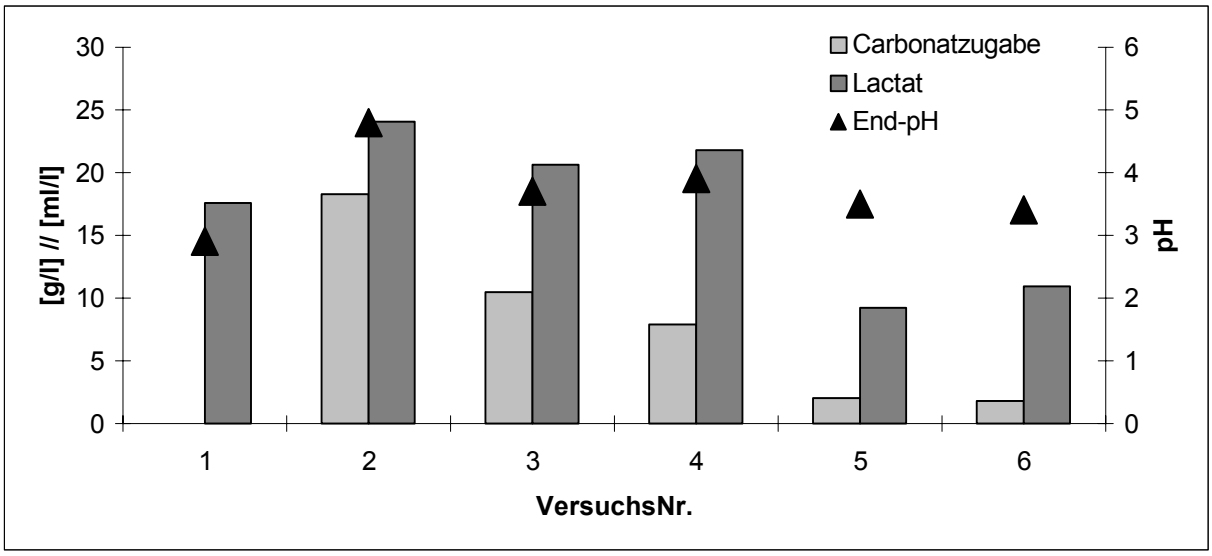



Abb. 5/20: pH-Entwicklung, Lactatbildung, Carbonatdosage bei versch. pH-Stabilisierungen

Versuch 1 wurde als Vergleich ohne Carbonatdosage durchgeführt. Hier wurde ein Wert von pH 2,9 erreicht. Die gebildete Lactatmenge betrug 17,6 g/l. Für Versuch 2 wurde die pH-Stabilisierung nicht begrenzt, es wurde so lange Carbonat dosiert wie nötig war, um pH 4,8 zu halten. Deshalb ist natürlich auch der End-ph bei diesem Wert. Hierzu wurden 18,3 ml/l Carbonat zudosiert. Es wurde eine Lactatbildung von 24,1 g/l erzielt.

Bei den Versuchen drei und vier wurden die Dosagemengen reguliert, um eine pH-Absenkung am Ende der Fermentation zu erzielen.

Eine Menge von 10,5 ml/l Carbonat wurde bei Versuch 3 zudosiert. Dies resultierte in 20,6 g/l Lactat am Ende der Fermentation, womit ein Wert pH 3,7 erreicht wurde. Die pH-Absenkung ist auch im Versuch 4 nicht tiefer. Es wurde bei einer Carbonatdosage von 7,9 ml/l ein pH- Wert von 3,9 erreicht. Die entstandene Lactatmenge betrug 21,8 g/l. Bei den Versuchen 5 und 6 wurde die Carbonatdosage stark reduziert. In Versuch 5 wurden 2,0 ml/l Carbonat zugegeben. Hierbei produzierten die Laktobazillen 9,2 g/l Lactat. Der pH-Wert fiel auf 3,5 ab. Auch in Versuch 6 sind vergleichbare Werte zu erkennen. Bei einer Dosage von 1,8 ml/l sank der pH auf 3,4 ab und es entstanden 10,9 g/l Lactat.
Vergleichend betrachtet entsteht wesentlich mehr Lactat bei höheren Carbonatmengen, allerdings ist der pH-Wert nach der Regulation nicht mehr soweit abzusenken. Die höchste Lactatmenge entstand bei der kontinuierlich stabilisierten Fermentation, der niedrigste pH-Wert am Ende wurde bei der unstabilisierten Fermentation erreicht.

Untersucht wurde auch, wie die vorhandenen Kohlenhydrate bei den verschieden pH-stabilisierten Fermentationen verwertet wurden. Es wurde beobachtet, wieviel Gesamtkohlenhydrate verstoffwechselt wurden, aber auch wieviel niedere Kohlenhydrate. Gerade eine weitgehende Verstoffwechselung der niederen Kohlenhydrate ist für die biologischen Stabilität der entstehenden Getränke von Bedeutung.
Die Beobachtungen sind in Abbildung 5/21 dargestellt.

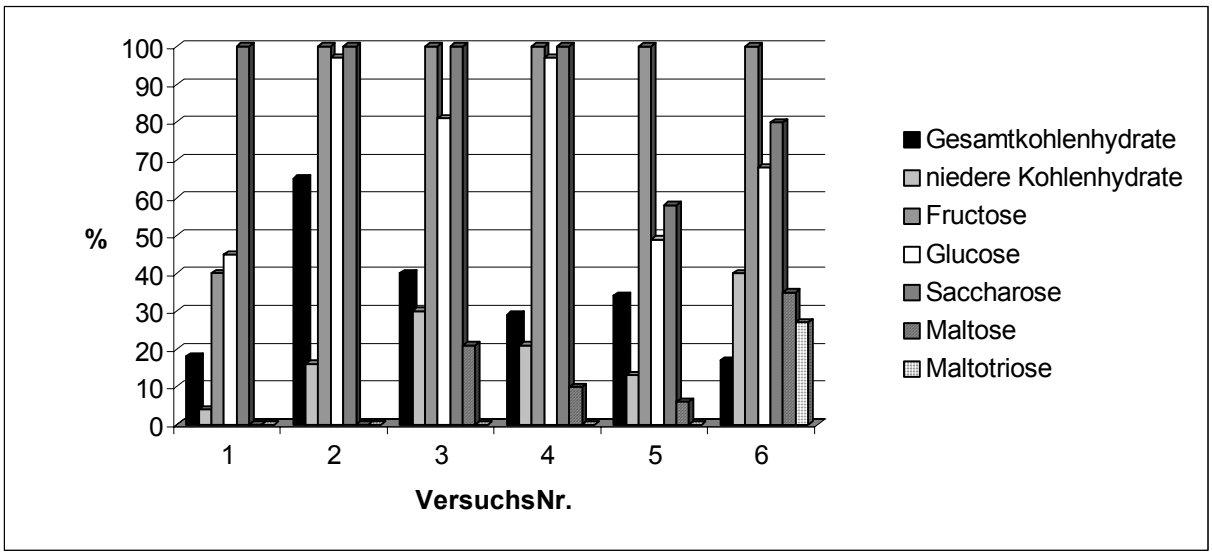



Abb. 5/21: Kohlenhydratverwertung der pH-stabilisierten Fermentationen

Die pH-Stabilisierung der einzelnen Versuche ist aus dem Abbildung 5/20 zu entnehmen. Versuch 1 ist auch hier der nicht stabilisierte, Versuch 2 der kontinuierlich stabilisierte.

Ohne pH-Stabilisierung ist die Abnahme der Gesamtkohlenhydrate mit 18 % gering, auch die niederen Kohlenhydrate erfahren nur eine Abnahme um 4 %. Hier wird vor allem die Saccharose (100%) verwertet. Von der Fructose (40 %) und der Glucose (45 %) wird jeweils knapp die Hälfte verstoffwechselt. Eine Verwertung von Maltose und Maltotriose ist nicht zu beobachten.
Bei kontinuierlicher Fermentation werden entsprechend mehr Kohlenhydrate umgesetzt. Am Ende der Fermentation sind 65 % der Gesamtkohlenhydrate verwertet. Von den niederen Kohlenhydraten wurden 16 % verstoffwechselt. Im Einzelnen waren dies Fructose (100 %), Glucose (97 %) und Saccharose (100 %). Maltose und Maltotriose erfuhren keine Abnahme.
Die Versuche 3 und 4 wurden relativ lange bei konstantem pH gehalten (s.o.). Die Verwertung der Gesamtkohlenhydrate betrug in Versuch 3 40 %. Es wurden 30 % der niederen Kohlenhydrate umgesetzt. Fructose und Saccharose erfuhren eine Abnahme von 100 %. Glucose nahm um 81 % ab. Von der Maltose wurden 20 % verwertet. Der Gehalt an Maltotriose änderte sich nicht.
Versuch 4 weist ähnliche Verhältnisse auf. An Gesamtkohlenhydraten wurden 29 % verbraucht, an niederen Kohlenhydraten 21%. Dabei entfielen auf Fructose 100%, auf Glucose 97%, auf Saccharose 100 %, auf Maltose 10 %. Bei Maltotriose konnten keine Veränderung festgestellt werden.
Nur kurz wurde bei den Versuchen 5 und 6 der pH-Wert konstant gehalten. Die Gesamtkohlenhydrate im Versuch 5 nahmen um 34 % ab, die niederen Kohlenhydrate um 13 %. Fructose wurde dabei zu 100 % verwertet, Glucose (49 %) und Saccharose (58 %) nur etwa zur Hälfte. An Maltose wurden 6 % verbraucht. Eine Verwertung von Maltotriose konnte nicht beobachtet werden.
Bei Versuch 6 wurden 17 % der Gesamtkohlenhydrate während der Fermentation verstoffwechselt. An niederen Kohlenhydraten wurden 40 % verwertet. Der Gehalt an Fructose nahm dabei um 100% ab, der von Glucose um 68 %, der von Saccharose um 80%. Maltose wurde zu 35 % verwertet, Maltotriose zu 27 %.

Sensorische Betrachtung

Nach den Fermentationen wurden auch hier wieder Getränke ausgemischt und verkostet. Das Produkt aus der kontinuierlichen pH-Stabilisierung wies einen unangenehmen, seifigen Charakter auf. In den länger stabilisierten Produkten war dieser Eindruck leicht wieder zu erkennen. Die Getränke, die aus den kurz pH-regulierten und der ungeregelten Fermentation entstanden sind, wurden als rein, säuerlich und spritzig beurteilt.

## 5.4 Kombinierte Fermentationen mit Laktobazillen und Gluconobacter

Mit dieser Versuchsreihe soll überprüft werden, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse zur Laktobazillen-Fermentation mit den Ergebnissen zur Gluconobacter-Fermentation[1] kombinieren lassen. Es soll untersucht werden, wie beide Fermentationen optimal mit einander verknüpft werden können. Dazu wurden verschiedene Fermentationen durchgeführt: Zum einen wurden beide Fermentationen getrennt geführt, der jeweilige Mikroorganismus abzentrifugiert und dann mit dem anderen Mikroorganismus weiter fermentiert. Zum anderen wurde mit einer Mischung aus beiden Mikroorganismen fermentiert und die jeweiligen Fermentationsbedingungen geändert. Außerdem wurden die Fermentationen mit jeweils einem Organismus gestartet und dann 1:1 verschnitten und unter den jeweiligen Bedingungen weitergeführt (Vgl. 9.6.4). Ziel ist es, durch die Gluconobacter-Fermentation eine weitere sensorische Aufwertung der Getränke zu erhalten. *Gluconobacter* ist im Gegensatz zu den Laktobazillen in der Lage, das Würzearoma während der Fermentation zu entfernen. Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Typen in Tabelle 5/3 aufgeführt:

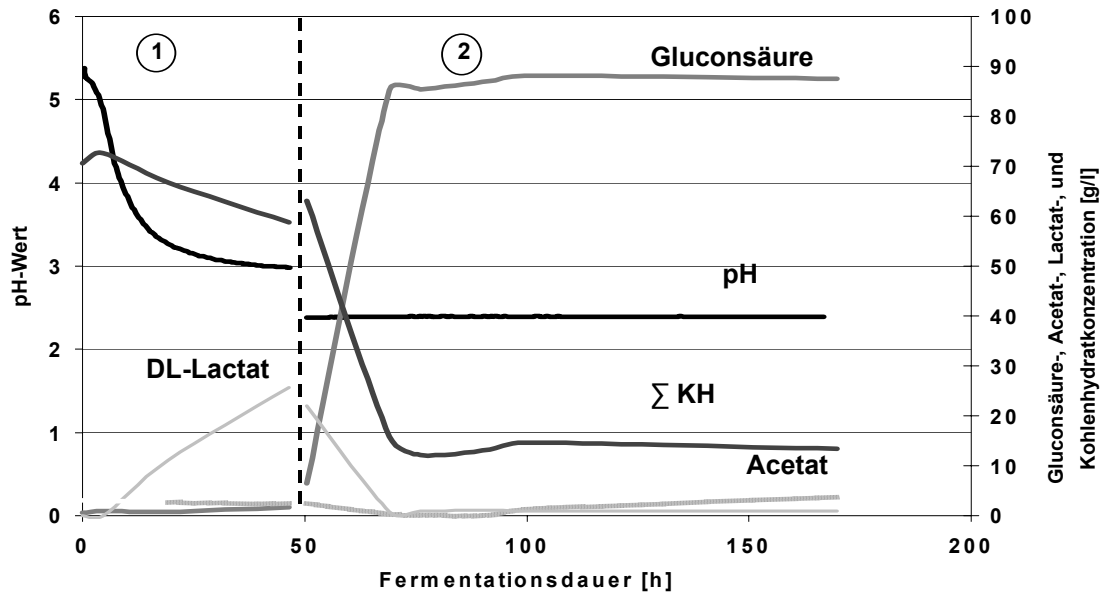
Tabelle 5/3: Fermentationstypen 1-3

| | **Fermentationen des 1. Typs (Var.1 / 2)** | **Fermentationen des 2.Typs** | **Fermentationen des 3. Typs** |
|---|---|---|---|
| **Animpfen** | Animpfen jeweils eines Mikroorganismus | gleichzeitiges Animpfen beider Mikroorganismen | Animpfen jeweils eines Mikroorganismus |
| **Mikroorganismen-abtrennung** | durch Zentrifugieren | keine | keine |
| **Dauer der Fermentation** | bis zu einem konstanten pH-Wert | bis zu einem konstanten pH-Wert | bis zu einem pH-Wert > 3,5 |
| **Organismenwechsel** | durch erneutes Animpfen | Steuerung über die Fermentationsparameter | durch Verschneiden von zwei Einzel-Fermentationen |

Fermentation Typ 1(Vgl. 9.6.4), Reihenfolge *Lactobacillus/Gluconobacter* (Variante 1)

Im ersten Teil der Abbildung 5/22 ist die Fermentation von Vorderwürze mit *Lactobacillus amylolyticus SAG 07* bis zum pH-Minimum sichtbar. Anhand des pH-Wertes lässt sich das damit steigende Wachstum der Laktobazillen sehr gut verfolgen. Man sieht die lag-Phase in den ersten 3,5 Stunden und den rapiden pH-Abfall der log-Phase innerhalb von 15-20 Stunden, gefolgt von einer langsamen Abflachung der Kurve in der stationären Phase.

[1] Vgl. Strachotta, T.: Grundlagen zur Herstellung neuartiger Getränke auf Malzbasis mit verschiedenen Mikroorganismen. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1998.




1 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*
2 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*

Abb. 5/22: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

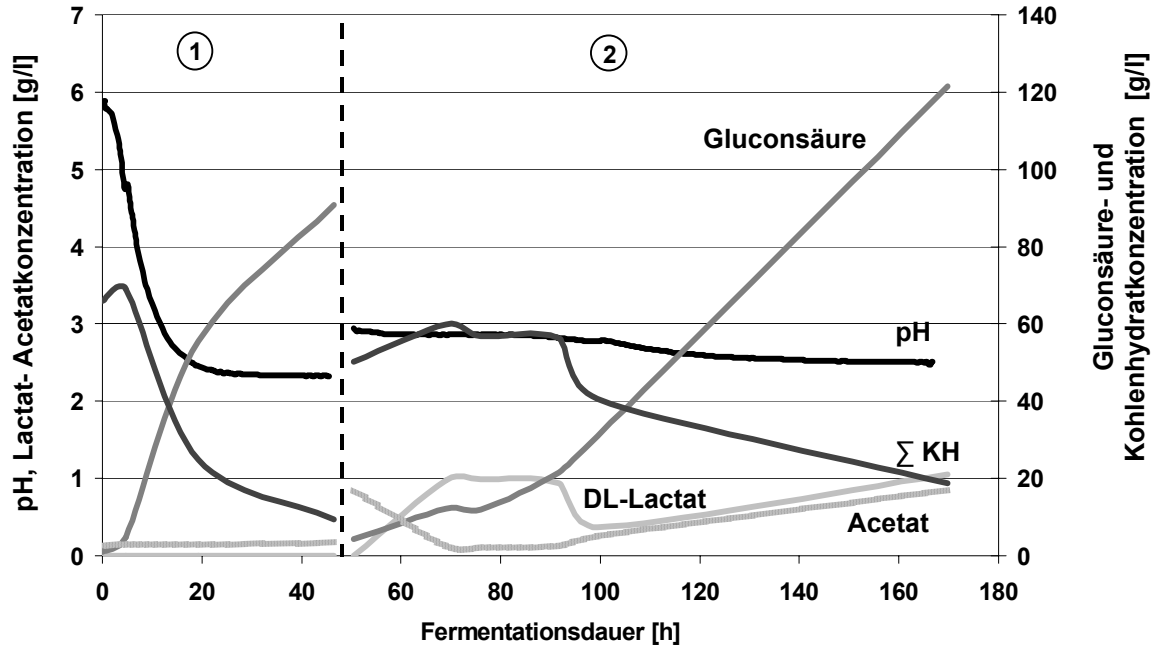
Dementsprechend nimmt parallel dazu die Summe der Kohlenhydrate ab und die Lactatmenge zu. Für die Konzentrationen von Gluconsäure und Acetat sind keine Veränderungen festzustellen.

Nach 46,5 Stunden ist der zweite Abschnitt der Fermentation mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans* dargestellt. Die komplette Abnahme der DL-Lactatkonzentration und der rapide Anstieg der Gluconsäurekonzentration sind die gravierendsten Veränderungen in Verlauf dieses Fermentationsabschnitts. Sechs Stunden nach der Inokulation mit *Gluconobacter* ist eine rapide Abnahme der Kohlenhydratkonzentration zu beobachten. Auffällig ist noch der pH-Wert Sprung von pH 2,9 auf pH 2,4 zu Beginn des zweiten Fermenationsabschnitts. Weiterhin bleibt der pH-Wert während des gesamten zweiten Abschnitts nahezu konstant.

Insgesamt ist zu sagen, dass sich die Fermentation in der Reihenfolge *Gluconobacter/Lactobacillus* nicht zur Herstellung eines lactatangereicherten Getränkes eignet, da das gesamte gebildete DL-Lactat von *Gluconobacter* wieder verstoffwechselt wird.

Fermentation Typ 1(Vgl. 9.6.4), Reihenfolge *Gluconobacter/Lactobacillus* (Variante 1)

Der erste Bereich der Abb. 5/23 zeigt eine Standard-Fermentation von Vorderwürze durch *Gluconobacter* bis zur Absenkung auf den konstanten pH-Wert 2,3. Die einzelnen Wachstumsphasen lassen sich durch den Verlauf des pH-Werts ableiten. Nach einer kurzen lag-Phase von etwa 4 Stunden geht das Wachstum der Mikroorganismen in die log-Phase über. Nach etwa 15 Stunden verlangsamt sich die Absenkung des pH-Werts, die stationäre Phase beginnt. Sie endet schließlich mit dem konstanten pH-Wert 2,3. Gleichzeitig ist in Abb. 6 eine schnelle Abnahme der Kohlenhydratkonzentration während der log-Pase, die während der stationären Phase wieder deutlich abflacht, zu verzeichnen. Dies entspricht der Stoffwechseltätigkeit der Mikroorganismen in der jeweiligen Phase. Bei der Acetatkonzentration sind keine signifikanten Veränderungen festzustellen.



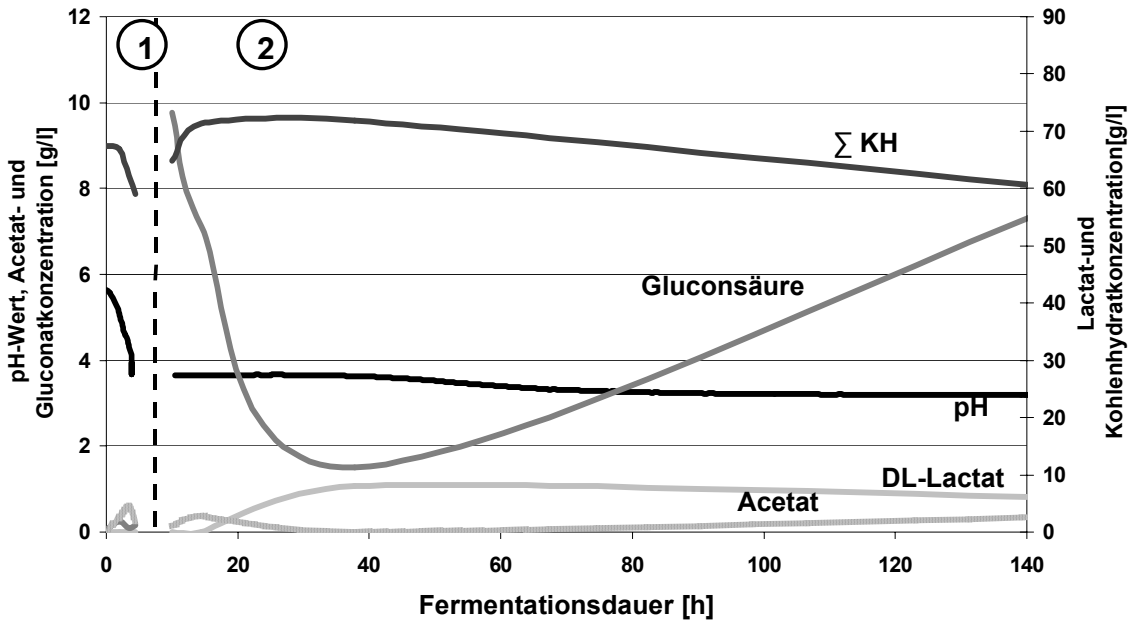

1 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*
2 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*

Abb. 5/23: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

Nachdem mit *Lactobacillus amylolyticus SAG 07* angeimpft wurde, beginnt der zweite Fermentationsabschnitt. In diesem Abschnitt fällt die extreme Abnahme der Gluconsäurekonzentration von 90 g/l auf 5 g/l auf. Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch der gleichzeitige Anstieg der Kohlenhydratkonzentration. Lactat, als anzureichernder Metabolit, und damit die Entwicklung von *Lactobacillus amylolyticus SAG 07* steigt nach der lag-Time der Mikroorganismen sehr stark an. Es wird nach ca. 18 Stunden eine Konzentration von 20 g/l erreicht. Folglich ist es grundsätzlich möglich, durch dieses Verfahren hohe Lactat-Konzentrationen in Würze einzubringen.

Fermentationstyp 1, Reihenfolge *Gluconobacter/Lactobacillus* (Variante2)

Da die Fermentation 1 schon gezeigt hat, dass eine Anreicherung der Lactatkonzentration auf diesem Weg nicht möglich ist, wurde bei der zweiten Variante des 1. Fermentationstyps nur noch die *Gluconobacter*-Fermentation gefolgt von der *Lactobacillus*-Fermentation durchgeführt.



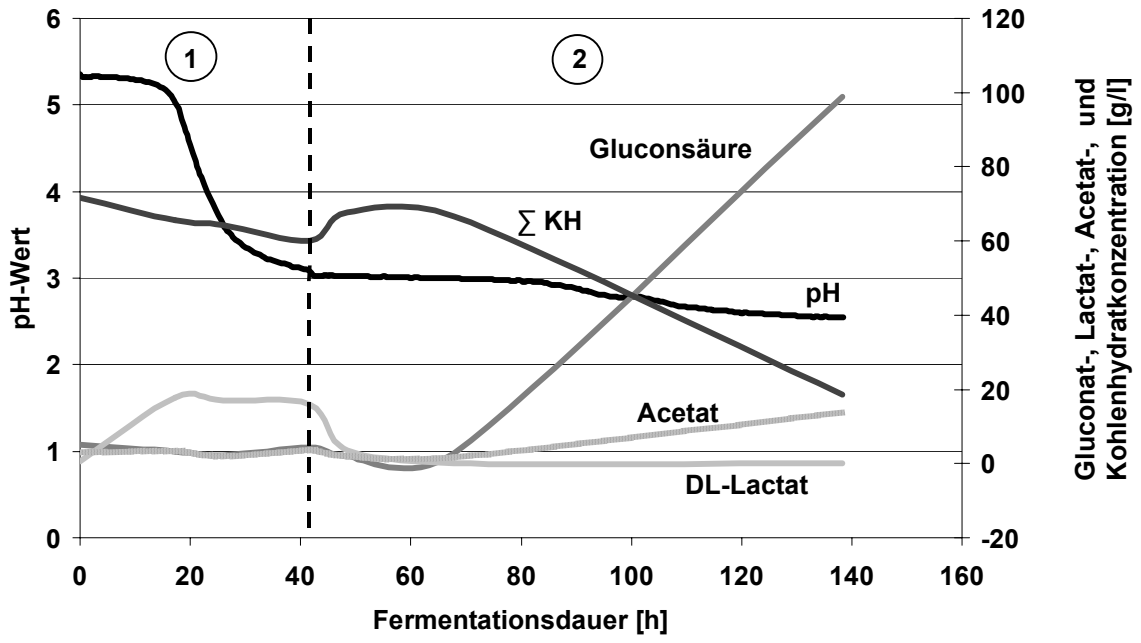

1 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. oxydans* bis pH 3,8
2 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*

Abb. 5/24: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH- Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

Zuerst wurde eine Standard-Fermentation mit *Gluconobacter* durchgeführt (Abb. 5/24) Diese wurde bei dem pH-Wert 4,2 abgebrochen. Da die biologische Oxidation während des Zentrifugierens weiter fortschreitet, sinkt der pH-Wert weiter ab, und es kommt zu einem weiteren Anstieg der Stoffwechselprodukte. Nach dem Zentrifugieren wurde der Grenzwert von pH 3,5 für das Wachstum von *Lactobacillus amylolyticus SAG 07* mit dem pH-Wert 3,8 nicht unterschritten, so dass angeimpft werden konnte. Im Verlauf der anaeroben Fermentation nimmt die Gluconsäurekonzentration rapide ab. Die Lactat-Konzentration steigt nach 5 Stunden stark an, stagniert bei einer Maximalkonzentration von 9,7 g/l, die damit deutlich unter der maximal erreichbaren Konzentration von 20-25 g/l liegt. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Sauerstoffkonzentration der Würze, sieht man, dass in diesem Batch keine kontinuierlich anaeroben Verhältnisse vorlagen. Die Kohlenhydratkonzentration steigt in den ersten 5 Stunden an. Ab dem Einsetzen der Lactatproduktion bleibt die Zuckerkonzentration konstant, da weitherhin Gluconat abgebaut wird. Beim Einsetzen des Gluconobacterwachstums durch die aeroben Bedingungen im Fermenter werden dann deutlich mehr Kohlenhydrate verstoffwechselt, so dass ihre Konzentration sinkt.

Fermentationstyp 2, Reihenfolge *Lactobacillus/Gluconobacter*

Der erste Teil der Abbildung 5/25 zeigt die Standardfermentation von *Lactobacillus amylolyticus SAG 07* in Vorderwürze. Rechts von der gestrichtelten Linie in der Abbildung ist die Umstellung der anaeroben Fermentationsparameter auf die aeroben Verhältnisse der *Gluconobacter*-Fermentation dargestellt. Wie durch die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu erwarten war, verstoffwechselt *Gluconobacter* auch bei dieser Fermentation die zuvor entstandene Lactatmenge. Es entsteht durch die Lactatdehydrogenase Acetat, dessen Menge stöchiometrisch der Lactatmenge entspricht. Damit ist auch die direkte Umstellung einer *Lactobacillus*-Fermentation auf eine *Gluconobacter*-Fermentation nicht zur Anreicherung von Lactat in Vorderwürze geeignet. Auffallend ist dennoch der Anstieg der Kohlenhydrat-Konzentration nach der Umstellung der Fermentationsparameter. Diese Beobachtung wurde auch in vorhergehender Fermentation gemacht. Im weiteren Verlauf der Fermentation sinkt die Kohlenhydratmenge durch das Wachstum und die damit verbundene Gluconsäurebildung von *Gluconobacter* wieder.

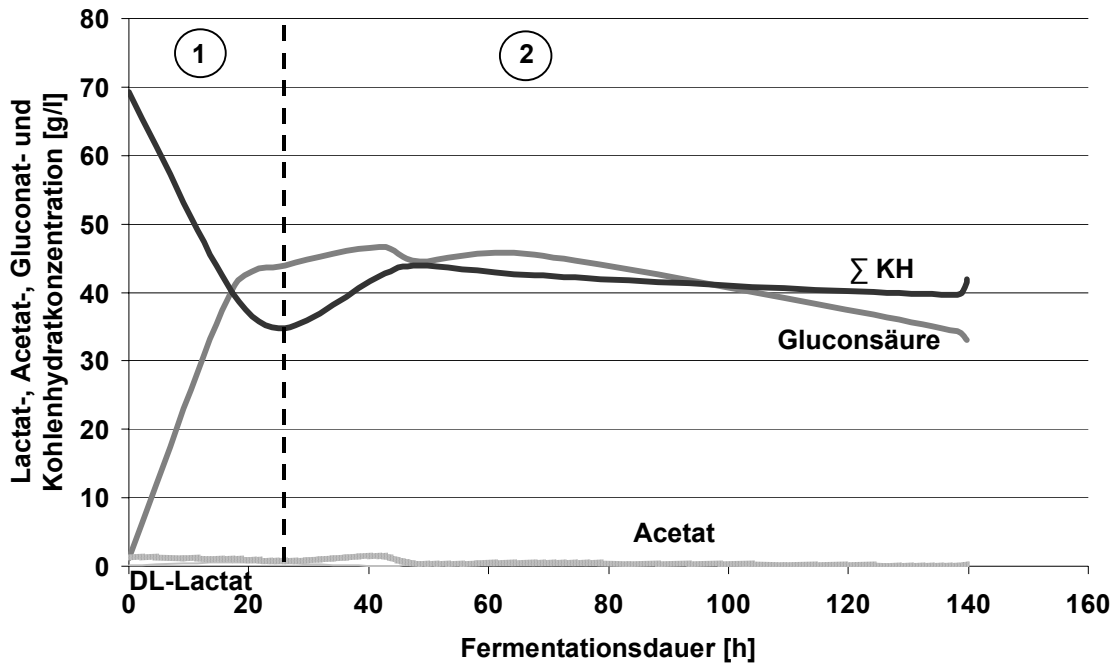



1 Anerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*
2 Aaerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*

Abb. 5/25: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

Fermentationstyp 2, Reihenfolge *Gluconobacter/Lactobacillus*

Diese Fermentation mit beginnender *Gluconobacter*-Fermentation und anschließendem Wechsel auf die anaeroben Parameter von *Lactobacillus amylolyticus* ist in Abbildung 5/26 dargestellt. Die pH-Werte stehen für diesen Versuch nicht zur Verfügung. Zuerst wurde die Standardfermentation mit *Gluconobacter* durchgeführt. Nach 26 Stunden wurden die Fermentationsparameter auf anaerobe Bedingungen umgestellt. Dieser zweite Abschnitt der Fermentation zeigt, dass es zu keiner Steigerung der Lactatmenge gekommen ist.

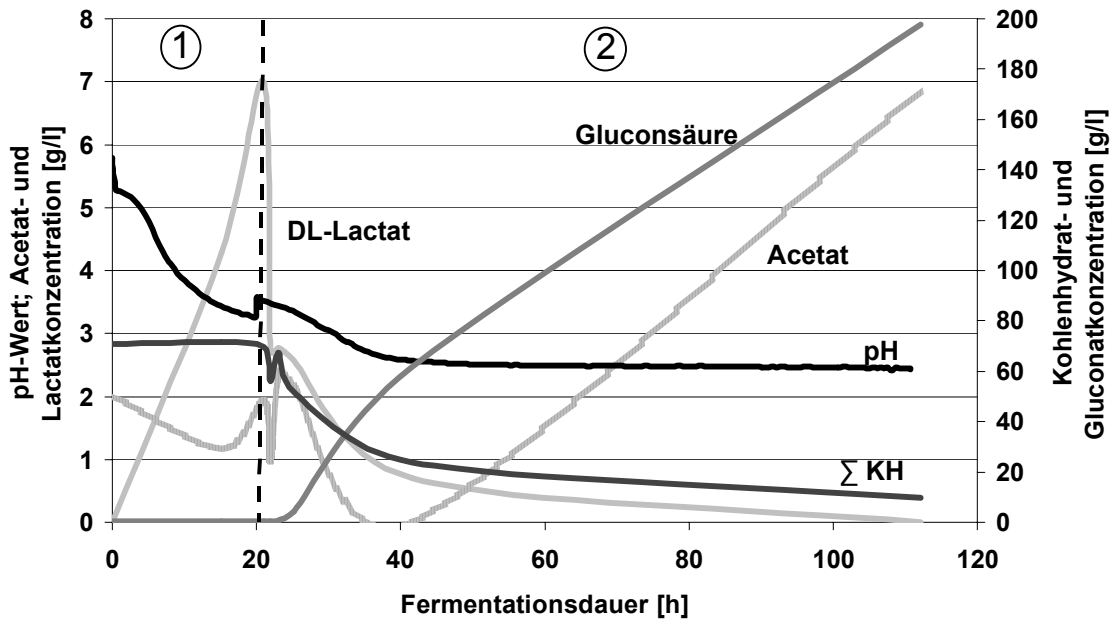



1 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*
2 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*

Abb. 5/26: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite und der Summe der Kohlenhydrate

Fermentation Typ 3, 2. Fermentationsabschnitt *Gluconobacter*-Bedingungen

Es wurde in zwei getrennten Batches eine Gluconobacter- und eine *Lactobacillus*-Standardfermentation bis zum Beginn der Log-Pase durchgeführt. Nach 16 Stunden hatte die *Lactobacillus*-Fermentation den pH-Wert 3.3 und eine Lactatkonzentration von 7 g/l erreicht (Abb. 5/27). Die *Gluconobacter*-Fermentation hatte in 4,25 Stunden den pH-Wert 4,5 erreicht und eine Gluconatmenge von 4,7 g/l gebildet. Diese beiden Ansätze wurden miteinander verschnitten und auf die aeroben Fermentationsparameter eingestellt. Am Verlauf der Gluconsäurekonzentration in Abbildung 5/27 ist deutlich abzulesen, dass sich Gluconobacter gegenüber den Laktobazillen unter diesen Bedingungen durchsetzt. Die Gluconatmenge steigt deutlich an und die Lactatmenge wird abgebaut. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnis aus den vorhergehenden Fermentationen. Eine *Lactobacillus*-Fermentation, die einer *Gluconobacter*-Fermentation vorgeschaltet ist, führt nicht zum gewünschten Ziel der Lactatanreicherung, da das angereicherte DL-Lactat von *Gluconobacter* wieder verstoffwechselt wird.




1 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*
2 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*

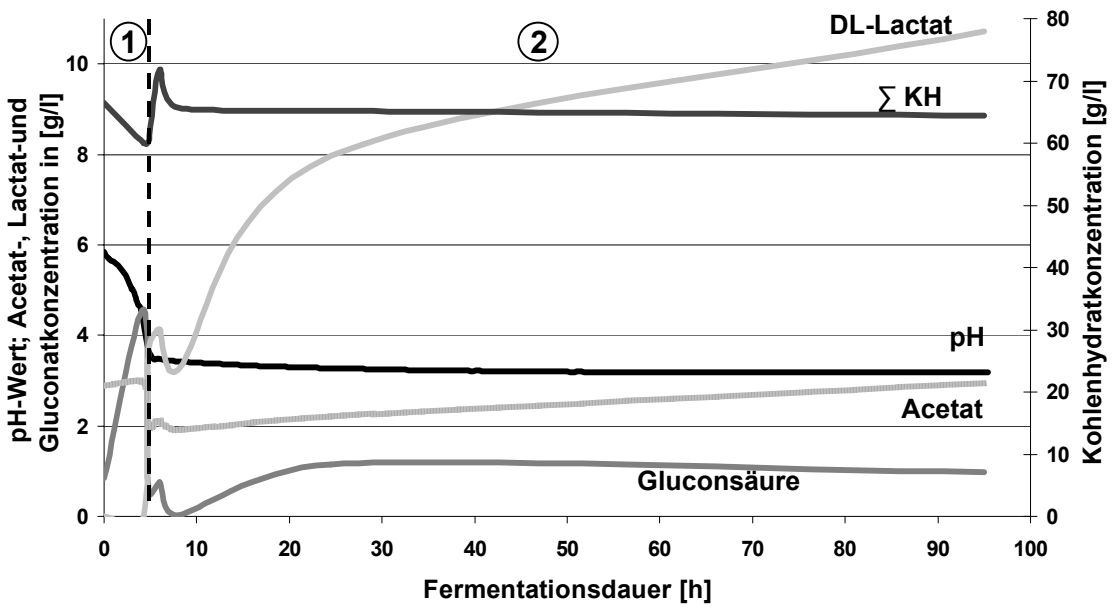
Abb. 5/27: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

Fermentation Typ 3, 2. Fermentationsabschnitt *Lactobacillus*-Bedingungen

Bei dieser Fermentation wurden, wie bei der vorherigen, zwei parallel mit *Gluconobacter* und *Lactobacillus* fermentierte Batches miteinander verschnitten. Anschließend wurde jedoch mit den anaeroben Bedingungen weiterfermentiert (Abb. 5/28).

Zu Beginn dieser Fermentationsphase ist in der Mischung der pH-Wert 3,5 gemessen worden. Ferner enthält die Mischung eine Gluconsäurekonzentration von 0,5 g/l und eine Lactatkonzentration von 2,7 g/l. Die Lactatkonzentration steigt unter den anaeroben Bedingungen durch den weiterhin aktiven Stoffwechsel der Laktobazillen noch an. Danach sinkt diese Konzentration ab, da kurzer Sauerstoffmangel *Gluconobacter* in seinem Stoffwechsel nicht wesentlich beeinträchtigt. Das gebildete Lactat wird von *Gluconobacter* zu Acetat abgebaut. Im weiteren Verlauf setzt sich *Lactobacillus amyloyticus* gegenüber *Gluconobacter* deutlich durch und die Lactatkonzentration steigt auf 10,7 g/l.

Die Kurve von Gluconsäure bildet den selben Sachverhalt ab. Erst steigt die Gluconsäuremenge noch, da kurze anaerobe Phasen auf das Wachstum von *Gluconobacter* kaum Einfluss haben. Bei längerem Sauerstoffmangel kann *Gluconobacter* die biologische Oxidation nicht aufrecht erhalten, so dass sich *Lactobacillus* in diesem Batch durchsetzt. Die Gluconat-Konzentration nimmt hierbei erst ab und pendelt sich dann auf einem konstant niedrigen Wert von 1 g/l ein.




1 Aerober Fermentationsabschnitt mit *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans*
2 Anaerober Fermentationsabschnitt mit *Lactobacillus amylolyticus*

Abb. 5/28: Konzentrationsverlauf der Fermentationsmetabolite, des pH-Wertes und der Summe der Kohlenhydrate

Sensorik

Eine sensorische Prüfung wurde nur von den Fermentationen mit Lactataneicherung durchgeführt. Hierbei wurde für beide Fermentationen dieses Typs ein feiner, süßlich, honigartiger Geruch wahrgenommen. Der Geschmack hingegen war frisch säuerlich, vollmundig und durch einen harmonischen Gesamteindruck gekennzeichnet. Ein Würzearoma konnte bei den Fermentationen nicht mehr wahrgenommen werden, das Produkt hatte eine eher schlanke, frische, leicht herbe Note, die zusammen mit dem feinen Honigaroma ein angenehmes Gesamtbild lieferte.

# 6 Filtration der Fermentationsbrühe mittels Kieselgurfiltration

Eine komplette Technologie zur Herstellung alternativer Getränke auf Malzbasis beinhaltet auch eine Filtrationsmöglichkeit, um ein stabiles und klares Produkt herstellen zu können. Um die Technologie einfach in Brauereien umsetzen zu können, wurde nach einer Filtrationsmöglichkeit gesucht, die in der Brauerei geläufig ist. Die gebräuchlichste Filtrationstechnologie ist die Filtration mittels Kieselgur und anschließender Sterilfiltration über einen Schichtenfilter. Hier soll nun überprüft werden, ob das durch Lactofermentation entstandene Substrat mittels Kieselgur filtriert werden kann. Im Vordergrund stehen dabei die Druckzunahme am Filter und damit die Standzeit, die Trübungsverläufe während der Filtration und die Rückhaltung der Mikroorganismen. Die verschiedenen Filtrationen sind in Kapitel 9.7 beschrieben. Der Übersicht halber werden vor der jeweiligen Filtration noch detaillierte Angaben zu den Filtrationsbedingungen gemacht.

Optimierung der Filterstandzeit

Die Filterstandzeit ist abhängig vom Druckanstieg an der Filtrationsanlage. Gemessen wird die Druckdifferenz zwischen Kieselgurfiltereinlauf und Schichtenfiltereinlauf ($\Delta p1$) und zwischen Kieselgurfiltereinlauf und Drucktank ($\Delta p2$). Die Abbildungen 6/1 – 6/4 zeigen die Druckverläufe der verschiedenen Filtrationen.

Filtrationstyp: A (Vgl.9.7)
Filtrationsleistung: 10l/h
Laufende Dosage: 1200g/hl feine Gur

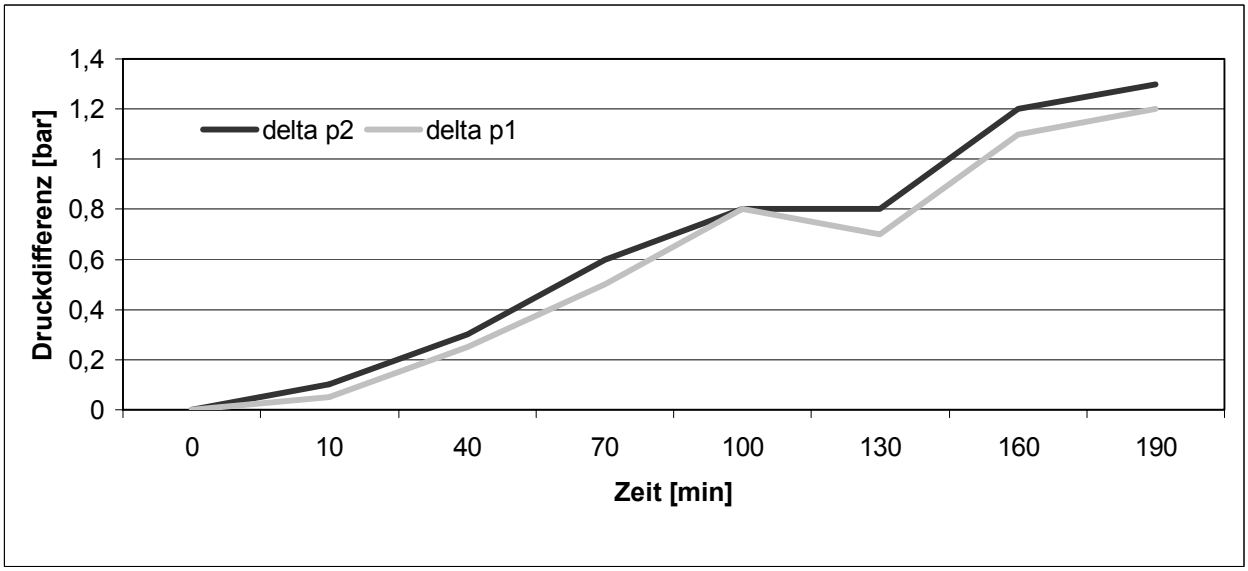



Abb. 6/1: Druckverlauf Filtration A (einfache laufende Dosage)

Es ist ein starker Druckanstieg von 0, 4 bar/h zu beobachten. Dies führt zu einer geringen Standzeit von weniger als 190 Minuten. Außerdem wird deutlich, dass der Drucksanstieg am Kieselgurfilter entsteht. Am Schichtenfilter findet keine weitere Druckzunahme statt.
Zur Reduktion des Druckanstieges bei der Kieselgurfiltration wurde die laufende Dosage um dieselbe Menge grobe Kieselgur (1200 g/hl) erweitert.

Filtrationstyp: B (Vgl.9.7)
Filtrationsleistung: 10l/h
Laufende Dosage: 1200g/hl feine Gur + 1200 g/hl grobe Gur

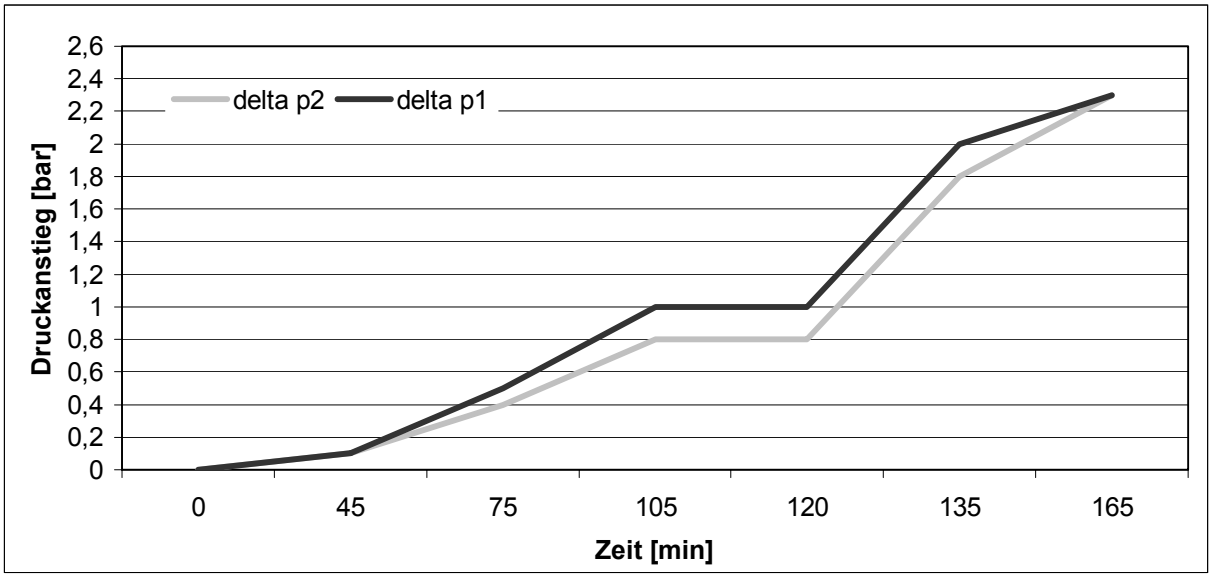



Abb. 6/2: Druckverlauf Filtration B (doppelte laufende Dosage)

Die Druckverläufe sind vergleichbar mit denen der Filtration A. Eine Verbesserung der Standzeit konnte trotz Veränderung der laufenden Dosage nicht erreicht werden. Dies ist auf ein Aussedimentieren der Kieselgur im Einlauf des Rahmenfilters zurückzuführen. Deshalb konnte sich die laufende Dosage nicht in ausreichendem Umfang zu einem Filterkuchen aufbauen.
Um ein Aussedimentieren der Kieselgur im Einlauf des Rahmenfilters zu verhindern, wurde das Volumen der laufenden Dosage von 700 ml auf 1400 ml verdoppelt und der Kolbenhub der Dosierpumpe ebenfalls verdoppelt. Hierdurch wurde bei gleicher angeschwemmten Kieselgurmenge der Durchfluß erhöht. Diese Steigerung sollte das Aussedimentieren der Feststoffpartikel verhindern.

Filtrationstyp: C (Vgl.9.7)
Filtrationsleistung: 10l/h
Laufende Dosage: 1200g/hl feine Gur + 1200 g/hl grobe Gur

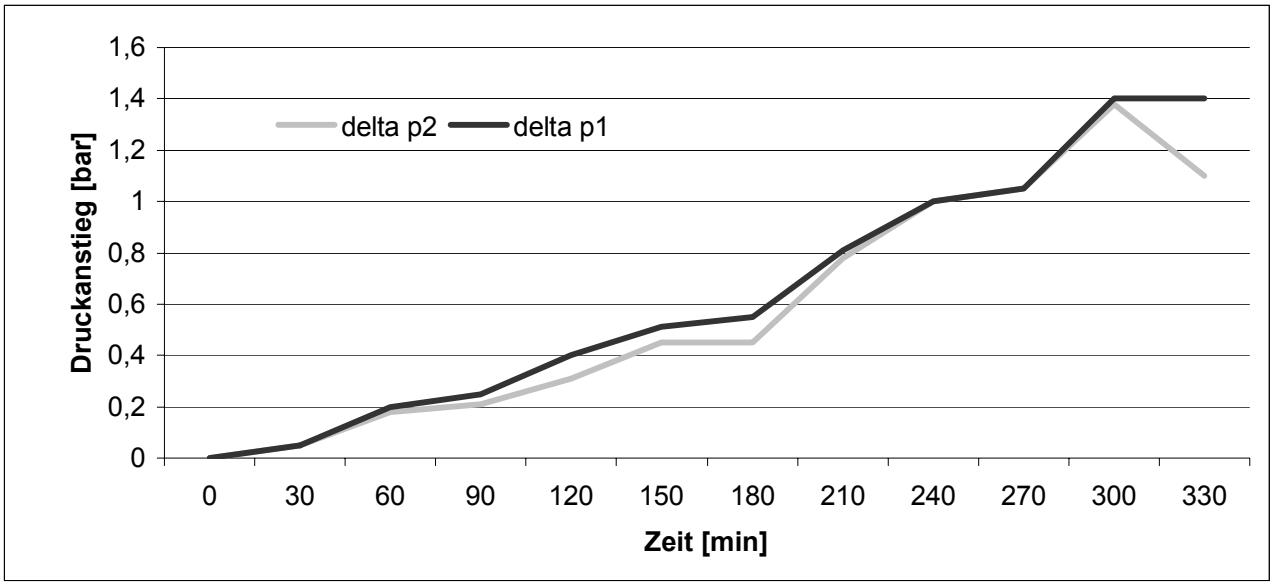



Abb. 6/3: Druckverläufe Filtration C (doppelte laufende Dosage und doppelte Dosiergeschwindigkeit)

Der Druckanstieg betrug nach den Modifikationen nur noch etwa 0,25 bar/h. Dies brachte eine ungefähre Verdoppelung der Standzeit mit sich.
Um den Druckanstieg noch weiter zu senken, wurde bei Filtration E noch eine einwöchige Kaltlagerung bei 0°C durchgeführt, um die Filtrationseigenschaften des Substrates zu verbessern.

Filtrationstyp: E (Vgl. 9.7)
Filtrationsleistung: 30l/h
Laufende Dosage: 1200g/hl feine Gur + 1200 g/hl grobe Gur

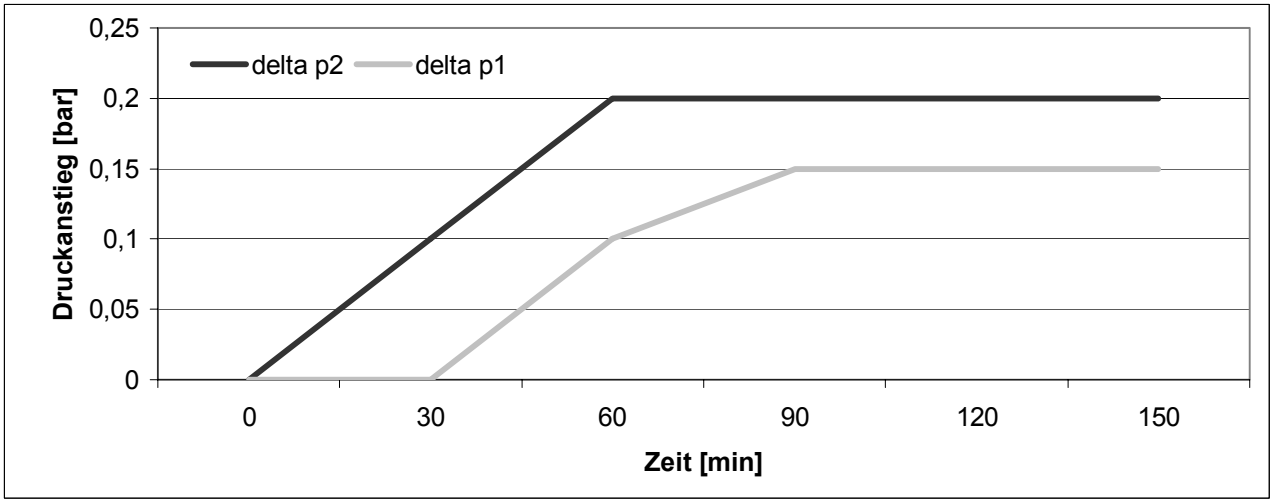



Abb. 6/4: Druckverläufe Filtration E (vorherige Kaltlagerung)

In Abbildung 6/4 ist zu erkennen, dass durch die Kaltlagerung eine weitere Verringerung des Druckanstiegs möglich ist. Ab einer Zeit von 60 min gelang es den Druck über eine Stunde konstant bei 0,2 bar zu halten.

Trübungsentwicklung bei der Filtration

Um ein optisch blankes Getränk zu produzieren, muss während der Filtration die Trübung reduziert werden. Die Trübungsmessung wurde im Winkel von 90° für die Detektion von feinen kolloidalen Trübungen kleiner 0,5 μm und mit einer Vorwärtsstreuung von 12° für die Detektion von gröberen Trübungsbildnern größer 0,5 μm durchgeführt. In Abb. 6/5 - 6/7 sind die Trübungsverläufe der verschiedenen Filtrationen dargestellt.

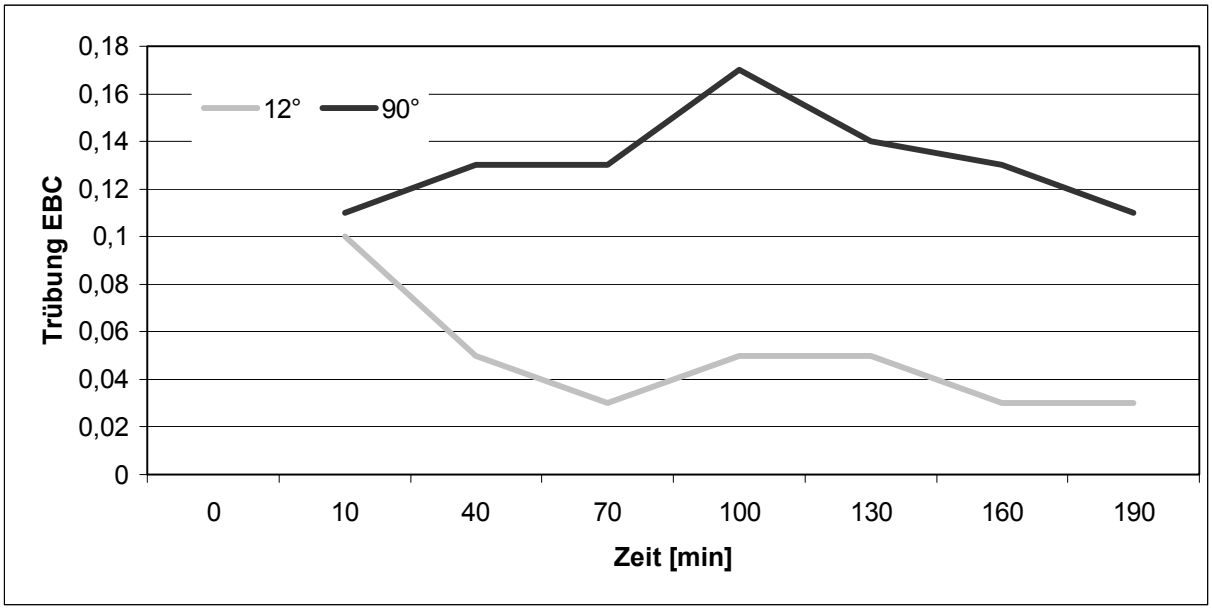



Abb. 6/5: Trübungsverlauf Filtration A (einfache laufende Dosage)

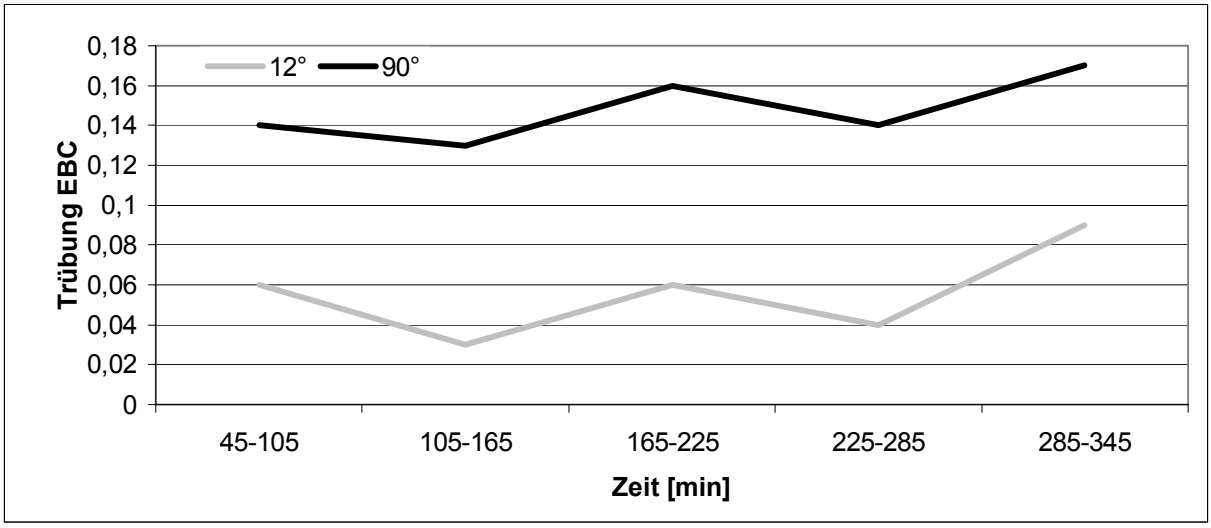



Abb. 6/6: Trübungsverlauf Filtration C (doppelte laufende Dosage und doppelte Dosiergeschwindigkeit)

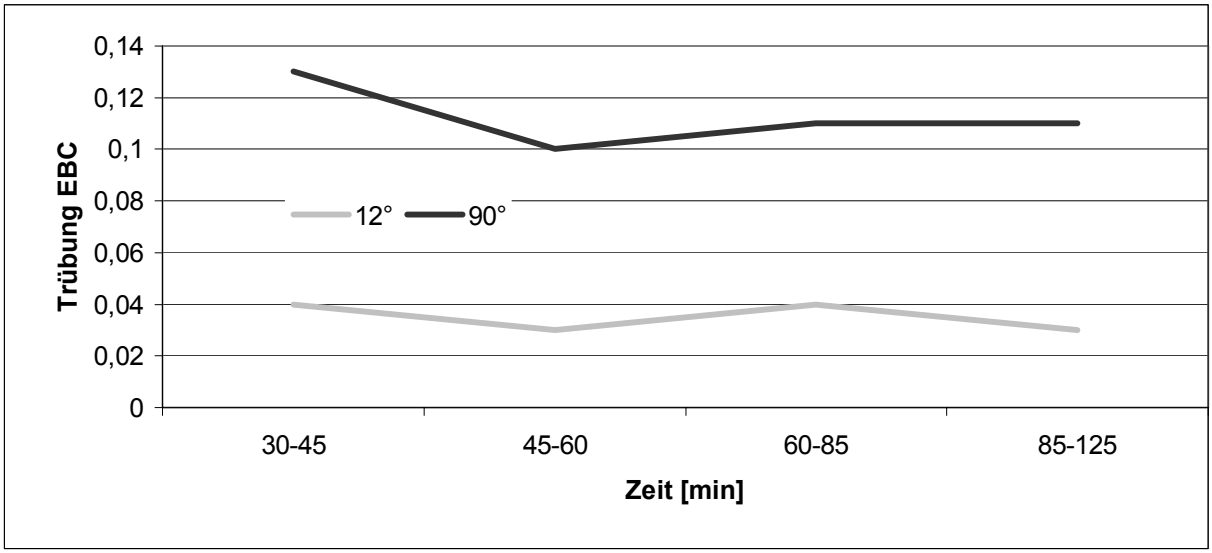



Abb. 6/7: Trübungsverlauf bei Filtration E (vorherige Kaltlagerung)

Im Vergleich der einzelnen Filtrationen zeigt die Trübung eine einheitliches Bild. Die Trübungen nach der Kieselgurfiltration liegen alle im Bereich zwischen 0,03 – 0,1 EBC-Einheiten für die 12 °Messung und zwischen 0,1 – 0,17 EBC-Einheiten für die 90° Messung. Bei Filtration E (mit Kaltlagerung) sind die Trübungswerte im Mittel etwas geringer, für die 12° Messung lag der höchste Wert bei 0,04 EBC-Einheiten, für die 90° Messung bei 0,13 EBC-Einheiten.

Optimierung der Mikroorgansimen-Rückhaltung

Hierzu wurden verschiedene Schichten zu Sterifiltration verwendet, die sich in ihrer relativen Klärschärfe unterscheiden. Nach dem Schichtenfilter wurden Proben gezogen und bebrütet. Zum einen wurde überprüft, ob die verwendeten Laktobazillen komplett herausgefiltert wurden, zum andern, ob das Produkt nach der Filtration keimfrei war. Es können vom Rohstoff Würze unbedenkliche Würzebakterien in die Fermentation gelangen, die auch herausfiltriert werden sollten. Dem Kieselgurfilter kommt auch Bedeutung zu; hier sollten schon möglichst viele Mikroorganismen zurückgehalten werden, um die Sterilschichten weniger zu belasten.

| | |
|---|---|
| Filtrationstyp: | A (Vgl.9.7) |
| Filtrationsleistung: | 10 l/h |
| Relative Klärschärfe der Sterilschichten: | 0,4 µ |

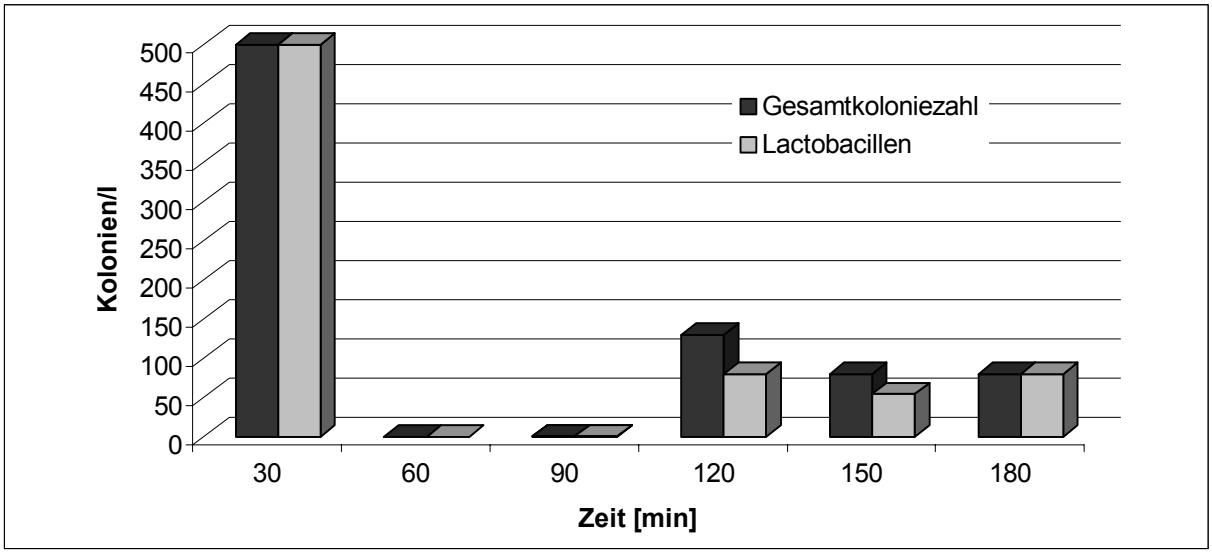



Abb. 6/8: Koloniezahlen nach der Kieselgurfiltration

Im zeitlichen Verlauf wird deutlich, dass der Kieselgurfilter einen überwiegenden Teil der Mikroorganismen entfernt. Von einer Ausgangszellzahl von $10^9$ Zellen/ml bleiben nach der Kieselgurfiltration (Filtrationsbeginn) nur etwa 500 Keime/l im Filtrat. Gegen Filtrationsende verbleiben etwa 80 Keime/l im Filtrat. Inwieweit diese Mikroorganismen mittels Sterilschichten zurückgehalten werden, zeigt Abbildung 6/9.

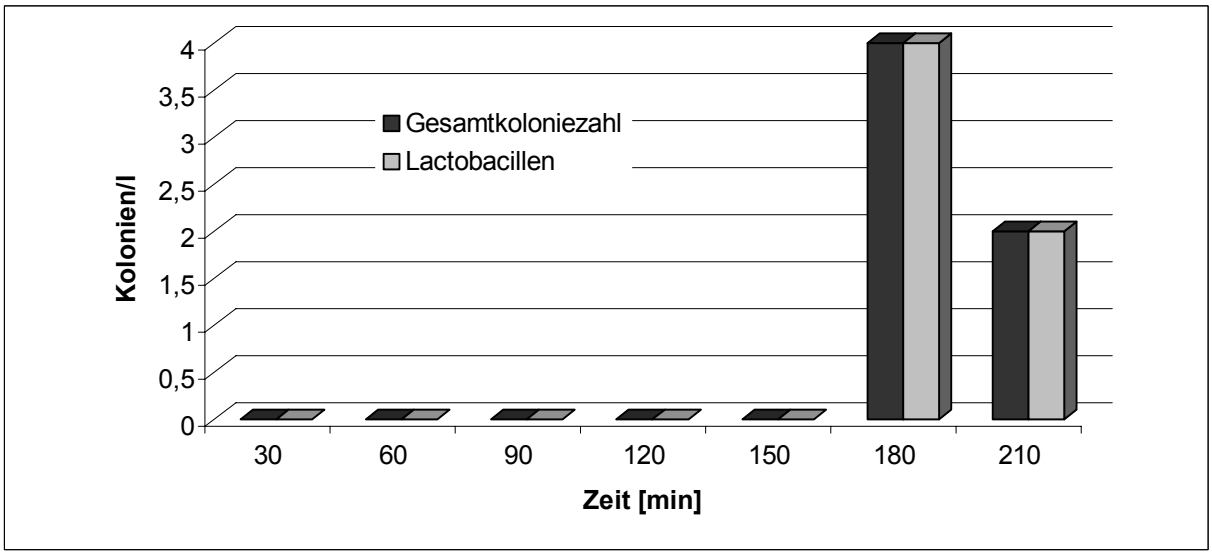



Abb.: 6/9: Koloniezahl nach der Schichtenfiltration (0,4 µ)

Die Keime werden über lange Zeit (150 min) zu 100 % zurückgehalten, erst zum Filtrationsende hin wurden einzelne Keime nachgewiesen. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Laktobazillen.

Um die Keimzahl nach der Filtration auf Null zu reduzieren, wurde für Filtration C eine schärfere Sterilschicht verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6/10 dargestellt.

Um Druckstöße zu vermeiden, wurden die Proben ab Filtration C aus dem Drucktank entnommen, um Vermischungen zu unterbinden wurde über kurze Abschnitte in kleine Tanks filtriert.

| | |
|---|---|
| Filtrationstyp: | C (Vgl.9.7) |
| Filtrationsleistung: | 10 l/h |
| Relative Klärschärfe der Sterilschichten: | 0,2 µ |

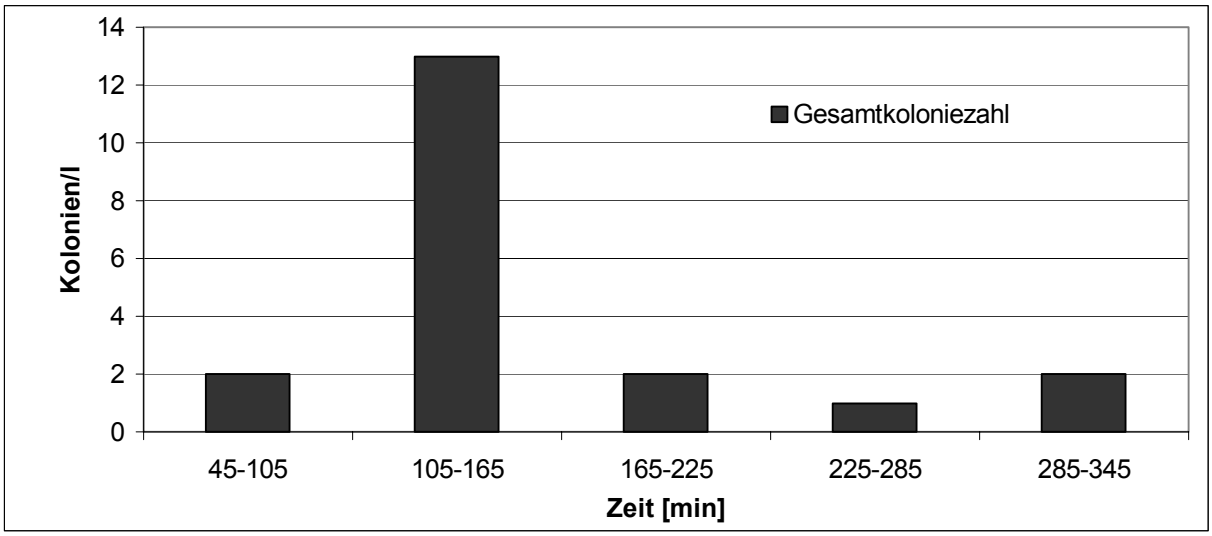



Abb. 6/10: Gesamtkoloniezahl nach der Schichtenfiltration (0,2 µ)

Nach der Filtration über die Schicht mit 0,2µ relativer Klärschärfe konnten keine Laktobazillen mehr nachgewiesen werden. Eine völlige Keimfreiheit war aber nicht gegeben. Es wurden noch einzelne Kolonien von Würzebakterien auf dem Nähragar gefunden. Im Filtrationsabschnitt zwischen 105 min bis 165 min waren noch 13 Keime/l nachweisbar. Über den Filtrationsverlauf konnten immer 1 bis 2 Keime/l gefunden werden.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurde bei Filtration D eine Schicht mit höherer relativer Klärschärfe verwendet.

| | |
|---|---|
| Filtrationstyp: | D (Vgl.9.7) |
| Filtrationsleistung: | 10 l/h |
| Relative Klärschärfe der Sterilschichten: | 0,1 µ |

Die Ergebnisse der Proben, die während der Filtration genommen wurden, waren alle ohne Befund. Nach der Sterilfiltration von Filtration D konnten weder Laktobazillen noch andere Keime nachgewiesen werden. Auf eine graphische Darstellung wird deshalb verzichtet.

Unter diesen Bedingungen (relative Klärschärfe 0,1 µ) war das Filtrat keimfrei.

# 7 Stabilität der entstandenen Getränkebasis und Getränke

Ein weiterer, wichtiger technologischer Aspekt ist die Stabilität der gewonnenen Basis und der Getränke. Kenntnisse über die chemisch-physikalische (kolloidale) und über die mikrobiologische Stabilität sind unabdingbar für den späteren Vertrieb der Produkte. In diesem Kapitel werden Untersuchungen über die Trübungsneigung der Basis und der Getränke (Ausmischungen siehe 9.8) gemacht. Des Weiteren wird überprüft, mit welchen Möglichkeiten sich die kolloidale Stabilität verbessern lässt. Für den Vertrieb von unfiltrierten Getränken sollen Aussagen über das Verhalten der gewünschten Trübung gemacht werden. Die Trübungen werden mittels Forciertest erzeugt und anschließend bei 12° und 90° gemessen. Die erzielten Warmtage werden bei einer Trübungszunahme > 2 EBC ermittelt. In jeder Versuchsreihe wird die mikrobiologische Stabilität überprüft (Vgl. 9.7). Abschließend soll der Einfluss der Pasteurisation untersucht werden.

## 7.1 Trübungsneigung der Basis und der Getränke

In Abbildung 7/1 sind die Trübungszunahmen der Basis und der Ausmischung dargestellt.

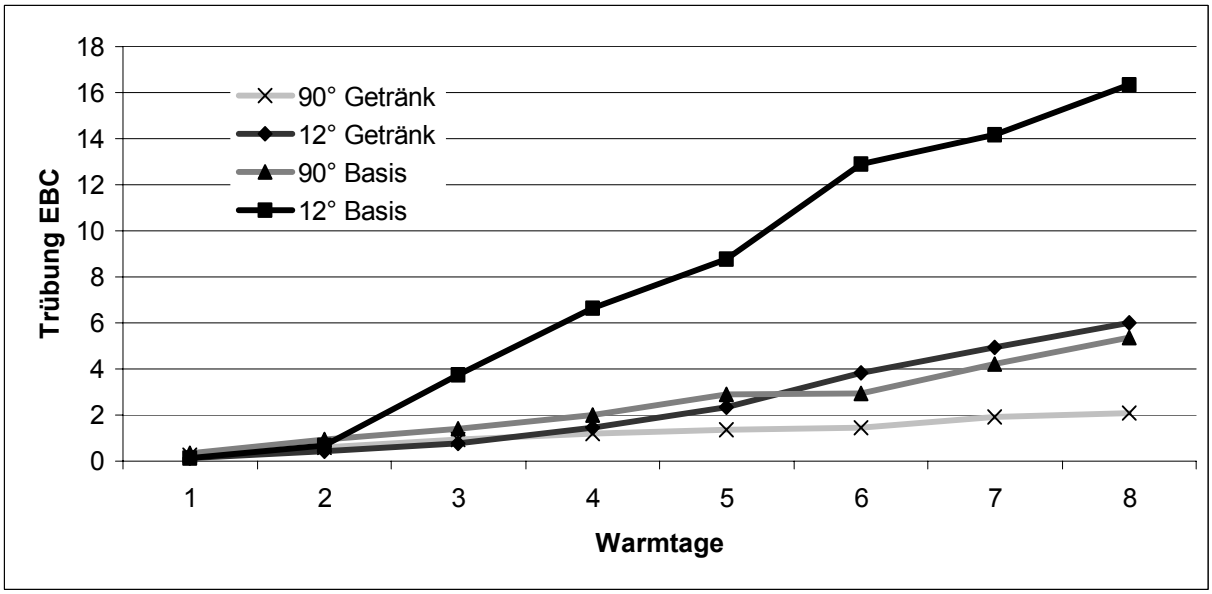



Abb. 7/1: Trübungsentwicklung von Getränk und Basis

Es ist zu erkennen, dass das Getränk mit fünf Warmtagen gegenüber der Basis mit zwei Warmtagen die höhere kolloidale Stabilität aufweist. Auffällig bei der Basis ist, dass die 12°-Trübung sich überproportional stärker entwickelt als die 90°-Trübung.

Die entstandene Trübung wurde anschließend abzentrifugiert und auf ihre Zusammensetzung analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7/1 dargestellt.

Tabelle 7/1: Trübungszusammensetzung von Getränk und Basis

| | Polyphenole | Anthocyanogene | Protein | Kohlenhydrate |
|---|---|---|---|---|
| **Basis** | **121,8 mg/l** | **5,3 mg/l** | **156 µg/mg** | **870 µg/mg** |
| **Getränk** | **n.n.** | **n.n.** | **148 µg/mg** | **700 µg/mg** |

Die Werte für Polyphenole und Anthocyanogene beziehen sich auf das gesamte Flüssigkeitsvolumen, die Werte für Protein und Kohlenhydrate auf die Masse an Zentrifugat.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass sich die Trübung überwiegend aus Kohlenhydraten zusammensetzt. Der Anteil an Polyphenolen und Anthocyanogenen ist gering im Vergleich zum Bier. Hier kommt zum einen der niedrigere Stammwürzegehalt zum Tragen, zum anderen werden viele phenolische Substanzen auch über den Hopfen eingebracht, der hier fehlt. Bei Maßnahmen zur Verbesserung der Stabilität sind diese Werte zu berücksichtigen.

Die mikrobiologische Untersuchung der Trübung blieb ohne Befund. Sowohl Getränk als auch Basis zeigten keine Spuren von Kontaminationen oder des Fermentationsorganismus.

Sauerstoff hat einen sehr hohen Einfluss auf die kolloidale Stabilität. Deshalb wurden nochmals Proben unter besonders sauerstoffarmen Bedingungen abgefüllt und dann forciert. Abbildung 7/2 zeigt die Verbesserungen der Stabilität für das Getränk.

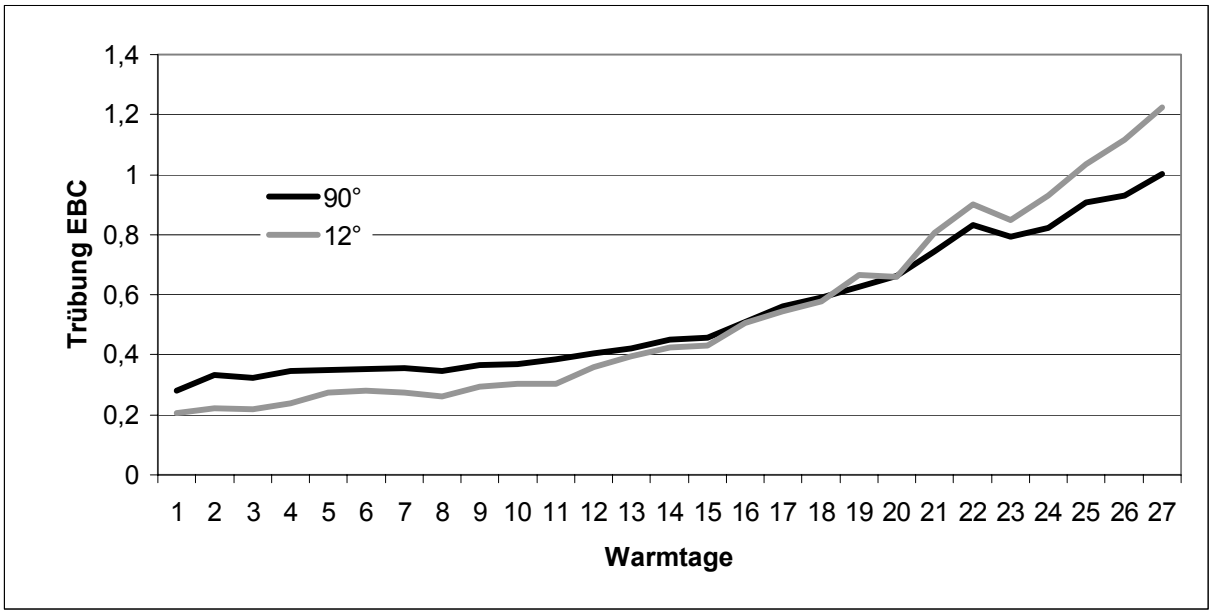



Abb. 7/2: Kolloidale Stabilität des Getränks nach sauerstoffarmer Abfüllung

Eine Trübungszunahme auf über 2 EBC-Einheiten ist auch nach 26 Warmtagen nicht zu verzeichnen. Zum einen wird hier der grosse Einfluss des Sauerstoffs deutlich, zum anderen zeigt das ausgemischte Getränk eine ausgezeichnete Stabilität. Für die Basis konnte keine deutliche Verbesserung festgestellt werden.

## 7.2 Einfluss der Kaltlagerung auf die kolloidale Stabilität

Bei der Kaltlagerung können trübungsrelevante Stoffe bereits ausfallen, die dann während der Filtration abgetrennt werden. Hierdurch soll eine Verbesserung der kolloidalen Stabilität erreicht werden. Die Lagerung erfolgte für eine Dauer von 24 Stunden, 72 Stunden, und 120 Stunden vor der Filtration. Die Getränke erreichten nach der Kaltlagerung alle über 20 Warmtage

Die Ergebnisse für die Getränke sind in Abbildung 7/3 dargestellt. Die gute Stabilität zeigt sich auch hier wieder. Der Forciertest wurde deshalb nach 20 Tagen abgebrochen. Die Trübungswerte nach 20 Warmtagen sind hier aufgeführt.

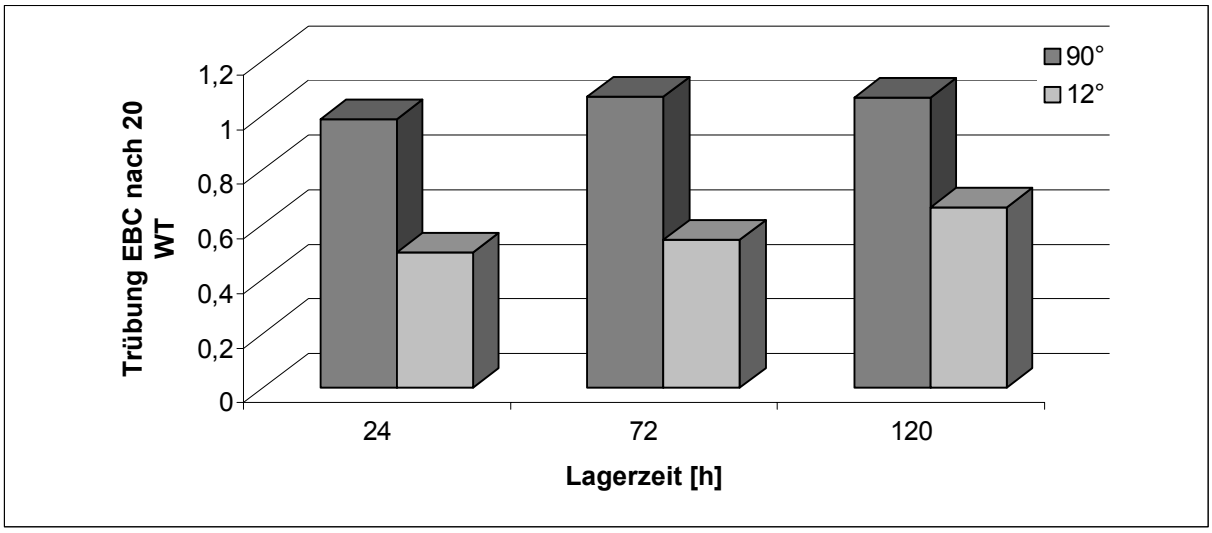



Abb. 7/3: Stabilität des Getränks bei verschiedener Kaltlagerung

Es ist kein großer Unterschied zwischen den einzelnen Kaltlagerphasen zu erkennen. Die Proben zeigen alle ähnliche Trübungswerte nach den Forciertests. Da die Getränke auch ohne Kaltlagerung eine gute Stabilität aufweisen, ist der Einfluss erwartungsgemäß gering.

Wie sich der Einfluss bei der wenig stabilen Basis bemerkbar macht, ist in Abbildung 7/4 zu sehen.

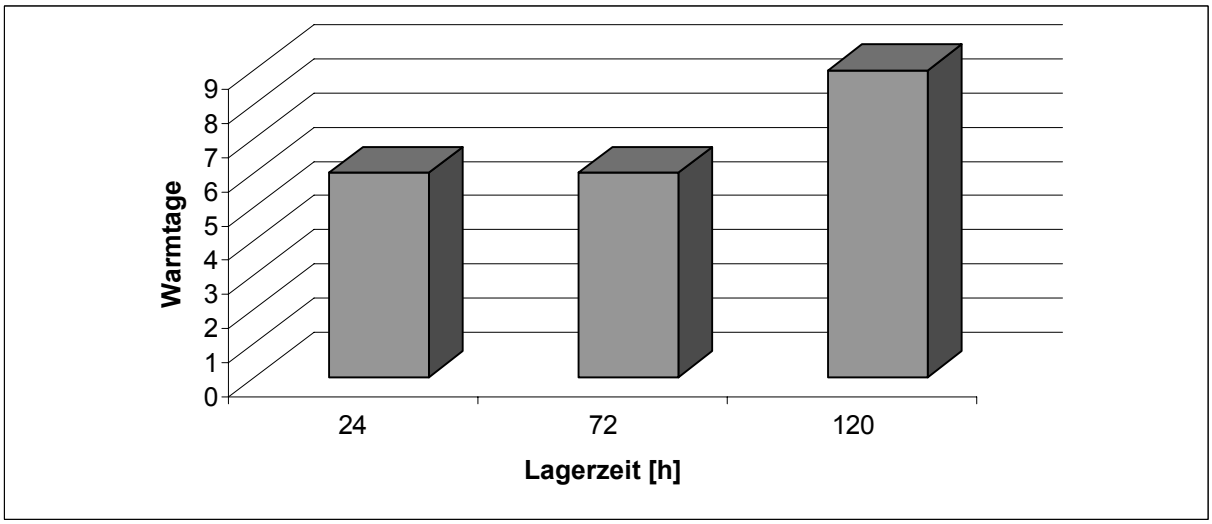



Abb. 7/4: Stabilität der Basis bei verschieden langer Kaltlagerung

Eine deutliche Verbesserung der Stabilität ist erst nach 5 Tagen Kaltlagerzeit zu erkennen. Die Basis erreicht hier 9 Warmtage. Nach 24 Stunden bzw. 72 Stunden ist eine Verbesserung der Stabilität um einen Warmtag zu erkennen. Eine Stabilität von 9 Warmtagen ist als gut zu bezeichnen, werden aber längere Distributionswege berücksichtigt, ist das Ergebnis sicherlich nicht ausreichend. Außerdem ist es nur anzunehmen, wie vielen Tagen unter Praxisbedingungen ein Warmtag entspricht (1 WT ≈ 1 Woche). Aus dieser Sicht ist eine höherer Stabilität wünschenswert.

### 7.3 Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Stabilität der Basis

Um auch für die Basis lange Stabilitätszeiten garantieren zu können, wurden verschiedene Stabilisierungsmittel getestet. Zum einen wurde mit PVPP stabilisiert. PVPP adsorbiert trübungsrelevante Polyphenolverbindungen, so dass diese ausfiltriert werden können. Zum andern wurde ein Kieselgelpräparat eingesetzt. Kieselgelpräparate stabilisieren eiweißseitig, das heißt sie binden trübungsbildende Proteine. Des Weiteren wurde auch eine Mischung beider Stabilisierungsmittel getestet.

Abbildung 7/6 zeigt die Trübungsentwicklung bei der 90°-Messung, Abbildung 7/7 die bei der 12°-Messung.

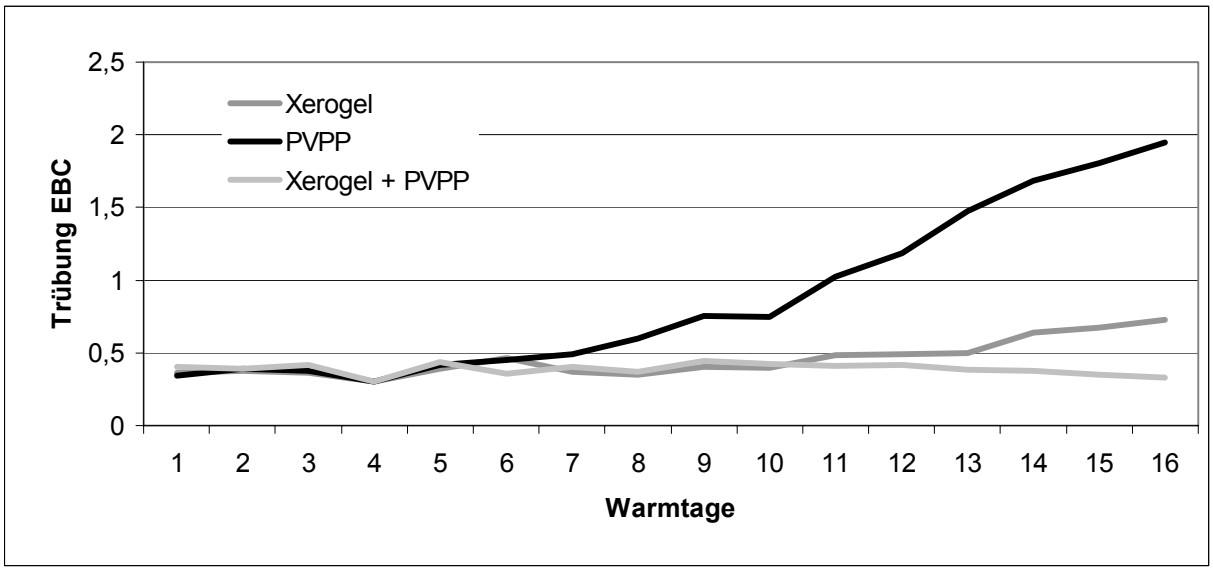



Abb. 7/6: 90°-Trübung der Basis bei verschiedenen Stabilisierungsmitteln

Die Stabilität der Basis wird durch den Einsatz der Stabilisierungsmittel deutlich erhöht. Nach 16 Warmtagen ist bei keiner Probe die Trübung auf über 2 EBC-Einheiten gestiegen. Bei alleiniger Stabilisierung mit PVPP erreicht die 12°-Trübung einen Wert von 1,9. Bei den Stabilisierungsmaßnahmen mit Xerogel bzw. Xerogel + PVPP liegen die Werte bei 0,3 bzw. 0,7 und damit wesentlich niedriger.

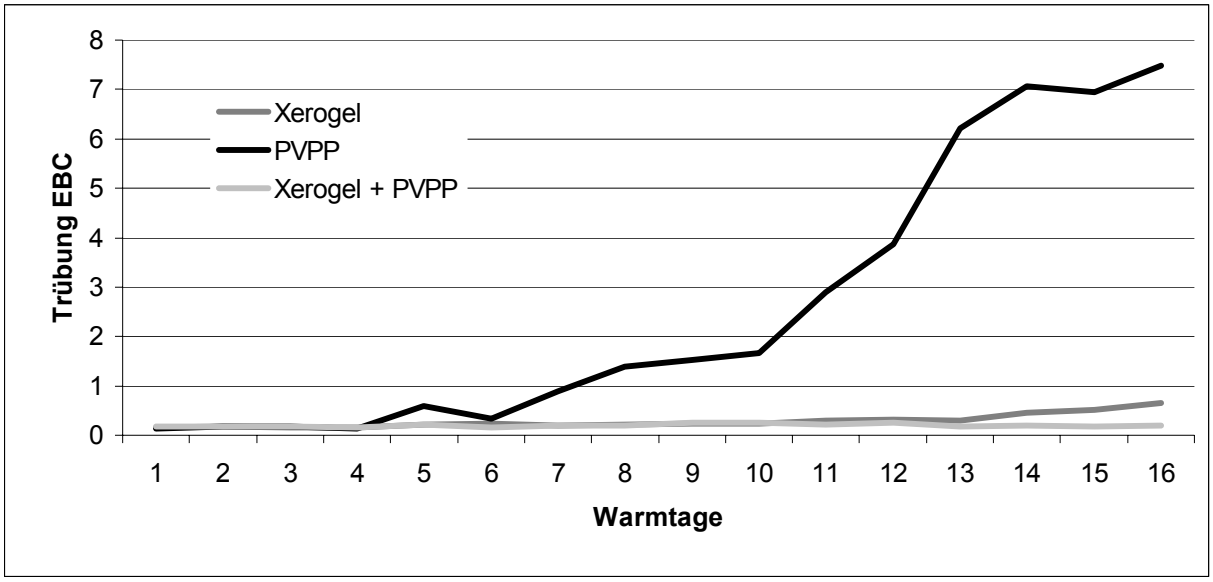



Abb. 7/7: 12°-Trübung der Basis bei verschiedenen Stabilisierungsmitteln

Die Ergebnisse der 12°-Messung spiegeln die der 90°-Messung wieder. Die alleinige PVPP-Stabilisierung hat keinen großen Einfluss, nach 11 Tagen ist eine Trübungszunahme auf über 2 EBC-Einheiten erreicht. Der Einsatz von Xerogel und von Xerogel + PVPP bringen eine deutliche Steigerung der kolloidalen Stabilität. Auch bei der 12°-Messung ist nur ein geringer Anstieg der Trübung zu beobachten (0,7 bei Xerogel/ 0,2 bei PVPP + Xerogel).

### 7.4 Trübungsentwicklung der unfiltrierten Basis und des unfiltrierten Getränkes

Die Produkte sind auch als „naturtrübe“, unfiltrierte Getränke zu vermarkten. Hierzu ist es notwendig, zu wissen, wie sich die Trübung über einen längeren Zeitraum verhält. Hierzu wurden verschiedene unfiltrierte Proben einem Forciertest unterzogen und die Trübung beobachtet. Bei diesen Proben wurde von Beginn an mit einer Kaltlagerung gearbeitet, um einen Großteil der Trübung vor der Abfüllung auszusedimentieren. Hierdurch sollte von Anfang an eine gleichbleibende Trübung erreicht werden.

Für die Getränke sind die Trübungsverläufe der 90°-Messung in Abbildung 7/8, der 12°-Messung in Abbildung 7/9 abgebildet. Die Trübungsverläufe der Basis sind in Abbildung 7/10 bzw. 7/11 dargestellt.

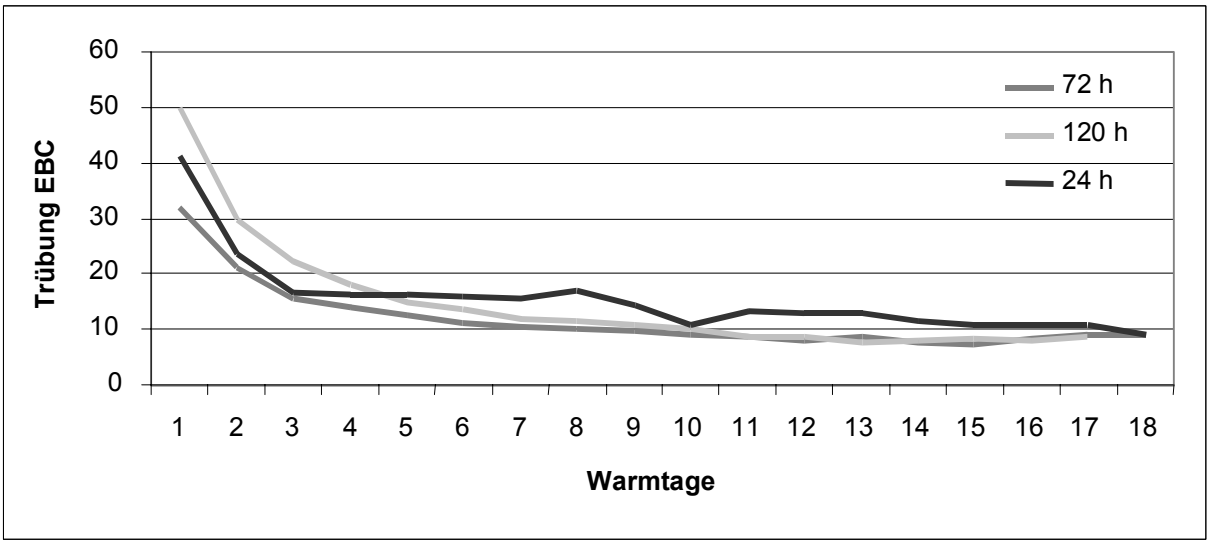



Abb. 7/8: Trübungsverlauf des unfiltrierten Getränks bei verschieden langer Kaltlagerung (90°Messung)

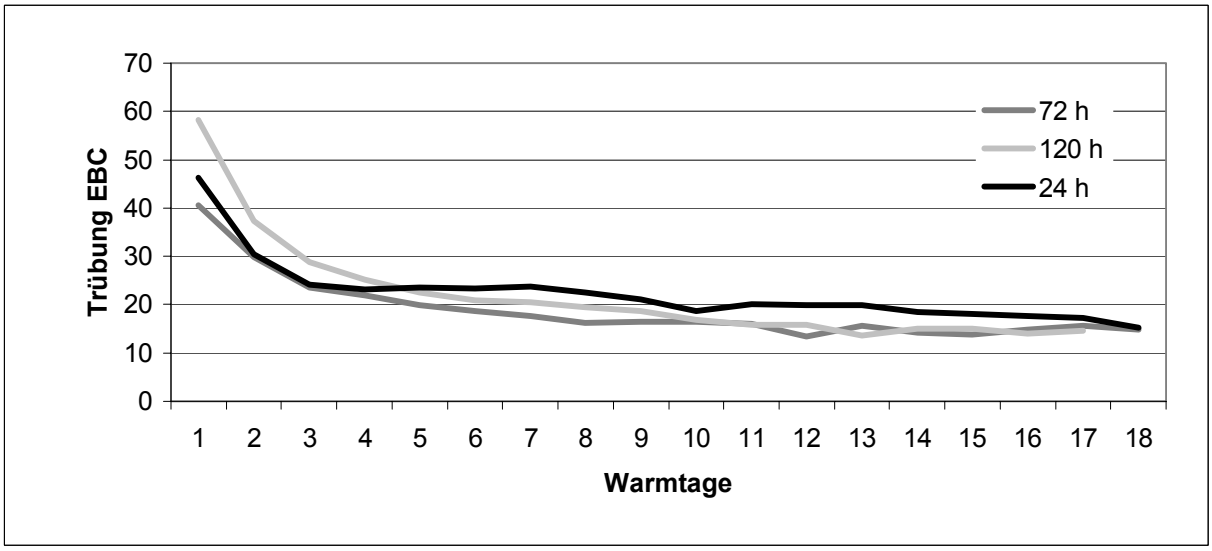



Abb. 7/9: Trübungsverlauf des unfiltrierten Getränks bei verschieden langer Kaltlagerung (12° Messung)

Aus den Trübungsverläufen ist zu sehen, dass die stärkere Anfangstrübung nach etwa 4 Tagen aussedimentiert. Die Trübung nimmt bis zum 10 Tag weiter ab und stabilisiert sich dann bei etwa 10 EBC-Einheiten (90°) bzw 15 EBC-Einheiten (12°). Ein weiteres Ausklaren der Getränke ist nicht zu beobachten. Ein Einfluss der Kaltlagerung ist nicht zu erkennen. Auch bei 120 Stunden Lagerzeit sedimentiert nach der Abfüllung anfangs noch ein Großteil der Trübung aus.

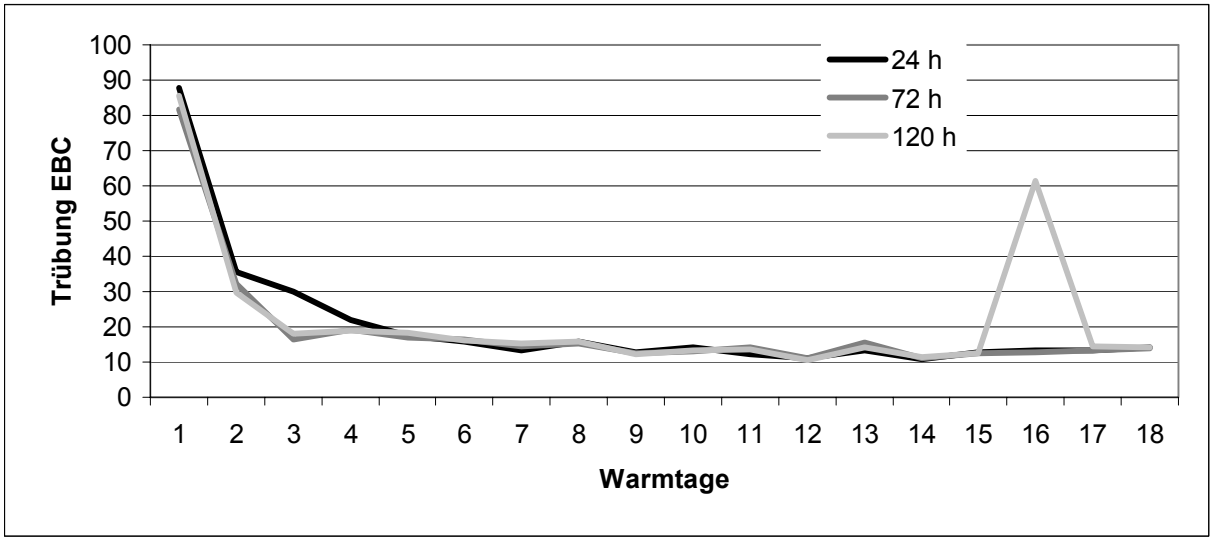



Abb. 7/10: Trübungsverlauf der unfiltrierten Basis bei verschieden langer Kaltlagerung (90°-Messung)

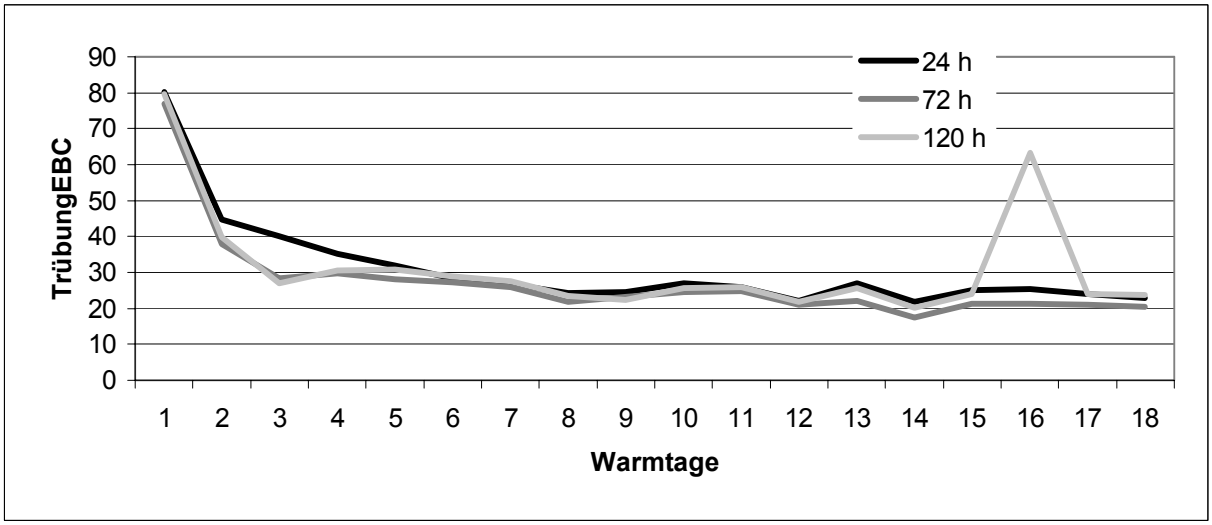



Abb. 7/11: Trübungsverlauf der unfiltrierten Basis bei verschieden langer Kaltlagerung (12°-Messung)

Die Ergebnisse für die Basis entsprechen den Trübungsverläufen der Getränke. Auch hier sedimentiert die hohe Anfangstrübung in den ersten vier Tagen aus. Danach stellt sich eine konstante Trübung ein. Sie beträgt etwa 10 EBC-Einheiten bei 90°-Messung und 20 EBC-Einheiten bei 12°-Messung. Ein Ausklaren der Basis ist nicht zu erkennen. Der Peak am 16. Warmtag ist auf ein Aufschütteln der Flasche zurückzuführen.

### 7.5 Einfluss der Pasteurisation

Obwohl bei allen Versuchen keine mikrobiologischen Befunde nachgewiesen wurden, ist das Getränk bzw. die Basis gegenüber Sekundärkontaminationen gefährdet. Im Abfüllbereich können Keime in das Getränk gelangen und auf Grund des Restzuckergehaltes anwachsen und negative Veränderungen bewirken. Um dieses Problem zu beheben, wäre eine Pasteurisation der abgefüllten Getränke sinnvoll. Ob die thermische Einwirkung einen Einfluss auf die kolloidale Stabilität oder auf den Geschmack hat, soll hier überprüft werden.

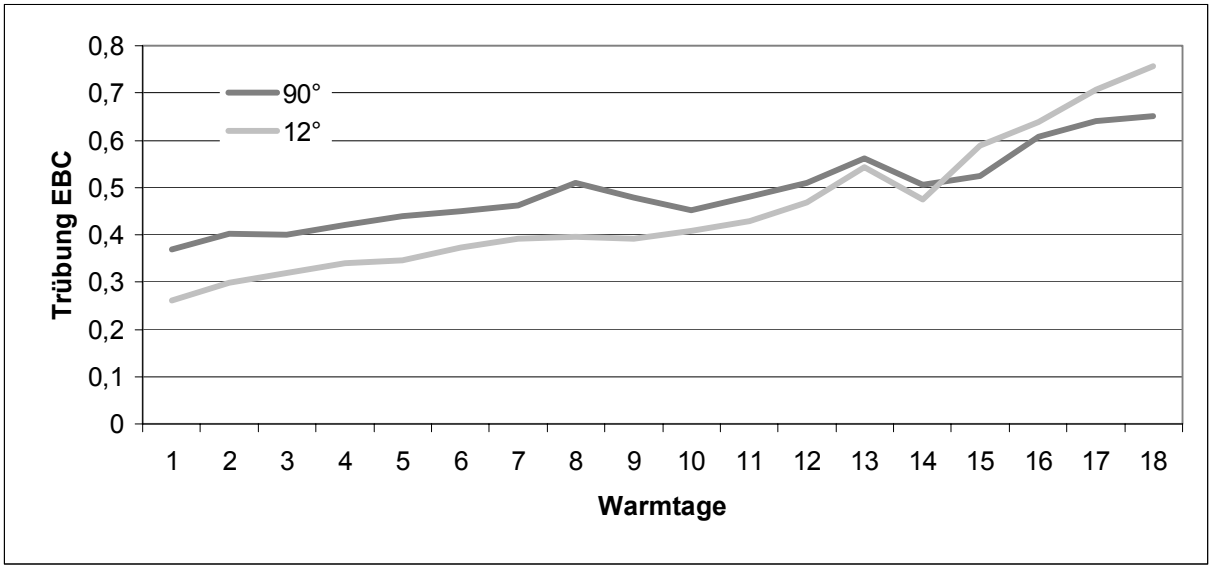



Abb. 7/12: Trübungsentwicklung nach der Pasteurisation

Ein Einfluss der Pasteurisation auf die kolloidale Stabilität ist nicht erkennbar. Auch nach 18 Warmatgen ist sowohl die 90°-Trübung als auch die 12°-Trübung noch unter 1 EBC-Einheit.

Ob die Pasteurisation einen negativen Einfluss auf den Geschmack hat, wurde anhand eines Dreiecks-Tests überprüft (Vgl. 9.7). Die pasteurisierte Probe wurde gegen eine nicht-pasteurisierte verkostet.

Bei einer Anzahl von 7 Prüfern hätten alle 7 die Proben richtig zuordnen müssen, um einen signifikanten Unterschied festzustellen. Einen Unterschied erkannten jedoch nur 2 Prüfer. Eine geschmackliche Beeinflussung durch die Pasteurisation ist somit auszuschließen.

# 8 Diskussion

Die Herstellung alkoholfreier fermentierter Getränke auf Malzwürzebasis erfordert eine sorgfältige Auswahl an geeigneten Mikroorganismen. Bei der Entwicklung einer Technologie zur Herstellung soll auf eine möglichst einfache Umsetzung in der Brauerei Rücksicht genommen werden.
In einer früheren Arbeit[1] wurde auf die Vorteile von *Gluconbacter*-Stämmen hingewiesen. Sie zeichneten sich durch einen hohe Umsetzung der Würzekohlenhydrate in Gluconsäure aus. Laktobazillen produzieren hingegen nur bis zu 2 % Säure.[2] Für die Verwendung von Laktobazillen sprechen aber andere gewichtige Gründe. Zum einen sind diese Mikroorganismen „brauereibekannt", sie werden zur biologischen Sauergutherstellung verwendet[3], aber auch in einigen Spezialbieren (Berliner Weisse[4], belgische Spezialbiere). Zum anderen sind diese Mikroorganismen beim Verbraucher geläufig und in ihrer gesundheitlichen Wirkung akzeptiert.[5] Dieses Argument wiegt besonders für die spätere Vermarktung der Getränke. Die Milchindustrie hat mit den Probiotik-Produkten ein sehr positives Image für Lebensmittel mit Laktobazillen aufgebaut.
Physiologisch gesehen sind außerdem 2% Milchsäure in der Basis ausreichend, da bei einer 1:1 Ausmischung die Säure-Konzentration mit 1 % immer noch im Bereich von Joghurt[6] liegt. Auch sensorisch ist eine solche Säuremenge ausreichend, um eine angenehme säuerliche Note in die Getränke zu bringen. Aufgrund dieser Argumente wurde die Verwendung von Laktobazillen als Fermentationsorganismus beschlossen. Eine Kombination mit *Gluconobacter* wird an späterer Stelle diskutiert.

Um aus der Vielzahl von Laktobazillen einen geeigneten Stamm herauszuselektieren, wurde eine eigene Stammsammlung angelegt (Vgl. 9.3). Es wurden ausschließlich Stämme aufgenommen, die an Würzemedium adaptiert sind und nicht als bierschädlich gelten. Es wurden hier aus verschiedenem Brauerei-Sauergut Laktobazillen Stämme isoliert. Das Selektionskriterium war die absolute Menge an gebildetem L(+)-Lactat.

---

[1] Vgl. Strachotta, T.: Grundlagen zur Herstellung neuartiger Getränke auf Malzbasis mit verschiedenen Mikroorganismen. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1998.
[2] Vgl. Back, W.: Biologische Säuerung. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft. Nr. 41. Nürnberg 1988, S. 152-156.
[3] Vgl. ebenda.
[4] Vgl. Narziß, L.: Abriss der Bierbrauerei. Stuttgart 1986, S. 359-360.
[5] Vgl. Hammes, P. und P. Tichazek: The potential of Lactic Acid Bacteria for the production of safe and wholesome food. In: Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung. 1994, S. 192-201.
[6] Vgl. Belitz; H.-D. und W. Grosch: Milch und Milchprodukte. In: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin 1992, S. 473.

Dieses Isomer ist ernährungsphysiologisch wertvoller als D (-)-Lactat, da nur dieses aufgrund der vorhandenen L-Lactatdehydrogenase metabolisiert werden kann.[1] Des Weiteren sollte aus sensorischen Gründen nur wenig Acetat gebildet werden. Ein unangenehmer Essigstich in den späteren Getränken lässt sich so vermeiden. Die Ergebnisse der Selektionsversuche sind in Kapitel 3.1 dargestellt. Aus den Ergebnissen lässt sich ablesen, dass die Stämme 07 und 10 die gestellten Anforderungen am besten erfüllen. Sie bilden im Vergleich am meisten L(+)-Lactat und wenig Acetat. Andere Stämme bilden zwar prozentual mehr L(+)-Lactat, sind aber von der Gesamtausbeute deutlich schwächer. Mit diesen Stämme ist eine gute Fermentation der Würze und damit eine ausreichende Säurebildung für die spätere Getränkeherstellung zu erwarten. Die ausgewählten Stämme sind der Art *Lb. amylolyticus* zuzuordnen. Für alle weiteren Versuche wurde Lb. amylolyticus SAG 07 ausgewählt.

Mit molekularbiologischen Methoden sollte überprüft werden, ob diese Stämme wirklich zu der vermuteten Art gehören und sich Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zeigen. In Kapitel 3.2 wurde zuerst die Zuordnung der Stämme zu der Art Lb. amylolyticus mittels RAPD-PCR–Technik geprüft. Die Methode eignet sich für Fingerprint-Analysen, sie benötigt wenig Zeit und Materialaufwand.[2] Es ist möglich hiermit *Bacillus*-Spezies und Typen innerhalb einer Spezies zu unterscheiden.[3] Beim Vergleich der entstandenen Bandenmuster wird deutlich, dass die beiden selektierten Stämme der Art *Lb. amylolyticus* zugeordnet werden können. Der Unterschied zu den nächsten Artverwandten ist offensichtlich. Es ist mit dem verwendeten Primer eine erste Einordnung der ausgewählten Laktobazillen möglich. Eventuelle Kreuzreaktion oder gleiche Bandenmuster mit anderen als den getesteten Laktobazillen könnten durch weitere Tests ausgeschlossen werden. Die molekularbiologischen Untersuchungen stehen jedoch nicht im Vordergrund dieser Arbeit, deshalb wurde auf weitere Untersuchungen an dieser Stelle verzichtet. Ob die beiden Stämme unterschiedlich sind und ob sie sich vom Typstamm unterscheiden, wurde anhand der AFLP-Analyse überprüft. Die Methode ist sehr gut geeignet, auch geringe Unterschiede (wie Stammunterschiede) im Genom festzustellen. Es können sehr viele DNA-Fragmente mittels PCR visualisiert werden. Die AFLP-Methode ist aussagekräftig und verlässlich, da sie die Reproduzierbarkeit der Restriktionsanalyse mit den Vorteilen der PCR-Technik verbindet.[4] Wie aus 3.2 ersichtlich ist, lassen sich auf dem Sequenziergel deutliche Unterschiede in den Bandenmustern erkennen. Zum einen ist sichtbar, dass die Spezifität der verwendeten Primer ausreicht, da die Unterschiede zu den verwendeten artfremden Stämmen sehr groß sind. Die Unterschiede zwischen den einzelnen *Lb. amylolyticus*-Stämmen sind so als stammspezifisch zu werten.

---

[1] Vgl. Baltes, W.: Lebensmittelchemie. Berlin 2000, S.333.
[2] Vgl. Newton, C. R. und A. Graham: Fingerprint-Analysen. In: PCR. Heidelberg 1994, S. 161.
[3] Vgl. Gibbs, R. A. et al.: o.T. In: Nucleic Acids Research Nr. 17. 1989, S. 3606.
[4] Vgl. Vos, P. et al.: AFLP: A new Technique for DNA Fingerprinting. In: Nucleic Acids Research. Vol. 23 Nr. 21, S. 4407

Zum andern lassen sich die beiden selektierten Stämme durch die Unterschiede in den Bandenmustern eindeutig vom Typstamm unterscheiden. Untereinander lassen sich jedoch keine Unterschiede erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um die gleichen Stämme handelt. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus den Ergebnissen der AFLP-Methode. Aus dem sichtbar gemachten Unterschied zwischen dem selektierten Stamm und dem Typstamm liesse sich ein Primer entwickeln, der spezifisch für den selektierten Stamm ist. Mit diesem Primer wäre dann eine einfache Identifizierung des Stammes über eine PCR möglich.

Es stellt sich als nächstes die Frage, ob eine herkömmliche Bierwürze für den selektierten Stamm als Fermentationsmedium geeignet ist. Es besteht die Möglichkeit, anhand technologischer Variationen, die Würzezusammensetzung für die Ansprüche des *Lb. amylolyticus SAG 07* zu optimieren. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Fermentationen mit einem synthetischen Würzemedium (Vgl. Kap. 9.5) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4 dargestellt. Der Hauptbestandteil der Würze sind, neben Wasser, Kohlenhydrate. Der Frage ob und wie die verschiedenen Würzezucker und Dextrine verstoffwechselt werden, kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Betrachtet man die Versuche mit nur einer Kohlenstoffquelle fällt auf, dass allein bei Fructose und bei den Dextrinen kaum Stoffwechselaktivität zu beobachten ist. Fructose wird daher möglicherweise nicht aus dem Medium aufgenommen. Gobetti berichtet über dieses Stoffwechselverhalten.[1] Obwohl diesem *Lactobacillus*-Stamm amylolytische Eigenschaften[2] zugeschrieben werden, findet eine Verstoffwechselung der Dextrine nicht statt. Dies kann aber durch die Qualität der Dextrine bedingt sein, da keine Maltodextrine verfügbar waren. Alleinige Anwesenheit von Saccharose zeigt auch kaum Stoffwechselaktivität. Bei Maltose und Glucose findet verstärkt Zellvermehrung statt. Dieses Verhalten zeigt eine gute Adaption des Mikroorganismus an die Würzekohlenhydrate (ca. 45 % Maltose). Sjöberg und Hahn-Hägerdahl berichten von einer Verwertung des ß-Glucose-1-Phosphats für den Aufbau von Polysacchariden bei der Zellwandsynthese von Lactococcen.[3] Dieses System könnte auch bei *Lb. amylolyticus* vorliegen. Bei Maltose als alleinige Kohlenstoffquelle wird außerdem am meisten Lactat gebildet. Generell ist die Stoffwechselaktivität mit einer einzelnen Kohlenstoffquelle nicht so hoch wie bei Anwesenheit mehrere C-Quellen. Grund dafür könnte die Reduzierung der Glykolyserate beim Wechsel vom homofermentativen auf heterofermentativen Stoffwechsel sein.

---

[1] Vgl. Gobetti, M. et al.: Maltose-Fructose co-Fermentation by *Lactobacillus brevis subsp. lindneri* CB1 Fructose-negative Strain. In: Applied Microbiology and Biotechnology 42. 1995, S. 939-944.

[2] Vgl. Bohak, I. et al.: *Lactobacillus amylolyticus sp. nov.* , isolated from Beer Malt and Beer Wort. In: Systematic and Applied Microbiology 21. Stuttgart 1998, S. 360-364.

[3] Vgl.: Sjöberg, A. und B. Hahn-Hägerdahl: ß-Glucose-1-Phosphat, a possible Mediator for Polysaccharide Formation in Maltose-Assimilating *Lactococcus lactis*. In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 55, No. 6. 1989, S. 1549-1554

In diesem Fall wäre von einer reduzierten Menge an Intermediaten aus der Glykolyse auszugehen, was in Folge die Aktivität der Enzyme, die um Pyruvat konkurrieren, beeinflussen würde. Das allosterische Enzym Lactatdehydrogenase von *Lb. casei* z.B. benötigt Fructose-6-Diphosphat (FDP) aus der Glykolyse.[1] Bei heterofermentativem Stoffwechsel wurden geringere Mengen an FDP gefunden.[2] Auf diesen Stresszustand reagieren die Laktobazillen mit Regulierung bestimmter Enzymaktivitäten, um dadurch Pyruvat vor der Reaktion zu Milchsäure zu bewahren. Statt dessen wird die Energie durch den Pyruvat-Formiat-Lyase Weg gewonnen. *Lb. amylolyticus SAG 07* könnte also bei Abwesenheit bestimmter C-Quellen in eine solche Stresssituation geraten und auf den heterofermentativen Weg umstellen. Diese Erkenntnisse werden dadurch unterstützt, dass bei Anwesenheit mehrerer C-Quellen alle Fermentationen mit besseren Ergebnissen verliefen. Bei allen C-Quellen im Ansatz wurde am meisten Zellsubstanz und die grösste Menge Milchsäure gebildet. *Lb. amylolyticus SAG 07* ist also sehr gut an die Kohlenhydratverhältnisse der Würze angepasst.

Ähnliche Erkenntnisse lassen sich auch aus den Versuchen der Wuchsstoffvariationen ableiten. Die Fermentationen, in denen ein Wuchsstoff im Ansatz weggelassen wurde, zeigten alle weniger Stoffwechselaktivität als im kompletten Ansatz. Diese Wuchsstoffe sind hauptsächlich als Co-Enzyme an wichtigen zellulären Reaktionen (z.B.Transaminierungen, Decarboxylierungen, Oxidationen) beteiligt. Fehlt einer dieser Substanzen sind viele Stoffwechselwege nicht mehr durchführbar. Der in der Literatur beschriebenen Bedarf an Wuchsstoffen[3] wird also an diesem Beispiel bestätigt.

Bei der Verwertung von verschiedenen Stickstoffquellen wird wieder deutlich, dass *Lb. amylolyticus* SAG 07 nährstoffreiche Wachstumsmedien braucht. Ohne Stickstoffquelle ist kein Wachstum und keine Lactatbildung feststellbar. Die gemessenen Mengen werden über die Vorkultur eingebracht. Auffällig ist, dass bei Verwendung beider N-Quellen weniger Aktivität als bei alleiniger Verwendung von Pepton zu verzeichnen ist. Eine Hemmung durch einen Caseininhaltstoff muss noch geklärt werden. *Lb. amylolytivus SAG 07* scheint also wie *Lb. helveticus* auxotroph für mehrere Aminosäuren zu sein. Diese Auxotrophie beruht auf dem Verlust, ein Biosyntheseenzym zu bilden. Zum Wachstum benötigen die Laktobazillen daher das Endprodukt des blockierten Syntheseweges.[4,5] Dieser Verlust rührt aus der Anpassung an die nährstoffreiche Umgebung.

---

[1] Vgl. Garvie, E.I.: Bacterial Lactate Dehydrogenases. In: Microbiological Review, 44. S. 106-139.

[2] Vgl. Thomas, T.D. et al.: Change from Homo- to hetereolactic fermentation by *Streptococcus Lactis* resulting from Glucose Limitation in anaerobic chemostat cultures. In: Journal of Bacteriology 138 Jg. 1979, S. 109-117.

[3] Vgl. Schlegel, H.-G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Stuttgart 1992, S. 296.

[4] Vgl. Morishita, T. et al. :Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acids biosynthetic pathways. In: Journal of Bacteriolgy 148. 1981, S. 64-71.

[5] Vgl. Chopin, A.: Organization and Regulation of Genes for Amino Acids synthesis in lactic acid Bacteria. In: FEMS Microbiological Reviews 12. 1993. S. 21-38.

Der Bedarf an Mineralsalzen von *Lb. amylolyticus SAG 07* zeigt, dass die Anwesenheit eines Mineralsalzes ausreicht. Es können bei den unterschiedlichen Zusammensetzungen des Mediums keine wesentlichen Unterschiede bei den Fermentationsergebnissen festgestellt werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass durch andere Medienbestandteile Mineralsalze in ausreichender Menge eingeschleppt wurden und so das Ergebnis beeinflussen. Auffällig ist eine vermehrte Lactatbildung bei Anwesenheit von KCl. Dies könnte auf einen gute Abpufferung der gebildeten Säure durch Kaliumsalze hinweisen.

Bei diesen Versuchen fielen immer niedrigere Werte für Säurebildung und Zellwachstum als bei Versuchen in frischer Würze auf. Der Grund dafür liegt bei dem notwendigen Autoklavieren des Mediums. Hierbei gehen eventuell verschiedene Vitamine oder Kohlenhydrate durch Maillardreaktionen verloren.

Zusammenfassend wird aus diesen Ergebnissen aber deutlich, dass Würze ein optimales Medium für eine Fermentation mit *Lb. amylolyticus SAG 07* darstellt. Eine Anpassung der Würze an den Mikroorganismus ist nicht notwendig, da der Mikroorganismus bestens adaptiert ist.

Mit dem selektierten Lactobacillus-Stamm und den gewonnenen Erkenntnissen über seine Stoffwechseleigenschaften sollten Parameter erarbeitet werden, die eine reproduzierbare Fermentation von Würze ermöglichen. Mit diesen Parametern sollte außerdem eine möglichst hohe Milchsäureproduktion erzielt werden.

Es zeigt sich, dass es bei einer Versuchstemperatur von 53°C zu einem Überschreiten des Temperaturoptimums kommt. Das Überschreiten des Temperaturoptimums führt dazu, dass wichtige Zellfunktionen sowie Reaktionsschritte gehemmt werden. Häufig sind Enzyme und enzymkatalysierte Systeme zuerst betroffen (z.B. enzymkatalysierte Transportsysteme in die Zelle zur Aufnahme von Metaboliten). Bei 43°C wird deutlich, dass die Temperatur ebenfalls nicht im optimalen Bereich liegt. Allerdings verkraften die Zellen Temperaturen unterhalb des Optimums besser, als oberhalb, da dieses zu dauerhaften Schädigungen an den Zellen führen kann. Da das Hauptkriterium auf einer möglichst hohen Lactatkonzentration liegt, empfiehlt sich ein Temperaturbereich von 46°C-49°C, da hier die höchsten Werte an DL-Lactat erreicht wurden. Es ist sinnvoll, mit einer möglichst hohen Temperatur zu fermentieren, da dieses die Gefahr von Kontaminationen mit Fremdhefen (wie z.B. *Candida sp.*) verringert. Im Bereich von 46°C – 49°C wurden keine signifikanten, sensorischen sowie Konzentrationsunterschiede für Lactat festgestellt.

Es wurden weitere Einflussfaktoren wie die Würzekonzentration untersucht:

Bei einer Substratkonzentration von 3 GG % konnte nur eine ungenügende pH-Abnahme erzielt werden. Es wäre möglich, dass die Laktobazillen nicht ausreichend mit Nähr- und Wuchsstoffen versorgt werden können. Wahrscheinlicher ist aber, dass die natürliche Pufferkapazität der Würze hier nicht ausreicht, um mehr Milchsäure zu bilden, Die gebildete Milchsäure hemmt die weitere Produktbildung. Vorderwürzekonzentrationen um 10 GG % haben sich als optimal herausgestellt. Hier scheint das Optimum von Nährstoffversorgung und Pufferkapazität zu liegen. Über 10 GG % ließen sich durchaus noch Fermentationen mit akzeptablen DL-Lactatwerten erzielen, jedoch bekam das Produkt eine zu würzige und malzige Note.

Bei den Versuchen mit unterschiedlichen Anstellzellzahlen wurden bei Zellgaben bis 10 $*10^6$ Zellen/ml keine ausreichende DL-Lactatkonzentrationen innerhalb einer Fermentationszeit von 40 Stunden erreicht (siehe Tabelle 5.3). Die Zellgabe war zu gering, bzw. die Menge die vorhanden sein muss, um möglichst von Beginn ausreichende Zellzahlen, eine schnelle und kontinuierliche Lactatbildung und damit auch eine pH–Abnahme zu erzielen, war unterschritten. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass immer ein bestimmter Anteil der Zellen sich nicht in seinem optimalen Aktivitätszustand befindet, bzw. ein gewisser Teil abgestorben ist. Die höchsten Raten der Lactatbildung scheinen in der Phase der größten Zellvermehrung erreicht zu werden. Ab 100 $*10^6$ Zellen/ml zeigte sich bei der DL-Lactatbildung wieder eine leicht fallende Tendenz. Eine zu hohe Anstellzellzahl sollte vermieden werden, da diese eine geringere Vermehrung mit sich bringt. Statt junger, aktiver Zellen, fermentieren weniger aktive Zellen. Ein Bereich zwischen 20 und 60 $*10^6$ Zellen/ml ist als optimal anzusehen. Ein entscheidender Einfluss auf die Fermentationsdauer ist in diesem Bereich nicht festzustellen.

Auffällig bei den Versuchen zu verschiedenen Sauerstoffsättigungskonzentrationen ist die deutlich ansteigende Tendenz an erzielbaren DL-Lactatwerten, je höher die anfängliche Sättigungskonzentration an $O_2$ ist. Da die Laktobazillen keine Atmungsphase wie die Hefen besitzen, die nach dem $O_2$-Verbrauch und der Vermehrungsphase, auf Gärung umschalten, ist dieser Tatbestand ungeklärt und widerspricht der Literatur [1,2]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Laktobazillen durch die Begasung mit $N_2$ empfindlich gestört werden, wie es noch nachfolgend beschrieben wird. Bei der Eichung der $pO_2$-Elektrode erfolgt eine Begasung mit $N_2$ je nach gewünschter Sauerstoffsättigungskonzentration einmal (100% Sauerstoffsättigung) oder zweimal (0% Sauerstoffsättigung). Somit ist die Dauer der Begasung, um bei anaeroben Zuständen anzustellen, doppelt so hoch wie bei 100% Sauerstoffsättigung.

[1] Vgl. Kunze, W.: Technologie Brauer und Mälzer. Berlin 1994. S. 184-185.
[2] Vgl.Back, W.: Biologische Säuerung, In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 41, 4, 1988, S. 152–156.

Bei Versuchen (Substrat: Vorderwürze) mit kontinuierlichen Begasungen zeigte sich, dass die höchsten Werte an DL-Lactat und die größte pH-Absenkung bei einer Begasung mit $CO_2$ erzielt wurden. Bei einer kontinuierlichen Begasung mit $N_2$ kamen die Fermentationen fast vollständig zum Erliegen und die pH-Werte konnten nicht unter 4,5 gebracht werden. Es stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss der Stickstoff auf die Aktivität der Mikroorganismen hat. $N_2$ gilt als Inertgas und eine starke Anreicherung des Substrates mit $N_2$ und daraus resultierende, negative Einflüsse scheinen daher auszuscheiden. Ob es jedoch zu einer Anreicherung innerhalb der Zellen kommt und dieses zu einer Inhibierung führt, müsste gegebenenfalls gesondert untersucht werden. Eine Begasung mit $CO_2$ ist nicht nur für die Fermentation von Vorteil: ähnlich einer $CO_2$-Wäsche bei der Bierlagerung trägt es dazu bei, unerwünschte, flüchtige Aromen auszutreiben.
Insgesamt lassen sich bei folgenden Fermentationsbedingungen die besten Ergebnisse erzielen: Temperatur 49 °C, Würzekonzentration 10 GG%, Anstellzellzahl 20-60 $*10^6$ Zellen/ml, kontinuierliche $CO_2$ -Begasung. Sensorisch liefern die unter diesen Bedingungen hergestellten Substrate frische und spritzige Getränke, die ein ausgewogenes Zucker/Säureverhältnis (Ratio) besitzen.
Diese Ergebnisse lassen sich problemlos im Großmaßstab reproduzieren wie die Ergebnisse in Kapitel 5.2 zeigen. Im Scale-up wurden mit denselben Parametern vergleichbare Ergebnisse erzielt. Dies bedeutet, dass eine großtechnische Umsetzung in einer Brauerei unkompliziert möglich sein sollte. Damit ist ein wesentliches Ziel dieser Arbeit erreicht. Das unerwünschte DMS-Aroma entsteht bei den hohen Fermentationstemperaturen aus dem aktiven DMS-Precursor. Dieser wird bei der normalen Würzebereitung durch thermische Behandlung zu DMS umgewandelt und ausgetrieben.[1] Da die Würze für die alternativen Gärgetränke nur kurz gekocht werden sollte, bleiben große Mengen an DMS-Vorläufer in der Würze und werden noch aus dem inaktiven Vorläufer gebildet. Diese werden während der Fermentation zu freiem DMS. Das Problem wurde erst deutlich, nachdem in der großen Anlage nicht kontinuierlich $CO_2$ eingeblasen wurde. Das freie DMS ist aber mit einer $CO_2$-Wäsche während der Fermentation unter den Geschmacksschwellenwert auszutreiben. Hierzu ist allerdings keine permanente, sondern nur eine periodische Begasung (alle 60 min 10 min) notwendig.

Wird die Fermentation mit den erarbeiteten Parametern durchgeführt, kommt sie bei ca. pH 3 zum Erliegen. Es findet keine weitere Produktbildung und Zellvermehrung mehr statt. Die Kohlenhydrate der Würze sind nur zu 15% verwertet. Durch die Regulierung des pH-Wertes könnte zum einen die Lactatproduktion erhöht werden. Zum anderen könnten die Produkte durch eine intensivere Kohlenhydratverwertung mikrobiologisch stabiler sein. Eine pH-Regulierung kann mit zwei verschiedenen Maßnahmen erfolgen.

[1] Vgl. Narziß, L.: Abriss der Bierbrauerei, 6.Aufl. Stuttgart 1995, S. 180.

Erstens kann ein geeigneter Puffer vorgelegt werden, der eine entsprechende Menge Milchsäure abpuffert. Zweitens kann die Kultur durch Laugedosage pH-statisch reguliert werden. Die Versuchsergebnisse hierzu sind in Kapitel 5.3 dargstellt. Aus den Vorversuchen wird deutlich, dass *Lb. amylolyticus SAG 07* optimalen Wachstums-pH-Werte bei pH 5,0 hat. Zwischen pH 4,6 und pH 5, sind aber vergleichbar hohe Wachstumsraten zu erhalten. Im diesem Bereich lässt sich aufgrund ihrer pKs-Werte am besten mit einem Acetat- oder Citrat-Puffer arbeiten. Beide Puffer werden auch nicht als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt. Allerdings zeigt *Lb. amylolyticus SAG 07* in Anwesenheit von Citrat nur ein schwaches Wachstum. Dass Citrat das Wachstum von Laktobazillen hemmt, wurde an anderer Stelle schon festgestellt.[1] Für sämtliche verwendeten Puffersubstanzen wurde eine Toleranzkonzentration von >333 mmol/l festgestellt. Für Lacat liegt die Grenze etwa bei 270 mmol/l. Es kann also auch durch pH-Regulierung nicht unbegrenzt Lactat produziert werden, sondern nur etwa 270 mmol/l. Dies entspricht 24 g/l Lactat. Es können daher maximal 330 mmol/l ( 5,9 g/100ml) Kohlenhydrate verstoffwechselt werden.

Dieses Ziel gilt es mit den gepufferten Fermentationen zu erreichen. Technologisch wären diese Fermentationen wesentlich einfacher umzusetzen als eine pH-statische Kulturführung. Der Puffer könnte beim Fermentationsbeginn vorgelegt werden. Die Ergebnisse zeigen bei der Pufferung mit Acetat zwar die gewünschte Milchsäureproduktion und die Verringerung der Gesamtkohlenhydrate. Sensorisch hingegen weisen diese Getränke einen nicht akzeptablen Essigstich auf. Diese Pufferung führt daher nicht zum gewünschten Erfolg. Auch die Versuche mit Citrat-Puffer sind fehlgeschlagen. Es bestätigt sich, dass Citrat unabhängig von der Salzkonzentration die Lactatbildung bei *Lb. amylolyticus* hemmt. Mit diesen beiden Puffersystemen ist die Fermentation also nicht zu intensivieren. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Pufferung mit Malat (pKs=5,05). Bei der Rotweinbereitung wird das Malat zu Milchsäure umgewandelt[2]. Nach der Pufferung könnte das Malat also noch verbraucht werden. Dies gilt es an anderer Stelle zu überprüfen.

Die genaue Regulierungszeit zu berechnen, die nötig ist, um die Milchsäureproduktion soweit voranzutreiben, dass eine anschließende pH-Absenkung auf pH 3,0 stattfindet, ist nahezu unmöglich. Einflussfaktoren wie Zustand der Vorkultur, Pufferkapazität der Würze, Eigenpufferung des Lactats bei verschiedenen pH-Werten sind zu groß. Es wurde versucht, empirisch eine Dosiermenge zu finden, die eine anschließende pH-Absenkung möglich macht. Eine solche Steuerung ist technologisch aufwendiger als eine Pufferung und damit nicht ohne größere Investitionskosten in der Brauerei umzusetzen.

---

[1] Gänzle, U: persönliche Mitteilungen

[2] Vgl. Lonvaud-Funel, A.: Microbiology of the Malolactic Fermentation: Molecular Aspects. In: FEMS Microbiology Letters 126. 1995, S. 209-214.

Eine zusätzliche, ernährungsphysiologische Aufwertung der Getränke ist durch die Wahl der zu dosierenden Lauge möglich. Es wurde hier Kaliumdicarbonat verwendet, womit noch mehr Kalium in das spätere Getränk eingebracht werden kann.
Die tiefsten pH-Werte wurde bei den Ansätzen erreicht, bei denen kleine Mengen an Lauge dosiert wurden. Allerdings waren hier die Lactatwerte wesentlich geringer als bei einer nicht pH-statischen Fermentation. Hohe Lactatwerte ließen sich nur mit höherer Laugendosage erreichen, hier konnte der pH-Wert am Ende nicht mehr weit genug abgesenkt werden. Ein Abfangen der entstehenden Säure scheint also nicht unbedingt in einer höheren Lactatproduktion zu resultieren. Es scheinen andere Stoffwechselwege beschritten zu werden. Erst bei weiterer Dosage wird mehr Lactat gebildet. Mit weiteren Versuchen wären diese Zusammenhänge zu klären und die Ergebnisse zu optimieren. Der Aufwand steht allerdings in keinem Verhältnis zum Nutzen. Die Lactatproduktion wird nur um wenige Gramm pro Liter gesteigert. Auch die niederen Kohlenhydrate, die einen Einfluss auf die mikrobiologische Stabilität haben, erfahren keinen größeren Abbau. Die unregulierte Fermentation ist aufgrund der einfacheren Handhabung die bessere Alternative.

Wie erwähnt, wurde versucht, die Vorteile der *Gluconobacter*-Fermentation mit denen der *Lactobacillus*-Fermentation zu verbinden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 5.2 dargestellt.
Bei allen Versuchen wurde festgestellt, dass die Reihenfolge *Lactobacillus*-Fermentation mit anschließender *Gluconobacter*-Fermentation nicht zum gewünschten Erfolg führt. *Gluconobacter* baut die im ersten Fermentationsschritt entstandene Milchsäure ab. Der hier verwendete Stamm besitzt also eine Lactat-Dehydrogenase, die entstandenes Lactat über Pyruvat zu Acetat abbaut[1]. Eine stöchiometrisch gleiche Bildung von Acetat konnte jedoch nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung ist die Anreicherung von Acetat in den Zellen. Diese wurden vor der Analyse abzentrifugiert und so könnte das Acetat in der Analytik nicht erfasst worden sein.
Um aber weiterhin Lactat in den Getränken zu haben, muss die *Gluconobacter*-Fermentation vor der Laktobazillen-Fermentation erfolgen. Dies ist wie in den Ergebnissen gezeigt, auch möglich. Im ersten Abschnitt wird Gluconsäure gebildet mit einer entsprechenden Abnahme der Kohlenhydrate. Im zweiten Fermentationsabschnitt wachsen die Laktobazillen schnell an und produzieren ausreichend Lactat. Die Gluconsäure geht zwischen den beiden Fermentationsabschnitten, in der Aufarbeitungsphase, zum Großteil verloren. Da *Gluconobacter* die gesamte Wachstumsphase durchlaufen hat, ist die Autolyse der Zellen in der Absterbephase naheliegend. Hierbei können durch das Zentrifugieren Enzyme aus den Zellen freigesetzt werden, die die Gluconsäure umwandeln.

[1] Vgl. Matsushita, K. et al.: Respiratory Chains and Bioenergetics of acetic acid bacteria. In: Advances in Microbial Physiology 36. 1994, S. 247-301.

Auch die reduzierenden Bedingungen nach dem Umstellen auf die anaeroben Verhältnisse könnten für eine Reduktion der Gluconsäure verantwortlich sein. Nach Start der Laktobazillen-Fermentation findet eine Zunahme der niederen Kohlenhydrate statt. Dies könnte zum einen durch die amyloyltischen Eigenschaften der Laktobazillen begründet sein, die eventuell weiter Zucker aus den Dextrinen der Würze abbauen. Zum anderen könnten die Kohlenhydrate aus der Gluconsäure aufgebaut werden. Sjöberg und Hahn-Hägerdahl berichten über eine Polysaccharidbildung durch *Lactococcus Lactis.*[1] Ob hier eine Zusammenhang besteht und welche Stoffwechselwege beschritten werden, bedarf der Klärung. Es wird auch deutlich, dass die Laktobazillen noch bei pH 2,3 Stoffwechselaktivität zeigen. Das beweist, dass der intrazelluläre pH-Wert von Bedeutung ist und weniger der des Mediums. In dieser Reihenfolge lässt sich also in Kombination mit *Gluconobacter* eine Lactat angereicherte Basis herstellen.

Um den technologisch Aufwand des Abzentrifugierens der Kulturen zu vermeiden, wurden Versuche durchgeführt, beide Mikroorganismen gleichzeitig anzuimpfen und nur die Fermentationsbedingungen zu ändern. Die Reihenfolge *Lactobacillus/Gluconobacter* führte aus den erwähnten Gründen nicht zum Erfolg. Allerdings sind auch in anderer Reihenfolge keine zufrieden stellenden Fermentationsergebnisse zu erzielen. Der physiologische Zustand der angeimpften Zellen ist nach der aeroben Fermentation so schlecht, dass durch den Wechsel der Bedingungen keine Stoffwechselaktivität mehr möglich ist.

Als weiteres wurde versucht, beide Stämme getrennt bis zur log-Phase herzuführen, dann zu verschneiden und auf die jeweiligen Bedingungen einzustellen. Die aeroben Verhältnisse im zweiten Fermentationsabschnitt bewirken ein Überwachsen durch *Gluconobacter*. Auch hier wird wieder Lactat abgebaut, so dass diese Reihenfolge nicht zielorientiert ist. Wird die Fermentation unter „Laktobazillen-Bedingungen“ weitergeführt, setzen sich diese deutlich durch, es kommt zu einer Lactatbildung. Allerdings ist *Gluconobacter* am Anfang noch in der Lage, etwas Lactat abzubauen, was sich in einer niedrigeren Endausbeute zeigt. Kurzer Sauerstoffmangel macht sich bei *Gluconobacter* wenig bemerkbar. Eine Optimierung der ersten Fermentationsphase könnte aber für höhere Lactatausbeuten sorgen. Damit wird deutlich, dass eine Kombination der Mikroorganismen durch Verschneiden zweier Fermentationen in der logarithmischen Wachstumsphase und anschließender Regulation der Fermentationsparameter möglich ist. So kann das aufwändige Abtrennen der Mikroorgansimen umgangen werden.

---

[1] Vgl.: Sjöberg, A. und B. Hahn-Hägerdahl: ß-Glucose-1-Phosphat, a possible Mediator for Polysaccharide Formation in Maltose-Assimilating *Lactococcus lactis.* In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 55, No. 6. 1989, S. 1549-1554.

Ein wesentlicher Grund für die Versuche mit beiden Mikroorganismen war in erster Linie die Sensorik. Nach der Laktobazillen-Fermentation ist immer noch ein leichtes Würzearoma in der Basis zu erkennen. Dies kann teilweise als negativ beurteilt werden. Die Würzenote lässt sich nur beim Ausmischen durch Aromatisieren überdecken. Nach der *Gluconobacter*-Fermentation war das Würzearoma nicht mehr feststellbar. Deshalb sollte mit den kombinierten Fermentationen versucht werden das negative Aroma zu entfernen. Es wurde ein feiner süßlich-honigartiger Geruch festgestellt. Der Geschmack war frisch, säuerlich und harmonisch. Ein Würzearoma konnte nicht mehr festgestellt werden. Durch Verwendung beider Mikroorganismen lassen sich die Vorteile beider Fermentationen verbinden. Die Möglichkeit des Verschneidens macht dies technologisch einfach umsetzbar.

Die Getränke können als trübe und filtrierte Getränke vermarktet werden. Um ein blankes Produkt herzustellen, muss eine geeignete Filtrationstechnologie gefunden werden. In der Brauindustrie ist die Filtration mit Kieselgur am gebräuchlichsten. Deshalb wurde auch hier versucht, mit dieser Technologie zu arbeiten. Dabei stehen die Filterstandzeit, die Trübungsentwicklung und die mikrobiologische Sicherheit im Vordergrund. Aus den in Kapitel 6 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass mit den angeführten Optimierungen der Kieselgurdosage und der Kaltlagerung eine Filterstandzeit von über 5 h zu erreichen ist. Bei den zu erwartenden Mengen, die zu filtrieren sind, ist diese Standzeit als völlig auszureichend zu betrachten.

Die Trübungswerte sind als gut zu bezeichnen. Beim Bier wird bis 1 EBC-Formazin-Trübungseinheit das Produkt als glanzfein bis klar beurteilt.[1] Die hier erzielten Werte liegen um eine Zehnerpotenz niedriger. Die Kaltlagerung hat noch einen geringen Einfluss, die Trübungswerte liegen etwas niedriger. Der Einfluss wird sich bei der Stabilität stärker bemerkbar machen. Eine wesentliche Funktion der Filtration ist die Entfernung der Mikroorganismen. Hier wurde mit verschiedenen Sterilschichten gearbeitet. Eine Abtrennung der Laktobazillen ist schon mit einer relativen Klärschärfe von 0,2 µ sicher zu erreichen. Die geforderte Keimfreiheit wird mit einer Klärschärfe von 0,1 µ erreicht. Die Keime, die noch durch die 0,2 µ-Schicht gelangen, waren latent in einer Würze vorhanden und sind für die Fermentation und die Getränke keine Gefahr. Durch steriles Arbeiten sind sie schon im Vorfeld zu vermeiden. Sie konnten sich in keinem Versuch durchsetzen. Lediglich unter den optimalen Wachstumsbedingungen des Spurennachweises waren sie festzustellen. Trotzdem sollte aufgrund möglichsten Sicherheit die schärfste Sterilschicht verwendet werden.

Es wird deutlich, dass mit dieser Filtrationstechnologie ein blankes, mikrobiologisch einwandfreies Filtrat mit den entsprechenden Standzeiten produziert werden kann. Bei der Umsetzung in der Praxis ist eine Filtration auf der Bierlinie sicher nicht praktikabel, um etwaige Einflüsse auf die Bierqualität zu

[1] o.V.:Trübungsneigung. In: Brautechnische Analysenmethoden Band 2. 3. Aufl. Pfenninger H. (Hrsg.) Freising 1993, S. 157.

vermeiden. Das Arbeiten mit einer vertrauten Technologie macht die Umsetzung aber wesentlich einfacher.

Für den späteren Vertrieb der Getränke sind Aussagen über die chemisch-physikalische und über die mikrobiologische Stabilität unabdingbar. Um hier erste Ergebnisse zu bekommen, wurde sowohl die Basis als auch ausgemischte Getränke forciert gealtert und entsprechend analysiert. Da zur Herstellung der alternativen Gärgetränke die selben Rohstoffe wie zur Bierbereitung verwendet werden, sind sicher auch die Trübungsbildungsprozesse ähnlichen Gesetzmäßigkeiten unterworfen. Hierbei treten komplexe Wechselwirkungen zwischen Eiweiß, Polyphenolen und Kohlenhydraten unter Beteiligung von Sauerstoff und Metallionen auf. Das daraus resultierende Produkt ist die kolloidale Trübung.[1]

Unter Berücksichtigung sauerstoffarmer Verhältnisse bei der Abfüllung zeigte sich, dass die Getränke im Gegensatz zur Basis eine sehr gute Stabilität besitzen (Vgl. 7.1). Dies ist darin begründet, dass mit der Ausmischung eine Verdünnung von 1:1 verbunden ist. Hierdurch werden auch die trübungsrelevanten Bestandteile auf die Hälfte reduziert. Eine überproportionale Erhöhung der kolloidalen Stabilität bei Verdünnung wurde auch schon für Bier festgestellt.[2] Vergleicht man bei der Basis die Trübungen der 12° und 90°-Messungen, fällt auf, dass die 12°-Trübung wesentlich schneller und stärker steigt. Dies deutet auf eine Trübung, bedingt durch Kohlenhydrate, hin.[3] Der Restzuckergehalt der Basis ist eine Erklärung dafür. Die Analyse der Trübungszusammensetzung bestätigt diese Erklärung, da das Verhältnis von Kohlenhydraten zu Proteinen eindeutig auf Seiten der Kohlenhydrate liegt. Der Gehalt an phenolischen Substanzen ist im Vergleich zum Vollbier wesentlich geringer. Zum einen kommt hier der niedrigere Stammwürzegehalt zum Tragen, zum anderen fehlen die Polyphenole des Hopfens.

Um die kolloidale Stabilität der Basis zu erhöhen, wurde zum einen eine Kaltlagerphase vor der Filtration getestet, zum anderen wurden verschieden Stabilisierungsmittel eingesetzt (Vgl.7.2/7.3). Bei der Kaltlagerung ist erst nach 5 Tagen eine deutliche Verbesserung der kolloidalen Stabilität zu erkennen. Zur Stabilitätsverbesserung sollte also mindestens 5 Tage bei 0°C, eine gelagert werden.[4]

Durch den Einsatz von Stabilisierungsmitteln können auch bei der Basis sehr gute Werte für die chemisch-physikalische Stabilität erreicht werden. Die besten Werte wurden bei kombiniertem Einsatz von PVPP und Xerogel erreicht, unwesentlich schlechter waren die Werte bei alleinigem Einsatz von Xerogel. Die Verwendung von ausschließlich PVPP hingegen brachte eine geringere Stabilitätszunahme. Dieses spiegelt die Ergebnisse der Trübungsanalyse wieder. Der geringe Anteil an phenolischen Substanzen hat wenig Einfluss auf die Stabilität.

---

[1] Vgl. Pfenninger, H.: Die kolloidale Stabilität – ein wichtiges Qualitätskriterium von Bier. In: Brauerei-Rundschau, Nr. 7. 1987, S. 129-152.
[2] Kusche, Marc: persönliche Mitteilungen
[3] Winnewisser, Wolfram: persönliche Mitteilungen
[4] Vgl. Kunze,W.: Technologie Brauer und Mälzer. 7. Aufl. Berlin 1994, S. 333.

Diese ist, abgesehen von den Kohlenhydraten, überwiegend proteinabhängig. Zum einen werden bei der Substratherstellung zur Fermentation durch die geringe Kochzeit weniger trübungsrelevante Proteine koaguliert, zum anderen fehlen die phenolischen Substanzen des Hopfens, die diesen Agglomerationsprozess unterstützen und beschleunigen.
Insgesamt kann festgestellt werden, dass sowohl die ausgemischten Getränke als auch die Basis so hergestellt werden können, dass sie ausreichende Stabilität auch für längere Vertriebswege besitzen.
Es besteht auch die Alternative, die Getränke bzw. die Basis nicht zu filtrieren und als „naturtrüb“ auf den Markt zu bringen was einem solchen „Natur“-getränk gut anstehen würde. Hierfür sollte ein stabile Trübung in den Getränken verbleiben und es nicht zu Ausklarungen kommen. Bei den Versuchen (Vgl. 7.4) wurde auch nach einer Kaltlagerung von 5 Tagen immer eine höhere Ausgangstrübung festgestellt, die erst im Laufe der forcierten Lagerung absank. Danach blieb die Trübung dann auf einem stabilen Niveau. Es konnten keine Ausklarungen festgestellt werden. Um von Beginn an eine stabile Trübung im Getränk bzw. in der Basis zu haben, könnte mit einer Zentrifuge eine Trübung eingestellt werden, die im Bereich der konstanten Dauertrübung liegt.
Während der gesamten Stabilitätsuntersuchungen wurden Proben der Trübung und der forcierten Getränke und Basis mikrobiologisch untersucht. Es wurden keine Kontaminationen festgestellt, auch konnte kein Durchkommen der Fermentationsorganismen beobachtet werden. Trotzdem sind die Getränke im Abfüllbereich gefährdet gegenüber Sekundärkontaminationen, denn sie beinhalten immer noch relativ hohe Mengen an Restzucker, die für einige Hefen Wachstumsgrundlage sein könnten. Eine Pasteurisation würde hier eine höhere mikrobiologische Sicherheit schaffen. Hier besteht allgemein die Gefahr der geschmacklichen Beeinträchtigung durch die thermische Einwirkung. In Dreieckstests bewahrheitete sich diese Befürchtung nicht: es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht behandelten und den pasteurisierten Proben festgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem selektierten Stamm und den festgelegten Parametern alkoholfreie Erfrischungsgetränke auf Würzebasis hergestellt werden können. Die entwickelte Technologie lässt sich einfach in großtechnischem Maßstab in der Brauerei umsetzen. Damit sind die wesentlichen Ziele dieser Arbeit erreicht: Mit den eigenen Rohstoffen und den vielfältigen Ausmischmöglichkeiten, die die erarbeitete Technologie bietet, können die Brauereien so eigene optimale Produkte kreieren und sich neue, vielversprechende Marktsegmente erobern.

# 9 Material und Methoden

## 9.1 Mikroorganismen, Stammhaltung und Kultivierung

Verwendete Mikroorganismen

Für die hier beschriebenen Arbeiten wurden verschiedene Mikroorganismen verwendet. Es kamen *Lactobacillus*-Arten und *Gluconobacter*-Arten zum Einsatz.

Die verwendeten Laktobazillen wurden in einer Stammsammlung zusammengefasst:

Tabelle 9/1: Lactobacillus-Stammsammlung für alternative Gärungsgetränke (SAG)

| Stammnummer | Stamm | Herkunft |
|---|---|---|
| SAG 01 | *Lb. delbrückii ssp. delbrückii* | Hefebank Weihenstephan |
| SAG 02 | *Lb amylovorus* | Hefebank Weihenstephan |
| SAG 03 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.188 |
| SAG 04 | *Lb. paracasei ssp. paracasei* | TMW 1.301 |
| SAG 05 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.610 |
| SAG 06 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.612 |
| SAG 07 | *Lb. amylolyticus* | Eigenisolat aus Sauergut |
| SAG 08 | *Lb. amylolyticus* | Eigenisolat aus Sauergut |
| SAG 09 | *Lb. amylolyticus* | Eigenisolat aus Sauergut |
| SAG 10 | *Lb. amylolyticus* | TMW 1.1077 |
| SAG 11 | *Lb. amylolyticus* | TMW 1.1080 |
| SAG 12 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.1095 |
| SAG 13 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.1097 |
| SAG 14 | *Lb. amylovorus* | TMW 1.694 |
| SAG 15 | *Lb. amylovorus* | DSMZ 20531$^{T}$ |
| SAG 16 | *Lb. amylolyticus* | TMW 1.487 |
| SAG 17 | *Lb. amylolyticus* | DSMZ 1166$^{T}$ |
| SAG 18 | *Lb. paracasei ssp. paracasei* | DSMZ 5622$^{T}$ |
| SAG 19 | *Lb. paracasei ssp. paracasei* | DSMZ 20312 |

Für die kombinierten Fermentationen wurde ein *Gluconobacter*-Stamm verwendet:

Tab. 9/2: Verwendeter Mikroorganismus

| Mikroorganismus | Herkunft |
|---|---|
| *Gluconobacter oxydans ssp. suboxydans* | TE 629[1] |

[1] Vgl.: Strachotta, T.: Grundlagen zur Herstellung neuartiger Getränke auf Malzbasis mit verschiedenen Mikroorganismen. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1998, S. 44.

Kultivierung der Mikroorganismen und Stammhaltung

Die Laktobazillen wurden als Starterkulturen für die Fermentationen in Erlenmeyerkölbchen mit 50 ml MRS-Nährmedium[1] anaerob hergezogen. Die Bebrütungstemperatur für die verschiedenen Stämme richtete sich nach den Angaben auf der Homepage der DSMZ. Vor dem Animpfen der Fermenter wurden die Laktobazillen durch Zentrifugation (5 min / 5000 U/min) vom Nährmedium getrennt und mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen.

Die mittelfristige Stammhaltung wurde nach Anzucht einer Stichkultur bei 4°C in MRS-Agar gewährleistet. Zur längerfristigen Sicherung der Stammsammlung wurden die einzelnen Stämme nach einer Vorkultur in MRS, in 80%igem Glycerin, bei –80 °C eingefroren.

Der *Gluconobacter*-Stamm wurde bei 26 °C aerob in Erlenmeyerkölbchen mit 50ml Medium 1 hergezogen. Zur Stammhaltung wurde eine Schrägarkultur mit Nährmedium 2 verwendet.

*Eingesetzte Materialien:*
*MRS-Bouillion, MRS-Agar, Nährmedium 1[2] (D-Glucose 10%,Hefeextrakt 1%, $CaCO_3$ 2%,Agar-Agar 1,5 %), Nährmedium 2[3] (Hefeextrakt 0,5%, Pepton 0,3%, D-Mannitol 2,5%), NaCl – Merk, Darmstadt*
*Glycerin – Sigma, Deisenhofen*
*Glaswaren - Schott, Mainz*
*Zentrifuge: Labofuge GL – Hereaus, Hanau*
*Greiner 50 ml-Falconröhrchen – Merk, Darmstadt*
*1,5 ml Kryoröhrchen – Nunc, Wiesbaden*

[1] Vgl. De Man, J.C: et al.: A Medium for the cultivation of Lactobacilli. In: Journal of applied Bacteriology. 23, (1). Amsterdam, Niederlande 1960, S. 130-135.
[2] Vgl. Strachotta, T.: a.a.O., S. 45.
[3] Vgl. ebenda, S.45.

## 9.2 Bestimmung der Stoffwechselmetabolite

Bestimmung von Lactat, Acetat, D-Gluconsäure und Ketogluconaten

Die Bestimmung von Lactat, Acetat und der Gluconate erfolgte mittels HPLC[1]. Die Unterscheidung der Isomere D-Lacat und L-Lactat wurde durch enzymatische Bestimmung erreicht[2].

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse wurde wie folgt durchgeführt:

2 ml Probe wurden in einem Reaktionsgefäß 30 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:10 verdünnt und durch ein 0,45 µm Filter in die Bördelrandflaschen gefüllt. Die Analysenparameter sind in Tabelle 10.3 aufgeführt.

Tabelle 9/3: Analysenparameter zur Detektion von Lactat, Acetat und Gluconaten mittels HPLC

| **Analysenparameter** | |
|---|---|
| Mobile Phase | 0,002 n $H_2SO_4$ |
| Stationäre Phase | Ionenaustauscherharz mit H-ionischer Form |
| Säulentemperatur | 70 °C |
| Flussrate | 0,6 ml/min |
| Injektionsvolumen | 20 µl |
| Detektion | UV 210 nm |

Die enzymatische Differenzierung wurde mit einem handelsüblichen Enzymtest-Kit durchgeführt. Dabei liegt folgendes Prinzip zur Grunde: D- bzw. L-Lactat werden durch entsprechende Enzyme, D- bzw L-Lacat-Dehydrogenase, stufenweise oxidiert. Die dabei entstehenden Mengen an NADH werden photometrisch bei 340 nm bestimmt. Daraus können die stöchiometrisch gleichen Mengen D- bzw L-Lactat berechnet werden[3].

Die in der Anleitung angegebenen Volumina wurden 1:10 heruntergerechnet, damit die Messungen auf einer Mikrotiterplatte erfolgen konnten. Hierdurch konnten bis zu 96 Proben auf einmal gemessen werden.

Bestimmung der niederen Würzekohlenhydrate mittels HPLC

Um Auskunft über den Kohlenhydratstoffwechsel und über die Stoffumsätze während der Fermentationen zu bekommen, wurden die in der Würze vorkommende Zucker bestimmt. Diese sogenannten vergärbaren Zucker sind Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose und Maltotriose[4].

---

[1] Vgl. Strachotta, T.: a.a.O. S. 46-51.

[2] Vgl.: Gutmann, I. und A.W. Wahlenfeld.:o.T. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, H.U.(Hrsg.). 3. Aufl. , Bd 2. Weinheim 1974, S. 1510-1514.

[3] Vgl.: o.V.: Arbeitsanleitung für D- und L-Lactat Bestimmung mittels UV-Methode. Enzym-Test Cat.No. 112821, Boehringer. Mannheim 1997.

[4] Vgl.: Heyse, K. U.: Handbuch der Brauerei Praxis. Nürnberg 1995, S. 169.

Die Analyse erfolgte mit einer modifizierten Methode von Wagner und Donhauser[1]. Zur Probenaufbereitung wurden diese 30 min bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein 0,45 µm Filter in Bördelrandflaschen abgefüllt. Die Analysenparameter sind in Tabelle 10.4 aufgeführt.

Tabelle 9/4: Analysenparameter zur Detektion von vergärbaren Zuckern mittels HPLC

| **Analysenparameter** | |
|---|---|
| Mobile Phase | 78%Acetonitril : 22% $ddH_20$ |
| Stationäre Phase | Aminophase auf Kieselgelbasis |
| Säulentemperatur | 25 °C |
| Flussrate | 1,7 ml/min |
| Injektionsvolumen | 20 µl |
| Detektion | Refraktionsindex |

*Eingesetzte Materialien:*
*HPLC Anlage: Autosampler Series 200, Pumpe Series 200, Dioden Array-Detektor Series 200, Refractive Index Detector Series 200, PE Nelson Interface Series 900, Turbochrom-Software, Säulenofen LKB 2155– Perkin Elmer, Überlingen*
*Säulenheizkissen - Labortechnik Barkey, Bielefeld*
*Chromatographiesäulen Nucleosil 100-5 NH2, Nucleogel Sugar 810H – Macherey und Nagel, Düren*
*Acetonitril (HPLC-Qualität), Schwefelsäure, Referenzsubstanzen (Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose, Acetat) – Merck, Darmstadt*
*Referenzsubstanzen (Lactat, D-Gluconsäure, 2-Keto-D-Gluconsäure, 5-Keto-D-Gluconsäure, Maltotriose) – Sigma, Deisenhofen*
*Referenzsubstanz (2,5-Diketo-D-Gluconsäure) – Universität Dortmund, Fachbereich Chemietechnik*
*Millex-HV-Filtereinheiten 0,45µ – Millipore, Eschborn*
*Eppendorf Micro Test Tubes, verschiedene Größen – Eppendorf Hamburg*
*D-Milchsäure/L-Milchsäure Enzymtest-Kit Cat.No. 1112821 – Boehringer, Mannheim*
*Mikrotiterplatten, 96-Well – Sarstett, Nümbrecht*
*UV-Reader – Teca*

[1] Vgl. Donhauser, S. und D. Wagner: Zucker und Endvergärungsgradbestimmung mittels der HPLC. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 43, 9. Nürnberg 1990, S. 296-305.

### 9.3 Selektion geeigneter Laktobazillenstämme

Die spezielle Stammsammlung (Vgl. 9.1) wurde aus Laktobazillen erstellt, die aufgrund ihres Metabolismus besonders geeignet sind in Würze zu wachsen[1,2]. Für die Herstellung eines Getränkes mit ernährungsphysiologischem Nutzen wurden die Stämme nach ihrem Säurebildungsvermögen und vor allem nach ihrer Fähigkeit, L(+)-Milchsäure zu bilden, selektiert. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Acetatbildung gering war, womit sensorischen Einbußen vorgegriffen werden sollte.

Diese ersten Selektionen wurden aerob in 50 ml - Erlenmyerkölbchen durchgeführt. Als Fermentationsmedium wurde 10%GG Vorderwürze verwendet. Die Fermentationsdauer betrug 5 Tage, bei den stammabhängigen Fermentationstemperaturen:

| | |
|---|---|
| *Lb. delbrückii, Lb. amylovorus, Lb. paracasei* | 37°C |
| *Lb. amylolyticus* | 45°C |

Die bei der Fermentation entstandenen Metabolite wurden wie oben beschrieben (Kap. 10.2) bestimmt. Die Stämme SAG 02 und 06 wurden aufgrund von Kultivierungsschwierigkeiten nicht berücksichtigt.

### 9.4 Molekularbiologische Mikroorganismendifferenzierung

Die Differenzierung des selektierten Stammes erfolgte in zwei Stufen: erst wurde der Stamm mittels RAPD-PCR[3] einer Art zugeordnet, und dann wurde mittels AFLP[4], versucht ihn von anderen Stämmen zu unterscheiden.

Bei beiden Untersuchungsmethoden werden die Mikroorganismen anhand ihrer DNA unterschieden. Diese muss zuvor aus den Bakterienkulturen gewonnen werden.

Die Isolierung erfolgte nach folgendem Protokoll[5]:

1) 50 ml Flüssigkultur bei Raumtemperatur 10 min mit 5000 U/min abzentrifugieren
2) Einmaliges Waschen der Zellen mit sterilem $ddH_2O$
3) Aufnehmen der Zellen in 5,0 ml Raffinose-Lösung mit Mutanolysin (250 U/ml) und Lysozym (7500 U/ml)
4) Inkubieren bei 37 °C, 2 h
5) Zugabe von 1,25 ml Lysepuffer und 50 µl Proteinase K (Konz. 20 mg/ml)
6) Inkubieren bei 50 °C, 2 h
7) Tiefgefrieren evtl. trüber Proben 10 min bei –80 C

---

[1] Vgl. Bohak, I. et al.: Lactobacillus amylolyticus sp. nov., Isolated from Beer Malt and Beer Wort. In: Systematic and Applied Microbiology 21. Stuttgart, Jena, Ulm 1998, S. 360-364.

[2] Vgl. Back, W.: Biologische Säuerung. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 41,4. Nürnberg 1988, S. 152-156.

[3] Vgl. Newton, C. R. und A. Graham: Fingerprint-Analysen. In: PCR. Heidelberg 1994, S.161.

[4] Vgl. Vos, P. et al.: AFLP: a new technique for DNA – Fingerprinting. In: Nucleic Acids Research 23. Amsterdam 1995, S. 4407-4414.

[5] Vgl. Vogeser, Gudrun: Isolierung eines bakteriellen α-Acetolactat-Decarboxylase-Gens und Klonierung in Brauhefen. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1993, S. 17.

8) Zugabe von 6,5 ml Phenol
9) Langsames Überkopfschütteln, 30 min
10) Zentrifugieren bei 5000 U/min, 20 min
11) Entnahme der oberen wässrigen Phase und überführen in weiteres steriles Schraubdeckelgefäß
12) Wiederholung der Schritte 8) – 11) mit Phenol/CIA und CIA
13) Zugabe von tiefgekühltem i-Propanol (-20 °C)
14) Vorsichtiges Durchmischen der Lösung, DNA fällt als Faden aus
15) Überführen des DNA – Fadens in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß
16) Zugabe von 300 µl Natriumacetatlösung (10M), Überkopfschütteln, 20 min
17) Zugabe von 900 µl tiefgekühltem Ethanol (-20 °C), mischen
18) Zentrifugieren in Eppendorfzentrifuge bei 4° C und 14000 U/min, 3 min
19) Waschen des DNA–Pellets mit 1 ml Ethanol (70% v/v) und 10 µl Ammoniumacetat-Lösung. (0,3 M, pH 4,8)
20) Vakuumtrocknung des Pellets
21) Aufnahme des Pellets in 500 µl sterilem $ddH_20$, über Nacht quellen lassen
22) Konzentrationsbestimmung mittels $\lambda$-DNA
23) Zugabe von 10 µl RNAse (Konz.: 20 mg/ml) pro ml DNA-Lösung, inkubieren bei 37 °C, 2 h
24) Einstellen der DNA-Konzentration auf 0,1 ng/µl mit sterilem $ddH_20$

*Eingesetzte Materialien:*
*Raffinose-Lösung(10% Raffinose, 20 mM Tris-HCL, 10mM $MgCl_2$, pH 6,8), Ethanol p.A., i-Propanol p.A., Natriumacetat-Lösung, Ammoniumacetat-Lösung: Merck, Darmstadt*
*Lysozym, Mutanolysin, Proteinase K, RNAse: Sigma, Deisenhofen*
*$\lambda$-DNA, Boehringer Mannheim*
*Phenol, CIA (Chloroform:Isoamylalkohol 1:25), Phenol/CIA (1:2): Biometra, Göttingen*
*Speed Vac Concentrator: Bachhofer, Reutlingen*
*Eppendorfgefäße, Eppendorfzentrifuge 5402: Eppendorf, Hamburg*

Genotypische Art-Differenzierung mittels RAPD-PCR

RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA-PCR ist eine Fingerprintmethode zur Charakterisierung von DNA-Polymorphismen. Sie wird zur Aufklärung von genotypischen Verwandtschaftsbeziehungen eingesetzt.[1] Bei sehr ähnlichem Genom (Stammdifferenzierung) stößt die Methode an Grenzen. Bei dieser PCR wird mit sogenannten Random-Primern (Zufallsprimer) gearbeitet. Diese haben aufgrund ihrer Sequenz und ihres GC-Gehaltes (ähnlich dem der zu amplifizierenden DNA) eine hohe statistische Wahrscheinlichkeit, dass sie auf der DNA homologe Bindungsstellen finden. Die Primer können theoretisch an beiden Einzelsträngen der Ziel-DNA binden. Bindet der Primer an beiden Einzelsträngen in nicht zu weitem Abstand (< 5000 bp), kann ein PCR-Produkt gebildet werden. In den ersten PCR-Runden lässt man die Primer bei geringer Stringenz hybridisieren, so dass selbst dann eine Amplifizierung möglich ist, wenn sich in Primer und DNA-Matrize falsche Basen gegenüberstehen. Sind erst einmal Amplikons entstanden, deren Enden komplementär zu den Primern sind, führt man die nachfolgenden PCR-Zyklen bei höherer Stringenz durch[2]. Von Bakterienart zu Bakterienart unterscheidet sich die Länge und die Zahl der gebildeten PCR-Produkte. Hiermit wird eine Differenzierung der Arten möglich.

Die Differenzierung erfolgt in drei Schritten:

1. eigentliche PCR-Reaktion
2. Trennung und Färbung der entstandenen PCR-Produkte durch Elektrophorese
3. Sichtbarmachung und Vergleich mit dem Referenzstamm durch Fotographie unter UV-Licht

1. Zur PCR Reaktion wurde folgender Reaktionsmix zusammengestellt:

| PCR-Puffer | dNTP`s | Primer | Polymerase | DNA | Steriles $ddH_2O$ |
|---|---|---|---|---|---|
| (1X) | 100 µM | 2,5 µM (AT:31°C) | 0,025 U/ml | 1 ng/µl | Zum Reaktionsvolumen auffüllen |

Im Thermocycler wurden dann bei folgendem Temperaturprogramm die PCR-Produkte gebildet:

- 11 Zyklen bei 33°C Annealingtemperatur (AT-Absenkung von 0,2 °C pro Zyklus (s.o.))
- 31 Zyklen bei 31°C Annealingtemperatur (+ 25 sec. Elongationszeitverlängerung pro Zyklus)

Die Heizgeschwindigkeit des Cyclers wird während des Programms herabgeregelt, um eine Abtrennung der Primer vom Einzelstrang vor der Amplifikation durch zu schnelles Erwärmen zu verhindern.

[1] Vgl. o.V.: Stichwort: RAPD. In: Römpp-Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Deckwer, W.- D. et al. (Hrsg.). Stuttgart 1999, S. 663.
[2] Vgl. Newton, C. R. und A. Graham: a.a.O. S. 161.

2. Diese PCR-Produkte werden dann mittels Ethidiumbromid gefärbt und durch Agarose-Gel-Elektrophorese[1] getrennt. Die Agarosegele (1,5 % g/v) werden mit Ethidiumbromid-TAE-Puffer gegossen und in eine horizontale Elektrophoresekammer mit dem gleichen Puffer eingesetzt. Die Proben aus der PCR-Reaktion werden mit 10% (v/v) Stopplösung versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Die Elektrophorese fand unter folgenden Laufbedingungen statt:

| Gelvolumen | Spannung | Stromstärke | Leistung | Laufzeit | Temperatur |
|---|---|---|---|---|---|
| 25 ml | 110 V | 100 mA | 20 W | 30 min | RT |

3. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der sich in die DNA einlagert und unter UV-Beleuchtung fluoresziert. Zur Erzeugung der Fluoreszenz ist Durchlicht mit einer Wellenlänge von 254 nm am besten geeignet. Die so sichtbargemachten PCR-Produkte[2] wurden zur Dokumentation abfotografiert. Das entstandene Bandenmuster wurde mit dem des Referenzstammes verglichen.

*Eingesetzte Materialien:*
*PCR-Puffer, Taq DNA Polymerase: Pharmacia Biotech, Freiburg*
*TAE-Puffer 50x ( 2M Tris-Acetat, 50 mM $Na_2EDTA$, pH 8,0), Stopp-Lösung (55% Saccharose, 0,05% Bromphenolblau, 250 mM $Na_2EDTA$, pH 8,0): Merck Darmstadt*
*Ethidiumbromid: Sigma, Deisenhofen*
*Primer R-N16(Sequenz: 5´-AAG CGA CCT G-3´): Roth, Karlsruhe*
*Seakem-Agarose: FMC Bioproducts, Rockland, USA*
*Thermocycler PTC-100, MJ Research: Biozym, Oldendorf*
*Horizontale Elektrophorese-Einheit Miniphor LKB 2013: LKB, Bromma,Schweden*
*Spannungsgeber EPS 600: Pharmacia Biotech, Freiburg*
*MP4 Sofortbildkamera, Film 667 Professional: Polaroid,*
*UV- Beleuchtungseinrichtung Reprostar: Camag*

Genotypische Stammdifferenzierung mittels AFLP

Die AFLP ( Amplified Fragment Length Polymorphism)-Methode ist wie die in 10.4.1 vorgestellte RAPD-PCR eine DNA-Marker-Technologie.[3] Die Methode basiert auf einer PCR-Amplifikation von Restriktionsfragmenten nach Totalverdau der DNA.[4] Die Eignung der AFLP-Methode zur genotypischen Differenzierung ist in verschiedenen Studien unter Beweis gestellt worden.[5,6]

---

[1] Vgl. Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning – a laboratory manuel. 2. Aufl. Cold Spring Laboratory Press 1989, Kap 6,2-6,7.
[2] Vgl. Westermeier, R.: Elektrophorese Praktikum VLH-Verlagsgesellschaft 1996, S.17.
[3] Vgl. o.V.:Stichwort: DNA-Markertechnologie. In: Römpp-Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Deckwer, Wolf-Dieter et al. (Hrsg.). Stuttgart 1999, S. 216.
[4] Vgl. Vos, P. et al. a.a.O. S. 4407-4414.
[5] Vgl. Jansen , P. et. al.: Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. In: Journal of Microbiology. 142. 1996, S. 1881-1893.
[6] Vgl. Lin, J.J. et al.: A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. In: Nucleic Acids Research 24. 1996, S. 3649-3650.

Die Methode lässt sich in drei wesentliche Schritte unterteilen[1]:

1. Restriktion der zu untersuchenden DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen. Anschließende Ligation von Adaptern, die spezifisch für die Restriktionsschnittstellen sind.
2. Amplifikation eines Teils der entstandenen Fragmente mittels PCR. Die Primersequenzen sind komplementär zu denen der Adapter.
3. Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte in einem Sequenziergel.

Für die Restriktion werden zwei Enzyme verwendet, ein selten schneidendes und ein häufig schneidendes. Nach der Ligation der Adapter liegen dann drei verschiedene Fragmenttypen vor:

- Fragmente mit Adaptern für die Schnittstelle von Enzym 1 an beiden Seiten
- Fragmente mit Adaptern für die Schnittstelle von Enzym 2 an beiden Seiten
- Fragmente mit je einem Adapter für Enzym 1 bzw. Enzym 2 pro Seite

Mit den anschließenden PCRs lassen sich diese Typen unterschiedlich gut vervielfältigen. Die Fragmente mit zwei Schnittstellen des selten schneidenden Enzyms sind aufgrund ihrer Länge schlechter amplifizierbar. Die Fragmente mit zwei Schnittstellen des häufig schneidenden Enzyms bilden einen sogenannten Stem-Loop. Die Fragmente binden an sich selber und sind daher schlecht amplifizierbar. Bevorzugt gebildet werden PCR-Produkte mit zwei unterschiedlichen Primerbindestellen, so dass letztendlich nur ein kleiner Teil der Fragmente vervielfältigt wird. Die Primer bestehen aus einem zum Adapter komplemtären Teil, am 3´-Ende sind 1-3 weitere Nucleotide angehängt, die in den unbekannten Teil der Restriktionsschnittstelle hineinragen. Durch die Anzahl der zusätzlichen Nucleotide kann die Zahl der vervielfältigten Fragmente beeinflusst werden. Zur Detektion der AFLP-Produkte ist einer der Primer markiert, je nach Detektionsverfahren mit Radionukleotiden, Floureszenzfarbstoffen, Biotin oder Digoxiginin.

Die so entstandenen Bandenmuster können untereinander verglichen und die Stämme differenziert werden. Die Methode hat den Vorteil, dass sehr viel vom Genom untersucht werden kann, aber aufgrund der PCR-Schritte sich eine überschaubare Menge an Fragmenten auswerten lässt.

Die Versuche dieser Arbeit wurden mit den folgenden Restriktionsenzymen, Adaptern, Primern durchgeführt:

| Enzym | Erkennungssequenz | Adapter | Primer |
|---|---|---|---|
| Eco RI | GAATTC | 5´-CTCGTAGACTGCGTACC-3´<br>3´-CATCTGACGCATGGTTAA-5´ | 5´-GACTGCGTACCAATTCN-3´ |
| Mse I | TTAA | 5´-GACGATGAGTCCTGAG-3´<br>3`-TACTCAGGACTCAT-5´ | 5´-GATGAGTCCTGAGTAAN-3´ |

Das N in den Primersequenzen beschreibt das zusätzliche Nucleotid.

[1] Vgl. Vos, P. et al. a.a.O. S. 4407-4414.

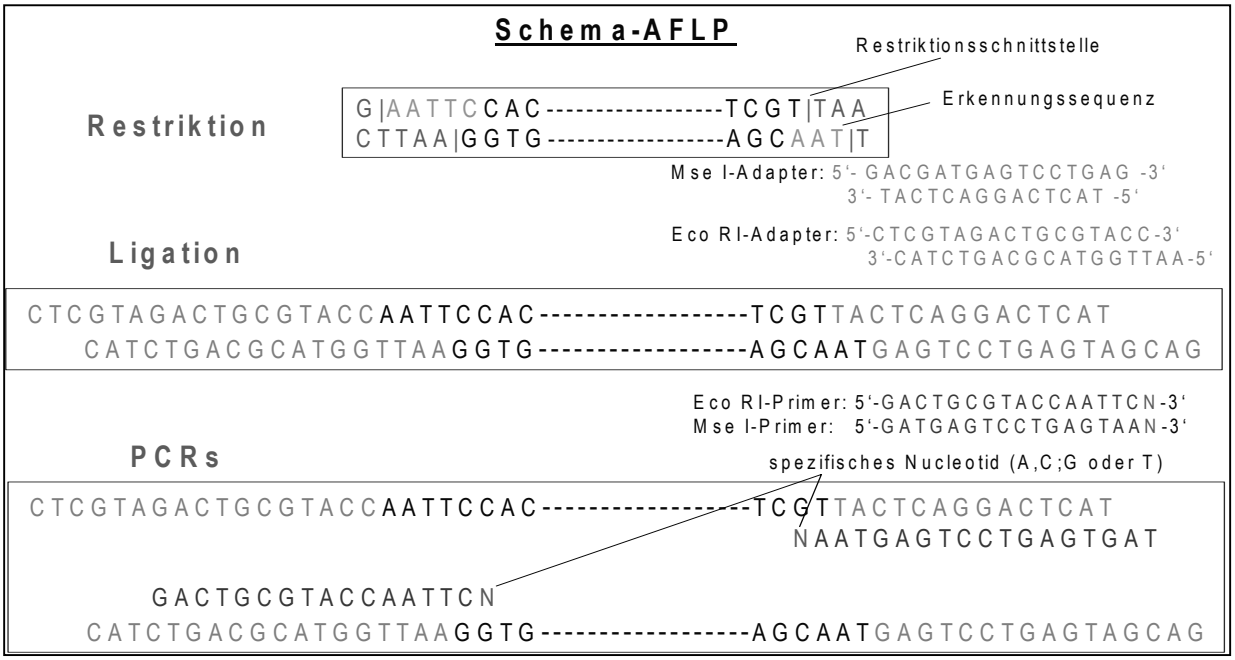



Abb. 9/1: Schema AFLP

Die Untersuchungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt, wobei je ein Ansatz mit einem zusätzlichen Nucleotid durchgeführt wurde:

1. Restriktion und Ligation

Der Restriktionsansatz wurde übernacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Restriktionsansatz

| | |
|---|---|
| $ddH_2O$ | 29,85 µl |
| Puffer 10X | 4,00 µl |
| BSA 100X | 0,40 µl |
| Eco RI (20 U/µl) | 0,25 µl |
| Mse I (10U/µl) | 0,50 µl |
| DNA ( 1 mg/µl) | 5,00 µl |

Ligation

Der Ligationsmix wurde zur Restriktion gegeben und nochmals über Nacht bei 15 °C weiter inkubiert. Außerdem wurden nochmals Restriktionsenzyme zugesetzt, da die Enzymaktivität wichtig für die Ligation ist.

Ligationsmix:

| | |
|---|---|
| $ddH_2O$ | 4,25 µl |
| Puffer (für T4-Ligase) | 1,00 µl |
| ATP (10 mM) | 1,00 µl |
| Eco RI-Adapter (5pmol) | 1,00 µl |
| Mse I-Adapter (50 pmol) | 1,00 µl |
| T4-Ligase | 1,00 µl |
| Eco RI (20 U/µl) | 0,25 µl |
| Mse I (10 U/µl) | 0,50 µl |

2. AFLP-PCRs

Im Anschluß an die Ligation erfolgten die AFLP-PCRs. Es wurden zwei PCRs hintereinander durchgeführt. Die erste, die sogenannte Pre-Amplifikation, erfolgte zur Aufreinigung der Ligationsfragmente. Sie wurde mit unspezifischen Primern ohne selektive Nukleotide durchgeführt. Bei der eigentlichen Amplifikation wurden dann spezifische Primer mit selektiven Nukleotiden eingesetzt. Der Eco RI Primer war bei der Amplifikation Biotin markiert. Mit Hilfe der Markierung wurden die Amplikons später sichtbar gemacht.

PCR-Ansatz für die Pre-Amplifikation:

| | |
|---|---|
| $ddH_20$ | 14, 80 µl |
| PCR-Puffer | 3,00 µl |
| dNTP´s (2mM) | 3,00 µl |
| Primer „Eco RI“ (2,5 µM) | 3,00 µl |
| Primer „Mse 1“ (2,5 µM) | 3,00 µl |
| Taq-Polymerase | 0,20 µl |
| DNA (Ligation 1:10 verdünnt) | 3,00 µl |

Im Thermocycler wurden dann 20 Zyklen mit einer Annaelingtemperatur von 56 °C durchgeführt.

PCR-Ansatz für die Amplifikation:

| | |
|---|---|
| $ddH_2O$ | 16,80 µl |
| PCR-Puffer | 3,00 µl |
| dNTP´s | 3,00 µl |
| Primer „Eco RI"+N (2,5 µM) | 1,60 µl |
| Primer „Mse I"+N (2,5 µM) | 2,40 µl |
| Taq-Poymerase | 0,20 µl |
| DNA (Pre-Amplifikation 1:10 verdünnt) | 3,00 µl |

Im Thermocycler wurden dann 13 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 65 °C durchgeführt; die Annealingtemperatur wurde pro Zyklus um 0,7 °C abgsenkt. Dann folgten 23 weiter Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 56 °C.

3. Auftrennung und Sichtbarmachung der Fragmente im Sequenziergel

Zur Auftrennung wurde ein Direktblotting-System verwendet. Es ist eine Kombination aus vertikaler Elektrophorese und Blottapparatur. Die DNA wird in einem 0,19 mm dicken Gel in vertikaler Richtung aufgetrennt und beim Auslaufen aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen.

- Gießen eines 4 % denaturierenden Polyacrylamidgels nach Herstellerangaben[1].
- Vorlauf 45 min
- Denaturieren der Proben: 2 µl DNA-Probe + 2 µl Stopp-Mix 2 h bei 95 °C inkubieren, danach schnell abkühlen.
- Auftragen der Proben innerhalb von 10 min, um ein Renaturieren der DNA zu vermeiden.
- Probeneinlauf, 10 min
- Gellauf
- Wenn die Bromphenolblaufront die Membran erreicht (nach ca. 50 min), den Membrantransport starten.
- Nach Beendigung des Laufs wird die Membran automatisch aus dem Puffer gefördert. Sie kann dann getrocknet werden.

Elektrophoresebedingungen beim Directblotting:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Vorlauf | 1900 V | 19 mA | 30 W | 30 min |
| Probeneinlauf | 500 V | 15 mA | 30 W | 10 min |
| Gellauf | 1900 V | 15 mA | 30 W | 180 min |

Membranlänge: 40 cm, Membrantransport 19 cm/h

[1] Vgl.: o. V.: Anleitung für GATC 1500-System DNA-Sequenzer.

Detektion Biotin-markierter DNA[1]:

DNA-Fixierung und Antikörperbindung

- Membran trocknen ( 1h bei 37 °C).
- DNA auf Membran 1 min crosslinken mit GATC-Link.
- Maleinsäurepuffer in GATC-Tube einfüllen.
- Membran aufrollen, in GATC-Tube legen und abrollen ( Vermeidung von Knicken der Membran, maximale Mebranfläche 50 x 30 cm) und 5 min bei 30°C inkubieren.
- Maleinsäurepuffer abgießen, 80 ml Blockingpuffer zugeben und 30 min bei 30 °C inkubieren.
- Blockingpuffer abgießen und 20 ml Blockingpuffer + 3 µl Streptavidin-alkalische Phosphatase-konjugat einfüllen, 30 min bei 30 °C inkubieren.
- Flüssigkeit abgießen und 2 mal 10 min mit 150 ml Maleinsäure spülen.

Kolorimetrische Detektion:

- Maleinsäurepuffer abgießen, Reaktionspuffer zugeben, 10 min inkubieren.
- Reaktionspuffer abgießen und 20 ml Färbepuffer (Reaktionspuffer + 55 µl NBT (100 mg/l) und 55 µl BCIP (X-Phosphat 100 mg/l)) zugeben.
- 1-2 h entwickeln (Tube dabei sehr langsam rotieren lassen).
- Färbepuffer abgießen und 3 mal 10 min mit 150 ml TE-Puffer waschen.
- Membran trocknen und dunkel aufbewahren.

*Eingesetzte Materialien:*
*Restriktionsenzyme Eco RI und Mse I: Promega,*
*Adapter und Primer: MWG-Biotech, Ebersberg*
*Taq-Polymerase, PCR-Puffer, dNTP´s: Pharmacia Biotech, Freiburg*
*TBE-Puffer (10X) für Sequenziergel ( Tris 1,27M, Borsäure 0,42 M,$Na_2EDTA$ 24mM),*
*Harnstoffdiluent für Sequenziergel 4%( Harnstoff 84g, 10xTBE 18,7g, $ddH_20$ 73,4 g),*
*Sequenziergellösung 4% (GATC-Gel 30% 6,7ml, Harnstoffdiluent 43,3 ml), Ammoniumpersulfatlösung 10%, Gelladepuffer Sequenzier-Gel 2X (Formamid 98%, $NA_2EDTA$, Bromphenolblau 0,1 %),*
*Maleinsäurepuffer (Maleinsäure 23,21 g, NaCl 17,53 g, NaOH 16 g, mit $ddH_2O$ auf 2l auffüllen),),*
*Reaktionspuffer p 9,5 ( Tris 12,41 g, NaCl 5,84 g, $MgCl_2$ x 6 $H_2O$, mit ddH2O auf 1l auffüllen), TE-Puffer pH 8,1 (Tris 2,42 g, $Na_2EDTA$ 0,74 g, mit ddH2O auf 2 l auffüllen): Merck, Darmstadt*
*Blocking-Lösung 10X (Maleinsäurepuffer 90 ml, Blocking-Reagenz 10 g), Blocking Puffer (Maleinsäurepuffer 90 ml, Blocking-Lösung 10 ml):Roche Molekular Biochemicals,Darmstadt*
*BCIP (5-Bromo-4-chloro- 3-indolylphosphat (50 mg/ml)),NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid (100 mg/m)): Roche Molecular Biochemicals,Mannheim*
*Formamid: Sigma, Deisenhofen*
*GATC-Gel 30%, Direct-Blotting-Membrane, GATC 1500 Directblotting-system, Streptavidin alkalische Phosphatase-konjugat (1:7500), GATC-Link: GATC,Konstanz*
*Thermocycler PTC 200, MJ Research: Biozym, Oldendorf*
*Hybridisierungsofen: Unieequip, Martinsried*

[1] Vgl. o. V.: Protokoll des Roche DIG Nucleic Acid Detektion Kit. Mannheim.

## 9.5 Untersuchungen zum Nährstoffbedarf des selektierten Stammes

Zusammensetzung des Nährmediums

Bei den Versuchen wurde ein synthetisches Nährmedium verwendet, das in der Zusammensetzung einer ungehopften, hellen, 12 %igen Würze angepasst ist. Die zugegebene Menge an Inhaltsstoffen wurde systematisch verändert, wobei eine Basislösung mit unten angegebener Zusammensetzung verwendet wurde.

Zusammensetzung der Basislösung:[1]

| | | |
|---|---|---|
| Kohlenhydrate: | Fructose | 3,0 g/l |
| | Glucose | 12,0 g/l |
| | Saccharose | 4,0 g/l |
| | Maltose | 68,0 g/l |
| | Maltotriose | 15,0 g/l |
| | Dextrine | 18,0 g/l |
| | | 120,0 g/l |

scheinbarer Endvergärungsgrad 82,5%

| | | |
|---|---|---|
| Stickstoff: | Caseinhydrolysat (vitaminfrei) | 3,5 g/l |
| | Pepton | 4,0 g/l |
| Mineralsalze: | $CaCl_2$ | 1,0 g/l |
| | $MgSO_4$ | 1,0 g/l |
| | KCl | 1,0 g/l |
| Spurenelemente: | 10 ml einer Lösung, die im Liter enthält: | |
| | $H_3BO_4$ | 1,0 mg |
| | $ZnSO_4$ | 1,0 mg |
| | $MnCl_2$ | 1,0 mg |
| | $FeCl_3$ | 0,5 mg |
| | $CuSO_4$ | 0,1 mg |
| | KJ | 0,1 mg |

[1] Vgl. Weinfurtner, F. et al.: Eine Kleingärapparatur zur Ermittlung der Gäreigenschaften von Brauereihefe. In: Brauwissenschaft. Jg. 14 Nr.3. 1961, S.109-119.

| | | |
|---|---|---|
| Wuchsstoffe: | m-Inositol | 10,0 mg/l |
| | Ca-Pantothenat | 10,0 mg/l |
| | Nicotinsäure | 1,0 mg/l |
| | Thiamin (B1) | 1,0 mg/l |
| | Pyridoxin (B6) | 1,0 mg/l |
| | Biotin | 1,0 mg/l |
| | Guanin | 0,5 mg/l |
| | Uracil | 0,5 mg/l |

Variationen der Basislösung

Versuch Kohlenhydrate

Die zur Untersuchung des Kohlenhydratstoffwechsels des Lactobacillus amylolyticus durchgeführten Versuche können in drei Kategorien eingeteilt werden:

- Versuchsansätze ohne Kohlenhydrate
- Versuchsansätze mit ausschließlich einer Kohlenhydratart
- Versuchsansätze mit fünf verschiedenen Kohlenhydratarten.

Versuch Mineralsalze

Bei diesem Versuch wurden Variationen der Basislösung vorgenommen, die sich in folgende Kategorien einteilen lassen:

- Versuchsansätze mit einem einzigen Mineralsalz
- Versuchsansätze mit zwei von drei Mineralsalzen
- Versuchsansätze mit allen/ohne Mineralsalze

Versuch Wuchsstoffe

Um den Einfluss der verschiedenen Wuchsstoffe auf den Fermentationsvorgang zu untersuchen, wurden

- Versuchsansätze mit ausschließlich einem Wuchsstoff
- Versuchsansätze mit 7 von 8 Wuchsstoffen
- Versuchsansätze mit allen/ohne Wuchsstoffe hergestellt.

Versuch Stickstoffquellen

Bei dieser Versuchsreihe soll der Stickstoffstoffwechsel von Lactobacillus und dessen Einfluss auf andere Fermentationsparameter untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Variationen des Basismediums vorgenommen:

- Versuchsansätze mit ausschließlich einer Stickstoffquelle
- Versuchsansätze mit allen/ohne Stickstoffquellen

Versuchsdurchführung

Nach Herstellung der Versuchsansätze durch Variation der Basislösung wurde der pH-Wert mit 0,1 molarem Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,1) auf 5,5 eingestellt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 121 °C im Autoklav sterilisiert. Danach wurde aus einer in MRS bei 48°C gewachsenen Kultur mit *Lb. amylolyticus SAG 07* angeimpft, die Zellzahl in den Probenansätzen eingestellt und bei 42 °C im Anaerobiosetopf 48 Stunden lang bebrütet. Die Ermittlung der Zellzahl nach Ende der Fermentation erfolgte mit Hilfe der Zählkammer für Bakterien (Vgl. 9.6.1) in Doppelbestimmung. Danach wurden die Probenvolumina für die weiteren Untersuchungen (organische Säuren, Kohlenhydrate, Aminosäuren) entnommen. Diese Proben wurden sofort weiter verarbeitet oder zur Haltbarmachung eingefroren und später verarbeitet. Die Messung des pH-Wertes bildete den Abschluss des Versuchsablaufs.

*Eingesetzte Materialien:*
*Nährbodenbestandteile, Puffer, Anaerobiose-Zubehör: Merck, Darmstadt*
*pH-Meter: WTW, Weilheim*

**9.6 Durchführung der Fermentationsversuche**

Mit dem nach Kapitel 10.3 selektierten *Lactobacillus*-Stamm wurden verschiedene Versuche zur Optimierung der Fermentationsparameter durchgeführt. Des Weiteren wurden Fermentationen durchgeführt um eine Milchsäureausbeute-Steigerung durch pH-statische Kulturführung bzw. Pufferung zu erreichen. Eine Kombination von Milchsäuregärung und Fermentationen mit anderen Mikroorganismen wurde ebenfalls getestet.

Diese Fermentationsversuche fanden in drei verschiedenen Fermentationsanlagen statt. Die Anlagen sind von der Steuerung und Messdatenerfassung sehr ähnlich und unterscheiden sich im wesentlichen nur durch die Fermentationsvolumina:

- Anlage 1: Fermentationsvolumen 1,5 l
- Anlage 2: Fermentationsvolumen 3-5 l
- Anlage 3: Fermentationsvolumen 50-100 l

Als Fermentationssubstrat wurde für alle Versuche (bis auf die Versuchsreihe Optimierung der Fermentationsparameter) eine helle Würze mit 10 % GG Stammwürze nach folgendem Schema hergestellt:

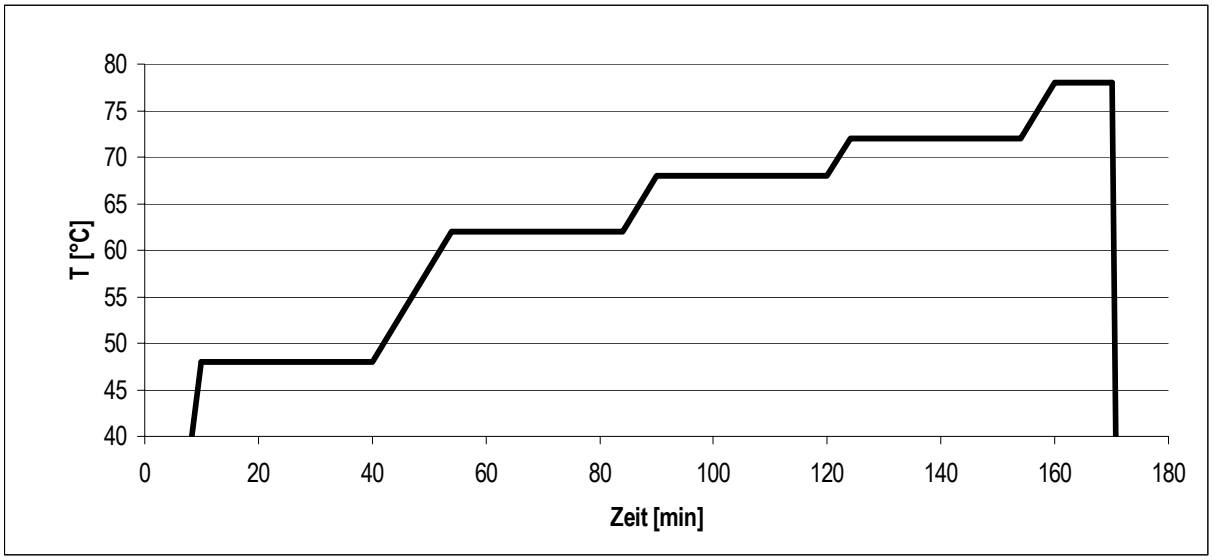



Abb. 9/2: Maischdiagramm für 10 % Würze hell

Als Schüttung wurden 100% Pilsenermalz verwendet. Die Würze wurde nach dem Abläutern für 10 min gekocht. Die 10 Minuten Kochzeit bedingen eine möglichste Schonung der Würze, so dass viele Wuchsstoffe wie z.B. Vitamine erhalten bleiben. Außerdem wird durch die Kochung eine Sterilität des Fermentationsmediums gewährleistet. Aufgrund der hohen Hopfenempfindlichkeit der verwendeten Laktobazillen wurde die Würze nicht gehopft. In dieser Hopfenempfindlichkeit begründet sich auch zum Teil, dass diese Laktobazillen keine Gefahr für die Bierproduktion darstellen.

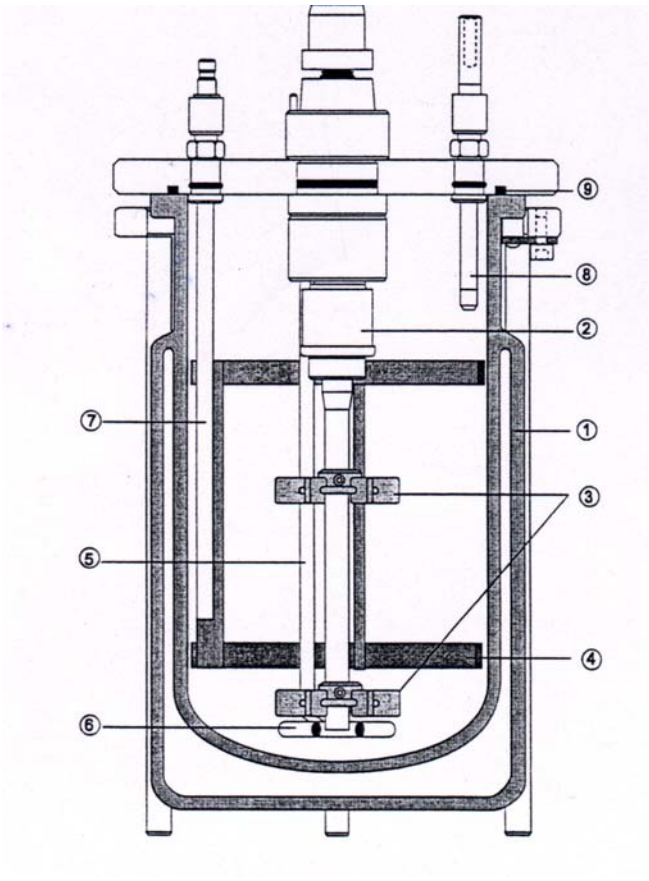
9.6.1 Optimierung der Fermentationsparameter

In dieser Versuchsreihe wurden für den ausgewählten Stamm die optimalen Fermentationsparameter bestimmt. Hauptaugenmerk wurde auf eine maximale Milchsäureproduktion gelegt. Es wurden folgende Parameter untersucht:

- Fermentationstemperatur
- Substratkonzentration
- Anstellzellzahl
- Belüftung

Die Fermentationen wurden in vier Bioreaktoren gleicher Bauart (doppelwandiges Kulturgefäß, Meßsonden, Zusatzgeräte, zentrale Kontrolleinheit und PC) durchgeführt. Die genauen Bezeichnungen der einzelnen Elemente sind folgende:

| | |
|---|---|
| Kulturgefäß | Doppelwandiges Glasgefäße mit einem Arbeitsvolumen von zwei Litern |
| Meßsonden | $pO_2$-Elektrode,<br>pH-Eletrode,<br>Temperatursonde Pt-100 |
| Zusatzgeräte | Elektronisch geregelter Gleichstrommotor<br>Thermostat |
| Kontrolleinheit | BIOSTAT ® B |
| Betriebsdatenerfassung | MFCS, Version 2.0 |




Interner Aufbau:

1. Doppelmantel-Glasgefäß
2. Rührwelle
3. 6-Blatt-Scheibenrührer
4. Schikanekorb
5. Begasungsrohr
6. Einblasring für Begasung
7. Ernte- (Probennahme-) rohr
8. Antischaumsonde
9. O-Ring-Dichtung Deckel-platte

Der Gleichstrommotor wurde auf die Kupplung der Deckelplatte gesteckt. Die Gewindedurchgänge sind mit pH-Elektrode, $pO_2$-Elektrode, Antischaumsonde, Entnahmerohr mit 20 ml Probennahmegefäß, Temperatursonde, Septum, Begasungsrohr und Abluftkühler mit 0,2 $\mu$m Sterilfiltern bestückt worden. Alle Prozeßparameter konnten über die Kontrolleinheit gesteuert und überwacht werden.

Als Fermentationssubstrat wurde hier Vorderwürze hell in der jeweiligen Konzentration verwendet.

Die Bioreaktoren wurden mit der Vorderwürze beschickt und etwa 0,5 ml Traubenkernöl als Antischaummittel zugegeben. Nachdem sich die gewünschte Prozeßtemperatur eingestellt und die $pO_2$-Elektrode einen Wert unter 0,4% erreicht hatte, konnte diese kalibriert werden. Durch das Einblasen von Luft, bei einer Rührerdrehzahl von 180 U/min, wurde die Sättigung des Mediums mit Sauerstoff abgewartet. Anschließend erfolgte die Kalibrierung hinsichtlich 100% Sauerstoffsättigung. Durch erneutes Einblasen von Stickstoff wurde die benötigte Sauerstoffsättigungskonzentration eingestellt. Das Animpfen mit der Mikroorganismensuspension erfolgte über den Impfstutzen.

Im Laufe einer Fermentation wurden durchschnittlich 4–5 Proben mit einem jeweiligen Volumen von 50 ml, gezogen. Die Probenentnahme erfolgte über das Probenahmesteigrohr. Dabei muss die Schlauchleitung zwischen den einzelnen Probenentnahmen mit einer Schlauchklemme abgeklemmt werden, um rückwärtige Kontaminationen zu vermeiden. Durch das Öffnen der Begasungseinheit entsteht im Kulturgefäß ein geringer Überdruck, der ausreicht, um die Probe zu überführen. Gegebenenfalls kann der Innendruck im Kulturgefäß durch kurzzeitiges Abklemmen der Abluftleitung, erhöht werden. Bei der Probenentnahme wurden die ersten 10–20 ml verworfen. Das offene Schlauchende sollte zwischen den Probenentnahmen in ein Gefäß mit Desinfektionsmittel getaucht sein.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Bei den im Ergebnisteil dargestellten Werten, handelt es sich um die gebildeten Mittelwerte.

Bestimmung der Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte nach der Methode von Bast [1]. Hierbei wird von den mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Mikroorganismen eine Verdünnungsreihe angelegt. Die Zellen der niedrigsten Verdünnung werden unter dem Mikroskop mit Hilfe der Zählkammer nach Helber, Petroff und Hauser ausgezählt. Damit ist in dieser Verdünnung die Zellzahl/ml bekannt. Durch photometrisches Vermessen der einzelnen Verdünnungen bei einer Wellenlänge von 620 nm und einer Auftragung der ermittelten Extinktionen zu den jeweiligen Zellzahlen, kann eine Eichgerade erstellt werden. Die Eichgerade wurde in einem Extinktionsbereich von 0,4–1,0 mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2$ = 0,9986 ermittelt. Bei zeitweisen Kontrollen durch paralleles Auszählen der Zellen, wurden Schwankungen von maximal 6% ermittelt, was einer für diese Versuche ausreichenden Genauigkeit entspricht.

Extrakt, Dichte und pH wurden mit dem automatischen Beeranalyzer Scaba der Firma Perstop Analytical Company der Prüf- und Versuchsanstalt, durchgeführt. Die pH–Messung entspricht der Analysenvorschrift der MEBAK, Band I 1.1.8 [2].

Die stofflichen Veränderungen während der Fermentation wurden wie in 10.2 dargestellt ermittelt.

*Eingesetzte Materialien:*
*Biostat®B2-Fermentationsanlage, MFCS, Version 2.0 Prozessteuerung: B. Braun Biotech International, Melsungen*
*Temperatursonde PT 100, pH-Elektrode, Sauerstoffelektrode: Mettler Toledo AG, Greifensee, Schweiz*
*Sterilfilter Midisart 2000: Sartorius, Göttingen*
*Stickstoff, Kohlendioxid: Linde*
*Scaba automatical beeranalyzer: Perstorp Analytical, Schweden*
*Photometer Unicon 810: Tegunenta, Rotkreuz, Schweiz*
*Pilotsudwerk: BAM, Freising*
*Vorderwürze hell: Staatsbrauerei Weihenstephan*

[1] Vgl. Bast, E.: „Mikrobiologische Methoden“, Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999

[2] Vgl. o. V.: pH-Wert. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 1. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1997, S. 28.

### 9.6.2 Scale-up Versuche zur Umsetzung der Fermentation in großtechnischen Maßstab

Um den erstellten Fermentationsprozess auf seine Anwendbarkeit in großtechnischem Maßstab zu prüfen, wurden Scale-up Versuche im 100l-Maßstab durchgeführt. Das Fermentationsmedium wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren erstellt. Die Herführung der Mikroorganismen fand auf zwei Arten statt. Von der Stichkultur wurde zunächst eine 50-ml MRS-Flüssigkultur hergezogen. Diese wurde dann entweder im 3 l-Fermenter (siehe unten) in Würze anaerob bei 48,5°C propagiert oder in 500 ml MRS-Flüssigkultur weitergeführt. Die Zellen aus dem Fermenter wurden abzentrifugiert und, wie oben beschrieben, gewaschen und resuspendiert und dann in den 100 l-Fermenter inocculiert. Die 500 ml MRS-Kultur wurde abdekantiert und dann direkt in den 100 l Fermenter gegeben. Beide Verfahrensweisen lieferten vergleichbare Fermentationsergebnisse.
Der 100 l-Bioreaktor ist aus Edelstahl gefertigt. Im Gegensatz zu den kleinen Fermentationsanlagen ist dieser Biorektor nicht mit einem Rührwerk ausgestattet. Die Fermentationsbrühe wird durch eine Pumpe über Kreislaufsystem umgewälzt. Beheizt wird der Reaktor mit Dampf, gekühlt über einen Kryostaten. Ausgestattet ist der Fermenter mit Temperatur-, pH-, Trübung- und Sauerstoffsonde. Die Anlage wird automatisch über ein Profibussystem gesteuert. Die Messdatenerfassung erfolgt mittels PC.

Vorbereitung und Fermentation:
Der Bioreaktor wurde mit einem CIP-Programm (Lauge, Säure, Desinfektionsmittel) gereinigt und vor der Fermentation mit Dampf sterilisiert. Die Messsonden wurden entsprechend der Bedienungsanleitungen kalibriert. Das Fermentationsmedium wurde mit $CO_2$ aus Corneliusbehältern in den Reaktor gedrückt. Nach Erreichen der Fermentationsbedingungen (48,5 °C, anaerob durch $CO_2$-Begasung) wurde durch die Deckelöffnung angeimpft. Während der Fermentation wurde kontinuierlich mit 300 l/h umgewälzt und jede Stunde für 10 min mit $CO_2$ begast. Die Begasung stellt zum einen die anaeroben Verhältnisse sicher, zum andern dient sie auch der Austreibung unedler Aromakomponenten, wie z.B. Dimethylsulfid, das aufgrund der geringen Würzekochdauer noch stark vorhanden ist.
Die Probenahme erfolgte über einen Zwickelhahn an der Umpumpleitung. Die Messwerte wurden aus der Datenerfassung übernommen. Die Veränderungen des Fermentationssubstrates wurden wie in 9.2 beschrieben ermittelt.
Der DMS-Gehalt wurde nach MEBAK Band 3 1.3 bestimmt.[1]

[1] Vgl. o. V.: Dimethylsulfid und Vorstufen. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 3. 2 Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1996, S. 31-41.

*Eingesetzte Materialien:*
*100-l Bioreaktor mit Verrohrung: Esau & Hueber, Schrobenhausen*
*Prozessvisualisierung und Phoenix Steuerung: ICS, Kranzberg*
*Sauerstoffsonde, pH-Sonde mit entsprechenden Transmittern: Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz*
*Temperatursonde PT 100: Negele*
*Trübungsmessung: Optek, Düsseldorf*
*Dampferzeuger: Veit, Landsberg am Lech*
*Kryostat: Colora, Lorch*
*Säure (Neodisher N), Lauge (Neodisher LA): Dr. Weigert, Hamburg-Mühlenhagen*
*Desinfektionsmittel (Rimasan V): Tensid Chemie, Muggensturm*

### 9.6.3 pH-statische Fermentationen und gepufferte Fermentationen

Die pH-statischen Fermentationen wurden im 3 l-Maßstab durchgeführt, da bei dieser Fermentationsanlage die Möglichkeit einer pH-Regulierung gegeben ist.

Der verwendete Bioreaktor bestand aus einem doppelwandigen Kulturgefäß, Zusatzgeräten, Messsonden, einer zentralen Steuereinheit und PC:

| | |
|---|---|
| Kulturgefäß | Glasgefäß mit 3 Liter Arbeitsvolumen |
| Zusatzgeräte | Motor, Motor Controller, Thermostat, Peristaltikpumpe, Belüftungseinheit |
| Messsonden | pH-,Sauerstoff-,Temperatursonde |
| Steuereinheit | Biocontroller ADI 1030 |
| Prozessvisualisierung | Software BioExpert NT |

Die doppelwandigen Kulturgefäße wurden durch eine Standarddeckplatte aus Edelstahl mit eingelassener Silikondichtung verschlossen. Die Deckplatte mit eingearbeiteter Rührerwelle war mit Gewindedurchgängen versehen, die wie folgt bestückt wurden: Probeentnahmerohr, Belüftungsrohr mit 0,2 µ Zuluftfilter, Abluftkühler mit 0,2 µ Abluftfilter, Zugabestutzen für Antischaum , Säure, Lauge sowie Messelektroden für Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffsättigung.

Der Rührermotor, der durch den Motor Controller gesteuert wurde, war direkt auf die Rührerwelle gesteckt. Das Rührorgan bestand aus je zwei Sechsblatt-Scheibenrührern.

Die Steuerung der Fermentationsparameter erfolgte über die Steuerungssoftware und die Steuereinheit sowie den dafür vorgesehenen Regelmodulen.

Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe durch Zugabe von Lauge geregelt. Die Temperatur wurde über den Umwälzthermostat geregelt, indem temperiertes Wasser durch den Mantel des Kulturgefäßes gepumpt wurde. Die Abluftkühlung wurde am Wasserzulauf ebenfalls an den Wasserkreislauf angeschlossen.

Zur Aufrechterhaltung des anaeroben Milieus wurde ständig $CO_2$ über eine Druckleitung und einen Sterilluftfilter in die Fermenationsbrühe eingebracht. Der pH-Wert, die Sauerstoffsättigung, die Temperatur, die Laugedosage wurden mit Hilfe der Steuereinheit in Messwerte umgewandelt und von der Software am PC online visualisiert und gespeichert.

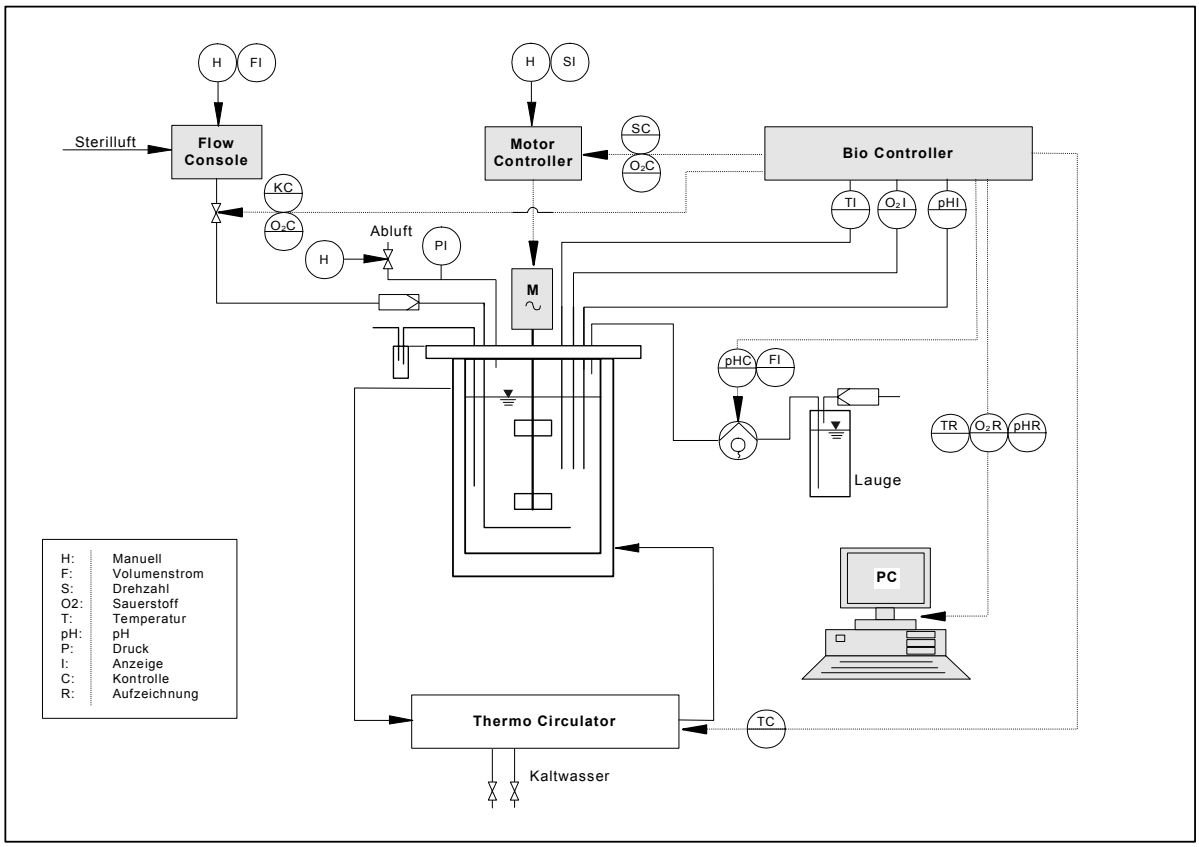



Abb. 9/3: 3 l-Fermentationsanlage mit Steuereinheit

Vorbereitung und Fermentation:

Das Kulturgefäß wurde mit Wasser gefüllt. Die Messsonden wurden nach Anleitung kalibriert und eingebaut, an den Probenahmestutzen sowie an die Zu- und Abluftleitung wurden Silikonschläuche angeschlossen. Außerdem wurde an der Zu- und Abluftleitung jeweils ein Sterilluftfilter angebracht. Die Verbindungsschläuche wurden mit Schlauchklemmen verschlossen, um ein Austreten des Wassers während des Sterilisierens zu verhindern. Die Schlauchenden, die Sterilluftfilter und die Elektrodenanschlüsse wurden zur Sicherheit mit Aluminiumfolie verschlossen.

Das so präparierte Kulturgefäß wurde 1,5 h im Dampftopf sterilisiert. Danach wurde das Wasser durch Überdruck mit $CO_2$ über den Probenahmestutzen ausgeleert. Das Fermentationsmedium wurde über eine Deckelöffnung eingebracht. Nach Erreichen der jeweiligen Fermentationsbedingungen (48,5 °C, Sauerstoffsättigung 0%) wurde mit den Mikroorganismen angeimpft. Diese wurden vorher wie in Kapitel.9.1 beschrieben kultiviert und aufbereitet.

Die pH-Regelung erfolgte über die Steuerung beim ermittelten optimalen Wachstums-pH mit Di-Kaliumcarbonat. Die Rührerdrehzahl wurde auf 200 Upm eingestellt, um eine schonende Umwälzung während der Fermentation zu gewährleisten.
Die Probenahme erfolgte bei einem leichten Überdruck über den Probenahmestutzen. Die Messwerte wurden aus der Datenerfassung übernommen. Die Veränderungen des Fermentationssubstrates wurden wie in 10.2 beschrieben ermittelt.
Die gepufferten Fermentationen erfolgten mit Puffervorlage (Citrat, Acetat) in den unter Kapitel 9 beschriebenen Fermentern. Diese wurden wie oben vorbereitet. Es wurde anaerob bei 48°C fermentiert.
Um eine Pufferung bzw. pH-statische Fermentation durchzuführen, wurden einige Vorversuche durchgeführt. Es musste das pH-Optimum für den Stamm ermittelt und verschiedene Puffer auf ihre Eignung getestet werden. Zum einen wurde überprüft, inwieweit diese als Kohlenstoffquelle verwertbar sind, zum anderen welche maximale Konzentration ihrer Salze der Stamm noch toleriert. Außerdem besitzt Würze noch eine eigene Pufferkapazität, die auch ermittelt werden musste. Die Versuchsdurchführungen werden im Folgenden beschrieben.

Ermittlung des pH-Optimums

Es wurden zwei modifizierte MRS-Nährlösungen hergestellt, einer wird mit 100 mmol Citrat auf etwa pH 3, der andere mit 100 mmol Phosphat auf etwa pH 8 eingestellt. Die beiden modifizierten MRS-Medien werden, entsprechend einem Vorversuch, anteilsmässig in die Küvetten der Mikrotiterplatte zur Summe von 200 µl gegeben, so dass jeweils 4 Küvetten die pH-Werte 3,5; 4,0; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 7,5 aufweisen. In alle Küvetten wurde Glucose gegeben, die wegen der zu erwartenden Maillardreaktion extra autoklaviert wurde, so dass eine Glucosekonzentration von 2 g/l entsteht. Alle Küvetten wurden nach dem Beimpfen mit Laktobazillen (5 µl), die in ungepuffertem, modifiziertem MRS gewaschen wurden, mit 90 µl Paraffin überschichtet, um ein anaerobes Milieu zu schaffen. Die Mikrotiterplatte wurde bei 43 °C, der maximal einstellbaren Temperatur, im SPECTRAFluor Microplate Reader bebrütet. Das Wachstum wurde über die Trübungszunahme bei 590 nm gemessen. Während der Versuche wurde alle 60 Minuten die Trübung gemessen. Die Trübung korreliert mit der Zellzahl. Ohne die Zellen quantifizieren zu müssen, kann über die regelmässige Trübungsmessung und der daraus entstehenden Trübungskurve die Wachstumsrate in den einzelnen Küvetten und damit bei den entsprechenden pH-Werten bestimmt werden.

Trägt man die einzelnen Wachstumsraten über die entsprechenden pH-Werte auf, so erhält man eine Kurve, an deren Maximum, der optimale Wachstums-pH-Wert abgelesen werden kann. Die Auswertung der Trübungen zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde über das Programm Sigma Plot 4.0 durchgeführt.

Bestimmung der Verwertung anderer Kohlenstoffquellen als Zuckern:

Die Verwertung von Citrat und Acetat als Kohlenstoffquelle wurde im Reagenzglas durchgeführt.

Es wurde jeweils 10 ml des modifizierten MRS als Nullprobe, zusätzlich mit 20g/l Glucose als Positivkontrolle, mit 100 mmol/l Citrat bzw. 100 mmol/l Acetat und einer mit 20 g/l Glucose und 100 mmol Citrat bzw. 100 mmol/l Acetat in Reagenzgläser gefüllt, autoklaviert, mit der Impföse Laktobazillen angeimpft und bei 43 °C bebrütet. Die Salze wurden so verwendet, dass der Nährboden einen pH-Wert von 5 hatte. Parallel wurden diese Versuche mit modifiziertem MRS-Agar (15 g Agar-Agar/l MRS-Boullion) als Ausgussplatten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte qualitativ, ob Wachstum zu beobachten war oder nicht.

Bestimmung relevanter Salztoleranzen

Es wurden zwei modifizierte MRS-Medien hergestellt, eins ungepuffert, eins mit einer Salzkonzentration von jeweils 1 mol/l. Als Salze wurden Citrat, Acetat und Lactat überprüft. Der pH-Wert des salzhaltigen MRS wurde auf 5 +/- 0,5 eingestellt, der des ungepuffertes MRS betrug 5,6. Der pH-Wert der Citrat- und Acetat haltigen MRS-Medien wurden durch entsprechendes Mischen der unterschiedlich protonisierten Salze bei Citrat, bzw. durch Mischen von Acetat und Eisessig das lactathaltigen MRS-Medium mittels Carbonat eingestellt. Entsprechende Vorversuche zur Ermittlung der Mischungsverhältnisse wurden durchgeführt.

Mit diesen beiden Nährböden wurde eine kreuzweise Verdünnungsreihe mit jeweils 10 ml in einem Reagenzglas hergestellt und autoklaviert. Für die Verdünnungsreihe werden zum einen zwei Teile gepuffertes mit einem Teil ungepuffertem MRS gemischt. Aus dieser Mischung werden wieder zwei Teile genommen und mit einem Teil ungepuffertem MRS gemischt. Die Verdünnungsreihe wird entsprechend fortgesetzt. Zum anderen werden zwei Teile ungepufferter MRS mit einem Teil gepuffertem gemischt, zwei Teile dieser Mischung erneut mit einem Teil gepuffertem MRS gemischt und so fort. Die Salzkonzentrationen sind wie folgt abgestuft: 802 mmol/l, 703 mmol/l, 666 mmol/l, 555 mmol/l, 444 mmol/l, 333 mmol/l, 296 mmol/l, 198 mmol/l, 132 mmol/l, 88 mmol/l, 59 mmol/l und 39 mmol/l. Die mit der Impföse angeimpften Reagenzgläser wurden im Anaerobiosetopf bei 43 °C bebrütet. Die Auswertung erfolgte auch hier wieder qualitativ.

Bestimmung des würzeeigenen Puffers

100 ml Würze wurden mit Salzsäure titriert und der jeweilige pH-Wert aufgezeichnet. Aufgrund der verbrauchten Menge Salzsäure bei entsprechender pH-Wertveränderung lässt sich die Pufferkapazität bestimmen.

*Eingesetzte Materialien:*
*Biocontroller ADI 1030, Pilotfermenter 3 l, Motorcontroller ADI 1012, Thermo Circulator ADI 1018, Bioexpert NT-Software, pH-Sonde: Applikon Dependable Instruments, Holland*
*Flow Console: Aalborg, New York, USA*
*Master Flex Pump Drive System: Cole Parmer Instrument Company, Barrington*
*Sauerstoffsonde: Mettler Toledo AG, Greifensee, Schweiz*
*Dampftopf DDG 40: Guwina-Hofmann GmbH, Berlin*
*Fermenter Pufferung siehe 10.5.1*
*SPECTRAfluor Microplate Reader incl. Software: Tecan, Crailsheim*
*pH-Meter 761 Calimatic für Microtiterplatten: Knick, Aschaffenburg*
*Microtiterplatten, 96 well: Sarstädt*
*MRS modifiziert: Merck, Darmstadt*
*Puffersubstanzen (Di-Kaliumhydrogenphosphat, Di-Kaliumcarbonat, Tri-Natriumcitrat-2-hydrat, Citronensäuremonohydrat, Natriumacetat-trihydrat, Eisessig, Salzsäure 1N): Merck, Darmstadt*
*D/L-Lactat 85%: Sigma, Deisenhofen*
*Paraffin, Agar-Agar, Glucose: Merck, Darmstadt*

### 9.6.4 Kombinierte Fermentationen mit Laktobazillen und Gluconobacter

Die durchgeführten Fermentationen lassen sich in 3 Gruppen unterteilen.

Im ersten Fermentations-Typ wurde jeweils mit einem der beiden Mikroorganismen eine Standard-Fermentation durchgeführt. Die dabei entstandenen Mikroorganismen wurden weitgehend abzentrifugiert und die Fermentationsbrühe neu mit dem jeweils anderen Mikroorganismus angeimpft und mit dessen Fermentationsparametern weiterfermentiert.

Hierbei sollte getestet werden, ob der jeweilige Mikroorganismus noch Wachstum in einem bereits fermentierten Medium zeigt, ob die noch verbliebene Kohlenhydratmenge ausreichend ist und in wie weit der bereits niedrige pH-Wert bzw. die Lactat- oder Gluconsäurekonzentration die Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen beeinflusst.

Hierzu wurden zwei Fermentationsvariationen durchgeführt. Zum einen die Fermentationen bis zum maximalen pH-Abfall und anschließendem Mikroorganismenwechsel und zum anderen eine Variante bis zu einem pH-Wert $> 3{,}5$ und anschließendem Organismenwechsel. Für diesen pH-Wert wird in der Literatur sowohl für *Gluconobacte*r als auch für *Lactobacillus amylolyticus* noch Wachstum angegeben.

Der zweite Fermentationstyp zeichnet sich durch gleichzeitiges Animpfen mit beiden Mikroorganismen aus.

Da die optimalen Wachstumsbedingungen des Anaerobiers *Lactobacillus amylolyticus* deutlich von denen des Aerobiers *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans* differieren, sollte hierbei festgestellt werden, ob allein durch Umstellung der Fermentationsparameter - Temperatur, Sauerstoffgehalt, Rührerdrehzahl und Belüftung - das Wachstum in einem Batch von einem Mikroorganismus auf den anderen möglich ist.

Beim dritten Fermentationstyp werden, wie beim ersten, jeweils eine Standard-Fermenation mit *Lactobacillus amylolyticus* und *Gluconobacter oxydans subsp. suboxydans* durchgeführt. Diese wurden komplett verschnitten und wieder halbiert. Eine Hälfte wird unter den aeroben Bedingungen weiterfermentiert und die andere unter den anaeroben Bedingungen. Hierbei hat im Gegensatz zum Anstellen und Animpfen keiner der beiden Organismen mehr die lag-Phase zu überwinden. Beide befinden sich noch in der Wachstumsphase und können sich so beim Umstellen der Fermentationsparameter gegen den anderen Organismus eventuell besser durchsetzen.

Tabelle 9/5: Differenzierung der einzelnen Fermentationstypen

| | Fermentationen des 1. Typs (Var.1 / 2) | Fermentationen des 2.Typs | Fermentationen des 3. Typs |
|---|---|---|---|
| Animpfen | **Animpfen jeweils eines Mikroorganismus** | **gleichzeitiges Animpfen beider Mikroorganismen** | **Animpfen jeweils eines Mikroorganismus** |
| Mikroorganismen-abtrennung | **durch Zentrifugieren** | **keine** | **keine** |
| Dauer der Fermentation | **bis zu einem konstanten pH-Wert** | **bis zu einem konstanten pH-Wert** | **bis zu einem pH-Wert > 3,5** |
| Organismen-wechsel | **durch erneutes Animpfen** | **Steuerung über die Fermentations-parameter** | **durch Verschneiden von zwei Einzel-Fermentationen** |

## 9.7 Filtration und Stabilität

Filtration:

Zur Überprüfung der Filtrierbarkeit der Fermentationsbrühe wurden verschiedene Filtrationsversuche an der Pilotfiltrationsanlage des Lehrstuhls durchgeführt. Die Anlage besteht aus einem Kieselgurrahmenfilter und einem Sterilfilter:

Tabelle 9/6: Filterdaten

| | |
|---|---|
| Filterfläche: | Kieselgurfilter 0.1 $m^2$ |
| | Schichtenfilter 0,3 $m^2$ |
| Filterleistung: | 0.3 hl/h |
| Spez. Filterleistung: | Kieselgurfilter 3 hl/$m^2$ h |
| | Schichtenfilter 1hl/$m^2$ h |
| Filterschichten: | Stützschicht Zellstofffasern |
| | Sterilschichten: Zellulosefasern |
| Filterhilfsmittel: | grobe Kieselgur (Permeabilität nach Darcy: 1,4-2,6)[1] |
| | feine Kieselgur (Permeabilität nach Darcy: 0,049-0,101)[2] |

Vor jeder Filtration wurde die Filteranlage mit 100°C heißem Wasser sterilisiert, wobei die Wassertemperatur am Filterauslauf mindestens 30 min lang 90°C betragen musste. Danach erfolgte eine Kaltwasserspülung mit entgastem Wasser, um den Filter abzukühlen und zu entlüften. Bei der darauf folgenden Voranschwemmung wurde der Durchfluss auf die doppelte Filtrationsgeschwindigkeit eingestellt. Das Unfiltrat wurde bei ca. 0°C filtriert. Die Filterhilfsmittel wurden über eine Hubkolbenpumpe dosiert. Der Inhalt des Dosiergefäßes wurde ständig durchmischt und mit $CO_2$ begast, um eine Sauerstoffaufnahme auszuschließen. Nach 30 min Vorlauf wurde in Cornelius-Behälter filtriert. Proben wurden zur Trübungsmessung und zur mikrobiologischen Kontrolle am Filter bzw. zur Vermeidung von Druckstößen aus dem Drucktank gezogen. Außerdem wurde während der Filtrationen der Druckverlauf aufgenommen.

Die Trübung wurde apparativ mittels eines Trübungsmessgerätes nach MEBAK bestimmt.[3] Es wurde unter einem Messwinkel von 90°C und 12°C gemessen.[4]

Die Rückhaltung der Laktobazillen durch den Filter wurde folgendermaßen bestimmt: Es wurden 0,5 l Probe über eine 0,2 µm Membran filtriert. Diese wurde anschließend 7 Tage bei 45°C auf MRS-Agar bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Es wurden verschiedene Kieselgurdosagen und verschiedene Sterilschichten verwendet:

---

[1] Vgl. o. V: SeitzSchenk Technisches Datenblatt Clarcel DIC. Bad Kreuznach. 2001.
[2] Vgl. o. V: SeitzSchenk Technisches Datenblatt Clarcel CBL. Bad Kreuznach. 2001.
[3] Vgl. o. V.: Trübung. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993, S. 157.
[4] Vgl. Thorne, R.S.W. und R.F. Beckley: o.T. .In: Journal of the Institiute of Brewing. 64, 38. 1958.

Tabelle 9/7: Variable Filtrationsparameter

| Filtration | Voranschwemmung ($g/m^2$) | Laufende Dosage (g/hl) | Sterilschicht (relative Klärschärfe in µm) |
|---|---|---|---|
| **A** | 600(grob) + 600(fein) | 1200(fein) | 0,4 |
| **B** | 600(grob) + 600(fein) | 1200(fein) + 1200(grob) | 0,4 |
| **C** | 600(grob) + 600(fein) | 1200(fein) + 1200(grob) | 0,2 |
| **D** | 600(grob) + 600(fein) | 1200(fein) + 1200(grob) | 0,1 |
| **E** | 600(grob) + 600(fein) | 1200(fein) + 1200(grob) | 0,1 |

Ab Filtration C wurden die Proben nur noch aus dem Drucktank entnommen, um Druckstöße während der Filtration zu vermeiden. Außerdem wurde noch die Anschwemmgeschwindigkeit verdoppelt, um ein Aussedimentieren der Kieselgur in der Zuleitung zu vermeiden. Die Filtration E beeinhaltet die Filtrationsparameter, die verwendet wurden, um einen Einfluss einer Kaltlagerung vor der Filtration zu prüfen. Hier wurde die Fermentationsbrühe 7 Tage bei 0°C in Cornelius-Behältern gelagert. Die Behälter wurden umgedrückt, so dass das gebildete Sediment zurückblieb, und filtriert.

*Eingesetzte Materialien:*
*Pilotfilteranlage, Stützschichten 0/400, Kieselgur DCL, BCL: SeitzSchenk, Bad Kreuznach*
*Sterilfilterschichten Steril S, Steril S 40, Steril S 100: Begerow, Langenlonsheim*
*Membranfilter 0,2 µm; Sartorius Göttingen*
*Trübungsmessgerät: Monitek, Düsseldorf*

Stabilität

Um Aussagen über die chemisch-physikalische als auch mikrobiologische Stabilität dieser Getränke machen zu können, wurde sowohl die Fermentationsbrühe als auch daraus ausgemischte Getränke analysiert.

Für die Versuche zur chemisch-physikalischen Stabilität wurden die Proben mittels des Forciertests gealtert und die entstandene Trübung anschließend untersucht, um geeignete Stabilisierungsmaßnahmen ergreifen zu können.

Die mikrobiologische Stabilität wurde anhand von biologischen Spurennachweisen überprüft. Des Weiteren wurde die Fermentationsbrühe als auch die ausgemischten Getränke pasteurisiert und eventuelle Einflüsse analytisch und sensorisch überprüft.

Überprüfung der chemisch-physikalischen Stabilität mittels Forciertest:

Die Methode lehnt sich an die, die in den Brautechnischen Analysenmethoden der MEBAK für Bier beschrieben ist[1], an. Dort wird für nicht stabilisierte Biere eine Temperatur von 40°C und für stabilisierte Biere eine Temperatur von 60 °C vorgeschlagen.

In dieser Arbeit wird der Forciertest ausschließlich bei 40 °C durchgeführt, da davon ausgegangen wurde, dass die bei dieser Temperatur entstandene Trübung in Ihrer Zusammensetzung einer natürlich entstandenen Trübung besser entspricht.[2]

Die Stabilitätsgrenze wurde bei Zunahme von 2 EBC-Formazineinheiten gesetzt. Die Proben wurden jedoch bis zu einer Zunahme von mindestens 3 EBC-Einheiten weiter forciert, um genügend Trübungsmaterial für die anschließenden Analysen zu haben.

Zur Analyse musste die Trübung zuerst isoliert werden:

- Probe und Zentrifuge auf 0°C kühlen
- 30 min bei 0°C und 13.700 U/min abzentrifugieren
- Überstand für die Polyphenolanalytik abgiessen
- Pellet mit 2% Milchsäurelösung waschen
- erneut 30 min bei 0°C und 13.700 g abzentrifugieren
- Pellet in dd$H_2O$ suspendieren und lyophilisieren
- Lyophilisat abwiegen und bei RT lagern

[1], Vgl. o. V.: Forciermethode. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993. S. 157.

[2] Vgl. Papp, A.: Erarbeitung von Beurteilungskriterien zur Vorhersage der Stabilisierbarkeit und der chemisch-physikalischen Stabilität in unfiltriertem Bier. (Diss.) Freising-Weihenstephan, S. 154.

Bestimmung der Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene:

Die Bestimmung der Gesamtpolyphenole und Anthocyanogene erfolgte nach MEBAK Kap. 2.21.1[1] und 2.21.2.[2]

Bestimmung der Kohlenhydrate

Die Kohlenhydrate werden nach Totalhydrolyse mit Schwefelsäure photometrisch bestimmt:[3]

- Lyophilisierte Probe einwiegen (1mg/ml ddH2O)
- Standardreihe erstellen ( 10, 20, 40, 80 µgl Glucose / ml ddH2O)
- Blindwert: ddH2O
- 400 µl Probe/Standard/Blindwert mit 10µl Phenol (80%) versetzen
- 1ml $H_2SO_4$ konz. zupipetieren
- 30 min bei RT inkubieren
- Extinktion bei 485 nm messen
- Mittels Standardkurve Analysenwert ermitteln

Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford[4]

Die Proteinbestimmung erlaubt eine Abschätzung der Proteinkonzentration in der Probe. Der Nachweis erfolgt über den Vergleich der Färbung mit Coomassie vom Protein der Probe und vom BSA-Standard

- Stammlösung 1 mg/ml BSA verdünnen zu 5, 10, 30, 50 µg/ml
- Standardkurve erstellen: 800 µl der Verdünnungen + 200 µl Coomassie Reagenz
- Probenvorbereitung 100 µl Probe + 700 µl H2O + 200 µl Coomassie Reagenz
- Blindwert: 800 µl H20 + 200 µl Coomassie Reagenz
- Extinktionen bei 595 nm gegen den Blinwert messen

Um die so analysierte Trübung vermeiden zu können, wurden Versuche zur Verbesserung der kolloidalen Stabilität gemacht. Zum einen wurde die Fermentationsbrühe und die Ausmischung verschieden lange bei O°C gelagert, um ein Ausfällen trübungsrelevanter Stoffe vor der Filtration zu erreichen. Es wurde eine Kaltlagerung von 24 h, 3 Tagen und 5 Tagen untersucht. Zum anderen wurde die Fermentationsbrühe mit Stabilisierungsmitteln versetzt, die bei der Filtration mitsamt den Trübungsbildnern herausfiltriert wurden.

---

[1] Vgl. o. V.: Gesamtpolyphenole. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 3. „2 Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1996, S.169.

[2] Vgl. ebenda: Anthocyanogene, S. 171.

[3] Vgl. Ashwell, G.: New Colorimetric Methods of Sugar Analyses. In: Methods in Enzymology; Vol. 7.San Diego, Ca 1966, S. 85-95.

[4] Vgl. BioRad-Arbeitsanweisung Protein-Assay, 1999.

Es wurde PVPP (20g/hl) zur polyphenolseitigen Stabilisierung, eingesetzt, es wurde ein Xerogel (50g/hl) eingesetzt und es wurde mit einer Kombination von beiden gearbeitet (20 g/hl PVPP + 50 g/hl Xerogel).

Einfluss der Pasteurisation:

Die Fermentationsbrühe wurde sowohl unfiltriert als auch filtriert in einem Tunnelpasteur hitzebehandelt. Ebenso wurde mit den ausgemischten Getränken verfahren. Die Proben wurden mit 46 Pasteureinheiten beaufschlagt. Eine Pasteureinheit entspricht der Einwirkung von 60°C über eine Minute.[1]

Der sensorische Einfluß wurde mittels Dreiecksprüfung bestimmt[2]:

Das Verfahren eignet sich besonders zum Feststellen geringer Unterschiede zwischen zwei Prüfproben. Es werden hier den Verkostern drei verschlüsselte Proben gereicht, zwei der Proben sind gleich, eine unterscheidet sich. Der Prüfer muss dann bestimmen, welche Probe abweicht und optional welche bevorzugt. Um z.B. ein Signifikanzniveau von 0,01 zu erreichen, müssen bei fünf Prüfern fünf die abweichende Probe erkennen.

*Eingesetzte Materialien:*
*Milchsäure: Sigma, Deisenhofen*
*Zentrifuge, Sorvall, Mainz*
*Glucose, $H_2SO_4$, NaOH: Merck, Darmstadt*
*Phenol, Merck Darmstadt*
*BSA, Boehringer, Mannheim*
*Coomassie-Proteinraegenz: Biorad, Krefeld*
*PVPP(Divergan): BASF, Ludwigshafen*
*Becosorb (Xerogel): Begerow, Langenlonsheim*
*Membranfilter 0,2 µm; Sartorius Göttingen*
*Trübungsmessgerät: Monitek, Düsseldorf*
*Photometer Unicon 810: Tegunenta, Rotkreuz, Schweiz*

[1] Vgl. Heyse, K.U.: Handbuch der Brauerei-Praxis. 3. Aufl. Nürnberg 1995, S. 380.
[2] Vgl. o. V.: Dreieckstest. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993, S. 104.

## 9.8 Ausmischversuche

Um die entstandenen Fermentationsbrühen besser sensorisch beurteilen und um Aussagen über die Stabilität der Getränke machen zu können, wurde diese zu einem Getränk ausgemischt.

Rezept:

1 Teil Fermentationsbrühe

1 Teil Brauwasser

2 % Kristallzucker oder Vorderwürze

bei Bedarf natürliches Fruchtaroma.

Diese so ausgemischte Basis wurde dann auf 6g/l $CO_2$-Gehalt eingestellt und abgefüllt.

*Eingesetzte Materialien:*
*Brauwasser (9 Teile entsalztes Wasser/ 1 Teil Freisinger Leitungswasser)*
*Kristallzucker: Südzucker, Mannheim*
*Aromen: Haarmann & Reimer, Nördlingen*
*$CO_2$: Linde, Darmstadt*

# 10 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund des rückläufigen Bierabsatzes sind neue Wege für den deutschen Biermarkt notwendig. Es stellt sich die Frage, in welchen Marktsegmenten Brauereien Innovationen platzieren können, um sich neue Marktanteile zu erobern. Der boomende Markt der Wellness- und Functional-Drinks bietet sich hier an. Brauereien haben mit ihren Rohstoffen und daraus resultierenden Zwischenprodukten die Möglichkeit eine Getränkebasis herzustellen, mit der Fertiggetränke mit ernährungsphysiologischem Zusatznutzen ausgemischt werden können. Ein Zwischenprodukt ist die Bierwürze. Diese könnte durch Fermentation mit säurebildenden Mikroorganismen eine Basis für alkoholfreie Erfrischungsgetränke darstellen. Die Bierwürze enthält eine Vielzahl an ernährungsphysiologisch wertvollen Substanzen wie Mineralstoffe, Vitamine, Ballaststoffe und sekundäre Pflanzenstoffe. Eine Fermentation bringt eine weitere Aufwertung durch organische Säuren. Außerdem wird durch die Säure die für Erfrischungsgetränke notwendige Ratio (Zucker/Säureverhältnis) eingestellt. Diese Getränke wären ausschließlich aus natürlichen Rohstoffen hergestellt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Technologie zur Herstellung dieser alternativen Gärungsgetränke zu entwickeln. Hauptaugenmerk lag dabei auf der einfachen Umsetzbarkeit in der Brauerei.

Zunächst musste ein geeigneter säurebildender Mikroorganismus-Stamm gesucht werden, der zum einen an das Medium Bierwürze adaptiert ist, zum anderen aber keine biologische Gefährdung für die restlichen Produktionsabläufe in der Brauerei darstellt. Ausgewählt wurde die Gattung *Lactobacillus*. Einige Stämme finden bereits Anwendung in der Bierbereitung und sind daher gut an Würze adaptiert. Aufgrund ihrer thermophilen und hopfensensiblen Eigenschaften sind sie nicht bierschädlich. Aus verschiedenen Isolaten wurde ein Stamm selektiert, der die höchste Produktbildungsrate von ernährungsphysiologisch wertvoller L(+)-Milchsäure aufwies. Dieser Stamm wurde mittels RAPD-PCR-Analysen der Art *Lb. amylolyticus* zugeordnet. Er konnte durch AFLP-Technik eindeutig vom bei der DMSZ hinterlegten Typstamm unterschieden werden. Mit diesem Stamm (*Lb. amylolyticus SAG 07*) wurde nun die Technologie erstellt.

Zunächst wurde die Eignung von Bierwürze als Fermentationssubstrat für *Lb. amylolyticus* untersucht. Es wurde die Verstoffwechselung der Hauptinhaltsstoffe mit einer synthetischen Würze überprüft. Für Kohlenhydrate, Protein, Mineral- und Wuchsstoffe war der Mikroorganismus sehr gut an die Verhältnisse in Würze adaptiert. Eine Optimierung der Würzezusammensetzung war nicht notwendig.

Mit dem Mikroorganismus und dem Substrat wurden dann die optimalen Fermentationsparameter ermittelt.

Bei folgenden Fermentationsbedingungen ließen sich die besten Ergebnisse erzielen: Temperatur 49 °C, Würzekonzentration 10 GG%, Anstellzellzahl 20-60 $*10^6$ Zellen/ml, kontinuierliche $CO_2$ - Begasung. Unter diesen Bedingungen hergestellte Getränke zeichnen sich durch Frische und Spritzigkeit durch ein ausgewogenes Zucker/Säureverhältnis (Ratio) aus.

Diese Parameter wurden auf ihre Umsetzbarkeit im großtechnischen Maßstab geprüft. In Scale-Up Versuchen konnten reproduzierbare Ergebnisse wie in den Pilotfermentern erzielt werden. Ein erhöhter DMS-Gehalt konnte durch eine $CO_2$-Wäsche korrigiert werden.

Ein weiterer Kohlenhydratabbau und damit verbundene höhere Milchsäureausbeuten sollten durch pH-regulierte Fermentationen erreicht werden. Weder eine Pufferung noch eine pH-statische Kulturführung führten aber zu den gewünschten Ergebnissen.

Eine kombinierte Fermentation mit *Lactobacillus* und *Gluconobacter* wurde zusätzlich untersucht. Am vielversprechendsten war folgender Ablauf: In einer ersten Fermentationstufe wurden Laktobazillen und Gluconobacter getrennt bis zur log-Phase geführt. Dann wurde 1:1 verschnitten und unter „Laktobazillen-Bedingungen“ weiter fermentiert. Hierdurch konnte ein nach der Lactofermentation noch vorhandenes Würzearoma eleminiert werden.

Um aus der Basis auch klare Getränke herstellen zu können, wurde eine Filtrationstechnologie entwickelt. Sie basierte auf der brauereibekannten Kieselgurfiltration. Hiermit ließen sich trübungsfreie, mikrobiologisch einwandfreie Getränke herstellen.

Für den Vertrieb der Getränkebasis bzw. der Fertiggetränke sind Aussagen über die chemsich-physikalische Stabilität notwendig. Durch die Verdünnung wiesen die ausgemischten Getränke eine sehr hohe Stabilität auf. Die Basis hingegen musste mit Stabilisierungsmitteln behandelt werden. Da die Trübung sich überwiegend aus Kohlenhydraten und Proteinen zusammensetzt, war hier eine eiweiß-seitige Stabilisierung mit Xerogel am erfolgreichsten. Die mikrobiologische Stabilität war bei hygienischer Arbeitsweise kein Problem. Es empfiehlt sich jedoch eine Pasteurisation. Diese hat keine negativen Einflüsse auf die Sensorik und kolloidale Stabilität.

Mit dem selektierten Stamm und den gewonnenen Erkenntnissen über Stoffwechsel, Fermentations-parameter, Filtrationsmöglichkeiten und Stabilität ist es möglich, eine Basis herzustellen, die zu ernährunsphysiologisch wertvollen alkoholfreien Erfrischungsgetränken ausgemischt werden kann.

Mit der einfachen Umsetzbarkeit der Technologie mit der vorhandenen betrieblichen Ausstattung und der Vielzahl der ausmischbaren Getränke ist es den Brauereien möglich, in den boomenden Markt der Functional Drinks mit eigenen Mitteln einzusteigen.

# 11 Literaturverzeichnis


Anke, M. und K. Schümann: Spurenelemente. In Ernährungsmedizin. Biesalski, H. –K. (Hrsg.) Stuttgart 1999.

Ashwell, G.: New Colorimetric Methods of Sugar Analyses. In: Methods in Enzymology; Vol. 7.San Diego, Ca 1966.

Axelsson, L.: Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic acid Bacteria. Salminen, S. (Hrsg.). Helsinki, Finnland 1998.

Back, W.: Biologische Säuerung. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft 41,4. Nürnberg 1988.

Back, W.: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie. Teil I Nürnberg 1994.

Baltes, W.: Lebensmittelchemie. Berlin 2000.

Bast; E: „Mikrobiologische Methoden“, Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1999.

Beisenherz, G. et al.: Proteinbestimmung mittels Biorad-Reagenz. In: Zeitschrift für Naturforschung 8 1953.

Belitz, H.-D. und Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl. Berlin 1992.

Bergmeyer, H.U (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse 3. Aufl. , Bd 2. Weinheim 1974.

Biesalski, H.-K. (Hrsg.): Ernährungsmedizin. Stuttgart 1999.

Biesalski, H.-K.: Ballaststoffe. In: Ernährungsmedizin. Biesalski H.-K. (Hrsg.).Stuttgart 1999.

Biesalski, H.-K.: Vitamine. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H.-K. (Hrsg.) Stuttgart 1999.

Bohak, I. et al.:*Lactobacillus amylolyticus sp. nov.,* Isolated from Beer Malt and Beer Wort. In: Systematic and Applied Microbiology 21. Stuttgart, Jena, Ulm 1998.

Buchal, G.: Biersonderheiten. In: Getränkefachgrosshandel 6 . 2002.

Champ, M. et al.: Amylase Production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. In: Journal of Applied Bacteriology 55. 1983.

Chopin, A. :Organization and Regulation of Genes for Amino Acids synthesis in lactic acid Bacteria. In FEMS Microbiological Reviews 12. 1993.

Christensen J. et al.: Sequenze Analyses, distribution and expression of an aminopeptidase-N encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ232. In Gene 155. 1995, S. 89-93.

Daniel, H. und G. Rehner: Biochemie der Ernährung. Heidelberg 1999.

De Man, J.C: et al.: A Medium for the cultivation of Lactobacilli. In: J. appl. Bact. 23, (1). Amsterdam, Niederlande 1960.

Deckwer, W.-D. et al.(Hrsg.) et al.: Römpp-Lexikon - Biotechnologie und Gentechnik. 2 Aufl. Stuttgart 1999.

Dermirci, A. et al.: Media Evaluation of Lactic Acid Repeated-Batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*. In: Journal of Agricultur and food Chemistry 46. 1998.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (Hrsg.): Ernährungsbericht 1996. Frankfurt 1996

Döhler GmbH: Alkoholfreie Getränke auf Basis von Cerealien. Verfahren und Mikroorganismen zu ihrer Herstellung. Offenlegungsschrift Deutsches Patentamt DE 3512814 A1 1986.

Donhauser, S. und D. Wagner: Zucker und Endvergärungsgradbestimmung mittels der HPLC. In Monatsschrift für Brauwissenschaft 43, 9. Nürnberg 1990.

Edmund, R.S. et al.: The proteolytic system of Lactcic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Venema, G. (Hrsg.) Dordrecht, Niederlande 1995.

Ehrmann, M. und R. Vogel: Maltose Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and hetrerologous Expression of the Key Enzymes, Maltose Phosphorylase and Phosphoglucomutase. In: FEMS Microbiology Letters 169. 1998.

Ehrmann, M.: Klassifizierung und Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1994.

Elmadfa, I. und C. Leitzmann: Ernährung des Menschen. Stuttgart 1998.

Flemming, H.P. et al.: The Lactobacilli, Pediococci, and Leuconostocs: Vegetable Products: In: Bacterial Starter Cultures for Food .Gilliland, S. E. (Hrsg.). Boca Raton, Fl, USA 1985.

Fürst, P.:Proteine. In Ernährungsmedizin. Biesalki, H.-K. (Hrsg.) Stugart 1999.

Gandy, M.: Schmeckt die Zukunft funktionell? In: Getränkeindustrie Nr. 4. 2002.

Gänzle, U.: persönliche Mitteilungen

Garvie, E.I.: Bacterial Lactate Dehydrogenases. In: Microbiological Review, 44.

Geiger, E.: Gärung. In: Handbuch der Brauerei Praxis. Heyse, K.-U. (Hrsg.) Hamburg 2000.

Gibbs, R. A. et al.: o.T. In: Nucleic Acids Research Nr. 17. 1989.

Gilliland, S. E. (Hrsg.): Bacterial Starter Cultures for Food . Boca Raton, Fl, USA 1985

Giraud, E. et al.: Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of *Lactobacillus plantarum*. In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 60, No. 12. 1994.

Gobetti, M. et al.: Maltose-Fructose co-Fermentation by *Lactobacillus brevis subsp.lindneri* CB1 Fructose-negative Strain. In: Applied Microbiology and Biotechnology 42. 1995.

Gutmann, I. und A.W. Wahlenfeld. In: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, H.U (Hrsg.). 3. Aufl. , Bd 2. Weinheim 1974.

Hahn, A. und M. Wolters. Ernährungsökologie 1. 2000.

Hammes, P. und P. Tichazek: The potential of Lactic Acid Bacteria for the production of safe and wholesome food. In: Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Lebensmittelforschung. 1994.

Hammes, Wolfgang und Rudi Vogel: The genus Lactobacillus In: The Lactic Acid Bacteria. Wood, B. und Holzapfel, W. (Hrsg.). Glasgow 1995.

Henneberg, W. : Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brennereimaische, der Milch, des Bieres, der Presshefe, der Melasse, des Sauerkohls, der sauren Gurken und des Sauerteigs; sowie einige Bemerkungen über die Milchsäurebakterien des menschlichen Magens. In: Zentralblatt Bakterien und Parasitenkunde Abt. 2, 11.1904.

Heyse, K. U (Hrsg.).: Handbuch der Brauerei-Praxis. 3. Aufl. Nürnberg 1995.

Heyse, K. U.: Handbuch der Brauerei Praxis. 3. Aufl. Nürnberg 1995.

Heyse, K. U.: Neue Wege für den deutschen Biermarkt gefragt. In. Brauwelt Nr.31-32. 142 Jg. 2002.

Heyse, K.-U. (Hrsg.) Handbuch der Brauerei Praxis. Hamburg 2000

Heyse, K.U. (Hrsg.): Brauweltbrevier. Nürnberg 2002.

Holck, A. und H. Naes: Cloning, sequenzing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NCDO 151. In Journal of Genetic Microbiology 138. 1992.

Hopulele, T.: Zum Verhalten verschiedener Mineralstoffe in der Brauereitechnologie. (Diss.). Freising 1972.

Hüwell, H. et al.: Maltose Phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Purification, Characterization and Application in a Biosensor for Orthophosphat. Enzym. Microb. Technil. 21. 1997..

Jago, D.: New Food Products from Around the World. In: Food Engineering & Ingredients. April 2002.

Jansen , P. et. al.: Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. In: Journal of Microbiology. 142. 1996.

Jaskari, J. et al.: Oat ß-glucan and Xylan Hydrolysates as selektive substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. In: Journal for Applied Microbiology and Biotechnology 49. 1998.

Juillard, V. et al.: The extracellular $P_1$-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes ß-casein into more than hundred different oligopeptides. In: Journal of bacteriology 177. 1995.

Kandler, O. und N. Weiss: Regular, Nonsporing Gram-positive Rods. In: Bergey´s Manuel of systematic Bacteriology, Vol. 2. Baltimore, USA 1986.

Kandler, O.: Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. In: Antonie von Leeuwenhoek 49. Doordrecht 1983.

Kashket, E. R.: Bioenenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic pH and Osmotolerance. In: FEMS Micriobiology Review 46. Dordrecht 1987.

Kashket, E. und T. Wilson: Proton Motive Force in fermenting *Streptococcus lactis*. In Biochem. Biophys. Res. Commun. 59. 1974.

Konings et al.: Bioenergetics and Solute Transport in Lactococci. In: Critical Reviews in Microbiology. Vol 16.Issue 6. 1989.

Kontula, P. et al.:Oat bran ß-Gluco- and Xylo-oligosaccharides as fermentative substrates for Lactic acid bacteria. In: International Journal of food Microbiology 45. 1998.

Krishnan, S.et al.: Screening and selection of media components for Lactic acid production using Plackett-burma design. In: Bioprocess Engineering 19, 1998.

Kunze, W.: Technologie Brauer und Mälzer. Berlin, 1994.

Lauret, R.et al.: Carbohydrate Utilization in *Lactobacillus sake*: In: Applied and Environmental Microbiology 62. 1996.

Lin, J.J. et al.: A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. In: Nucleic Acids Research 24. 1996.

Lindgren, S. und O. Refai: Amylolytic Lactic Acid Bacteria in Fish Silage. In: Journal of Applied Bacteriology 57. 1984.

Lindner, P,: Über ein neues in Malzmaischen vorkommendes, Milchsäure bildendes Ferment. In: Wochenschrift für Brauerei 4, Nr. 23. 1887.

Löhnis, F.: Versuch einer Gruppierung der Milchsäurebakterien. In. Zentralblatt Bakterien- und Parasitenkunde Abt 2, 18. 1907.

Lonvaud-Funel, A.: Microbiology of the Malolactic Fermentation: Molecular Aspects. In: FEMS Microbiology Letters 126. 1995.

Matsushita, K. et al.: Respiratory Chains and Bioenergetics of acetic acid bacteria. In: Advances in Microbial Physiology 36. 1994.

Mc Feeters, R. F. und K.-H. Chen: Utilization of Electron Acceptors for anaerobic Metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as Electron Acceptors. In: Food Microbiology 3. 1986.

McIntosh, G.H.et al.: Barley foods and their influence on cholesterol metabolism. In: Plants in Human Nutrition, World Review Nutrition Dietetics 77. Simopoulos, A.P. (Hrsg.). 1995.

Morishita, T. et al. :Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acids biosynthetic pathways. In Journal of Bacteriolgy 148. 1981.

Morlion, B.J.: Wasser, Elektrolyte und Säure-Basen-Haushalt. In Ernährungsmedizin. Biesalski, H.-K. (Hrsg.) Stuttgart 1999.

Munro, H. und M. Crim: The Proteins and Amino Acids. In: Modern Nutrition in Health and Disease. Shils, M. und V. Young (Hrsg.).Philadelphia 1988.

Nakamura, L.K.: *Lactobacillus amylovorus*, a new Starch Hydrolysing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. In International Journal of Systematic Bacteriology 31. 1981.

Narziß, L.: Abriß der Bierbrauerei. 6. Aufl. Nürnberg 1995.

Narziß, L.: Die Technologie der Würzebereitung. Freising 1992.

Neubauer, H. et al.: Mechanism of Maltose Uptake and Glucose Excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. In: Journal of Bacteriology Vol. 176. No.10. 1994.

Newton, C. R. und A. Graham: Fingerprint-Analysen. In: PCR. Heidelberg 1994.

o. V. : Stichwort: Milchsäurebakterien. In: Biotechnologie und Gentechnik. Deckwehr, W.D. (Hrsg.). Stuttgart 1999..

o. V. In Getränkemarkt Nr. 9.

o. V.: Anleitung für GATC 1500-System DNA-Sequenzer

o. V.: Anthocyanogene. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 3. „2 Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1996.

o. V.: Dimethylsulfid und Vorstufen. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 3. 2 Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1996.

o. V.: Dreieckstest. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993.

o. V.: Forciermethode. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993.

o. V.: Gesamtpolyphenole. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 3. 2 Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1996.

o. V.: pH-Wert. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 1. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1997.

o. V.: Protokoll des Roche DIG Nucleic Acid Detektion Kit. Mannheim

o. V.: Trübung. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993.

o.V.: Sudwerkkontrolle. In: Brautechnische Analysenmethoden. Band 2. 3. Aufl. Pfenninger, H. (Hrsg.) Freising 1993.

o. V: SeitzSchenk Technisches Datenblatt Clarcel CBL. Bad Kreuznach. 2001

o. V: SeitzSchenk Technisches Datenblatt Clarcel DIC. Bad Kreuznach. 2001.

o.V. : Neues über Bier und Gesundheit. In Brauwelt Brevier 2002. K.U. Heyse(Hrsg.). Nürnberg 2002.

o.V.: Arbeitsanleitung für D- und L-Lactat Bestimmung mittels UV-Methode. Enzym-Test Cat.No. 112821, Boehringer. Mannheim 1997.

o.V.: Bier und Cola: Musik bei den Biermischgetränken. In: Brauwelt Nr. 29 .142. Jg. 2002.

o.V.: Stichwort: RAPD. In Römpp-Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Deckwer, W.-D. et al. (Hrsg.). Stuttgart 1999.

o.V.:Stichwort: DNA-Markertechnologie. In Römpp-Lexikon – Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Deckwer, W.-D. et al. (Hrsg.). Stuttgart 1999.

Olsen, N.: The impact of Lactic Acid Bacteria on cheese Flavour. In FEMS Microbiological Reviews 87. 1990.

Orla-Jenson, S.: The Lactic acid bacteria. In Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr. Naturvidensk. Og Mathem. Afd., 8 Raekk, V. 2. Andr. Fred. Host & Son. Kopenhagen, Schweden 1919.

Papp, A.: Erarbeitung von Beurteilungskriterien zur Vorhersage der Stabilisierbarkeit und der chemisch-physikalischen Stabilität in unfiltrierten Bier. (Diss.) Freising-Weihenstephan.

Peter, S.: Alkoholfreies Erfrischungsgetränk. Schutzrecht deutsches Patentamt DE 401200C2 1996.

Pfenninger, H. (Hrsg.): Brautechnische Analysemmethoden. Band 1. 3. Aufl. Freising 1997.

Pfenninger, H. (Hrsg.): Brautechnische Analysemmethoden. Band 2. 3. Aufl. Freising 1993.

Pfenninger, H. (Hrsg.): Brautechnische Analysemmethoden. Band 3. 2. Aufl. Freising 1996.

Pfenninger, H.: Die kolloidale Stabilität – ein wichtiges Qualitätskriterium von Bier. In: Brauerei-Rundschau, Nr. 7. 1987

Piendl, A und I. Wagner: Physiologische Eigenschaften der organischen Säuren des Bieres. In: Brauindustrie 68.1983.

Piendl, A.: Physiologische Bedeutung der Eigenschaften des Bieres. Nürnberg 1999.

Polmann, B. und W.N. Konings: Secondary solute transport in bacteria. In Biochem. Biophys. Acta 1183. 1993.

Pompeyo, C. et al: Comparison of Amylolytic Properties of *Lactobacillus amylovorus* and of *Lactobacillus amylophilus*. In:Applied Microbiology and Biotechnology 40. 1993.

Postma, P.W. et al.: Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System of Bacteria. In: Microbiological Reviews 57. 1993, S. 543-594.

Reizer, J. et A. Peterkofsky. (Hrsg.): Sugar Transport and Metabolism in Gram-positive Bacteria. Chichester, England 1987

Salminen, S. (Hrsg.): Lactic Acid Bacteria. 2. ed rev. New York 1998.

Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning – a laboratory manuel. 2. Aufl. Cold Spring Laboratory Press 1989.

Schlegel, H.-G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Kap. 8.2: Milchsäuregärung und *Lactobacteriaceae*. Stuttgart 1992.

Schleifer K. H. und E. Stackebrandt: Molecular systematics of procaryontes. In: Annual review in Microbiology. 1983.

Schleifer, K. H. und W. Ludwig, Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria In: The Lactic Acid Bacteria. Wood, B. und Holzapfel, W. (Hrsg.) London, 1995.

Schümann, K. und M. Anke: Mengenelemente. In: Ernährungsmedizin. Biesalski, H. –K. (Hrsg.) Stuttgart 1999.

Shils, M. und V. Young (Hrsg.): Modern Nutrition in Health and Disease. Philadelphia 1988

Simopoulos, A.P. (Hrsg.): Plants in Human Nutrition, World Review Nutrition Dietetics 77. 1995

Sjöberg, A. et al.: The influence of limiting and non limiting Growth Conditions on Glucose and Maltose Metabolism In *Lactococcus lactis ssp. lactis* Strains. In: Applied Microbiology and Biotechnology 42. 1995.

Sjöberg, A. und B. Hahn-Hägerdahl: ß-Glucose-1-Phosphat, a possible Mediator for Polysaccharide Formation in Maltose-Assimilating *Lactococcus lactis*. In: Applied and Environmental Microbiology Vol. 55, No. 6. 1989.

Steinmetz, T.: Der Einsatz von High Value Magnesium- und Calciumzitraten. In: Getränke. 1999.

Strachotta, T.: Grundlagen zur Herstellung neuartiger Getränke auf Malzbasis mit verschiedenen Mikroorganismen. (Diss.). Freising-Weihenstephan 1997.

Steudel, L.: Physiologische Bedeutung und molekulare Charakterisierung der Stressantwort von *Lb. pontis* und *Lb. sanfranciscensis*. (Diss.). Freising-Weihenstephan 2001.

Thomas, T.D. et al.: Change from Homo- to hetreolactic fermentation by *Streptococcus Lactis* resulting from Glucose Limitation in anaerobic chemostat cultures. In: Journal of Bacteriology 138 Jg. 1979.

Thompson, J. and B.M. Chassy: Uptake and Metabolism of Sucrose by *Streptococcus lactis*. In: Journal of Bacteriology 147. 1981.

Thompson, J.: Sugar Transport in Lactic acid Bacteria. In: Sugar Transport and Metabolism in Gram-positive Bacteria. Reizer, J. et A. Peterkofsky. (Hrsg.). Chichester, England 1987.

Thorne, R.S.W. und R.F. Beckley: o.T. .In: Journal of the Institiute of Brewing. 64, 38. 1958

Tolksdorf, M.: So schmeckt die Zukunft. In: Getränkeindustrie Nr. 10. 2001.

Tuley, L.: Functional Foods the technical issues. In: Food Manufacture Nr. 30.32. 1995.

UCN-Nahrungsmittel GmbH: Marke Scarabaeus, Au/Hallertau

Venema, G. (Hrsg.): Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Dordrecht, Niederlande 1995

Vogeser, G.: Isolierung eines bakteriellen $\alpha$-Acetolactat-Decarboxylase-Gens und Klonierung in Brauereihefen. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1993.

Vos, P. et al.: AFLP: A new technique for DNA – Fingerprinting. In: Nucleic Acids Research 23. Amsterdam 1995.

Wagner, D. : Mälzerei und Gärungstechnologische Einflüsse auf den Aminosäuregehalt der Malze und Biere. (Diss.) Freising-Weihenstephan 1969.

Walker, C.: Die Auswirkungen des Brauprozesses auf den Folsäuregehalt in Bier. In Brauwelt 11. 2002.

Watzl ,B. und C. Leitzmann: Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Stuttgart 1995.

Watzl, B.: Gesundheitliche Bedeutung sekundärere Pflanzenstoffe. In Ernährungsbericht 1996. DGE (Hrsg.). Frankfurt 1996.

Weinfurtner, F. et al.: Eine Kleingärapparatur zur Ermittlung der Gäreigenschaften von Brauereihefe. In: Brauwissenschaft. Jg. 14 Nr.3. 1961.

Westermeier, R.: Elektrophorese Praktikum VLH-Verlagsgesellschaft 1996.

Winnewisser, W.. Persönliche Mitteilungen.

Wood, B. und Holzapfel, W. (Hrsg.): The Lactic Acid Bacteria. Glasgow 1995.

**Danksagung**

Diese Arbeit entstand von April 1999 bis Dezember 2001 am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II der Technischen Universität München, Weihenstephan, unter der Leitung meines Doktorvaters Prof. Geiger. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Arbeitsmittel, vor allem aber für die intensive wissenschaftliche Betreuung danken.
Auch den vielen Mitarbeitern am Lehrstuhl sei gedankt. Nur durch ihre Mithilfe und ihr Teamwork konnte ich die Arbeit in diesem Umfang fertig stellen. Zum einem Frau Volkert und Frau Giebels, die erfolgreich die bürokratischen Kleinigkeiten auch wirklich klein hielten, des weiteren dem wissenschaftlichen Team: Dr. Wagner, Dr. Winnewisser, Dr. Springer, Dr. Vogeser, Prof. Donhauser, Herr Koller, Frau Volk, Herr Hummel für viel Rat und Tat und auch dem Laborteam: Frau Frey, Frau Oberkofler, Frau Huf, Herr Lackermeier und vor allem Frau Illing, die mir oft bei „Analysenschlachten“ zur Seite stand. Die Zeit wäre nicht annähernd so schön und erfolgreich gewesen ohne die „Doktor-Mitstreiter“: Michael Zepf, Georg Stettner, Andreas Papp, Andreas Scherer, Thomas Schubeck, Jonny Burkert, Holger Schöneborn, Beate Laible, Marc Kusche, Urs Wellhoener und Andreas Brandl. Sie standen mir mit viel, aber glücklicherweise nicht ausschließlich, fachlicher Hilfe zur Seite. Großen Anteil an der Arbeit haben auch meine fleißigen Diplomanden und Semesterarbeiter: Andreas Tramm, Rouven Otto, Anke Scheffler, Michaela Miedl, Michael Lipps, Michael Ruth und Nancy McGregor: Euch vielen Dank.
Es war sehr interessant im zusammenwachsenden Wissenschaftszentrum Weihenstephan zu arbeiten. Hierdurch wurden intensive und fruchtbare Kontakte zu andern Instituten möglich, die große Fortschritte bei dieser Arbeit brachten. Besonders erwähnt und gedankt sei hier Prof. Vogel, Dr. Gänzle und Dr. Ehrmann und ihrem Team vom Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie für die mikro- und molekularbiologische Hilfestellung. Prof. Kulozik und seine „Vorzimmer-Mannschaft“ hatten wegen dieser Arbeit noch mehr vorweihnachtlichen Stress. Auch die Unterstützung der Mitarbeiter der Brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt war eine sehr große Hilfe bei den vielen Analysen.
Ohne außeruniversitäre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Nicht nur die Finanzierung, sondern auch die praxisorientierte, fachliche Unterstützung des Gremiums bei der Berichterstattung, seitens der Wissenschaftsförderung des deutschen Brauerbundes waren sehr ergiebig. Der Fachhochschule Weihenstephan und hier vor allem Herrn Watermeyer sei gedankt für die Bereitstellung der Fermentationskapazitäten. Industrielle Unterstützung erhielt ich von der Staatsbrauerei Weihenstephan als ständiger Rohstoff- und Zwischenproduktlieferant und der Firma Haarmann und Reimer durch viele Aromen (Vielen Dank Herr Schulze).Ein ständig offenes Ohr hatten auch Dr. Briem und Dr. Strachotta, die mir durch viele Anregungen den Start in das Thema sehr erleichtert haben. Sandra Strobel sei gedankt für ihre unkomplizierte, schnelle Hilfe beim korrigieren.
Den mit größten Anteil an dieser Arbeit haben sicherlich meine Eltern, die während der gesamten Ausbildung immer an mich geglaubt haben und mir ihre volle Unterstützung entgegen gebracht haben. Vielen lieben Dank dafür.
Auch meiner Freundin Annika danke ich sehr für ihre Geduld und Motivation, vor allem während des zähen „Zusammenschreibens“.
Ohne euch alle hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können.