

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie  
Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie

Isolierung universell einsetzbarer und mikrobiologisch stabiler  
Sauerteigstarterkulturen  
durch spontane Fermentationen mit Amaranth



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

Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim

vorgelegt von  
**Yasemin Arzu Sterr**  
aus Leonberg

2009

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person und Prüfer:	Prof. Dr. Herbert Schmidt
2. berichtende Person und Prüfer:	Prof. Dr. Jochen Weiss
3. Prüfer:	Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhold Carle
Eingereicht am:	11. September 2009
Mündliche Prüfung am:	10. Dezember 2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 16. November 2009 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

*WER WEISHEIT MIT HEITERKEIT UND LIEBENSWÜRDIGKEIT VERBINDET,  
HAT DIE HÖCHSTE STUFE IM MENSCHENLEBEN ERREICHT.*

(William McDougall 1871-1938)



---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Pseudocerealien und ihre Eigenschaften .....	13
1.2 Die Krankheit Zöliakie – Definition, Vorkommen und Therapie .....	15
1.3 Sauerteig – Eigenschaften, Typisierung und Milchsäurebakterien .....	17
1.4 Problemstellung und Zielsetzung der wissenschaftlichen Arbeit .....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1 Kultivierungsbedingungen .....	23
2.2 Medien.....	23
2.3 Puffer und Lösungen .....	25
2.4 Herstellung von Amaranthmehl .....	26
2.5 Spontane Sauerteigfermentationen mit Amaranth.....	27
2.6 Molekularbiologische Analysen .....	28
2.6.1 DNA-Isolierung von MSB .....	28
2.6.2 DNA-Isolierung von Schimmelpilzen .....	28
2.6.3 Differenzierung dominanter MSB-Stämme mit RAPD-PCR .....	29
2.6.4 Amplifikation bakterieller 16S rDNA .....	31
2.6.5 Amplifikation eukaryontischer 28S rDNA.....	32
2.6.6 Aufreinigung der 16S rDNA bzw. 28S rDNA PCR-Produkte .....	33
2.6.7 Sequenzierung der 16S- bzw. 28S rDNA PCR-Produkte.....	33
2.7 Fermentationseigenschaften ausgewählter Stämme.....	34
2.7.1 Fermentationen mit ausgewählten Stämmen .....	34
2.7.2 Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h .....	35
2.7.3 Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der autochthonen Mikroflora .....	35
2.7.4 Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen.....	36
2.8 Analyse von Metaboliten in mMRS-5-Medium mittels HPLC .....	36
2.9 Analyse von Metaboliten in Sauerteig mittels HPLC.....	36
2.9.1 Bestimmung von organischen Säuren und Ethanol.....	37
2.9.2 Bestimmung von Kohlenhydraten und Mannitol .....	37

---

2.10	Verwertung von Kohlenhydraten.....	38
2.11	Vergleich der Fermentationsleistungen der Isolate mit denen kommerzieller Starterkulturen.....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Fermentationsparameter spontan fermentierter Sauerteige.....	40
3.2	Differenzierung und Identifizierung dominanter MSB.....	43
3.3	Morphologische Beschreibung der MSB-Stämme.....	48
3.3.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> RTa12 (LTH 6724).....	48
3.3.2	<i>Lactobacillus sakei</i> RTa14 (LTH 6725).....	48
3.3.3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> RTa11 (LTH 6727).....	49
3.4	Fermentationseigenschaften ausgewählter Stämme.....	48
3.4.1	Fermentationen mit ausgewählten Stämmen.....	49
3.4.2	Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h.....	52
3.4.3	Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der autochthonen Mikroflora.....	54
3.4.4	Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen.....	57
3.5	Analyse von Metaboliten in mMRS-5-Medium mittels HPLC.....	58
3.6	Analyse von Metaboliten in Sauerteig mittels HPLC.....	59
3.6.1	Fermentationen mit ausgewählten Stämmen.....	59
3.6.2	Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h.....	61
3.6.3	Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen.....	68
3.7	Verwertung von Kohlenhydraten.....	81
3.8	Vergleich der Fermentationsleistungen der Isolate mit denen kommerzieller Starterkulturen.....	81
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>

**Abkürzungsverzeichnis:**

A	Adenin
ADP	Adenosyldiphosphat
AM	Amaranth aus Mexiko (Allos GmbH)
AP	Amaranth aus Peru (Alnatura <sup>®</sup> Produktions- und Handels GmbH)
ATP	Adenosyltriphosphat
bp	Basenpaare
BR	Bio Reisstarter
C	Cytosin
CoA	Coenzym A
ddNTP	2'-3' Dideoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Amaranth aus Peru (Davert GmbH)
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
End-Säuregrad	Säuregrad am Ende der Fermentation
End-pH-Wert	pH-Wert am Ende der Fermentation
<i>Exol</i>	Exonuklease I
FDA	Food and Drug Administration
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICC	International Association for Cereal Science and Technology
KbE	Koloniebildende Einheit

---

KmU	kleine und mittlere Unternehmen
l	Liter
LP RTa12	<i>Lactobacillus plantarum</i> RAPD-Typ Amaranth Nr. 12
LS RTa14	<i>Lactobacillus sakei</i> RAPD-Typ Amaranth Nr. 14
M	mol/l
min	Minute
mMRS-5	modifiziertes de Man-Rogosa-Sharpe-5-Medium
MSB	Milchsäurebakterien
n	nano
NAD <sup>+</sup>	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NP	Amaranth aus Peru (Neuform VDR e. G.)
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PP RTa11	<i>Pediococcus pentosaceus</i> RAPD-Typ Amaranth Nr. 11
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RT	RAPD-Typ
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SG	Amaranth aus Deutschland (St. Josefgut)
T	Thymin
TA	Teigausbeute
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TPP	Thiamin-Pyrophosphat
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	Unit
YGC	Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Medium

**Abbildungsverzeichnis:**

- Abbildung 1. Übersicht über den Kohlenhydratstoffwechsel homo- und heterofermentativer MSB nach KANDLER (1983). NAD<sup>+</sup> und NADH: oxidiertes und reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; ADP und ATP: Adenosyldi- und triphosphat..... 20
- Abbildung 2. A. MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] des spontan fermentierten Amaranth-sauerteiges SG über zehn Tage. Keimzahlen von Typ 1-Kolonien (grüne Balken), Typ 2-Kolonien (gelbe Balken), Typ 3- und 4-Kolonien (blaue Balken) und MSB-Gesamtkeimzahl (schwarze Linie). B. pH-Wert-Verlauf (■) und Säuregradverlauf (●) während der Spontanfermentation. .... 42
- Abbildung 3. Agarosegel (1,5%) mit RAPD-PCR-Mustern von ausgewählten MSB-Isolaten (identifiziert durch Sequenzierung) erhalten durch den Primer 1254 (A) und M13V<sub>mod.</sub> (B). In den Klammern stehen die Mehle, aus denen die Stämme isoliert wurden (vgl. Tabelle 8). 1, 11: λ HindIII/EcoRI-Marker; 2: *Lactobacillus sakei* (LS) RTa14 (AM 1); 3: LS RTa1 (AM 1); 4: *L. plantarum* (LP) RTa12 (SG 2); 5: *Pediococcus pentosaceus* (PP) RTa3 (AM 2); 6: PP RTa5 (SG 1); 7: PP RTa7 (AI 2); 8: PP RTa8 (AP 1); 9: PP RTa9 (AI 1); 10: PP RTa11 (AP 2)..... 44
- Abbildung 4. Dendrogramm der RAPD-Typen (erhalten durch den Primer M13V<sub>mod.</sub>) der aus allen Spontanfermentationen mit Amaranth isolierten Stämme. *Pediococcus pentosaceus* (PP) RTa3, 5, 7, 8, 9, 11; *Lactobacillus plantarum* (LP) RTa12; *L. sakei* (LS) RTa1, 14..... 45
- Abbildung 5. Kolonienmorphologie von *Lactobacillus plantarum* RTa12 LTH 6724 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre... .. 48
- Abbildung 6. Kolonienmorphologie von *Lactobacillus sakei* RTa14 LTH 6725 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre. .... 48

- Abbildung 7. Kolonienmorphologie von *Pediococcus pentosaceus* RTa11 LTH 6727 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre. .... 49
- Abbildung 8. RAPD-PCR Fingerprints unter Verwendung von Primer M13V<sub>mod.</sub>, aufgetrennt in einem 1,5%igen Agarosegel. 1:  $\lambda$  HindIII/EcoRI-Marker; 2-6: eingesetzter Stamm *L. plantarum* RTa12; 7-11: Isolate aus dem Teig nach zehntägiger Fermentation. .... 51
- Abbildung 9. A. MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] der Fermentation über 24 h mit Amaranth DP. B. pH-Wert- (■) und Säuregradverlauf (●) während der Fermentation. *P. pentosaceus* (gelbe Balken bzw. Kurve) und *L. plantarum* (rote Balken bzw. Kurve). .... 53
- Abbildung 10. Schimmelpilzkulturen, die im Teig DP fermentiert mit *L. plantarum* RTa12 nach 16 h vorhanden waren. Nachweis auf YGC-Agarplatten, Inkubation für 48 h bei 30°C. .... 54
- Abbildung 11. MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] der Fermentation zur Evaluation der Wettbewerbsfähigkeit über 64 h mit Amaranth DP. *P. pentosaceus* (gelbe Balken); *L. plantarum* (rote Balken); Begleitflora (mittelblaue, grüne, hellblaue, dunkelblaue Balken); MSB-Gesamtkeimzahl (schwarze Kurven). Einsatz von 10<sup>7</sup> KbE g<sup>-1</sup> *L. plantarum* RTa12 (A) und *P. pentosaceus* RTa11 (B) nach 24 h Spontanfermentation, nach 48 h mit 10% Vorteig angefrischt. .... 56
- Abbildung 12. MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] von Amaranthfermentationen mit Temperaturvariation. Blaue Balken, 25°C; grüne Balken, 30°C; gelbe Balken, 35°C. A. Keimzahlen von *L. plantarum* RTa12. B. Keimzahlen von *P. pentosaceus* RTa11. C. (*L. plantarum* RTa12), D. (*P. pentosaceus* RTa11) pH-Wert- und Säuregrad-Verlauf während den Fermentationen mit Temperaturvariation.  $\Delta$ , blaue Kurven, 25°C;  $\square$ , grüne Kurven, 30°C;  $\circ$ , gelbe Kurven, 35°C. .... 58

- Abbildung 13. Konzentrationen [mM] von Laktat (■) und Acetat (●) mit Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb 24 h. Rote Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12, gelbe Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11. .... 62
- Abbildung 14. Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat im Teig innerhalb einer 24stündigen Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 (●) und *P. pentosaceus* RTa11 (●)..... 63
- Abbildung 15. Konzentrationen [mM] von Glukose (▲) und Saccharose (◆) mit Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb 24 h. Rote Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12, gelbe Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11. .... 64
- Abbildung 16. Mittelwerte der Konzentrationen [mM] der analysierten organischen Säuren in den mit *Lactobacillus plantarum* (A) und *Pediococcus pentosaceus* (B) fermentierten Teigen über 24 h (Standardabweichungen siehe Anhang)..... 66
- Abbildung 17. Mittelwerte der Konzentrationen [mM] der analysierten Kohlenhydrate und des Zuckeralkohols Mannitol in den mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 (A) und *Pediococcus pentosaceus* RTa11 (B) fermentierten Teigen über 24 h (Standardabweichungen siehe Anhang). .... 67
- Abbildung 18. Konzentrationen [mM] von Laktat (■) und Acetat (●) mit Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb von 24 h bei 25°C (blaue Kurven), 30°C (grüne Kurven) und 35°C (gelbe Kurven). A. *Lactobacillus plantarum* RTa12, B. *Pediococcus pentosaceus* RTa11..... 69
- Abbildung 19. Konzentrationen [mM] von Glukose (▲) und Saccharose (◆) während der Fermentation innerhalb von 24 h bei 25°C (blaue Kurven), 30°C (grüne Kurven) und 35°C (gelbe Kurven). A. *Lactobacillus plantarum* RTa12, B. *Pediococcus pentosaceus* RTa11. .... 72

Abbildung 20. Konzentrationen [mM] von Fruktose, Maltose, Cellobiose, Trehalose und Mannitol während der Fermentation mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung..... 75

Abbildung 21. Konzentrationen [mM] von Fruktose, Maltose, Cellobiose, Trehalose und Mannitol während der Fermentation mit *Pediococcus pentosaceus* RTa11 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung..... 76

Abbildung 22. Konzentrationen [mM] von Citrat, Formiat, Propionat, Succinat, Iso-Butyrat und Butyrat während der Fermentation mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung..... 79

Abbildung 23. Konzentrationen [mM] von Citrat, Formiat, Propionat, Succinat, Iso-Butyrat und Butyrat während der Fermentation mit *Pediococcus pentosaceus* RTa11 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung..... 80

Abbildung 24. A. MSB-Keimzahlen [ $\text{KbE g}^{-1}$ ] von Amaranthfermentationen mit kommerziellen Starterkulturen und ausgewählten Stämmen. Grüne Balken: Böcker Bio Reisstarter; rote Balken: *Lactobacillus plantarum* RTa12; gelbe Balken: *Pediococcus pentosaceus* RTa11; blaue Balken: Blessing Biotech *Lactobacillus fermentum* LF1. B. pH-Wert- und Säuregrad-Verlauf während den Fermentationen mit kommerziellen Starterkulturen. Grüne Kurven: Böcker Bio Reisstarter; rote Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12; gelbe Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11; blaue Kurven: Blessing Biotech *Lactobacillus fermentum* LF1; schwarze Kurven: Leerteige. .... 83

---

Abbildung 25. Pyruvat-Stoffwechsel homofermentativer MSB nach KANDLER *et al.* (1993), CSELOVSZKY *et al.* (1992) und COCAIGN-BOUSQUET *et al.* (1996). Endprodukte des Stoffwechsels sind fettgedruckt, Hauptprodukte fettgedruckt und unterstrichen. CoA: Coenzym A, P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat, TPP: Thiamin-Pyrophosphat, [O<sub>2</sub>]: oxidative Decarboxylierung..... 93

**Tabellenverzeichnis:**

Tabelle 1. Reaktionsansatz RAPD-PCR mit den Primern M13V <sub>mod.</sub> oder 1254.....	30
Tabelle 2. PCR-Programm für RAPD-PCR mit den Primern M13V <sub>mod.</sub> oder 1254....	30
Tabelle 3. Reaktionsansatz 16S rDNA-PCR mit den Primern 616V und 630R.....	31
Tabelle 4. PCR-Programm für 16S rDNA-PCR mit den Primern 616V und 630R ....	32
Tabelle 5. Reaktionsansatz 28S rDNA-PCR mit den Primern P1 und P2.....	32
Tabelle 6. PCR-Programm für 28S rDNA-PCR mit den Primern P1 und P2 .....	33
Tabelle 7. pH-Werte, Säuregrade und MSB-Keimzahlen [KbE g <sup>-1</sup> ] aus spontan fermentierten Amaranthsauerteigen nach zehn Tagen Fermentation mit täglichem Propagieren.....	40
Tabelle 8. MSB-Spezies, isoliert aus spontan fermentierten Amaranthsauerteigen, deren prozentualer Anteil an der MSB-Gesamtkeimzahl und die Anzahl der vorkommenden Stämme. AP: Alnatura <sup>®</sup> Peru; AM: Allos Mexiko; AI: Alnatura <sup>®</sup> Indien; NP: Neuform Peru; SG: St. Josefgut Deutschland. ....	47
Tabelle 9. Eigenschaften und Charakteristika von Amaranthsauerteigen, fermentiert mit ausgewählten Stämmen. Es wurde jeweils mit 10 <sup>7</sup> KbE g <sup>-1</sup> Teig inokuliert.....	50
Tabelle 10. Konzentrationen [mM] der Metabolite am Ende der Fermentation mit <i>A. P. pentosaceus</i> RTa11 (AP, AM, SG, AI und NP). <i>B. L. sakei</i> RTa14 (AP, AM, SG und NP) und <i>L. plantarum</i> RTa12 (DP), analysiert mit HPLC.....	60
Tabelle 11. Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat, analysiert in den mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11 fermentierten Teigen und den Mehlen AP, AM, SG, AI und NP am Ende der Fermentation.....	61

---

Tabelle 12. Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat, analysiert in den mit <i>L. sakei</i> RTa14 (AP, AM, SG, NP) und <i>L. plantarum</i> RTa12 (DP) fermentierten Teigen am Ende der Fermentation.....	61
Tabelle 13. Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat analysiert in den mit <i>L. plantarum</i> RTa12 fermentierten Teigen bei 25, 30 und 35°C nach 0, 4, 8, 12 und 24 h. ....	70
Tabelle 14. Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat analysiert in den mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11 fermentierten Teigen bei 25, 30 und 35°C nach 0, 4, 8, 12 und 24 h.....	70
Tabelle 15. Vergleich der kompletten 16S rDNA-Sequenz des Isolates <i>Lactobacillus sakei</i> RTa14 (= Query; Accession No. FM 179608) mit <i>L.sakei</i> 23 K (= Sbjct; Accession No. CR936503; Chaillou <i>et al.</i> , 2005). Identisch zu 99,9% mit 1540 von 1542 Übereinstimmungen.....	103
Tabelle 15 (Forts.). Vergleich der kompletten 16S rDNA-Sequenz des Isolates <i>Lactobacillus sakei</i> RTa14 (= Query; Accession No. FM 179608) mit <i>L.sakei</i> 23 K (= Sbjct; Accession No. CR936503; CHAILLOU <i>et al.</i> , 2005). Identisch zu 99,9% mit 1540 von 1542 Übereinstimmungen.....	104
Tabelle 16. Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	105
Tabelle 16 (Forts.). Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	106
Tabelle 16 (Forts.). Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	107
Tabelle 17. Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	108

---

Tabelle 17 (Forts.). Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	109
Tabelle 17 (Forts.). Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	110
Tabelle 18. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 25°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	111
Tabelle 19. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	112
Tabelle 20. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 35°C mit <i>L. plantarum</i> RTa12, analysiert mit HPLC.....	113
Tabelle 21. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 25°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	114
Tabelle 22. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 30°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	115
Tabelle 23. Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 35°C mit <i>P. pentosaceus</i> RTa11, analysiert mit HPLC.....	116

# 1. Einleitung

## 1.1 Pseudocerealien und ihre Eigenschaften

Glutenfreie Pseudocerealien wie Amaranth, Buchweizen und Quinoa gelangen in jüngster Zeit als Lebensmittel vermehrt in den Mittelpunkt des weltweiten Interesses. Brot oder Broterzeugnisse welche teilweise oder vollständig aus Pseudocerealien hergestellt werden, sind neben ihren ernährungsphysiologischen Eigenschaften sowie aufgrund ihrer Potentiale, neue Aromakomponenten im Lebensmittel zu kreieren, von Bedeutung. Sie zeichnen sich durch die nicht zöliakietoxischen Eigenschaften der Prolamine als Ersatznahrungsmittel für Zöliakiepatienten aus. Im Vergleich zu Weizen, Roggen, Hafer und Gerste haben MATUZ *et al.* (2000) keine Reaktionen der Prolaminfraktion von Amaranth gegenüber Hasen Anti-Gliadin (Weizen) Antikörper analysieren können. Dies konnte durch andere Studien bestätigt werden. Durch das Fehlen von Gluten weisen sie jedoch keine Klebereigenschaften im Teig auf und das Ausbilden eines viskoelastischen dreidimensionalen Netzwerkes im Teig und somit im späteren Gebäckstück ist nicht gegeben. Als Gerüstsubstanz für glutenfreie voluminöse Backwaren wird daher stets glutenfreie Stärke im Brotteig mitgeführt.

Pseudocerealien sind aus botanischer Sicht zweikeimblättrige Pflanzen und unterscheiden sich aufgrund dessen von den echten, zur Gruppe der einkeimblättrige Pflanzen gehörenden, Cerealien. Die Produktion von stärkereichen Körnern ist ebenso gegeben. Strukturell und chemisch gesehen ähnelt das Endosperm dem des Cerealienkornes, das aus einer nicht aus Stärke bestehende Aleuronschicht und großen stärkehaltigen Zellen, welche den meisten Anteil des Endosperms ausmachen, besteht.

Amaranthkörner sind runde, linsenförmige, einen Millimeter kleine Samen. Weltweit sind über 60 Amaranth Spezies bekannt. Bei der bekanntesten Spezies handelt es sich um *Amaranthus caudatus* L. (syn. *edulis* Spegazzini), *Amaranthus cruentus* L. (syn. *paniculatus* L.) und *Amaranthus hypochondriacus* (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008). Besonders der aus Mexiko stammende *Amaranthus hypochondriacus* (SILVA-

SÁNCHEZ, 2008) ist aufgrund seines hohen ernährungsphysiologischen Nährwertes ein interessantes Nahrungsmittel. Insbesondere ist damit der Proteingehalt von Bedeutung, der mit einem Anteil von 8,9 bis 16,5% höher liegt als bei Buchweizen und Quinoa. Der Proteingehalt und die Aminosäurezusammensetzung sind stark abhängig vom jeweiligen Genotyp und von den Wachstumsbedingungen (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008). Der Gehalt an essentiellen Aminosäuren bei Amaranth ist auffallend hoch. Lysin, Methionin, Arginin und Tryptophan wurden im Vergleich zu anderen Cerealien in größeren Mengen gefunden (MATUZ *et al.*, 2000; GORINSTEIN *et al.*, 2002). Die Aminosäurezusammensetzung von Amaranth entspricht in etwa den Anforderungen, welche von der WHO/FAO (OLUSEGUN, 1983) vorgeschrieben werden und ist demnach wertvoll für die menschliche Ernährung. Die Proteinqualität hängt einerseits von der Aminosäurezusammensetzung ab, andererseits von der Bioverfügbarkeit der Proteine. Diese ist für Pseudocerealien weitaus größer als für konventionelle Cerealien (74,2% für Amaranth Vollkornmehl) (BEJOSANO und CORKE, 1998). Amaranth ist reich an Vitaminen, Mineralstoffen und besonders an Kalzium, Magnesium, Eisen, Kalium und Zink (GAMEL *et al.*, 2006; BECKER *et al.*, 1981). Der Mineralstoffgehalt (Asche) ist im Amaranth doppelt so hoch als in anderen Cerealien. Der Fettgehalt, insbesondere der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, ist um 2-3-mal höher als bei herkömmlichen Cerealien.

Die Stärke im Amaranth ist im Vergleich zur Stärke aus konventionellem Getreide unterschiedlich. Im Amaranth stellt sie die Hauptkomponente an Kohlenhydraten dar (55%), ist jedoch in kleineren Mengen als in Cerealien vorhanden (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008). Weiter ist Amaranthstärke nicht im Endosperm sondern im Perisperm lokalisiert. Amaranthkörner weisen zusätzlich geringe Mengen resistenter Stärke auf. GONZALEZ *et al.*, 2007 haben einen Gehalt von 0,65% im Korn analysiert. Bei der Extrusion und durch Erhitzen steigt der Gehalt an, während er durch Kochen und Aufpoppen eher sinkt (GAMEL *et al.*, 2005). Resistente Stärke ist, ähnlich wie Ballaststoffe, für menschliche Darmenzyme nicht spaltbar und gelangt unverdaut in den Darm, wo sie von Bakterien fermentiert wird. Ihr werden gesundheitsfördernde Eigenschaften, wie eine blutfettsenkende Wirkung und die Verminderung des Risikos an Darmkrebs zu erkranken, zugeschrieben. Mono- und Disaccharide können im Amaranth nur in geringen Mengen gefunden werden (1,84-2,17 g/100 g, GAMEL *et*

*al.*, 2006). Saccharose konnte als das vorherrschende Kohlenhydrat im Korn analysiert werden (0,58-0,75 g/100 g). In geringeren Mengen sind andere Kohlenhydrate wie Galaktose und Glukose (0,34-0,42 g/100 g), Fruktose (0,12-0,17 g/100 g), Maltose (0,24-0,28 g/100 g), Raffinose (0,39-0,48 g/100 g), Stachyose (0,15-0,13 g/100 g) und Inositol (0,02-0,04 g/100 g) vorhanden (GAMEL *et al.*, 2006; vgl. auch BECKER *et al.*, 1981). Bezüglich dem Gehalt an Ballaststoffen liegen die Werte für Amaranth im Bereich der Cerealien (19,5-27,5% *A. cruentus* und 33,1-49,3% *A. hypochondriacus*; BRESSANI *et al.*, 1990).

## 1.2 Die Krankheit Zöliakie – Definition, Vorkommen und Therapie

Unter Zöliakie wird eine immunologische Erkrankung verstanden, welche durch mit der Nahrung aufgenommenes Gluten ausgelöst wird (HURTADO-VALENZUELA *et al.*, 2008). Es handelt sich um eine chronische gastrointestinale Entzündung, die ausschließlich durch den lebenslangen Verzicht auf Gluten behandelt werden kann (GREEN und CELLIER, 2007; LESTER, 2008). Der Codex Alimentarius definiert Gluten als eine Proteinfraction von Weizen, Roggen, Gerste und Hafer oder deren Kreuzungen und Derivate, auf die manche Menschen intolerant reagieren und welche in Wasser und 0,5 M NaCl unlöslich sind (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2008). Diese Definition ist ähnlich zur Festlegung der FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA; 2007): „Die Proteine, welche natürlicher Weise in Weizen, Roggen, Gerste und deren Kreuzungen vorkommen und welche nachteilige Gesundheitsauswirkungen für Zöliakiepatienten hervorrufen können“. Heutzutage ist quer durch alle Bevölkerungsschichten etwa 1-2% der Weltbevölkerung von dieser Krankheit betroffen (GREEN und CELLIER, 2007; RODRIGO, 2006). In genetisch isolierteren Ländern, wie z. B. Nordirland, Finnland oder Sardinien, soll eine stärkere Inzidenz vorliegen (MÄKI *et al.*, 2003). In Nordamerika scheint die Krankheit weniger verbreitet zu sein als in Europa. Gründe dafür könnten protektivere Umweltfaktoren in den USA sein, da Amerikaner und Europäer weitestgehend einen gemeinsamen genetischen Hintergrund haben (FASANO *et al.*, 2003). Zöliakie ist nicht nur in entwickelten Ländern zu finden, sie nimmt ebenso in Ländern der Dritten Welt, wie Nordafrika (BDIOUI *et al.*, 2006), dem

mittleren Osten (SHAHBAZKHANI *et al.*, 2003) und Indien (SOOD *et al.*, 2006) zu. Oft manifestiert sich Zöliakie schon in der frühen Kindheit und die hohe Kindersterblichkeit in Entwicklungsländer kann auf die Unverträglichkeit des Glutens zurückgeführt werden.

Glutenproteine sind aufgrund ihres hohen Prolingehaltes sehr resistent gegen proteolytische Degradation im Gastrointestinaltrakt, da den Magen- und Pankreasenzymen post-prolinspaltende Aktivität fehlt (CATASSI und FASANO, 2008). Die Ursachen der Krankheit sind noch weitgehend unklar, werden aber in erster Linie auf genetische Faktoren zurückgeführt. Typische Syndrome der Krankheit sind chronische Diarrhö, Gewichtsverlust, Ausdehnung des Unterleibs und Symptome mit Auswirkungen auf verschiedene Organe. Durch die verminderte Nährstoffaufnahme aufgrund der entzündeten Darmzotten kommt es vermehrt zu Osteoporose, da im Körper Kalziummangel herrscht. FASANO und CATASSI (2001) haben aufgrund undiagnostizierter Fälle von Zöliakie ein erhöhtes Risiko für Unfruchtbarkeit, Osteoporose und Krebs feststellen können. Sehr oft bleibt die Krankheit unerkannt. Dies resultiert aus dem Fehlen typischer Symptome, und sie kann nur durch serologische Prüfverfahren erkannt werden.

Da glutenhaltige Lebensmittel, wie Brot und Nudeln, in vielen Teilen der Welt zu Grundnahrungsmitteln gehören, ist es eine Herausforderung für zöliakiebetreffene Menschen, lebenslang auf Gluten zu verzichten. Als Grundnahrungsmittel tragen diese einerseits dazu bei, den Energiebedarf der Menschen zu decken, und stellen zusätzlich ein Genussmittel dar, welches einen Teil unserer Kultur ausmacht. In vielen hochverarbeiteten Lebensmitteln ist „verstecktes“ Gluten enthalten. Als Stabilisator oder als Bindemittel dienende Weizenproteine oder mit Gluten verunreinigte Weizenstärke können zur Glutentoxizität eines Produktes beitragen. Beispiele hierfür sind Suppen, Soßen, Wurst- und Käsewaren oder auch Vitaminpräparate. In einigen Biersorten ist ebenfalls Gluten enthalten. Aufgrund dieser beschränkten Lebensmittelauswahl ist es für die Betroffenen sehr schwierig ein normales Leben zu führen. Auf Weizen, Gerste und Roggen sollte lebenslang verzichtet werden. Ob dies ebenso auf Hafer zutrifft ist noch nicht vollständig geklärt. Klinische Studien haben mit wenigen Ausnahmen ergeben, dass eine dauerhafte

Aufnahme von Hafer keine Schädigungen bezüglich Zöliakie bei Kindern und Erwachsenen hervorruft (HABOUBI *et al.*, 2006). Viele auf dem Markt erhältliche Haferprodukte sind jedoch mit glutenhaltigen Cerealien kreuzkontaminiert und sollten aufgrund dessen von Erkrankten gemieden werden. Alternativ zu diesen Produkten können Amaranth, Buchweizen, Hirse, Reis und Mais ohne Bedenken verzehrt werden. In Reformhäusern, und vereinzelt auch in Supermärkten, werden speziell für Zöliakiepatienten glutenfreie Nahrungsmittel angeboten. Zöliakievereinigungen geben als Unterstützung der betroffenen Bevölkerung jährlich Daten über verarbeitete Lebensmittel heraus, welche als glutenfrei einzustufen sind.

### **1.3 Sauerteig – Eigenschaften, Typisierung und Milchsäurebakterien**

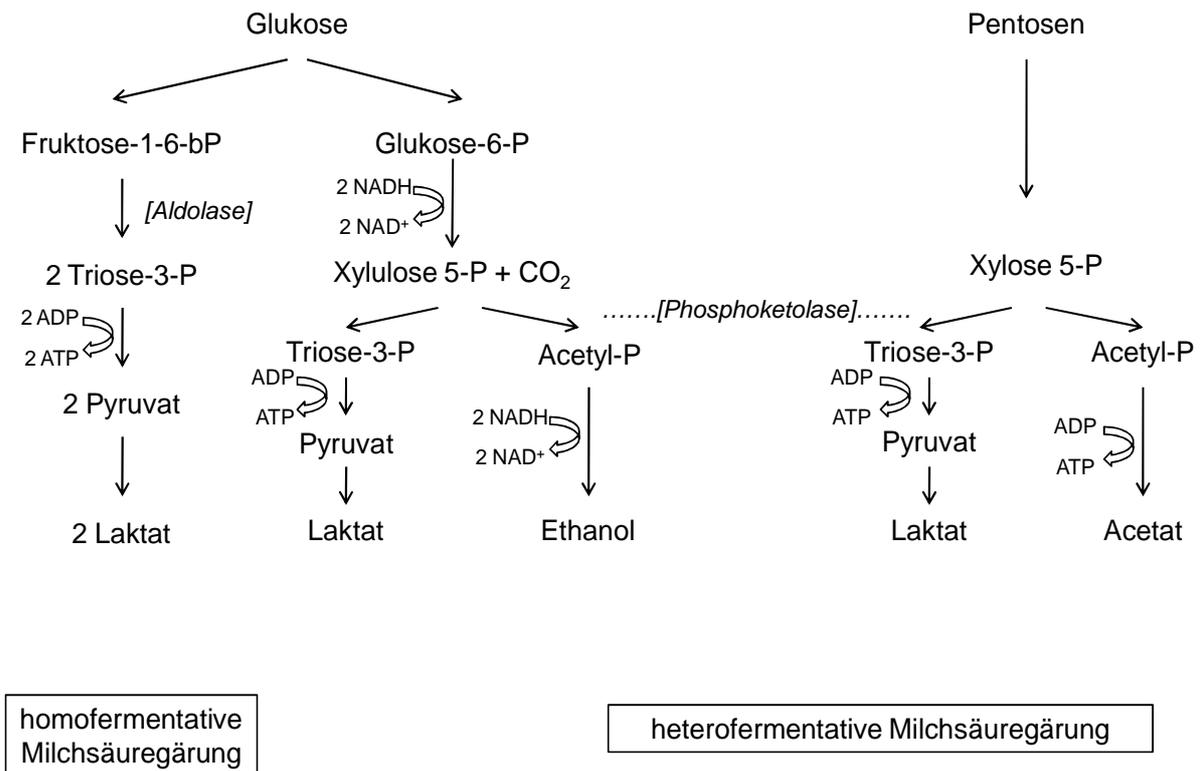
Sauerteig besteht aus Mehl und Wasser und kann mit Milchsäurebakterien (MSB), die ihren Ursprung aus der autochthonen Mikrobiota der Körner, den Teigzutaten oder der Umwelt haben (DE VUYST und VANCANNEYT, 2007), spontan fermentiert werden. Die Verwendung von Sauerteig als natürlicher Starter eines Gärprozesses ist einer der ältesten biotechnologischen Abläufe zur Fermentation von Lebensmitteln (RÖCKEN und VOYSEY, 1995). Sauerteig wird als natürlich und additivfrei angesehen und hat eine Vielzahl weiterer positiver Effekte. Weizen- und Roggensauerteige verbessern die sensorischen Eigenschaften von Broterzeugnissen, die Textur und vermindern zusätzlich Brotverderb (HAMMES *et al.*, 1996). Sie tragen zur Verbesserung der Brotstruktur, des Geschmacks, des Nährwertes und der Haltbarkeit von Brot und Broterzeugnissen bei. Insbesondere wird beispielsweise durch die Teigsäuerung das Brotvolumen erhöht, das Gashaltevermögen des Teiges gesteigert sowie der Geschmack von Vollkorn- und faserreichem Brot verbessert. Weiter wird die Retrogradation, also das Altbackenwerden von Brot und Broterzeugnissen, durch das Verlangsamen des Abbaus der Stärkemoleküle bestimmt (CROWLEY *et al.*, 2002). Besonders bei den meist auf Stärke basierenden glutenfreien Broterzeugnissen ist aufgrund des Fehlens von Gluten das Retrogradieren schneller gegeben als bei herkömmlichen Produkten (MOORE, 2005). Weiter können diese bezüglich Geschmackseindruck und Mundgefühl nicht überzeugen (GALLAGHER *et al.*, 2004) und

sind von sehr niedriger Qualität. Sauerteige aus Amaranth verleihen den Broterzeugnissen einen charakteristischen qualitätsverbessernden Geschmackseindruck und steigern neben Texturverbesserungen den ernährungsphysiologischen Beitrag. Amaranthsauerteige sichern zudem, durch die Verwendung bei der Brotherstellung von konventionellen Backwaren aus Weizen- oder Roggenmehl, die Erzeugung neuartiger Brotarten und -aromen.

Nach BÖCKER *et al.* (1995) und DE VUYST und NEYSENS (2005) kann eine Typisierung dreier Varianten von Sauerteig vorgenommen werden: Typ-I-Sauerteige werden täglich neu angefrischt, um die darin befindlichen MSB aktiv und lebensfähig zu halten und eine hohe metabolische Aktivität zu gewährleisten. Die Fermentation findet bei Temperaturen von 20-30°C statt und der End-pH-Wert befindet sich bei etwa pH 4,0 (GOBBETTI *et al.*, 2008). Beispiele hierfür sind die traditionelle Dreistufenführung bei Roggensauerteig und die Herstellung von San Francisco Sourdough French Bread und Panettone bei Weizensauerteig. Mit dieser Art der Sauerteigführung kann ein Brot ohne Hefezusatz hergestellt werden (BRANDT, 2001). Typ-II-Sauerteige werden hauptsächlich verwendet um einen hohen Säuregrad zu erzielen und dienen als Teigsäuerungsmittel. Die gewünschte pH-Wert-Absenkung soll durch sie gewährleistet werden, eine Triebleistung ist hier nicht erforderlich. Um den Prozess zu beschleunigen, wird zwei bis fünf Tage bei über 30°C fermentiert. Nach 24 h sind die pH-Werte unter 3,5 (HAMMES und GÄNZLE, 1998). Die Mikroorganismen befinden sich dann in der stationären Phase und haben eine eingeschränkte metabolische Aktivität. Typ-III-Sauerteige sind getrocknete, meist aus Typ-II-Sauerteigen hergestellte, Sauerteige. Sie dienen in erster Linie als Zusatzstoff in Form eines Teigsäuerungsmittels und als Aromaträger im Teig. Zusätzlich zu dieser Typisierung ist eine weitere Variante des Sauerteiges bekannt, die im Weizenbereich oft angewandt wird. Die Vorteigführungen, und somit der Zusatz von Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und anschließender 3-24stündiger Fermentation, werden als Typ-0-Sauerteige bezeichnet. In der Praxis sind neben diesen Klassifikationen weitere Ausführungen in der Anwendung von Sauerteigen in Handwerksbetrieben und in der industriellen Sauerteigfertigung bekannt (GOBBETTI *et al.*, 2005).

Die Mikrobiota von konventionellen Sauerteigen besteht aus einem Zusammenspiel von MSB und Hefen. Die ursprüngliche Mikroflora der Körner, und dementsprechend des Mehles, ist von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. In erster Linie ist sie vom Klima (Temperatur und Luftfeuchtigkeit) des jeweiligen Anbaulandes, den Lagerbedingungen, dem Insektenbefall und dem Einsatz von Fungiziden abhängig (DE VUYST und NEYSENS, 2005). Eine Vielzahl von Parametern hat einen Einfluss auf die letztendliche Zusammensetzung eines Sauerteiges. So sind endogene Faktoren wie die chemische und die enzymatische Zusammensetzung, sowie exogene Faktoren wie Temperatur, Redoxpotential, Teigausbeute (TA) und Fermentationsdauer, maßgeblich an der Zusammensetzung der Sauerteige beteiligt (HAMMES und GÄNZLE, 1998). Im reifen Sauerteig herrschen MSB in Keimzahlen von etwa  $10^8$  KbE  $g^{-1}$  vor, während Hefen in deutlich geringerer Anzahl vorhanden sind. Es wurden bisher über 50 verschiedene Spezies an MSB in Sauerteigen identifiziert, wobei der Genus *Lactobacillus* am häufigsten auftritt (HAMMES und GÄNZLE, 1998; VOGEL *et al.*, 1999). Repräsentative Genera an Sauerteig-MSB sind zusätzlich *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Weissella* (DE VUYST und VANCANNEYT, 2007). MSB, welche typischerweise im Roggensauerteig vorkommen, sind *Lactobacillus plantarum* (SCHEIRLINCK *et al.*, 2008; CORSETTI *et al.*, 2001), *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. alimentarius* (CORSETTI *et al.*, 2001), *L. amylovorus* (MOORE *et al.*, 2007), *L. curvatus* (FASANO *et al.*, 2003), *L. brevis*, *L. sakei* (DE ANGELIS *et al.*, 2002), *L. sanfranciscensis* (DE ANGELIS *et al.*, 2002; CORSETTI *et al.*, 2001), *L. pontis* (SCHEIRLINCK *et al.*, 2008), *L. paralimentarius* (CAI *et al.*, 1999; SCHEIRLINCK *et al.*, 2008) und *Pediococcus pentosaceus* (GEREZ *et al.*, 2006). In kommerziell erhältlichen Roggensauerteigstartern werden Stämme von *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. paralimentarius* und *L. sanfranciscensis* als Einzelstämme oder in Kombination verwendet (VOGELMANN *et al.*, 2009). In Abhängigkeit der Sauerteigführung variiert die Zusammensetzung an obligat und fakultativ heterofermentativen MSB im Teig. Nach GÄNZLE (2006b) sind Beispiele für homofermentative und fakultativ heterofermentative MSB *P. pentosaceus*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. alimentarius* und *L. acidophilus*. Zu den obligat heterofermentativen MSB zählen *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. pontis*, *L. reuteri* und *L. fermentum*. In Typ-I-Sauerteigen werden hauptsächlich *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, *L. pontis* und besonders *L. sanfranciscensis*, als ein Schlüssel-

bakterium im Sauerteig, isoliert (GOBBETTI und CORSETTI, 1997). Typ-II-Sauerteige werden überwiegend von *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. panis* und *L. reuteri* charakterisiert (DE VUYST und VANCANNEYT, 2007).



**Abbildung 1.** Übersicht über den Kohlenhydratstoffwechsel homo- und heterofermentativer MSB nach KANDLER (1983). NAD<sup>+</sup> und NADH: oxidiertes und reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; ADP und ATP: Adenosyldi- und triphosphat.

Verschiedenartige Kombinationen der Starterkulturen resultieren in einer Variation der Sauerteigsäuerung und der Entwicklung des pH-Wertes während des Fermentationsprozesses (SPICHER, 1984). Die verminderten pH-Werte im Sauerteig resultieren aus der Produktion von Laktat und Acetat das von den vorherrschenden MSB während der Fermentation gebildet wird. Zusätzlich wurde die Bildung von Ethanol, Bakteriozinen, Exopolysacchariden, Aromakomponenten und Enzymen während Sauerteigfermentationen beobachtet (LEROY und DE VUYST, 2004). Das für die MSB

im Sauerteig verfügbare Substrat beeinflusst die Produktion der Stoffwechselprodukte Laktat und Acetat und spielt eine wesentliche Rolle bei der Aromabildung. Im Vergleich zu Roggen- und Weizenmehlen unterscheidet sich Amaranth wesentlich in seiner Substratzusammensetzung (siehe Kapitel 1.1). Beim Abbau von Hexosen oder Pentosen verwenden MSB zwei Stoffwechselwege. Den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg und den Pentose-Phosphat-Weg (GÄNZLE, 2006b; Abbildung 1). Homofermentative MSB verwerten Hexosen wie Glukose über den Emden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse) zu Laktat. Obligat homofermentative MSB können keine Pentosen verwerten. Fakultativ heterofermentative MSB vergären Hexosen über die homofermentative Milchsäuregärung, Pentosen werden jedoch über den Pentose-Phosphat-Weg zu Laktat und Acetat abgebaut. Obligat heterofermentative MSB verwerten Hexosen nach dem Pentose-Phosphat-Weg zu Laktat, Ethanol und CO<sub>2</sub>.

#### **1.4 Problemstellung und Zielsetzung der wissenschaftlichen Arbeit**

Aufgrund der sich steigernden Nachfrage nach glutenfreien Nahrungsmitteln hat besonders die lebensmittelproduzierende Industrie ein Interesse daran, dem Verbraucher solche Nahrungsmittel zu bieten, und sich dadurch in neuen Bereichen auf dem Markt zu bewegen (vgl. auch REEVES, 2006). Ein großes Augenmerk liegt auf der Verbesserung von Geschmack und Textur von Backwaren aus Pseudocerealien, da die Qualität bisher erhältlicher glutenfreier Produkte denen konventioneller Produkte nicht im Geringsten ähnelt. Durch die Entwicklung eines für Pseudocerealien geeigneten Sauerteiges würde ein wesentlicher Beitrag zur Verbesserung der Brotqualität geleistet werden. Insbesondere kleine und mittlere Unternehmen (KMU) könnten durch das Vertreiben solcher neuartiger Sauerteige oder den damit hergestellten glutenfreien Endprodukten profitieren. Mittels zielgruppenorientiertem Herstellen bedarfsgerechter Produkte wäre ein Abheben von industriellen Großbäckereien möglich.

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, die in spontan fermentierten Amaranthsauerteigen vorherrschenden MSB-Stämme der autochthonen Mikroflora

zu isolieren. Diese sollten molekularbiologisch über Sequenzierung ihrer 16S rDNA und einer dadurch möglichen Spezieszuordnung identifiziert werden. Weiter sollte mittels Randomly Amplified Polymorphic Desoxyribonucleic acid Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) die Charakterisierung der isolierten Stämme auf Stammesebene durchgeführt werden. In weiteren Fermentationsexperimenten sollte die Eignung ausgewählter Isolate als Starterkulturen für Fermentationen in Amaranth geprüft werden. Dabei sollten Untersuchungen der Fermentationsparameter der inokulierten Teige innerhalb der ersten 24 Stunden im Mittelpunkt stehen. Aufgrund gewünschter wettbewerbsfähiger Eigenschaften der potentiellen Starterkulturen sollten Versuche gegenüber der mehleigenen Mikroflora im Teig durchgeführt werden. Nach dem Heranwachsen der autochthonen Flora sollten ausgewählte Stämme mit dieser konkurrieren. Weiter sollten in Abhängigkeit verschiedener Fermentationstemperaturen ausgewählte Stämme fermentiert werden und der Einfluss auf pH-Wert, Säuregrad und MSB-Keimzahlen während der Fermentation bestimmt werden. Die während den Fermentationen gezogenen und bei -20°C tiefgefrorenen Teigproben sollten einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Analyse unterzogen werden und somit die im Teig vorhandenen Metabolite wie Kohlenhydrate, organische Säuren, Mannitol und Ethanol analysiert werden. Es sollte ein kommerzieller api<sup>®</sup>-Test angewendet werden, um einen Überblick über die Verwertung von 49 Kohlenhydraten der Stämme zu bekommen. Ein weiteres Ziel war es, die ausgewählten Stämme mit kommerziell verfügbaren Sauerteigstartern zu vergleichen. Dafür sollten Fermentationen mit einer handelsüblichen Mehrstamm-sauerteigstarterkultur für Reis und einer Einzelstarterkultur für Roggen/Weizen für 24 h durchgeführt werden. Es sollten die Fermentationsparameter pH-Wert, Säuregrad und MSB-Keimzahlen verglichen werden und aufgrund dessen Rückschlüsse auf eine industrielle Verwendung gezogen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Kultivierungsbedingungen

Zur Isolierung von Milchsäurebakterien (MSB) wurde festes mMRS-5-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30°C unter kontrollierter Atmosphäre (88% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>). Für die Anzucht der MSB kam flüssiges mMRS-5-Medium zum Einsatz mit einer aeroben Inkubationszeit von 16 bzw. 24 h bei 30°C.

Um Hefen und Schimmelpilzen zu isolieren wurde festes YGC-Medium verwendet. Es wurde für 24 bis 48 h aerob bei 30°C inkubiert. Zur Anzucht von Hefen und Schimmelpilzen wurde flüssiges YGC-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte aerob für 16 h bei 30°C.

Für die Isolierung und Kultivierung von *Enterobacteriaceen* wurde ENDO-Agar verwendet. Es wurde aerob für 24 bis 48 h bei 30°C inkubiert. Die Sterilisation aller Medien erfolgte bei 121°C, 1 bar und 20 min.

### 2.2 Medien

**mMRS-5-Medium** (modifiziertes de Man-Rogosa-Sharp-5), STOLZ (1995)

Casein-Pepton (Trypton)	10 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	5 g
Glukose	10 g
Maltose	10 g
Fruktose	5 g
Tween 80 <sup>®</sup>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	2,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
Cystein-HCl	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g

MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Vitaminstammlösung	1 ml
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 5,8±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt)	

Zur Herstellung fester Medien wurden 20 g l<sup>-1</sup> Agar-Agar zugegeben. Zur selektiven Keimzahlbestimmung der MSB aus Teigen wurden dem Medium 0,025 g l<sup>-1</sup> Bromkresolgrün, 0,1 g Cycloheximid (Actidion®) und 5 g Na-Acetat [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> x 3 H<sub>2</sub>O] zugesetzt.

#### Vitaminstammlösung für mMRS-5-Medium

Thiamin	10 mg	Cobalamin	10 mg
Panthothensäure	10 mg	Niacinamid	10 mg
Pyridoxal	10 mg	Folsäure	10 mg
entionisiertes Wasser	ad 50 ml		
pH 5,8±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt); Sterilfiltration: Porengröße 0,2 µm			

#### YGC-Medium (Yeast-Glucose-Chloramphenicol), MEROTH *et al.* (2003a)

Glukose	20 g
Hefeextrakt	5 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 6,6±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt)	

Es wurden 15 g l<sup>-1</sup> Agar-Agar zur Herstellung fester Medien zugegeben. Zur selektiven Hefenbestimmung aus Teigen wurden dem Medium 0,025 g l<sup>-1</sup> Bromkresolgrün sowie 0,1 g l<sup>-1</sup> Chloramphenicol zugesetzt.

#### ENDO-Agar (Laktose-Fuchsin-Sulfit-Agar)

Fertigmedium (Merck, 1.04044)	39 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 7,2-7,6 (mit 1 M HCl eingestellt)	

### 2.3 Puffer und Lösungen

#### PBS-Puffer (0,9% NaCl; pH 7,4)

NaCl	8,18 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	1,42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,245 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 7,4±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt)	

#### TAE-Puffer (50-fach konzentriert; pH 8,0)

Tris-HCl	242 g
EDTA	37,2 g
entionisiertes Wasser	ad 800 ml
pH 8,0±0,1 (mit 1 M Eisessig eingestellt)	

#### STE-Puffer (1-fach konzentriert; pH 8,0)

Tris (2 M; pH 8,0)	6 g
EDTA (0,1 M; pH 8,0)	1,86 g
Saccharose	67 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 8,0±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt)	

#### Lysispuffer

Lysing Enzymes von <i>Trichoderma harzianum</i> (Sigma, L1412)	40 mg
Lyticase (Sigma, L2524)	20 mg
STE-Puffer (1-fach konzentriert; pH 8,0)	ad 1 ml

Anwendung für die DNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Methode aus Schimmelpilzen siehe Kapitel 2.6.2.

**Physiologische NaCl-Trypton-Lösung (pH 8,0)**

NaCl	8,5 g
Casein-Pepton (Trypton)	1 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 5,9±0,1 (mit 1 M HCl eingestellt)	

**SDS-Lösung (20%, w/v)**

Natrium-Dodecylsulfat	200 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml

**Natrium-Acetat-Lösung (3 M; pH 5,2)**

Natriumacetat	400,8 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 5,2 (mit 1 M HCl eingestellt)	

**Tris-HCl-Lösung (10 mM; pH 8,0)**

Tris/HCl	1,21 g
entionisiertes Wasser	ad 1000 ml
pH 8,0 (mit 1 M HCl eingestellt)	

**2.4 Herstellung von Amaranthmehl**

Amaranthkörner aus Indien (Alnatura<sup>®</sup> Produktions- und Handels GmbH, AI), Peru (Alnatura<sup>®</sup> Produktions- und Handels GmbH, AP; Neuform VDR e. G., NP; Davert GmbH, DP), Mexiko (Allos GmbH, AM) und Deutschland (St. Josefgut, SG) wurden zu Vollkornmehl auf einer Retsch-Getreidemühle vermahlen (ZM100; Retsch, Haan, Deutschland). Die Lochgröße des Siebes betrug 0,5 mm. Es erfolgte vor dem Mahlvorgang eine Reinigung der Mühle mit 70%igem Ethanol. Anschließend wurde das Mehl in sterilen luftdichten Plastikdosen bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

## 2.5 Spontane Sauerteigfermentationen mit Amaranth

Die Sauerteige wurden in sterilen 1-Liter Plastikdosen mit einer Teigausbeute [(Teigmasse / Mehlmasse) × 100] von 200 (TA 200) bereitet. Der Feuchtegehalt des Mehles wurde auf einem Sartorius Moisture Analyser (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) anhand der ICC-Standard-Methode 110/1 mit einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die genaue Mehlmenge wurde mit der Feuchtekorrekturformel bestimmt als:

$$[100 - (\text{Feuchte Soll})] / [100 - (\text{Feuchte Ist})] \times \text{g Mehl} = \text{eingesetzte Mehlmenge (g)}$$

Der Variable „Feuchte Soll“ entsprechen 14%, da eine Standardisierung des Feuchtegehalts des Amaranthmehles vorgenommen wurde. Die genaue Einwaage für das auf 30°C erwärmte Leitungswasser wurde aus der Differenz des Gesamtgewichtes des Teiges und der eingesetzten Mehlmenge errechnet. Die berechnete Mehl- und Leitungswassermenge (jeweils ca. 200 g) wurde mit Hilfe eines Haushaltshandrührgerätes bis zur vollständigen Homogenisierung des Teiges vermengt (ca. 1 min). Bei 30°C wurde der Teig in einem Wasserbad 24 h fermentiert und anschließend propagiert. 40 g des reifen Sauerteiges wurden hierfür mit ca. 180 g Amaranthmehl und ca. 180 g auf 30°C erwärmtes Leitungswasser (genaue Einwaage: siehe Feuchtekorrekturformel) gemischt und zu einem neuen Teig verarbeitet, welcher weitere 24 h fermentiert wurde. Es wurde über 10 Tage mit täglichem Propagieren fermentiert. Bei jedem Propagationsschritt wurden Proben für die pH-Wert-Bestimmung, die Bestimmung des Säuregrades, die MSB-Keimzahlen und für die HPLC-Analysen gezogen. Der pH-Wert und der Säuregrad wurden mit dem TitroLine *alpha* (Schott AG, Mainz, Deutschland) bestimmt. Der pH-Wert trifft eine Aussage über die H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration und gibt die Säurestärke an, während der Säuregrad die Menge an 0,1 M NaOH in ml angibt, die notwendig ist, um einen pH-Wert von 8,5 zu erreichen. Dieser trifft eine Aussage über freie Säuren und die Säurekonzentration im Teig. Für die Bestimmung des Säuregrades wurden 10 g des reifen Sauerteiges mit 100 ml demineralisiertem Wasser gemischt und bis zum End-pH-Wert (8,5) titriert. Um MSB und Hefen im Teig zu bestimmen wurde 1 g des Teiges mit 9 ml steriler physiologischer NaCl-Trypton-Lösung suspendiert, eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt und in einer Doppelbestimmung auf mMRS-5- und YGC-Agar ausplattiert. Anschlies-

end wurde bei 30°C für 48 h anaerob unter kontrollierter Atmosphäre (mMRS-5) und bei 30°C für 24 bis 48 h aerob (YGC) inkubiert (siehe Kapitel 2.1). 50 g des reifen Sauerteiges wurden bei -20°C für weitere Analysen (HPLC) tiefgefroren.

## 2.6 Molekularbiologische Analysen

### 2.6.1 DNA-Isolierung von MSB

Die Kolonien wurden aufgrund ihrer Morphologie (Größe, Farbe, Form, Rand- und Oberflächenbeschaffenheit) visuell auf mMRS-5-Agarplatten charakterisiert und somit in Morphologietypen unterschieden. Ein Morphologietyp wurde als vorherrschend eingeordnet, wenn der Anteil an Kolonien eines Morphologietypes an der Gesamtkeimzahl an MSB mehr als 50% ausmachte. Fünf MSB-Kolonien jedes Morphologietypes wurden zufällig ausgewählt und auf mMRS-5-Agarplatten reingezüchtet (30°C, 48 h, kontrollierte Atmosphäre). Einzelkolonien wurden in 8 ml mMRS-5-Medium bei 30°C als Übernachtskultur (16 h) angezüchtet. 2 ml der Übernachtskultur wurden zentrifugiert (5 000 × g, 10 min, 4°C) und das resultierende Zellpellet wurde für die DNA-Isolierung mit dem illustra™ bacterial genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Isolierung erfolgte, abgesehen von kleineren Änderungen, entsprechend den Herstellerangaben. Bei dem letzten Schritt der Isolierung (DNA-Elutionsschritt) wurde statt mit 200 µl Elutionspuffer zweimal mit 50 µl Reinstwasser (70°C) eluiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm (Photometer GeneQuant 1300; Biochrom, Cambridge, United Kingdom) unter Verwendung einer 10 mm Quarzküvette (Soul Sub Micro) bestimmt. Dazu wurden die Proben seriell mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 80 µl verdünnt.

### 2.6.2 DNA-Isolierung von Schimmelpilzen

Schimmelpilze wurden in 8 ml YGC-Medium aerob bei 30°C für 16 h angezüchtet, anschließend bei 4°C mit 5 000 × g für 10 min zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Die resultierenden Zellpellets wurden zweimal mit PBS gewaschen.

Dazu wurden die Pellets jeweils in 1 ml PBS resuspendiert und nach Zentrifugation mit  $5\,000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min der Überstand verworfen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden  $6\ \mu\text{l}$  Lysispuffer,  $13\ \mu\text{l}$  Ribonuklease A ( $1\ \text{mg/ml}$ ), sowie  $117\ \mu\text{l}$  STE-Puffer zugesetzt, gemischt und eine Stunde im Thermoblock bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit  $6\ \mu\text{l}$  20%iger SDS-Lösung und  $14\ \mu\text{l}$  Proteinase-K-Lösung ( $10\ \text{mg/ml}$ ) gemischt. Nach einer Inkubation bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 30 min wurden der Probe  $200\ \mu\text{l}$  auf  $65^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtes Phenol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter dem Abzug zugesetzt und bei  $65^{\circ}\text{C}$  weitere 6 min inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden  $220\ \mu\text{l}$  Tris-HCl-Lösung ( $10\ \text{mM}$ ) und zweimal  $300\ \mu\text{l}$  eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (Roth) zugegeben, um die DNA zu extrahieren. Nach einem einminütigen manuellen Mischschritt wurde bei  $16\,000 \times g$  für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Durch eine zweimalige Extraktion mit Chloroform (Roth) im Verhältnis 1:1 wurden Phenolrückstände entfernt. Die Proben wurden mit dem dreifachen Volumen an kaltem Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ; 99,8%) und mit 1/10 des Volumens an Natriumacetat-Lösung ( $3\ \text{M}$ ) versetzt und anschließend die DNA bei  $-85^{\circ}\text{C}$  für 15 min gefällt. Die präzipitierte DNA wurde bei  $20\,000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 25 min zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes im Vakuum getrocknet (Savant SpeedVac Concentrator, Albertville, USA). Vor der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde das Pellet in  $100\ \mu\text{l}$  Reinstwasser resuspendiert und für 5 min bei  $35^{\circ}\text{C}$  gelöst.

### 2.6.3 Differenzierung dominanter MSB-Stämme mit RAPD-PCR

Um einzelne Stämme innerhalb einer Spezies unterscheiden zu können, wurde Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) angewendet. Hierzu wurden mit Hilfe eines der zwei Oligonukleotidprimer 1254 ( $5'$ -CCGCAGCCAA- $3'$ ; TORRIANI *et al.*, 1999) und M13V<sub>mod.</sub> (in dieser Arbeit:  $5'$ -GTTTTCCCAGTTCACGAC- $3'$ ) (hergestellt von Operon, Köln, Deutschland) spezifische Bandenmuster erstellt. Der Reaktionsansatz der RAPD-PCR bestand aus Reagenzien der Firma Genaxxon (Biberach, Deutschland) und ist in Tabelle 1 dargestellt. Reinstwasser wurde mit einer Milli-Q Plus PF-Anlage (Millipore™, Billerica, USA) hergestellt. Es wurde der Thermocycler Primus 96 Plus (MWG AG

Biotech, Ebersberg, Deutschland) mit dem in Tabelle 2 dargestellten Programm verwendet.

**Tabelle 1.** Reaktionsansatz RAPD-PCR mit den Primern M13V<sub>mod.</sub> oder 1254

PCR-Reagenzien	Volumen (50 µl)
10 x PCR-Puffer (S) [15 mM MgCl <sub>2</sub> ]	5,00 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	7,00 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	2,00 µl
Primer M13V <sub>mod.</sub> bzw. 1254 [100 pmol/µl]	1,00 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,30 µl
Template-DNA	2,00 µg
steriles Reinstwasser	ad 50 µl

**Tabelle 2.** PCR-Programm für RAPD-PCR mit den Primern M13V<sub>mod.</sub> oder 1254

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 x Denaturierung	94°C	45 s
3 x {	Denaturierung	94°C
	Annealing	40°C
	Elongation	72°C
32 x {	Denaturierung	94°C
	Annealing	60°C
	Elongation	72°C
1 x Kühlen	15°C	∞

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5%igem (wt/vol) Agarosegel (LE Agarose, Biozym, Oldendorf, Deutschland) aufgetrennt (1-fach TAE-Puffer, 100 V, 90 min). Es wurde der Molekulargewichtsmarker  $\lambda$  HindIII/EcoRI (Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) eingesetzt. Nach 20minütigem Färben in Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 10minütigem Wässern wurden die Banden unter UV Licht (302 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Herolab, Wiesbaden, Deutschland) digitalisiert. Die RAPD-Bandenmuster wurden mit der Bionumerics

Software (Version 2.00; Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium) evaluiert. Um das arithmetische Mittel zu bestimmen, wurde der Pearson Korrelationskoeffizient und das Dendrogramm UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) angewendet. Mit diesem Programm und den angewendeten Algorithmen konnten die Bandenmuster in Verwandtschaftsgrade umgerechnet werden. Die verschiedenen Bandenmuster der Stämme wurden untereinander verglichen und bestimmten Clustergruppen zugewiesen, welche als RAPD-Typ bezeichnet wurden (RT). Die Zugehörigkeit einer Clustergruppe wurde bei einer Ähnlichkeit der Muster von >91% festgelegt.

#### 2.6.4 Amplifikation bakterieller 16S rDNA

Die gesamte bakterielle 16S rDNA wurde mit dem Primerpaar 616V (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCA-3') und 630R (5'-AAGGAGGTGATCCARCC-3') amplifiziert. Der Primer 616V bindet an die Position 11-26, während der Primer 630 R an die Position 1525-1541 der 16S rDNA bindet. Der Reaktionsansatz der 16S rDNA-PCR und das verwendete Amplifikationsprogramm sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

**Tabelle 3.** Reaktionsansatz 16S rDNA-PCR mit den Primern 616V und 630R

PCR-Reagenzien	Volumen (25 µl)
10 x Puffer (E) [15 mM MgCl <sub>2</sub> , 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	2,5 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,5 µl
Primer 616V [10 pmol/µl]	0,5 µl
Primer 630R [10 pmol/µl]	0,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]	0,3 µl
Template-DNA	1,0 µl
steriles Reinstwasser	20,7 µl

Alle verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Genaxxon. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igem (wt/vol) Agarosegel (LE Agarose) bei konstanter Spannung von 130 V und 1-fach TAE-Puffer 45 min aufgetrennt. Die erhaltenen

PCR-Produkte wurden nach 10minütigem Färben in Ethidiumbromid (10 mg/ml) und kurzem Wässern unter UV Licht (302 nm) sichtbar gemacht, mit Hilfe des Geldokumentationssystems (Herolab) digitalisiert und die Konzentration mit Hilfe des Molekulargewichtsmarkers  $\lambda$  *HindIII* (Fermentas) abgeschätzt.

**Tabelle 4.** PCR-Programm für 16S rDNA-PCR mit den Primern 616V und 630R

Zyklus	Temperatur	Zeit
1 x Denaturierung	94°C	240 s
35 x {	Denaturierung	94°C
	Annealing	57°C
	Elongation	72°C
1 x Elongation	72°C	300 s
1 x Kühlen	15°C	∞

### 2.6.5 Amplifikation eukaryontischer 28S rDNA

Für die Amplifikation der 28S rDNA wurden das Primerpaar P1 (5'-ATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3') und P2 (5'-CTCTGGCTTCACCCTATTC-3') verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 5 beschrieben und das Amplifikationsprogramm wurde wie in Tabelle 6 beschrieben gewählt. Die Auftrennung und Konzentrationsabschätzung der PCR-Produkte erfolgte gemäß den Beschreibungen in Kapitel 2.6.4.

**Tabelle 5.** Reaktionsansatz 28S rDNA-PCR mit den Primern P1 und P2

PCR-Reagenzien	Volumen (25 $\mu$ l)
10 x Puffer (E) [15 mM MgCl <sub>2</sub> , 160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	2,5 $\mu$ l
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,5 $\mu$ l
Primer P1 [50 pmol/ $\mu$ l]	0,125 $\mu$ l
Primer P2 [50 pmol/ $\mu$ l]	0,125 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0,25 $\mu$ l
Template-DNA	0,5 $\mu$ l
steriles Reinstwasser	21,0 $\mu$ l

**Tabelle 6.** PCR-Programm für 28S rDNA-PCR mit den Primern P1 und P2

Zyklus		Temperatur	Zeit
1 x	Denaturierung	94°C	240 s
35 x	Denaturierung	94°C	30 s
	Annealing	62°C	60 s
	Elongation	72°C	60 s
1 x	Elongation	72°C	420 s
1 x	Kühlen	15°C	∞

### 2.6.6 Aufreinigung der 16S rDNA bzw. 28S rDNA PCR-Produkte

Die amplifizierte 16S rDNA bzw. die 28S rDNA wurde mit einer Exo-SAP-Methode aufgereinigt und dabei einzelsträngige DNA und Phosphatgruppen von freien dNTPs entfernt. 5 µl 16S rDNA-PCR-Produkt wurde 0,5 µl Exonuklease I [20 U/µl] (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 2 µl Shrimp Alkaline Phosphatase [1 U/µl] (Qiagen) zu-pipettiert, anschließend bei 37°C für 15 min und bei 80°C für 15 min inkubiert.

### 2.6.7 Sequenzierung der 16S- bzw. 28S rDNA PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte fand mit dem Sequenzer CEQ<sup>TM</sup> 8000 Genetic Analysis System (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) statt. Es wurde die Kettenabbruchmethode nach SANGER *et al.* (1977) angewandt. Bei dieser Methode wurden neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) in geringerer Konzentration auch 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) dem Reaktionsansatz zugesetzt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppen kam es nach Einbau der ddNTPs durch die Polymerase bei der Amplifikation der DNA zu Kettenabbrüchen. Dadurch entstanden bei dieser PCR-ähnlichen enzymatischen Reaktion DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, welche jeweils mit einem der vier verschiedenen bekannten ddNTPs endeten. Diese Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und registriert. Es wurde für die Kapillarelektrophorese die Laufmethode Longfastread (LFR1) angewandt und für die Analyse der Qualität der

Rohdaten die CEQ™-Software (Beckmann coulter) verwendet. Zur Gewährleistung einer erfolgreichen Reaktion musste die Konzentration der Template-DNA bekannt sein. Die DNA-Konzentrationen wurden auf einem 1%igen Agarosegel durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker abgeschätzt. Neben dem Quick StartMix (Beckmann coulter), bestehend aus dNTPs, ddNTPs, Polymerase und Puffer wurde die DNA mit einer Konzentration von 50 fmol eingesetzt. Für die Sequenzierung der ersten 400 bis 650 bp der 16S rDNA der MSB wurde der Primer 616V (5´-AGAGTTTG ATYMTGGCTCA-3´) verwendet, während für die Sequenzierung der ersten 400 bis 650 bp der 28S rDNA der Schimmelpilze der Primer P1 (5´-ATCAATAAGCGGAGGAA AAG-3´) verwendet wurde. Für die Sequenzierung des kompletten 16S rDNA Gens wurden die Primer 616V, 699V (5´-AACGAGCDCAACCC-3´), 630R (5´-AAGGAGGTG ATCCARCC-3´), 610V (5´-GTGCCAGCAGYYGCGG-3´) und 97K (5´-CTGCTGCCTC CCGTA-3´) angewandt. Das Amplifikationsprogramm bestand aus 30 Zyklen: 96°C für 20 s, 50°C für 20 s und 60°C für 360 s. Die einzelnen Fragmente wurden mit der BioEdit Sequence Alignment Software nach HALL (1999) zusammengefügt und unter Verwendung des Blast-Algorithmus wurden die 16S rDNAs bzw. 28S rDNAs mit den in der National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen.

## 2.7 Fermentationseigenschaften ausgewählter Stämme

### 2.7.1 Fermentationen mit ausgewählten Stämmen

Ausgewählte Stämme, welche sich in Spontanfermentationen als dominant erwiesen hatten, wurden in weiteren Fermentationen dem Teig zugesetzt. Dabei wurden die Stämme über Nacht bei 30°C in mMRS-5-Medium angezüchtet und die Zellen mit Hilfe einer Thomazählkammer gezählt. Hierzu wurden 8 ml des inkubierten Mediums für 10 min bei  $5\,000 \times g$  und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml physiologischer NaCl-Trypton-Lösung aufgenommen und suspendiert. Nach entsprechender Verdünnung wurden 10 µl der Suspension für die Zellzahlbestimmung mit der Thomazählkammer herangezogen. Die Teige wurden pro Stamm mit  $10^7$  KBE  $g^{-1}$  Teig inokuliert. Das eingesetzte NaCl-Trypton-Volumen wurde

von der für den Teig verwendeten Wassermenge subtrahiert. Die Fermentationsbedingungen und Vorgehensweise waren äquivalent zur Beschreibung in Kapitel 2.5.

### **2.7.2 Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h**

Die Fermentationen wurden analog den Beschreibungen in Kapitel 2.5 und 2.7.1 durchgeführt, wobei zur Standardisierung das Amaranthmehl DP verwendet wurde. Innerhalb der ersten 24 h wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 und 24 h entnommen, pH-Werte, Säuregrade, MSB-Keimzahlen auf mMRS-5-Agar, Hefen und Schimmelpilze auf YGC-Agar bestimmt. Die Kolonien wurden visuell Morphologietypen zugeordnet. Da gezeigt werden konnte, dass eine gute Korrelation zwischen den Morphologietypen und der molekularbiologischen Identifikation besteht (95,2% von 175 überprüften Kolonien), wurde auf eine weitere RAPD-PCR verzichtet.

### **2.7.3 Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der autochthonen Mikroflora**

Um die Wettbewerbsfähigkeit der potentiellen Starterkulturen gegenüber der Mikroflora der spontan fermentierten Sauerteige zu evaluieren, wurde für 24 h spontan fermentiert und anschließend mit 10% Vorteig neu angefrischt. Bei diesem Propagationsschritt wurden die ausgewählten Stämme mit  $10^7$  KbE  $g^{-1}$  Teig inokuliert. Die Fermentationen wurden wie in Kapitel 2.5 und 2.7.1 beschrieben vorbereitet und durchgeführt. Um eine Standardisierung zu gewährleisten wurden alle Teige mit Amaranthmehl DP fermentiert. Vor Beginn und nach 24 h der Spontanfermentationen fand eine Analyse der pH-Werte, der Säuregrade und der MSB-Keimzahlen auf mMRS-5-Agar statt. Nach anschließender Propagation und Zusatz des Inokulums wurde nach 0, 4, 8, 12 und 24 h innerhalb der anschließenden Fermentationsperioden erneut pH-Werte, Säuregrade und MSB-Keimzahlen bestimmt. Nach einem weiteren Propagationsschritt wurden dieselben Analysen in gleichen Intervallen durchgeführt. Die Zuordnung der Kolonien zu den Morphologietypen fand visuell statt. Durch RAPD-PCR erfolgte die Unterscheidung einzelner Stämme.

### **2.7.4 Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen**

Um die Einflüsse der Temperatur auf das Wachstum und die Dominanz ausgewählter Stämme zu überprüfen wurde bei 25, 30 und 35°C mit ausgewählten Stämmen in Parallelf fermentationen mit Amaranthmehl DP (Standardisierung) über 24 h fermentiert. Die Teige wurden analog den Beschreibungen in Kapitel 2.5 und 2.7.1 hergestellt. Es wurden nach 0, 4, 8, 12 und 24 h die pH-Werte, Säuregrade und MSB-Keimzahlen in den Teigen analysiert. Die MSB-Keimzahlen und die Zuordnung zu Morphologietypen wurden aufgrund der guten Korrelation zwischen den Morphologietypen und der molekularbiologischen Identifikation visuell bestimmt. Die Stoffwechselprodukte im Teig wurden mittels HPLC analysiert.

## **2.8 Analyse von Metaboliten in mMRS-5-Medium mittels HPLC**

Ausgewählte Bakterienisolate wurden bei 30°C aerob für 24 h in mMRS-5-Medium kultiviert (siehe Kapitel 2.1). 50 µl dieser Kultur wurden in 5 ml frisches mMRS-5-Medium überführt und für 16 h bei 30°C inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurde bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren. Jede der Proben wurde mit Carrez I- [10,6% (w/v)  $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ ] und Carrez II- [28,8% (w/v)  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ] Lösungen geklärt, um Proteine, Fette und langkettige Zucker zu entfernen. 930 µl Reinstwasser wurden mit 20 µl der aufgetauten Probe versetzt, 10 µl der Carrez I-Lösung zugefügt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde 10 µl Carrez II-Lösung zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die Proben wurden bei 5 000 × g bei 4°C für 30 min zentrifugiert. 700 µl des Überstandes wurden sterilfiltriert (0,45 µm) und für die High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Analysen verwendet. Die Bestimmungen für die Stoffwechselprodukte wurden wie in Kapitel 2.9 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

## **2.9 Analyse von Metaboliten in Sauerteig mittels HPLC**

Um bakterielle Stoffwechselprodukte sowie Metabolite aus den Enzymaktivitäten im Teig analysieren zu können, wurde HPLC angewandt.

### 2.9.1 Bestimmung von organischen Säuren und Ethanol

Um die Säuremenge der Teige zu analysieren wurden  $2,5 \pm 0,1$  g des jeweilig aufgetauten Teiges mit 25 ml 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (entgast) für 1 min homogenisiert (Dispo X; IDL, Nidderau, Deutschland) und für 10 min bei  $5\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. 700  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurde sterilfiltriert (Cellulosefilter,  $0,45 \mu\text{m}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland) und mittels HPLC analysiert. Es wurde von Acetat, Succinat, Propionat, 1-Propanol, Valeriat, Iso-Butyrat, Glycerin, Ethanol (alle Merck) und Laktat, Formiat, Citrat, Butyrat (alle Sigma-Aldrich Holding AG, Basel, Schweiz) 100 mM-Stamm-lösungen hergestellt und mit den Konzentrationen 0,1, 0,5, 0,7 und 1,0 mM als externe Standards mit einer 4-Punkt-Kalibrierung verwendet. Mit einer HPLC-Anlage, bestehend aus einer Säule (Rezex ROA-Organic Acid  $\text{H}^+$  (8%),  $300 \times 7,8$  mm, 8 micron; Phenomenex Inc., Torrance, USA), einem Autosampler (728 auto sampler; Bischoff, Leonberg, Deutschland), einer Pumpe ( $\Sigma 871$ ; IRICA, Japan), einem Ventil (Rheodyne MX 7900-000; Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Deutschland), einem Säulenofen ( $70^\circ\text{C}$ ; Bischoff) und einem RI-Detektor (model 8100; Bischoff) wurden die Stoffwechselprodukte qualitativ und quantitativ bestimmt. Als Lösungs- und Laufmittel wurde 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit einem Fluss von  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$  verwendet. Innerhalb der Versuchsreihe wurden Zweifachbestimmungen pro Probe durchgeführt und zusätzlich Rückstellmuster der Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Software McDAcq Integrator v1.5 (Bischoff) herangezogen und die Peaks der mitgeführten Standards mit den aus den Messungen erhaltenen verglichen.

### 2.9.2 Bestimmung von Kohlenhydraten und Mannitol

Für die Analysen der Kohlenhydrate und des Zuckeralkohols Mannitol in den fermentierten Teigen wurden 1 860  $\mu\text{l}$  steriles Reinstwasser mit 40 mg einer aufgetauten homogenisierten Probe gemischt. Anschließend wurde für die Klärung der Proben 20  $\mu\text{l}$  Carrez I-Lösung [10,6% (w/v)  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ] zugesetzt und für 1 min inkubiert. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Carrez II-Lösung [28,8% (w/v)  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ] wurde weitere 5 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei  $5\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 30 min zentrifugiert. 500  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurde sterilfiltriert

(Cellulosefilter, 0,2  $\mu\text{m}$ ; Merck), 1:2 mit 80:20 (w/w) Acetonitril/Reinstwasser verdünnt und für die HPLC-Analysen herangezogen. Innerhalb der Versuchsreihen wurden pro Probe Dreifachbestimmungen durchgeführt. Es wurden Rückstellmuster der Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Kohlenhydrate und der Mannitol wurden mit einer HPLC-Anlage, bestehend aus einer Prevail Carbohydrate ES Säule (N708717; Alltech Grom GmbH, Rottenburg, Deutschland), einem ELS-Detektor (2000 ES; Alltech Grom GmbH), einem Säulenofen ( $25^\circ\text{C}$ ; Agilent 1100 Series G1316A Colcom; Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland), einem Autosampler (Agilent 1100 Series G1313A ALS), einer Pumpe (Agilent 1100 Series G1311A) und einem Entgaser (Agilent 1100 Series 61322A), analysiert. Die Identifizierung und Quantifizierung der Peaks erfolgte mit Hilfe externer Standards und einer 6-Punkt-Kalibrierung, wobei die Peakflächen mit den Standards verglichen wurden. Für die Verwendung als externe Standards wurden Stammlösungen für Mannitol, Maltose, Glukose, Fruktose, Saccharose (jeweils  $0,1\text{ g l}^{-1}$ ; alle Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Trehalose, Cellobiose und Gentiobiose (jeweils  $0,1\text{ g l}^{-1}$ ; alle Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Für die Evaluation der Ergebnisse wurde die Software Agilent Chem Station (B.01.01) verwendet. Das Elutionsverhältnis von Eluent A (Acetonitril, Lichrosolv<sup>®</sup> HPLC grade (1.00030; Merck)) und Eluent B (Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit  $< 0,05\ \mu\text{S cm}^{-1}$ ) betrug 70:30. Es herrschte eine Flussrate von  $0,9\text{ ml min}^{-1}$ .

## 2.10 Verwertung von Kohlenhydraten

Um die Fermentationseigenschaften ausgewählter Stämme zu charakterisieren wurde ein kommerziell erhältlicher api<sup>®</sup>-50CH-Test (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet. Mit diesem Test wurden 49 Kohlehydrate überprüft. Die Stämme wurden über Nacht in flüssigem mMRS-5-Medium bei  $30^\circ\text{C}$  kultiviert und anschließend mittels einer Impföse im Verdünnungsausstrich auf mMRS-5-Agar ohne Bromkresolgrün ausgestrichen (Inkubationszeiten siehe Kapitel 2.1). Mit einem sterilen Tupfer wurden Kolonien vom Agar abgeimpft und in api 50CHL-Medium (bioMérieux) überführt. Die optische Dichte wurde mit McFarland Standard 2 (bioMérieux) ver-

glichen und so eine Standardisierung gewährleistet. Die Evaluation der Ergebnisse wurde mit der apilab Software Version 5.1 (bioMérieux) durchgeführt.

## 2.11 Vergleich der Fermentationsleistungen der Isolate mit denen kommerzieller Starterkulturen

Für den Vergleich der Fermentationsleistungen der ausgewählten Stämme mit denen kommerziell erhältlicher Starterkulturen wurde Amaranthmehl DP in Doppelbestimmungen über 24 h bei 30°C fermentiert. Hierzu wurde zum einen eine handelsübliche frische Bio Reisstarterkultur (BR) (Böcker GmbH & Co. KG, Minden, Deutschland) mit einer MSB-Gesamtkeimzahl von  $10^9$  KbE  $g^{-1} \pm 50\%$  und einer Keimzahl der Hefe *Saccharomyces pastorianus* mit  $10^7$  KbE  $g^{-1} \pm 50\%$  zugesetzt. Es handelte sich um einen frischen Sauerteig, der nach Herstellerangaben folgende sechs homo- und heterofermentativen MSB-Spezies enthielt: *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. paralimentarius* und *Leuconostoc argentinum*. Das Produkt wurde üblicherweise für Fermentationen mit Reis angewandt. Der zweite Fermentationsansatz fand unter Zusatz des kommerziell erhältlichen Reinstamms *L. fermentum* (LF1) (Blessing Biotech GmbH, Stuttgart, Deutschland) statt. *L. fermentum* ist ein obligat heterofermentatives MSB und wird laut Hersteller für Roggen- und Weizensauerteigfermentationen verwendet. Die Inokulation aller Teige fand aufgrund der Vorgabe der Produktspezifikation des frischen Sauerteiges mit  $5 \times 10^7$  KbE  $g^{-1}$  statt. Dabei wurden Reinstämme der ausgewählten Stämme und die des LF1 für 16 h bei 30°C in mMRS-5-Medium angezüchtet und die Zellen mit Hilfe einer Thomazählkammer gezählt (siehe Kapitel 2.7.1). Die frische Starterkultur BR wurde gemäß der Produktspezifikation mit 10% (bezogen auf die Mehlmenge) eingesetzt. Die Durchführung der Fermentationen entsprach der Vorgehensweise in Kapitel 2.5 und 2.7.1. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12 und 24 h wurden Proben gezogen und die pH-Werte, Säuregrade und MSB-Keimzahlen auf mMRS-5-Agar bestimmt. Für die Kontrolle auf Hefen und Schimmelpilze wurde YGC-Agar mitgeführt. Die Zuordnung zu den Morphologietypen fand visuell statt. Zusätzlich wurden Teige ohne Zusatz einer Kultur mitgeführt, um einen Aufschluss über den direkten Einfluss der Starterkulturen zu bekommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Fermentationsparameter spontan fermentierter Sauerteige

Um die stabile Mikroorganismenflora der spontan fermentierten Amaranthsauerteige zu charakterisieren wurden die Mehle mit Körnern von AI, AP, NP, AM und SG (siehe Kapitel 2.4) in Doppelbestimmungen fermentiert. Bei den Analysen wurden die chemischen Eigenschaften der Mehle nicht berücksichtigt, da sie ausschließlich als Quelle für die Isolierung unterschiedlicher Milchsäurebakterien (MSB) dienen sollten. Eine potentielle Starterkultur sollte in der Lage sein, verschiedene Mehle fermentieren zu können, ohne den Ursprung des Mehles berücksichtigen zu müssen. Während den Fermentationen wurden täglich Proben entnommen, um die pH-Werte und die Säuregrade der Teige sowie die MSB-Keimzahlen zu bestimmen. Tabelle 7 zeigt die Anzahl der durchgeführten Amaranthfermentationen je Mehllart, die pH-Werte und die Säuregrade am Ende der Fermentation (End-pH-Wert, End-Säuregrad) sowie die MSB-Keimzahl am letzten Tag der Fermentation.

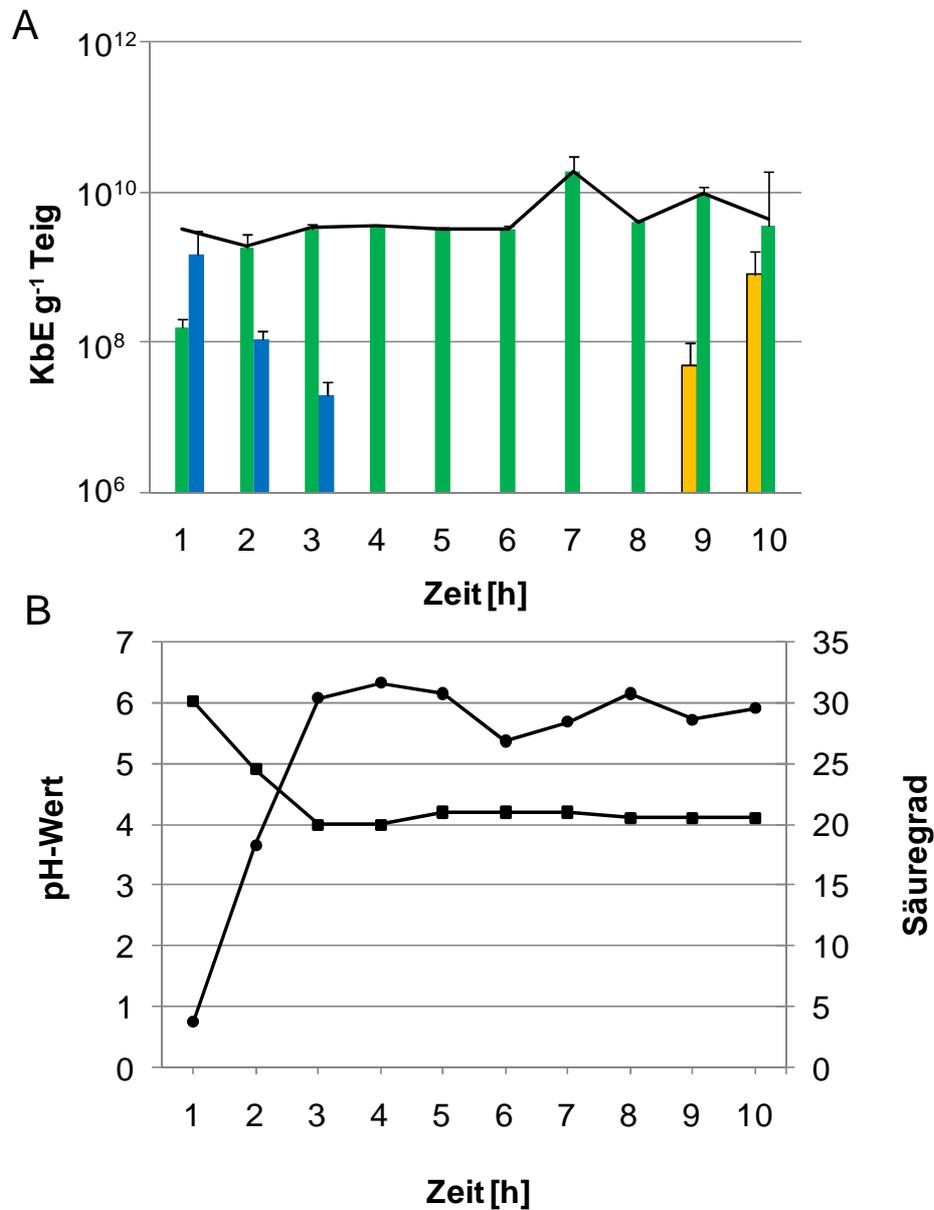
**Tabelle 7.** pH-Werte, Säuregrade und MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] aus spontan fermentierten Amaranthsauerteigen nach zehn Tagen Fermentation mit täglichem Propagieren.

Amaranth Mehl	Anzahl der Fermentationen	End-pH- Werte	End- Säuregrade	MSB Keimzahlen [KbE g <sup>-1</sup> ]
AP	2	4,0 ± 0,0	26,5 ± 3,5	4,4 × 10 <sup>9</sup> ± 1,4 × 10 <sup>9</sup>
AM	3	4,1 ± 0,1	25,2 ± 2,2	2,8 × 10 <sup>9</sup> ± 5,6 × 10 <sup>8</sup>
AI	4	3,9 ± 0,1	31,5 ± 0,8	5,0 × 10 <sup>9</sup> ± 2,4 × 10 <sup>9</sup>
NP	4	4,0 ± 0,1	25,0 ± 1,4	4,1 × 10 <sup>9</sup> ± 1,3 × 10 <sup>9</sup>
SG	2	4,1 ± 0,0	33,1 ± 5,0	5,6 × 10 <sup>9</sup> ± 5,4 × 10 <sup>9</sup>

Die pH-Werte fielen von pH 6,0±0,2 am Anfang der Fermentation auf pH 4,0±0,1 an Tag 3 und blieben auf diesem Wert bis zum Ende der Fermentation. Alle fünf Mehle zeigten ähnliche pH-Werte am Ende, welche sich schon nach dem dritten Tag der Fermentation zeigten. Die Säuregrade der Teige lagen bei 3,0±1,0 am ersten Tag bis 33,1±5,0 am letzten Tag der Fermentation. Die Säuregrade erreichten diesen Wert

am dritten Tag der Fermentation und blieben dann konstant bis zum Ende. Bei den Mehlen aus Europa und Asien (SG und AI) wurden leicht höhere Säuregrade am Ende des Fermentationsprozesses gemessen als bei den Mehlen aus Südamerika (AP, AM und NP) (Tabelle 7).

Abbildung 2 zeigt exemplarisch den Verlauf der MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] (A) sowie den Verlauf des pH-Wertes und des Säuregrades (B) während einer Spontanfermentation mit Amaranth SG. Um MSB, Hefen und Schimmelpilze zu bestimmen wurden täglich bei jedem Propagationsschritt Proben entnommen und auf mMRS-5- sowie YGC-Agar in einer Doppelbestimmung ausgestrichen. Die MSB-Keimzahlen lagen während der Fermentation bei 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> KbE g<sup>-1</sup> (Tabelle 7). Mikrobielle Kolonien wurden aufgrund ihrer Morphologie (Größe, Farbe, Form, Rand- und Oberflächenbeschaffenheit) visuell auf mMRS-5-Agarplatten charakterisiert und somit in Morphologietypen unterschieden. Es wurden bei dieser Fermentation vier verschiedene Morphologietypen beobachtet. Typ 1 (weiß, gewölbt, erhaben, glänzend, außen glatt, mittig leicht grün) war von Tag 1 bis Tag 10 in großer Anzahl vorhanden (Abbildung 2A, grüne Balken), während Typ 2 (wie Typ 1, jedoch außen leicht gewellt) erst an Tag 9 erschien und an Tag 10 bis auf 10<sup>9</sup> KbE g<sup>-1</sup> anstieg (Abbildung 2A, gelbe Balken). Typ 3 (wie Typ 1, jedoch kleiner) und 4 (grün, außen weißer Rand, glänzend, gewölbt) (in Abbildung 2A zusammengefasst als blaue Balken) waren von Tag 1 an mit 10<sup>9</sup> KbE g<sup>-1</sup> Teig vorhanden, wuchsen an Tag 2 auf 10<sup>8</sup> KbE g<sup>-1</sup> heran, fielen an Tag 3 auf 10<sup>7</sup> KbE g<sup>-1</sup> ab und waren am letzten Tag nicht mehr zu beobachten. Die Kolonien, die den blauen Balken in Abbildung 2A entsprechen, wurden nicht näher charakterisiert, da das wichtige Ziel dieser Arbeiten die Isolierung potentieller Starterkulturen war und kein näheres Augenmerk auf die am Anfang vorherrschende Begleitflora gelegt wurde.



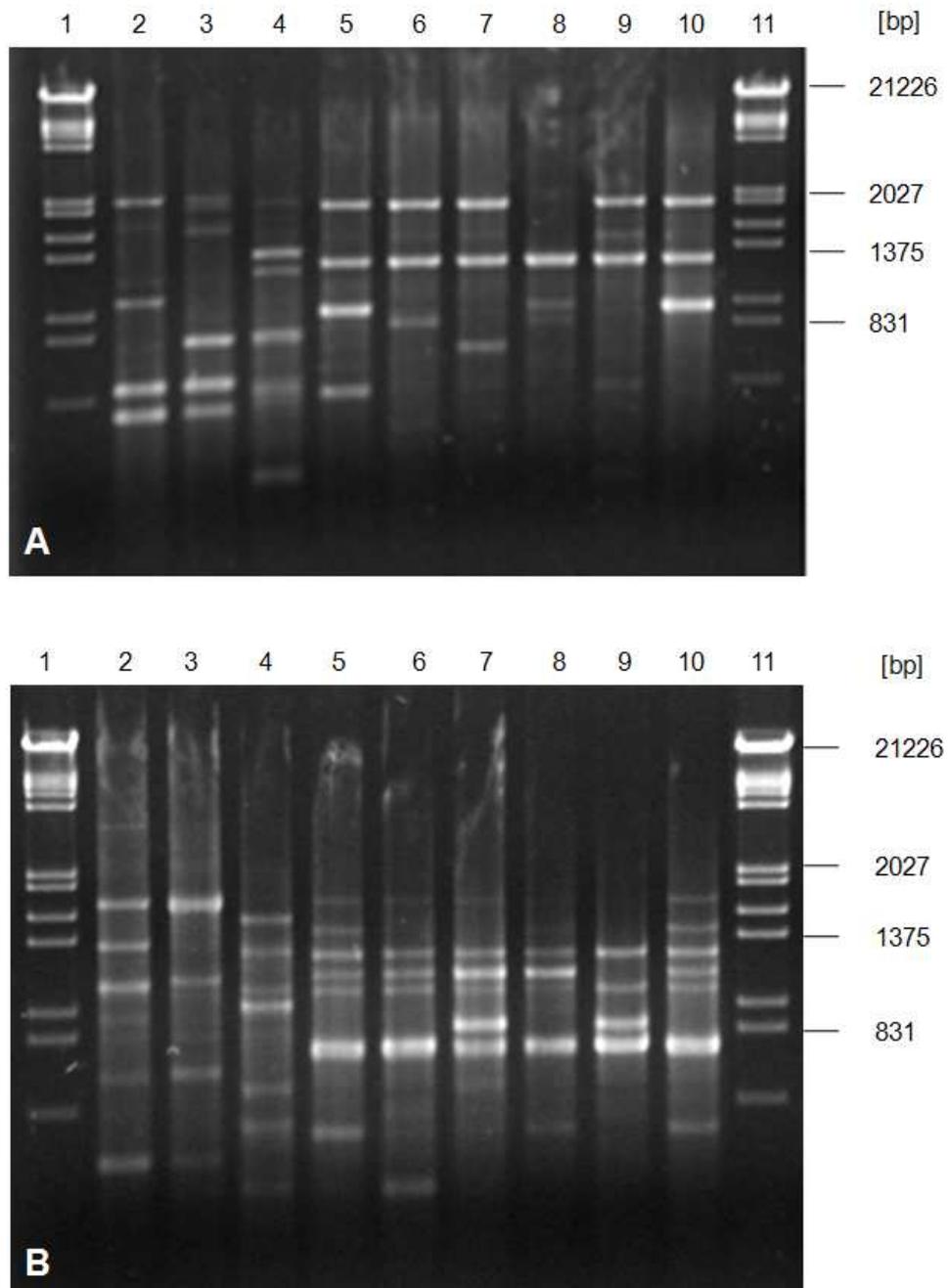
**Abbildung 2. A.** MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] des spontan fermentierten Amaranthsauerteiges SG über zehn Tage. Keimzahlen von Typ 1-Kolonien (grüne Balken), Typ 2-Kolonien (gelbe Balken), Typ 3- und 4-Kolonien (blaue Balken) und MSB-Gesamtkeimzahl (schwarze Linie). **B.** pH-Wert-Verlauf (■) und Säuregradverlauf (●) während der Spontanfermentation.

Für alle anderen Amaranthmehle wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet. Die Typ 1-Kolonien im obigen Beispiel waren die interessantesten Kolonien, da sie vom Beginn der Fermentation bis zum Ende hin in hoher Anzahl im Teig vorhanden waren. Solche Morphologietypen, welche den Typ 1-Kolonien im oben beschriebenen

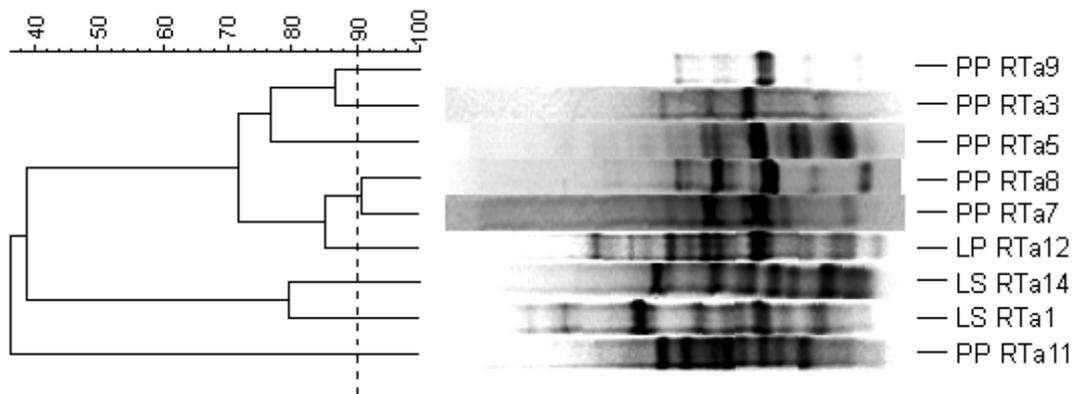
en Experiment entsprachen, wurden ebenfalls in anderen Fermentationen beschrieben. Insgesamt wurden 35 verschiedene Morphologietypen in den Fermentationsexperimenten identifiziert. Am letzten Tag der Fermentation wurden fünf Kolonien von jedem Morphologietyp abgeimpft (entsprechen im Beispiel Abbildung 2A den Typen 1 und 2) und mit molekularbiologischen Methoden analysiert. In allen durchgeführten Spontanfermentationen konnten keine Hefen in den Teigen gefunden werden. Schimmelpilze wurden in allen Teigen bis zum Ende der Fermentation analysiert. Durch die Isolierung der Schimmelpilz-DNA und einer anschließenden Sequenzierung der ersten 400 bis 650 bp der 28S rDNA mit dem Primer P1 (5'-ATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') (siehe Kapitel 2.6) konnten die Sequenzen unter Verwendung des Blast-Algorithmus mit denen in der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen werden. Dies ergab eine Identifikation von *Mucor* spp. mit einer Identität von etwa 98-100%.

### 3.2 Differenzierung und Identifizierung dominanter MSB

Von den am Ende der Fermentation zufällig ausgewählten fünf Kolonien eines jeden Morphologietypes wurden Reinkulturen auf mMRS-5-Agar hergestellt, die genomische DNA präpariert und mittels RAPD-PCR eine Differenzierung auf Stammesebene vorgenommen. In allen 15 durchgeführten Spontanfermentationen wurden insgesamt 175 Kolonien isoliert (entsprechen 35 Morphologietypen). In den Fermentationen traten die gleichen Morphologietypen mehrmals auf. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten wurden Ansätze einer RAPD-PCR mit zwei unterschiedlichen Primern durchgeführt. Die Bandenmuster aller aus Spontanfermentationen isolierten Stämme sind exemplarisch in Abbildung 3 dargestellt. Stämme, die dasselbe RAPD-Muster zeigten wurden zu einem RAPD-Typ (RT) zugeordnet und fortlaufend nummeriert. Die Ähnlichkeiten der RAPD-Muster pro RT lagen bei mehr als 91% (Abbildung 4). ROSSETTI UND GIRAFFA legten 2005 die Ähnlichkeit der RT der Stämme bei 89% fest. Für diese Studie war nach eigenem Ermessen eine Marke von 91% sinnvoll, da so eine Differenzierung aller Stämme möglich war. Insgesamt wurden sechs RT für die Spezies *P. pentosaceus* (RTa3, 5, 7, 8, 9, 11), ein RT für die Spezies *L. plantarum* (RTa12) und zwei RT für die Spezies *L. sakei* (RTa1, 14) isoliert (Abbildung 3, 4).



**Abbildung 3.** Agarosegel (1,5%) mit RAPD-PCR-Mustern von ausgewählten MSB-Isolaten (identifiziert durch Sequenzierung) erhalten durch den Pimer 1254 (A) und M13V<sub>mod.</sub> (B). In den Klammern stehen die Mehle, aus denen die Stämme isoliert wurden (vgl. Tabelle 8). 1, 11:  $\lambda$  HindIII/EcoRI-Marker; 2: *Lactobacillus sakei* (LS) RTa14 (AM 1); 3: LS RTa1 (AM 1); 4: *L. plantarum* (LP) RTa12 (SG 2); 5: *Pediococcus pentosaceus* (PP) RTa3 (AM 2); 6: PP RTa5 (SG 1); 7: PP RTa7 (AI 2); 8: PP RTa8 (AP 1); 9: PP RTa9 (AI 1); 10: PP RTa11 (AP 2).



**Abbildung 4.** Dendrogramm der RAPD-Typen (erhalten durch den Primer M13V<sub>mod.</sub>) der aus allen Spontanfermentationen mit Amaranth isolierten Stämme. *Pediococcus pentosaceus* (PP) RTa3, 5, 7, 8, 9, 11; *Lactobacillus plantarum* (LP) RTa12; *L. sakei* (LS) RTa1, 14.

Repräsentativ für einen Stamm jedes RT wurde die 16S rDNA amplifiziert, mit den Primern 616V und 97K ansequenziert (450-600 bp) und unter Verwendung des Blast-Algorithmus mit denen in der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen und identifiziert. Drei Stämme, welche in Spontanfermentationen vorherrschend waren und sowohl als Starterkulturen in anderen Lebensmittelprodukten bekannt waren, als auch aufgrund sehr guter Fermentationscharakteristika auffielen, wurden für weitere Fermentationen ausgewählt und näher charakterisiert. Für diese drei Stämme wurden Sequenzierungen der kompletten 16S rDNA Gene mit den Primern 616V, 699V, 630R, 610V und 97K angewandt. Repräsentativ für den Genus *Pediococcus* wurde der Stamm *P. pentosaceus* RTa11 gewählt, der aus der Spontanfermentation AP 2 isoliert wurde. Die DNA-Sequenz dieses Stammes war zu 100% identisch zu *P. pentosaceus* ATCC 25745 (Accession No. CP000422), ein Stamm, welcher in einem Projekt über komparative Genome von MSB evaluiert wurde (MAKAROVA *et al.*, 2006). Weiter wurden repräsentativ für den Genus *Lactobacillus* die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *L. sakei* RTa14, isoliert aus den Spontanfermentationen NP 3 und AM 1, verwendet (Tabelle 8). Die Sequenz des Stammes *L. plantarum* RTa12 war zu 100% identisch zur 16S rDNA von *L. plantarum* LP3 (Accession No. AY675256; JUNG *et al.*, 2004), welcher aus fermentierten koreanischen Lebensmitteln isoliert wurde. Der Stamm *Lactobacillus sakei* RTa14 besitzt eine Sequenz, die zu 99,9% (1540/1542 Übereinstimmungen) zur Sequenz von

*L. sakei* 23 K (Accession No. CR936503; CHAILLOU *et al.*, 2005) identisch war (siehe Anhang). Es handelt sich hier um einen Stamm, der aus frischem Fleisch und Fisch isoliert wurde. Die 16S rDNA-Sequenzen der Stämme *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden in der EMBL Nucleotid-Datenbank hinterlegt und erhielten die Accession No. FM 179607, FM179608 und FM 179610. Weiter wurden sie in der Stammsammlung für Mikroorganismen des Fachgebietes für Lebensmittelmikrobiologie hinterlegt mit den Nummern: LTH 6724 (*L. plantarum* RTa12), 6725 (*L. sakei* RTa14) und 6727 (*P. pentosaceus* RTa11).

Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass *P. pentosaceus* in nahezu allen fermentierten Teigen präsent war. Der prozentuale Anteil, welcher als der Anteil der Stämme an der MSB-Gesamtkeimzahl am letzten Tag der Fermentation definiert war, lag bei *P. pentosaceus* zwischen 70,9 und 100% (Tabelle 8) und stellte damit die Spezies mit dem durchschnittlich größten prozentualen Anteil in allen Teigen, unabhängig vom Ursprungsland, dar. Die Spezies *L. plantarum* kam zwischen 4,0 und 65,7% und *L. sakei* zu 11,6 und 69,0% am letzten Tag der Fermentation im Teig vor. Vergleicht man die Spezies der aus Spontanfermentationen isolierten Stämme der jeweiligen Anbauländer der Amaranthmehle, so brachten die Mehle aus Deutschland und Indien Stämme der Spezies *L. plantarum* und *P. pentosaceus* hervor, während mit Mehlen aus Südamerika am letzten Tag der Fermentation Stämme der Spezies *P. pentosaceus*, *L. paralimentarius*, *L. plantarum*, *L. sakei* und *Enterococcus sp.* isoliert wurden (Tabelle 8). Eine direkte anbaulandspezifische Korrelation wurde in diesen Experimenten nicht gefunden. Im Gegensatz zu Literaturangaben, die allgemeine Sauerteigfermentationen betreffen, wurden keine Stämme von *L. sanfranciscensis* in diesen spontan fermentierten Sauerteigen isoliert.

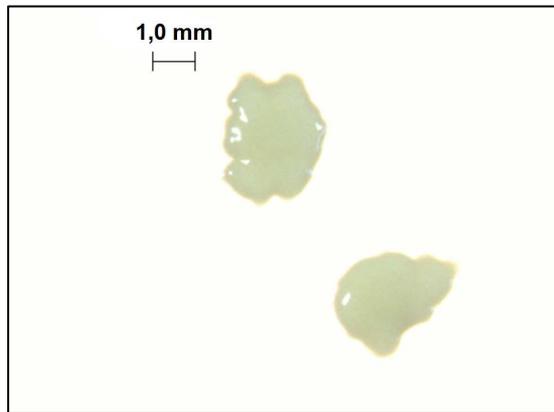
**Tabelle 8.** MSB-Spezies, isoliert aus spontan fermentierten Amaranthsauerteigen, deren prozentualer Anteil an der MSB-Gesamtkeimzahl und die Anzahl der vorkommenden Stämme. AP, AM, AI, NP, SG: siehe Kapitel 2.4.

Fermentations- experiment <sup>a</sup>	Spezies	Anzahl der Stämme	prozentualer Anteil der Spezies an der MSB- Gesamtkeimzahl [%]
AP 1	<i>P. pentosaceus</i>	3	70,9
	<i>Enterococcus spp.</i>	1	17,5
	<i>L. sakei</i>	1	11,6
AP 2	<i>P. pentosaceus</i>	3	100
AM 1	<i>L. sakei</i>	2	69,0
	<i>Enterococcus sp.</i>	1	31,0
AM 2	<i>P. pentosaceus</i>	2	100
AM 3	<i>P. pentosaceus</i>	1	76,2
	<i>L. plantarum</i>	1	23,8
AI 1	<i>P. pentosaceus</i>	2	100
AI 2	<i>P. pentosaceus</i>	2	100
AI 3	<i>P. pentosaceus</i>	1	96,0
	<i>L. plantarum</i>	1	4,0
AI 4	<i>P. pentosaceus</i>	1	100
NP 1	<i>P. pentosaceus</i>	1	100
NP 2	<i>P. pentosaceus</i>	1	100
NP 3	<i>L. plantarum</i>	1	65,7
	<i>L. paralimentarius</i>	1	34,3
NP 4	<i>P. pentosaceus</i>	1	100
SG 1	<i>P. pentosaceus</i>	4	100
SG 2	<i>P. pentosaceus</i>	2	89,6
	<i>L. plantarum</i>	1	10,4

<sup>a</sup> Die Zahlen in der Spalte des Fermentationsexperiments geben die fortlaufende Nummerierung der Fermentation des jeweiligen Mehles an.

### 3.3 Morphologische Beschreibung der MSB-Stämme

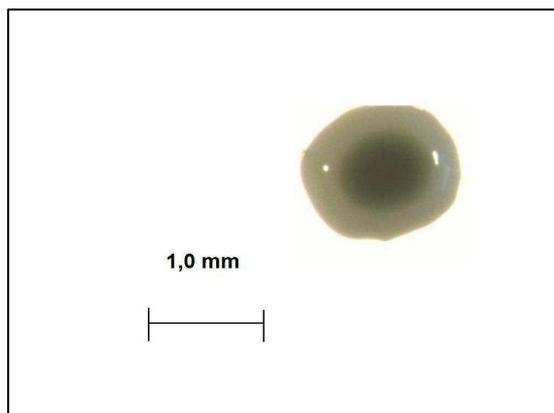
#### 3.3.1 *Lactobacillus plantarum* RTa12 (LTH 6724)



**Abbildung 5.** Kolonienmorphologie von *Lactobacillus plantarum* RTa12 LTH 6724 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre.

Kolonien von *L. plantarum* RTa12 zeigten auf mMRS-5-Agar, je nach Ausprägung stark bis leicht gewellte Kolonien, mit einem Durchmesser von etwa 2 mm (Abbildung 5). Sie waren meist weiß bis cremefarben, trugen innen gelegentlich eine leichte Grünfärbung (Bromkresolgrün des Mediums) und waren glänzende platte Kolonien. *L. plantarum* zeigte sich unter dem Mikroskop als ein stäbchenförmiges, am Ende abgerundetes, etwa 0,9 bis 1,2  $\mu\text{m}$  breites und 3,0 bis 8,0  $\mu\text{m}$  langes Bakterium, welches einzeln, gepaart oder in kurzen Ketten auftrat.

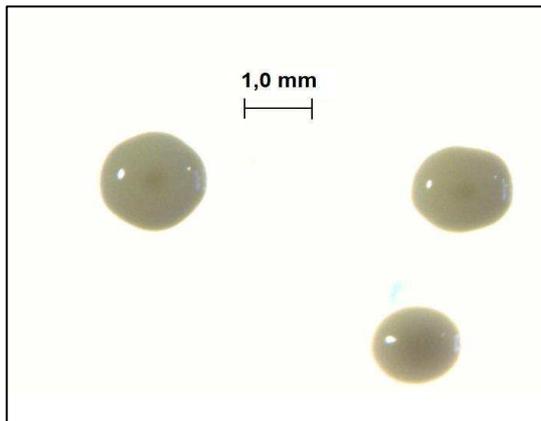
#### 3.3.2 *Lactobacillus sakei* RTa14 (LTH 6725)



**Abbildung 6.** Kolonienmorphologie von *Lactobacillus sakei* RTa14 LTH 6725 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre.

Kolonien von *L. sakei* erschienen auf mMRS-5-Agar mit weißem dicken Rand und innen grüner Färbung (Abbildung 6). Die Kolonien waren 1-2 mm groß und zeigten sich mit rundem bis leicht gewelltem Rand sowie einer glänzenden Erscheinungsform auf den mMRS-5-Agarplatten. Das Bakterium erschien unter dem Mikroskop stäbchenförmig und wies abgerundete Enden auf. Im Allgemeinen war es 0,6 bis 0,8  $\mu\text{m}$  breit und 2,0 bis 3,0  $\mu\text{m}$  lang und trat einzeln oder in kurzen Ketten auf.

### 3.3.3 *Pediococcus pentosaceus* RTa11 (LTH 6727)



*P. pentosaceus* wuchs auf mMRS-5-Agar meist weiß mit runden Kanten, hatte einen Durchmesser von etwa 2 mm, war in seiner Erscheinungsform gewölbt, erhaben, glänzend und zeigte mittig eine leicht grüne Färbung auf (Abbildung 7). Unter dem Mikroskop war *P. pentosaceus* als kokkoides, meist paarweise auftretendes, etwa 1,0  $\mu\text{m}$  großes Bakterium zu erkennen.

**Abbildung 7.** Kolonienmorphologie von *Pediococcus pentosaceus* RTa11 LTH 6727 auf mMRS-5-Agar nach Kultivierung von 48 h bei 30°C und kontrollierter Atmosphäre.

## 3.4 Fermentationseigenschaften ausgewählter Stämme

### 3.4.1 Fermentationen mit ausgewählten Stämmen

Es wurden für weitere Experimente aufgrund sehr guter Fermentationseigenschaften die Stämme *L. sakei* RTa14, *P. pentosaceus* RTa11 und *L. plantarum* RTa12 ausgewählt. Mehl aus Amaranthkörnern AI, AP, AM, NP, SG und DP (siehe Kapitel 2.4) wurden für Einzelfermentationsexperimente jeweils mit einem der drei Stämme verwendet. Um die Dominanz und Stabilität der Stämme zu untersuchen wurden die Teige mit jeweils  $10^7$  KbE des entsprechenden Stammes  $\text{g}^{-1}$  Teig inokuliert. Zusätzlich wurde DP mit einer Kombination aus *L. sakei* RTa14, *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 (jeweils  $10^7$  KbE  $\text{g}^{-1}$  Teig) versetzt, und in einem weiteren Ansatz eine Kombination aus *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 (jeweils  $10^7$  KbE  $\text{g}^{-1}$  Teig) dem Amaranthteig zugegeben. Es konnten in den Einzelfermentationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Keimzahlen von *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 festgestellt werden (Tabelle 9). Alle Stämme wuchsen je nach Mehl bis  $10^{10}$  KbE  $\text{g}^{-1}$  Teig und waren die Stämme, welche überwiegend im Teig vorherrschten.

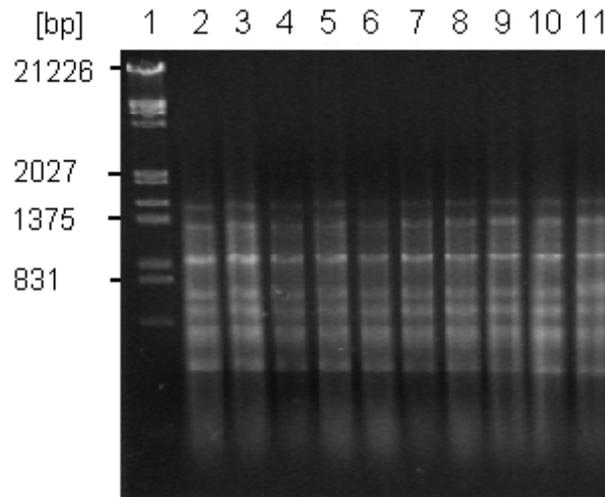
**Tabelle 9.** Eigenschaften und Charakteristika von Amaranthsauerteigen, fermentiert mit ausgewählten Stämmen. Es wurde jeweils mit  $10^7$  KbE  $g^{-1}$  Teig inokuliert.

Stamm	Amaranth Mehl	End-pH-Wert	End-Säuregrad	MSB-Keimzahlen [KbE $g^{-1}$ ]	prozentualer Anteil <sup>a</sup> [%]
<b><i>L. sakei</i> RTa14</b>					
	AP	3,9	25,3	$1,0 \times 10^{10}$	58
	AM	4,1	22,4	$6,9 \times 10^8$	67
	NP	4,1	21,7	$8,0 \times 10^9$	75
	SG	4,1	27,7	$1,5 \times 10^{10}$	60
<b><i>P. pentosaceus</i></b>					
<b>RTa11</b>					
	AP	4,1	25,0	$3,0 \times 10^{10}$	100
	AM	3,8	26,9	$4,2 \times 10^9$	100
	AI	4,0	25,1	$3,0 \times 10^{10}$	100
	NP	3,9	30,6	$2,9 \times 10^9$	100
	SG	3,9	23,8	$4,2 \times 10^9$	100
<b><i>L. plantarum</i></b>					
<b>RTa12</b>					
	DP	3,9	25,5	$2,3 \times 10^{10}$	100

<sup>a</sup> Anteil der Kolonien der eingesetzten Stämme an der MSB-Gesamtkeimzahl am Ende der Fermentation in %.

Aus der Vielzahl von untersuchten Kolonien auf mMRS-5-Agar konnten *L. plantarum* RTa12 sowie *P. pentosaceus* RTa11 zu 100% der MSB-Isolate aus den Teigen am letzten Tag der Fermentation isoliert werden. *L. sakei* RTa14 wies am Ende einen prozentualen Anteil an der MSB-Gesamtkeimzahl von 58% bis 75% auf. Die RAPD-Muster der inokulierten Starterkulturen und die aus dem Teig isolierten Klone am letzten Tag der Fermentation zeigten, dass es sich um dieselben Stämme handelte (Abbildung 8). Der durchschnittliche pH-Wert aller Fermentationen mit Einzelstamm-starterkultur (jeweils ein Stamm pro Fermentation) lag bei pH  $6,3 \pm 0,1$  am Anfang der Fermentation, fiel dann auf pH  $4,0 \pm 0,1$  an Tag 2 und blieb auf diesem Level bis zum Ende der Fermentation. Die durchschnittlichen Säuregrade lagen bei  $2,4 \pm 0,7$  am

ersten Tag der Fermentation, erreichten  $25,1 \pm 3,1$  am zweiten Tag und blieben bis zum Ende des Experimentes bei diesen Werten.

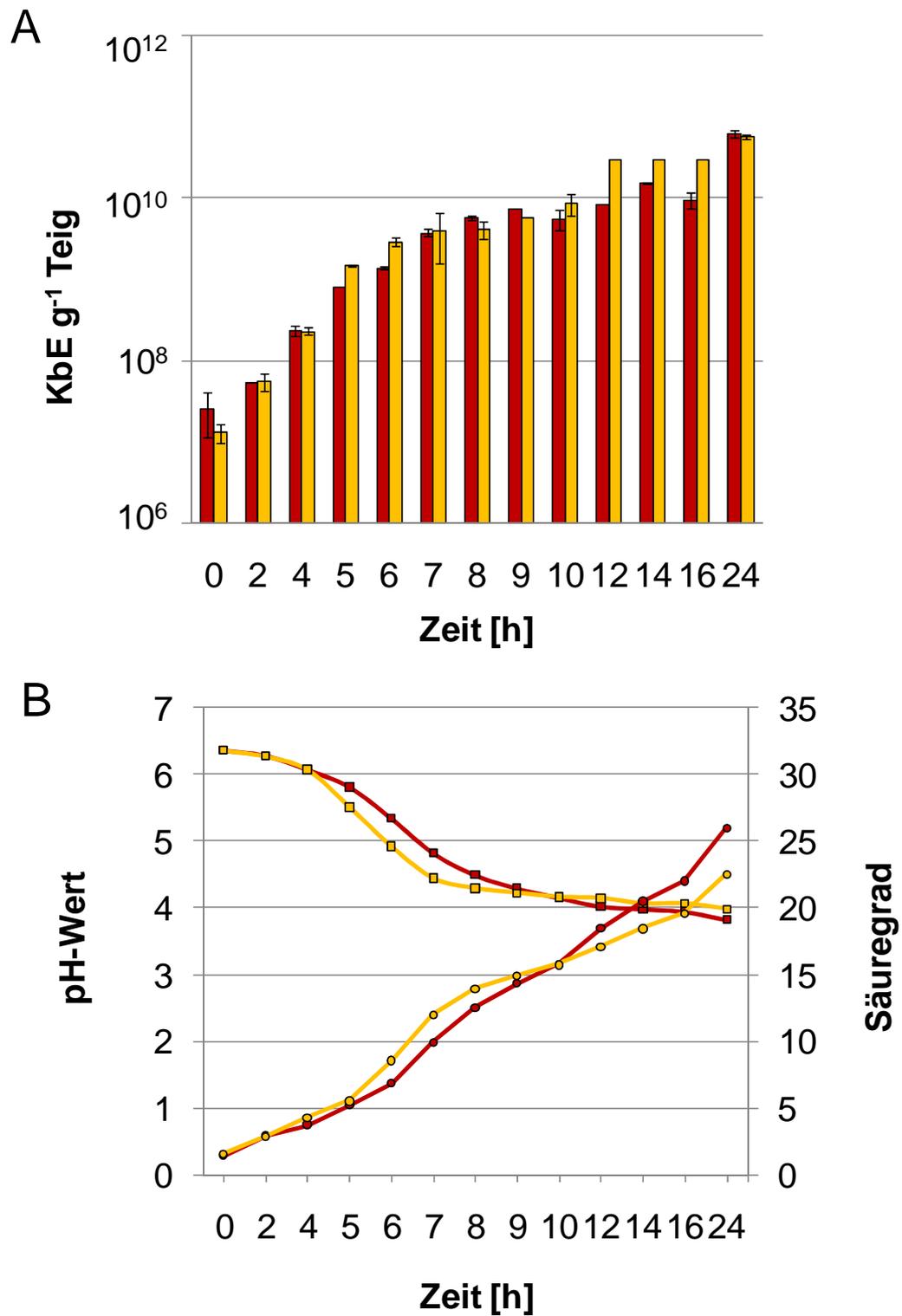


**Abbildung 8.** RAPD-PCR Fingerprints unter Verwendung von Primer M13V<sub>mod.</sub>, aufgetrennt in einem 1,5%igen Agarosegel. 1:  $\lambda$  HindIII/EcoRI-Marker; 2-6: eingesetzter Stamm *L. plantarum* RTa12; 7-11: Isolate aus dem Teig nach zehntägiger Fermentation.

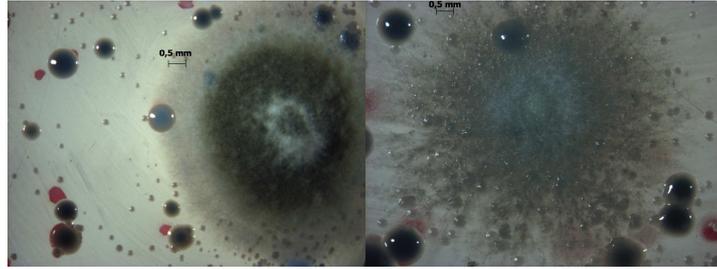
Nach dem Inokulieren einer Kombination von *L. sakei* RTa14, *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 in den Teig aus Amaranth DP herrschte *L. plantarum* RTa12 zu 100% am Ende der Fermentation vor. Der pH-Wert lag am Ende der Fermentation bei 3,8, während der Säuregrad bei 25,2 war. Wurden *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 dem Teig in Kombination zugesetzt, so war *P. pentosaceus* RTa11 zu 70% vorhanden, während *L. sakei* RTa14 nicht detektiert werden konnte. Der pH-Wert lag bei dieser Fermentation bei 3,9 und der Säuregrad wurde mit 23,5 analysiert. Für weitere Fermentationsexperimente wurden aufgrund ihrer 100%igen Dominanz im Teig ausschließlich die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 verwendet.

### 3.4.2 Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h

Die in den vorhergehenden Experimenten zu 100% im Teig vorherrschenden Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden in weiteren Fermentationen auf ihre Fermentationseigenschaften innerhalb von 24 h evaluiert. Während den Fermentationen wurden keine maßgebenden Unterschiede bezüglich des Wachstums zwischen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 beobachtet. *P. pentosaceus* RTa11 war während den Fermentationen trotz geringerer Anfangskeimzahlen tendenziell dominanter, jedoch waren die Unterschiede der Keimzahlen der beiden Stämme geringfügig ( $<10^1$  KbE g<sup>-1</sup>) (Abbildung 9A). Am Ende der Fermentation waren dieselben Keimzahlen erreicht. Die MSB-Keimzahlen bewegten sich für beide Stämme zwischen  $10^7$  und  $10^{10}$  KbE g<sup>-1</sup>. Auf den YGC-Agar Platten der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 konnten während der ersten 16 h Schimmelpilze analysiert werden (Abbildung 10), während sie bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa11 innerhalb 24 h nicht inhibiert wurden. Während der Fermentationsperiode konnten bei dem Einsatz beider Stämme keine Hefen im Teig beobachtet werden. Der pH-Wert Verlauf der Fermentationen war bei beiden Stämmen sehr ähnlich. Der pH-Wert von 4,2 wurde mit *P. pentosaceus* RTa11 im Teig früher gemessen, jedoch hatten beide Stämme nach 10 h dieselben pH-Werte erreicht (Abbildung 9B). Am Ende wurden leicht niedrigere pH-Werte im Teig mit *L. plantarum* RTa12 als im Teig mit *P. pentosaceus* RTa11 (pH 3,82 und pH 3,98) gemessen. Für den Säuregrad konnten dieselben Fermentationseigenschaften der beiden Stämme bis 10 h Fermentation im Teig analysiert werden. Jedoch waren danach die Unterschiede signifikanter. Die Säuregrade am Ende der Fermentation lagen bei 26,0 für *L. plantarum* RTa12 und bei 22,5 für *P. pentosaceus* RTa11.



**Abbildung 9. A.** MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] der Fermentationen über 24 h mit Amaranth DP. **B.** pH-Wert- (□) und Säuregradverlauf (○) während den Fermentationen. *P. pentosaceus* (gelbe Balken bzw. Kurven) und *L. plantarum* (rote Balken bzw. Kurven).



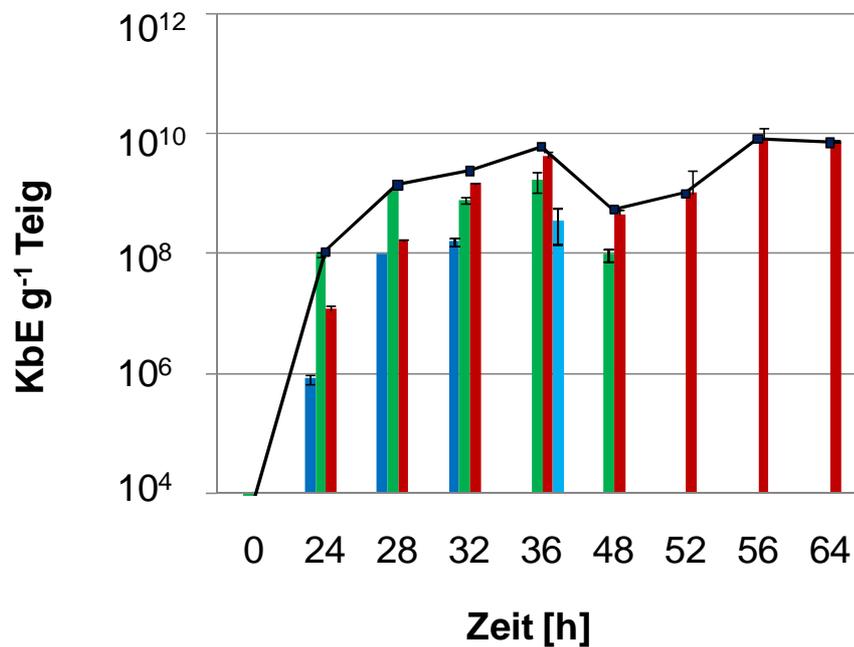
**Abbildung 10.** Schimmelpilzkulturen, die im Teig DP fermentiert mit *L. plantarum* RTa12 nach 16 h vorhanden waren. Nachweis auf YGC-Agarplatten, Inkubation für 48 h bei 30°C.

### 3.4.3 Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der autochthonen Mikroflora

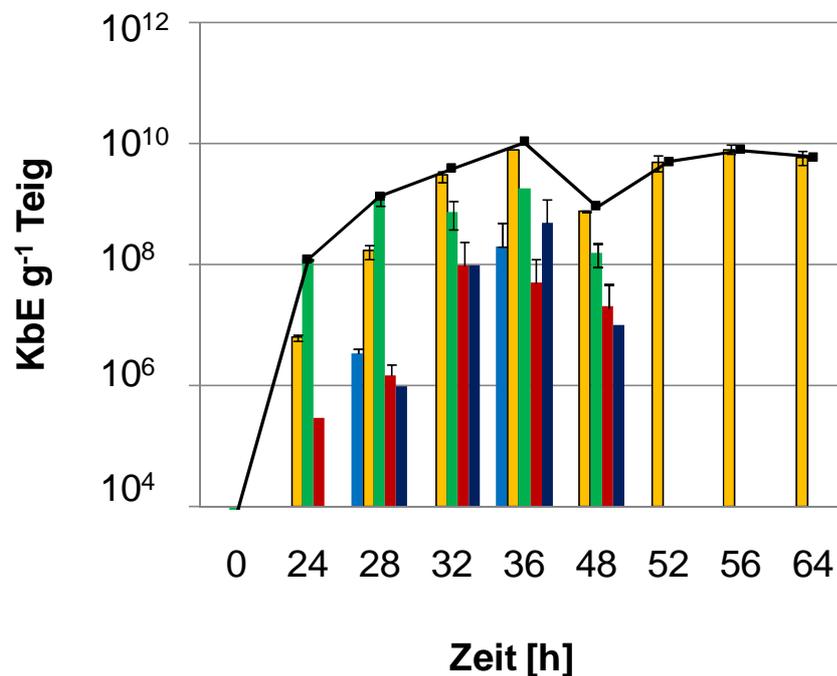
Bei der Analyse der Wettbewerbsfähigkeit der ausgewählten Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 gegenüber der autochthonen Mikroorganismenflora zeigten die beiden mit DP spontan fermentierten Teige fast identische chemische und mikrobiologische Parameter. Die pH-Werte der fermentierten Teige bewegten sich von pH 6,9±0,0 am Anfang der Spontanfermentationen bis 3,7±0,1 am Ende der Fermentationen nach 64 h, was den vorher durchgeführten Fermentationsversuchen mit Amaranth entsprach. Die Säuregrade lagen bei 1,8±0,1 bei 0 h und stiegen bis 26,0±1,3 nach 64 h. Nach 24 h Spontanfermentationen wurden die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 in zwei Ansätzen mit jeweils  $1 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup> inokuliert. Die initiierten Stämme repräsentierten etwa 10% der bakteriellen Mikrobiota zum Zeitpunkt des Inokulierens. Die MSB-Gesamtkeimzahlen der spontan fermentieren Sauerteige betragen nach 24 h  $1,1 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (*L. plantarum* RTa12) und  $1,3 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (*P. pentosaceus* RTa11) (Abbildung 11). Nach weiteren 24 h Fermentation betrug die Gesamtkeimzahl an MSB jeweils  $7,5 \times 10^9$  KbE g<sup>-1</sup> (*L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11) mit einem prozentualen Anteil der inokulierten Stämme an der MSB-Gesamtkeimzahl von 40% (*L. plantarum* RTa12) und 73% (*P. pentosaceus* RTa11). Bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa11 sind deutlich mehr verschiedene Morphologien zwischen 24 und 48 h der Fermentation im Teig vorhanden als bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12. Diese Begleitflora wurde nicht näher charakterisiert, da es sich ausschließlich um die Überprüfung der Wettbewerbsfähigkeit und des Durchsetzungsvermögen der eingesetzten potentiellen

Starterkulturen handelte. Den beiden Teigen gemeinsam war das Vorhandensein anderer Stämme, welche aus der autochthonen Mikroflora stammten, jedoch ausschließlich bis 48 h der Fermentationen im Teig nachweisbar waren. Zu diesem Zeitpunkt war nur der inokulierte Stamm bis zum Ende der Fermentation im Teig zu finden. Nach dem Propagieren der Teige (48 h) überwuchsen die eingesetzten Stämme die anderen MSB innerhalb der ersten Stunden und nach 4 h spiegelten die Keimzahlen ausschließlich die inokulierten Stämme wider (52 h). Die MSB-Gesamtkeimzahlen am Ende der Fermentation betragen  $7,0 \times 10^9$  KbE  $g^{-1}$  (*L. plantarum* RTa12) und  $6,0 \times 10^9$  KbE  $g^{-1}$  (*P. pentosaceus* RTa11).

A



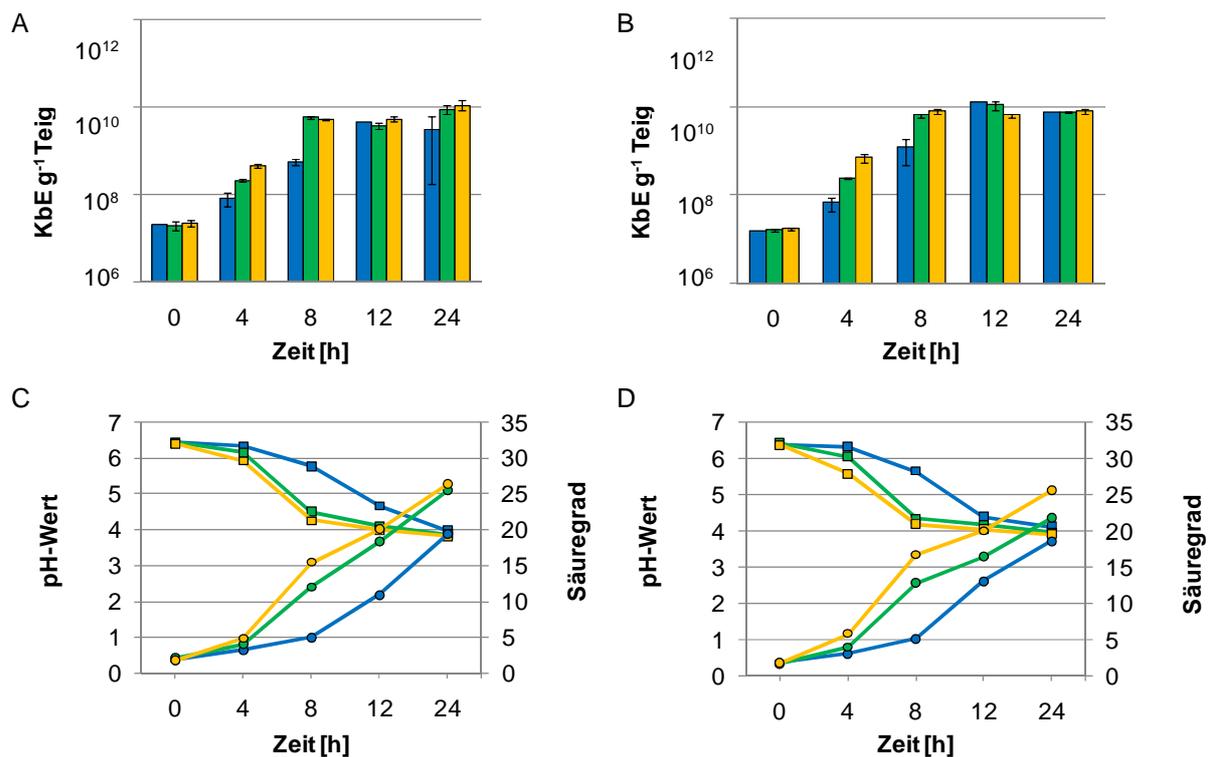
B



**Abbildung 11.** MSB-Keimzahlen [KbE g<sup>-1</sup>] der Fermentationen zur Evaluation der Wettbewerbsfähigkeit über 64 h mit Amaranth DP. *P. pentosaceus* (gelbe Balken); *L. plantarum* (rote Balken); Begleitflora (mittelblaue, grüne, hellblaue, dunkelblaue Balken); MSB-Gesamtkeimzahl (schwarze Kurven). Einsatz von 10<sup>7</sup> KbE g<sup>-1</sup> *L. plantarum* RTa12 (A) und *P. pentosaceus* RTa11 (B) nach 24 h Spontanfermentation, nach 48 h mit 10% Vorteig angefrischt.

### 3.4.4 Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen

Der Einfluss der Temperatur auf die Fermentationscharakteristika der Fermentationen mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 wurde bei 25°C, 30°C und 35°C untersucht. Die Teige wurden mit jeweils  $1 \times 10^7$  KbE  $g^{-1}$  inokuliert. Nach 4 h wurden Unterschiede der MSB-Keimzahlen sowie der chemischen Parameter für beide Kulturen beobachtet, welche tendenziell signifikanter für *P. pentosaceus* RTa11 als für *L. plantarum* RTa12 waren (Abbildung 12). Die Unterschiede wurden nach 8 h Fermentation deutlich größer und nahmen bis zum Ende der Fermentation (nach 24 h) bei beiden Stämmen wieder ab. Es konnten zwischen beiden Stämmen keine großen Unterschiede bezüglich MSB-Keimzahlen, pH-Werte und Säuregrade festgestellt werden. Die MSB-Keimzahlen lagen am Anfang der Fermentation durchschnittlich bei  $2,0 \times 10^7 \pm 2,8 \times 10^6$  KbE  $g^{-1}$  für *L. plantarum* RTa12 und  $1,6 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^6$  KbE  $g^{-1}$  für *P. pentosaceus* RTa11 und stiegen bis 8 h auf  $3,8 \times 10^9 \pm 2,8 \times 10^9$  KbE  $g^{-1}$  für *L. plantarum* RTa12 und  $5,4 \times 10^9 \pm 3,2 \times 10^9$  KbE  $g^{-1}$  für *P. pentosaceus* RTa11 an. Diese Werte blieben annähernd konstant bis 24 h (*L. plantarum* RTa12:  $7,5 \times 10^9 \pm 4,1 \times 10^9$  KbE  $g^{-1}$ ; *P. pentosaceus* RTa11:  $7,7 \times 10^9$  KbE  $\pm 4,5 \times 10^8$  KbE  $g^{-1}$ ). Bei 25°C wurden für die MSB-Keimzahlen und die Fermentationsaktivität reduzierte Werte während der ersten 12 h für beide Kulturen gefunden, während diese Unterschiede zu späteren Messpunkten (24 h) weniger groß waren. Im Gegensatz zu den anfänglichen Unterschieden bezüglich pH-Werten und Säuregraden, wurden sehr ähnliche pH-Werte am Ende der Fermentation festgestellt (Abbildung 12). Tendenziell konnten bei 25°C höhere pH-Werte im Teig bei beiden Stämmen beobachtet werden, während die Säuregrade positiv mit der Temperatur korrelierten. Die Unterschiede der MSB-Keimzahlen zwischen den Fermentationen mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 in Abhängigkeit von den Fermentationstemperaturen waren sehr gering.



**Abbildung 12.** MSB-Keimzahlen [ $\text{KbE g}^{-1}$ ], pH-Wert- und Säuregradverlauf von Amaranthfermentationen mit Temperaturvariationen. **A, C.** *L. plantarum* RTa12. **B, D.** *P. pentosaceus* RTa11. Blaue Balken und Kurven: 25°C; grüne Balken und Kurven: 30°C ; gelbe Balken und Kurven: 35°C; □: pH-Werte; ○: Säuregrade.

### 3.5 Analyse von Metaboliten in mMRS-5-Medium mittels HPLC

Die zu anfangs ausgewählten Stämme *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden für die Bestimmung der Stoffwechselaktivitäten in mMRS-5-Medium herangezogen, um die Überstände anschließend mittels HPLC auf Kohlenhydrate, organische Säuren, Mannitol und Ethanol zu analysieren. Die im mMRS-5-Medium enthaltene Glukose wurde von den Stämmen *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 vollständig verstoffwechselt. Maltose war ursprünglich mit  $10 \text{ g l}^{-1}$  im Medium vorhanden, wovon *L. plantarum* RTa12  $7,6 \pm 0,4 \text{ g}$  metabolisierte, *P. pentosaceus* RTa11  $7,3 \pm 0,3 \text{ g}$  Maltose verstoffwechselte und *L. sakei* RTa14  $7,0 \pm 0,1 \text{ g}$  Maltose nach dem Heranwachsen verbraucht hatte. Weitere Metabolite wurden in den Überständen nicht gefunden.

## 3.6 Analyse von Metaboliten in Sauerteig mittels HPLC

### 3.6.1 Fermentationen mit ausgewählten Stämmen

Es wurden Fermentationen mit sechs verschiedenen Amaranthmehlen mit den ausgewählten Stämmen *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 durchgeführt. Um Aufschluss über die im Teig vorhandenen Metabolite zu bekommen wurden Proben am Ende der Fermentation gezogen und nach vorübergehender Lagerung bei -20°C mit HPLC analysiert. Es wurden Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose, Saccharose, Cellobiose und Maltose im Teig detektiert und die Proben auf organische Säuren wie Laktat, Acetat, Formiat, Propionat, Succinat und Citrat untersucht (Tabelle 10). Weiter wurden der Zuckeralkohol Mannitol und Ethanol im Teig ermittelt. Für die analysierten Kohlenhydrate wurden die höchsten Konzentrationen im Teig am Ende der Fermentation für Glukose gefunden, während die Konzentrationen an Fruktose, Saccharose, Cellobiose, Maltose und Mannitol bei oder unter 40 mM lagen. Das Detektionslimit des verwendeten RI-Detektors lag bei 0,5 bis 1,0 mM. Die Teige AM, welche mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentiert wurden, und die Teige DP, fermentiert mit *L. plantarum* RTa12, zeigten höhere Glukosekonzentrationen ( $175,2 \pm 0,2$  mM und  $126,8 \pm 2,2$  mM), während die Konzentrationen der anderen Teige von  $20,4 \pm 2,2$  bis  $67,1 \pm 1,3$  mM variierten. Eine Korrelation zwischen den Kohlenhydratkonzentrationen im Teig und der Herkunft des Amaranthes konnte nicht festgestellt werden. Weiter waren die Kohlenhydratkonzentrationen nicht abhängig von den Fermentationsstämmen. Was die organische Säureproduktion innerhalb der Fermentation betraf, wurde Laktat, wie erwartet, als die in größten Mengen vorkommende Säure analysiert. In allen Teigen wurden hohe Konzentrationen an Formiat gefunden, während variierend geringe Mengen an Acetat, Propionat, Succinat und Citrat bestimmt wurden (Tabelle 10). Für *P. pentosaceus* RTa11 (ausgenommen: Teig AM und AI) und *L. sakei* RTa14 wurden sehr hohe Werte an Ethanol detektiert, während er im Teig mit *L. plantarum* RTa12 fast nicht nachweisbar war. 1-Propanol, Glycerin und Valeriat wurden in den Teigen nicht gefunden.

**Tabelle 10.** Konzentrationen [mM] der Metabolite am Ende der Fermentation mit **A.** *P. pentosaceus* RTa11 (AP, AM, SG, AI und NP), **B.** *L. sakei* RTa14 (AP, AM, SG und NP) und *L. plantarum* RTa12 (DP), analysiert mit HPLC.

Analyten	Amaranth					
	A	AP	AM	SG	AI	NP
D(-)-Fruktose		6,4±0,9	9,3±8,2	4,7±0,9	14,6±4,4	16,4±5,1
D(+)-Glukose		20,4±2,2	175,2±0,2	35,5±3,1	50,7±8,8	67,1±1,3
D(+)- Saccharose		0±0	0±0	2,1±1,3	2,3±2,0	0,6±1,0
Cellobiose		0±0	0±0	0,6±0,6	0,5±0,8	0,4±0,7
D-Maltose		2,0±0,2	1,9±0,3	2,7±0,1	2,1±0,4	2,1±0,2
D(-)-Mannitol		31,6±0,8	20,9±2,4	39,9±3,4	20,3±0,1	20,8±3,9
Formiat		103,7±5,5	58,9±4,7	113,5±3,9	82,3±5,6	103,3±7,2
Acetat		3,3±0,3	1,9±1,3	7,6±1,3	6,6±4,3	3,7±2,3
Propionat		2,5±0,3	1,7±0,4	2,4±0,9	2,0±0,5	2,0±0,2
Laktat		162,9±3,3	151,7±2,2	178,1±3,2	177,5±5,1	168,4±2,9
Succinat		1,5±0,3	1,6±0,7	1,6±0,5	1,2±0,2	1,6±0,5
Citrat		1,5±0,1	1,5±0,2	2,6±0,6	1,4±0,3	1,5±0,1
Ethanol		241,9±5,8	72,9±4,3	145,7±1,6	77,9±4,7	134,2±6,8
B	AP	AM	SG	NP	DP	
D(-)-Fruktose	5,3±0,7	8,2±0,9	5,8±1,1	6,4±0,9	6,9±1,6	
D(+)-Glukose	66,5±6,7	62,5±3,9	35,2±6,3	56,9±7,3	126,8±2,2	
D(+)- Saccharose	0,9±0,8	0,6±0,7	0,6±0,6	0,4±0,6	4,4±2,1	
Cellobiose	0,7±0,6	0,4±0,6	0,4±0,7	0,4±0,5	3,4±0,2	
D-Maltose	2,4±0,3	2,4±0,1	2,0±0,3	2,4±0,4	1,9±0,2	
D(-)-Mannitol	19,9±1,2	20,3±1,7	36,6±3,6	40,6±0,2	20,9±1,5	
Formiat	88,3±3,0	84,1±2,8	103,7±6,4	102,7±8,2	37,3±2,3	
Acetat	4,3±0,7	3,1±1,3	6,3±3,1	2,1±1,8	6,8±1,4	
Propionat	2,4±0,2	2,6±0,7	1,7±0,4	3,1±0,3	0,8±0,2	
Laktat	162,3±2,9	136,6±3,6	155,2±4,3	139,4±2,6	163,5±5,9	
Succinat	1,5±0,3	1,4±0,4	3,8±2,2	1,3±0,0	1,9±0,2	
Citrat	1,0±0,2	1,5±0,2	3,2±0,2	1,6±0,1	1,2±0,1	
Ethanol	173,1±2,9	187,5±2,9	151,5±2,5	314,9±5,6	7,7±5,4	

Ein Qualitätskriterium im Teig stellt das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat dar. Dieses Verhältnis trifft im Allgemeinen eine Aussage über die sensorischen Eigenschaften fertiger Brote. In Tabelle 11 und 12 sind die Verhältnisse dieser beiden Teigmetabolite in den mit *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Mehlen AP, AM, SG, AI, NP und DP dargestellt. Das größte molare Verhältnis war in dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig AM (79,8) sowie in dem mit *L. sakei* RTa14 fermentierten Teig NP (66,4) am Ende der Fermentation gegeben. In den mit SG fermentierten Teigen waren, unabhängig vom eingesetzten Stamm, sehr geringe Werte analysiert worden (23,4 und 24,6). Es konnte keine Korrelation zwischen dem molaren Verhältnis von Laktat und Acetat in Abhängigkeit des eingesetzten Stammes gefunden werden.

**Tabelle 11.** Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat, analysiert in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen und den Mehlen AP, AM, SG, AI und NP am Ende der Fermentation.

Amaranth Mehl	AP	AM	SG	AI	NP
Laktat : Acetat	49,4	79,8	23,4	26,9	45,5

**Tabelle 12.** Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat, analysiert in den mit *L. sakei* RTa14 (AP, AM, SG, NP) und *L. plantarum* RTa12 (DP) fermentierten Teigen am Ende der Fermentation.

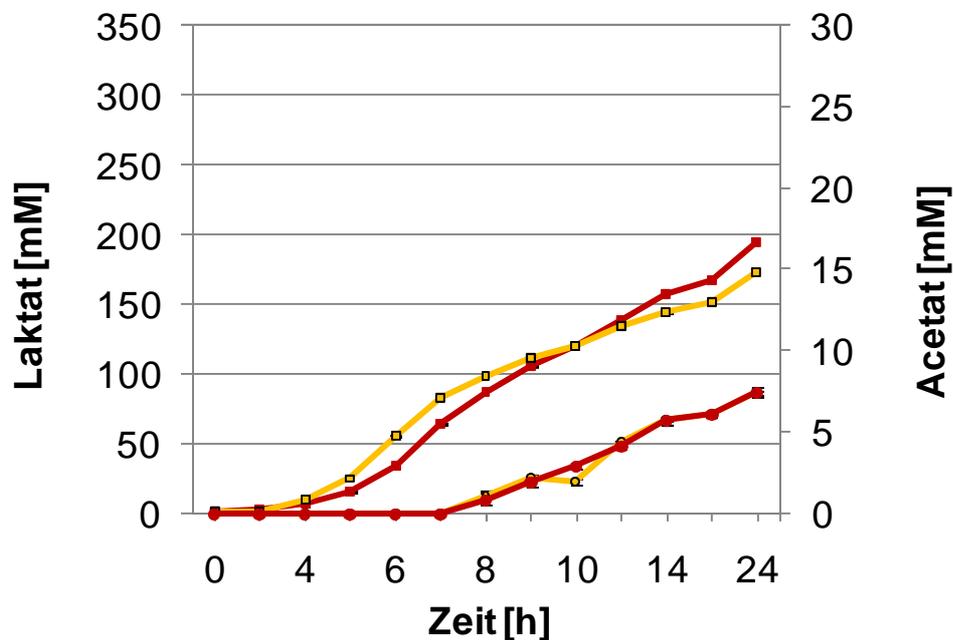
Amaranth Mehl	AP	AM	SG	NP	DP
Laktat : Acetat	37,7	44,1	24,6	66,4	24,0

### 3.6.2 Fermentationsverlauf innerhalb von 24 h

Bei der Analyse des Fermentationsverlaufs innerhalb der ersten 24 h mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 und 24 h während der Fermentation Proben für die Bestimmung von Kohlenhydraten, organischen Säuren, Mannitol und Ethanol mit HPLC gezogen und bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren. Wichtige

Stoffwechselprodukte innerhalb diesen Fermentationen waren Laktat, Acetat, Glukose und Saccharose.

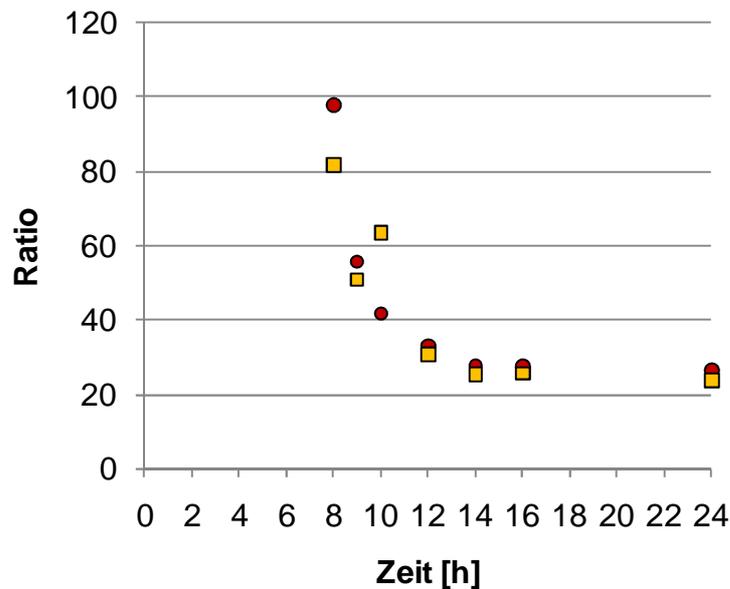
Der Laktatanstieg bei dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig war bis 10 h etwas größer als bei dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig, während letzterer nach 24 h höhere Laktatkonzentrationen aufzeigte (Abbildung 13). Die Acetatkonzentrationen waren bei beiden Teigen ähnlich. Die Acetatproduktion setzte jeweils nach 8 h Fermentation ein.



**Abbildung 13.** Konzentrationen [mM] von Laktat (□) und Acetat (○) mit Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen während den Fermentationen innerhalb 24 h. Rote Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12, gelbe Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11.

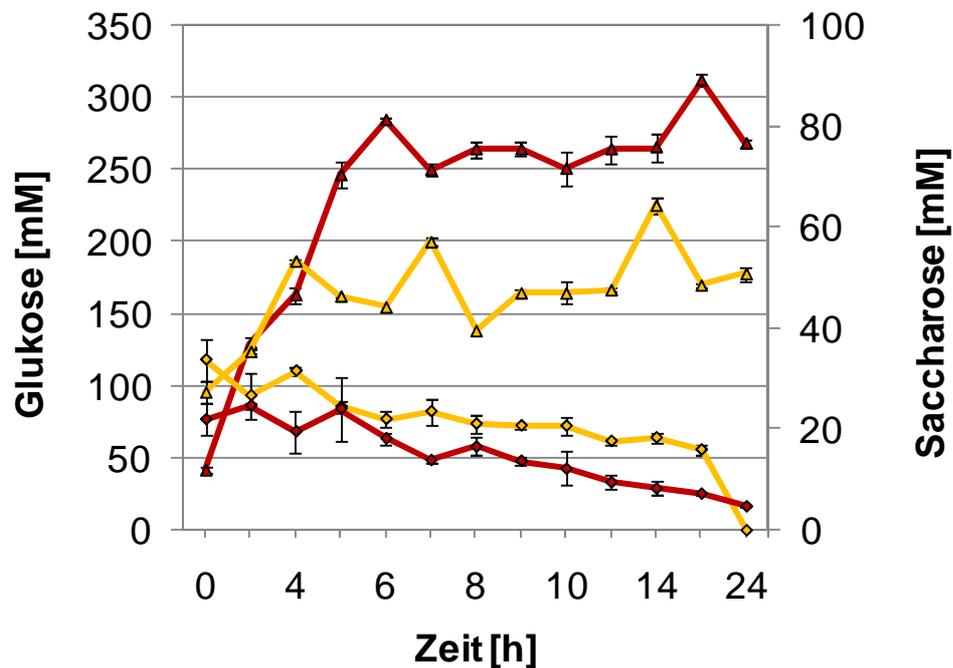
Weiter wurde das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat im Teig zu den jeweiligen Messpunkten bestimmt. Den beiden Fermentationen gemeinsam war die deutliche Abnahme der Ratio ab 8 h bis zum Ende der Fermentation nach 24 h. Das Verhältnis stieg von 0 am Anfang der Fermentation auf 97,7 (*L. plantarum* RTa12) und 81,8 (*P. pentosaceus* RTa11) nach 8 h, und sank nach 24 h auf 26,3 (*L. plantarum* RTa12) und 23,5 (*P. pentosaceus* RTa11). Das molare Verhältnis von Laktat zu

Acetat war mit *L. plantarum* RTa12 ab 8 h bis zum Fermentationsende tendenziell höher als das mit *P. pentosaceus* RTa11 (Abbildung 14). Die Unterschiede waren am Ende der Fermentation geringer.



**Abbildung 14.** Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat im Teig innerhalb einer 24stündigen Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 (○) und *P. pentosaceus* RTa11 (□).

Weiter in den Teigen analysiertes wichtiges Stoffwechselprodukt war Glukose. Während des Fermentationsverlaufs mit *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 konnte jeweils ein Anstieg der Glukosekonzentration innerhalb der ersten 4 bzw. 6 h beobachtet werden. Von diesem Zeitpunkt an blieb die Konzentration an Glukose mit leichten Schwankungen auf dem erreichten Level (Abbildung 15). Der mit *L. plantarum* RTa12 fermentierte Teig wies nach 2 h größere Glukosemengen auf als der mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierte Teig, obwohl dieser einen höheren anfänglichen Glukosegehalt zeigte (PP RTa11:  $95,6 \pm 8,1$  mM vs. LP RTa12:  $41,7 \pm 1,9$  mM). Die Saccharosekonzentration sank während den 24stündigen Fermentationen in beiden Teigen gleichermaßen (Abbildung 15). Der mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierte Teig zeigte höhere anfängliche Saccharosegehalte ( $33,6 \pm 4,2$  mM) als der mit *L. plantarum* RTa12 fermentierte Teig ( $21,9 \pm 3,1$  mM). Dennoch wurde darin am Ende der Fermentation nach 24 h keine Saccharose mehr nachgewiesen.



**Abbildung 15.** Konzentrationen [mM] von Glukose ( $\Delta$ ) und Saccharose ( $\diamond$ ) mit Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb 24 h. Rote Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12, gelbe Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11.

Die Konzentration an Formiat nahm bei beiden Fermentationen innerhalb der ersten 24 h zu (Abbildung 16). Die Zunahme bei dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig war deutlich größer als bei dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig (PP RTa11: 18,8 mM; LP RTa12: 12,7).

Propionat wurde im Teig mit *P. pentosaceus* RTa11 nach 5 h gebildet, während in dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig diese Produktion erst nach 8 h einsetzte. Es herrschten in beiden Teigen etwa gleich große Konzentrationen vor ( $1,0 \pm 0,0$  mM bis  $2,8 \pm 1,7$ ).

Die Konzentrationen an Succinat und Citrat blieben im Verlauf der Fermentationen auf einem konstanten Level und unterschieden sich innerhalb den Fermentationen nicht wesentlich (Succinat:  $1,6 \pm 0,4$  mM bis  $3,4 \pm 0,2$ ; Citrat:  $1,6 \pm 0,0$ ).

Iso-Butyrat war im Teig mit *P. pentosaceus* RTa11 nicht detektierbar, während im Teig fermentiert mit *L. plantarum* RTa12 nach 8 h Fermentation Iso-Butyrat in geringen Konzentrationen vorhanden war (Abbildung 16).

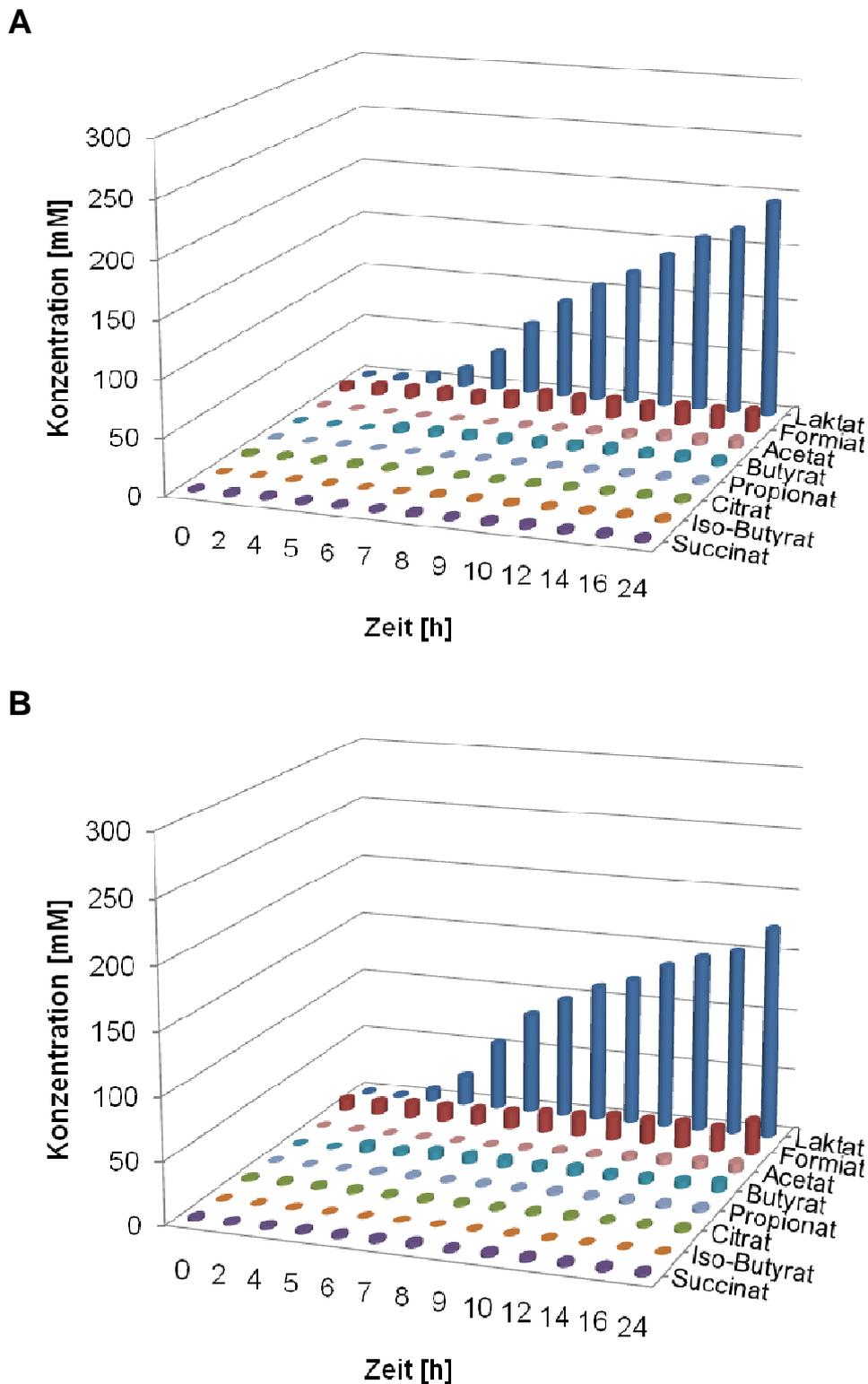
Butyrat konnte in beiden Teigen am Anfang der Fermentationen nicht gefunden werden. Es war in dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig nach 5 h und in dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig nach 4 h in äquimolaren Mengen bis zum Ende der Fermentation vorhanden (LP RTa12:  $4,8 \pm 0,2$  bis  $6,0 \pm 0,6$  mM; PP RTa11:  $4,3 \pm 0,6$  bis  $7,8 \pm 1,2$  mM). 1-Propanol, Glycerin und Valeriat wurden in den Teigen nicht nachgewiesen.

Die Kohlenhydratkonzentrationen waren in den Teigen im Allgemeinen größer als die Konzentrationen der organischen Säuren (vgl. Abbildung 16 und 17). Die Konzentration an Maltose blieb bei dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig während den Fermentationen konstant bei etwa 5,1 bis 6,7 mM. In dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig war Maltose während den Fermentationen ausschließlich bis 4 h nach Fermentationsbeginn vorhanden (Abbildung 17).

Die anfänglichen Fruktosegehalte waren bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 niedriger als bei dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig. Innerhalb der ersten 24 h war allgemein eine leichte Zunahme des Fruktosegehaltes festzustellen. Bei dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig nahm der Gehalt an Fruktose um 8,5 mM zu, während bei dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig die Zunahme innerhalb 24 h bei 3,8 mM lag.

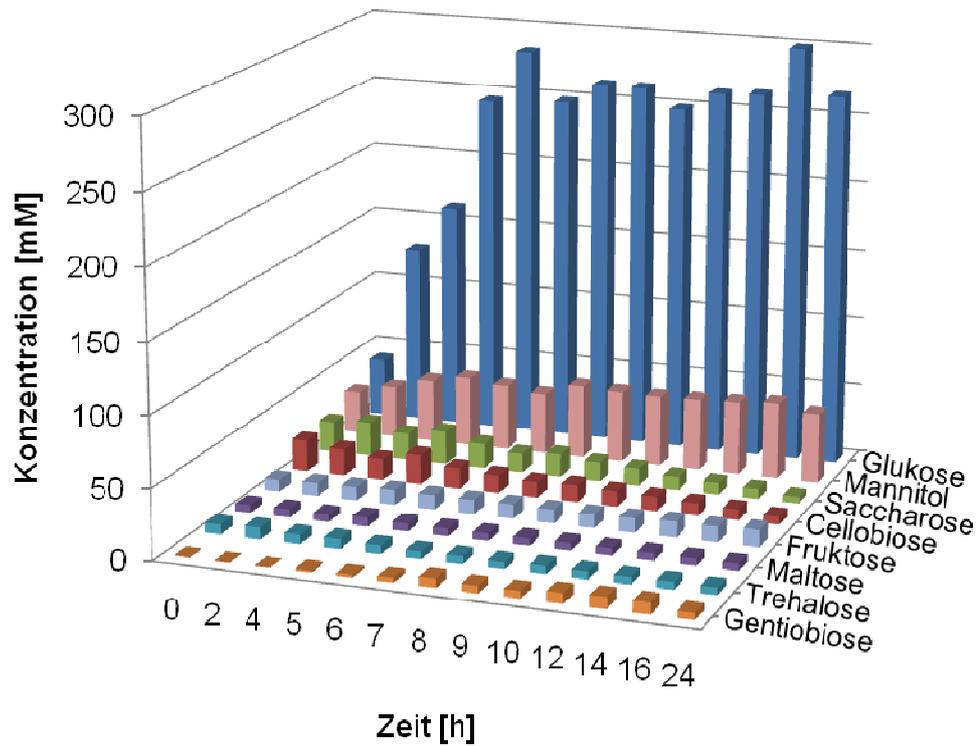
Cellobiose war mit höheren Gehalten am Anfang der Fermentation im Teig mit *P. pentosaceus* RTa11 analysiert worden, während sie am Ende nicht mehr nachweisbar war.

Trehalose und Gentiobiose waren in dem Teig mit *P. pentosaceus* RTa11 nicht nachweisbar. In dem mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig schwankten die Trehalosekonzentrationen von  $5,0 \pm 0,0$  bis zu  $8,3 \pm 1,4$  mM, jedoch nicht in Korrelation zur Fermentationsdauer. Gentiobiose war erst nach 4 h im Teig nachweisbar.

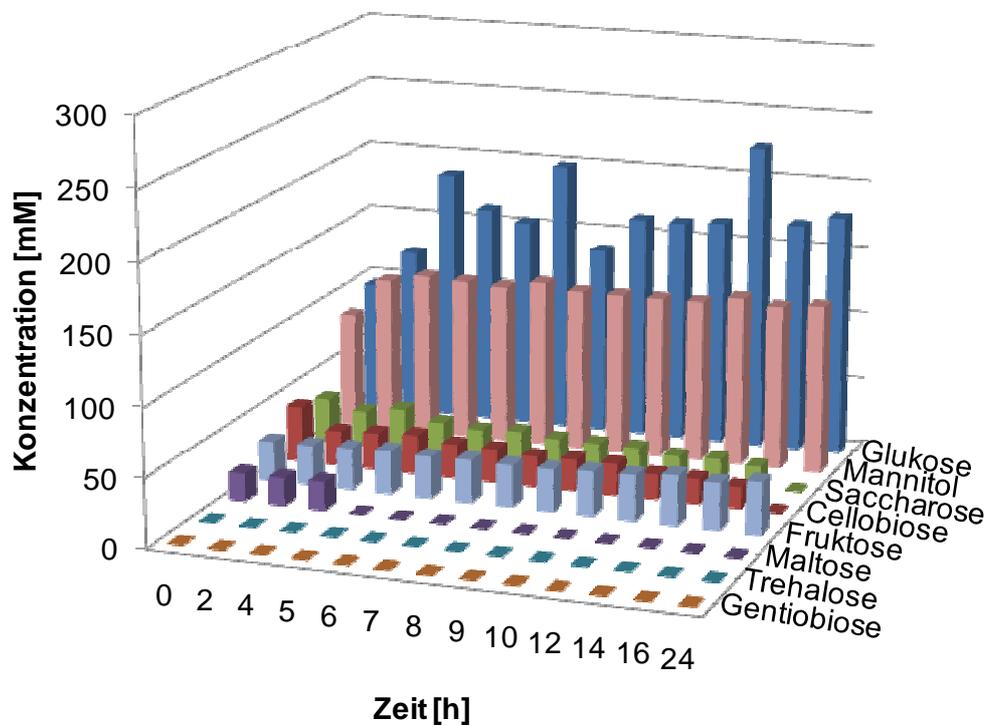


**Abbildung 16.** Mittelwerte der Konzentrationen [mM] der analysierten organischen Säuren in den mit *Lactobacillus plantarum* (A) und *Pediococcus pentosaceus* (B) fermentierten Teigen über 24 h (Standardabweichungen siehe Anhang).

A



B

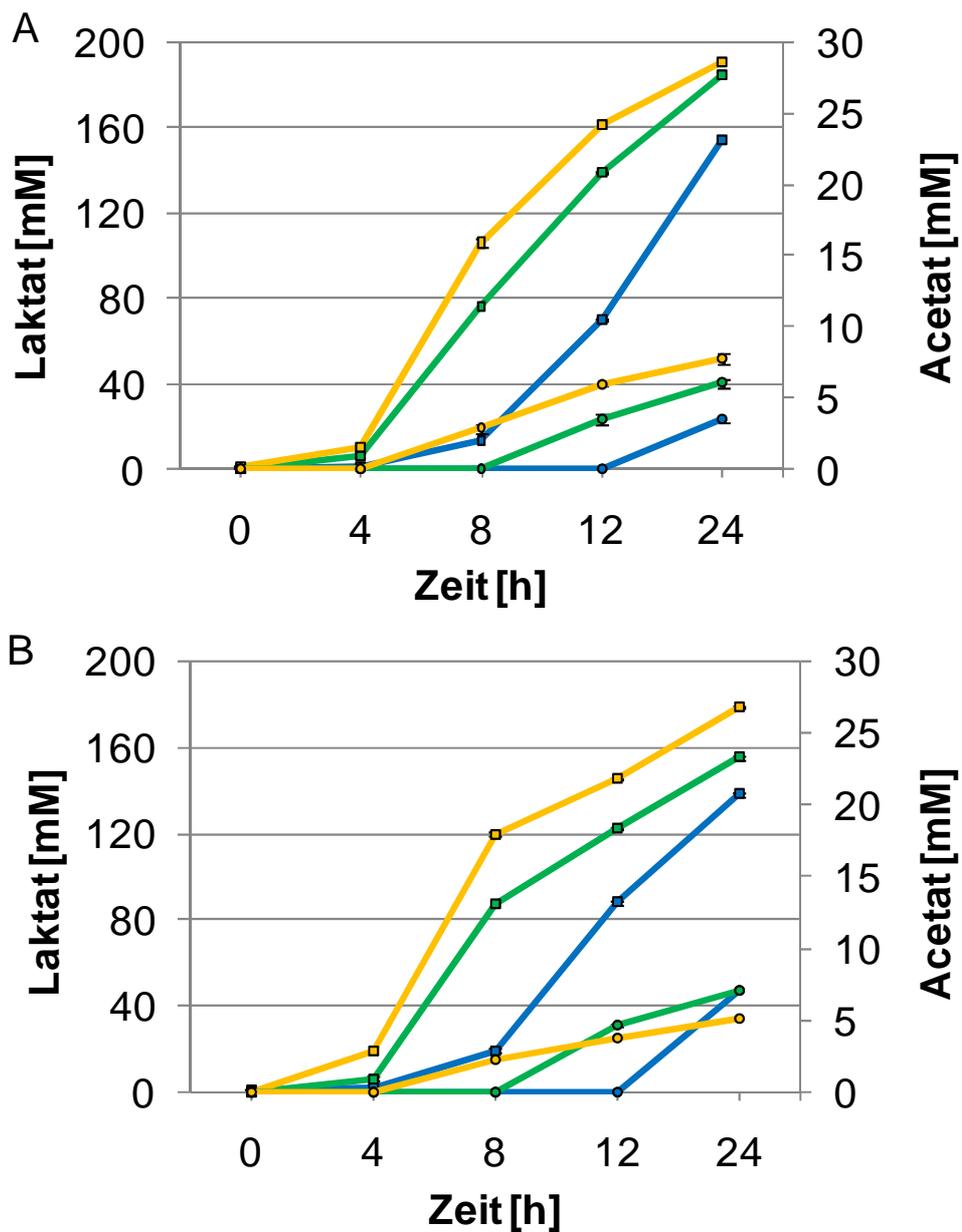


**Abbildung 17.** Mittelwerte der Konzentrationen [mM] der analysierten Kohlenhydrate und des Zuckeralkohols Mannitol in den mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 (A) und *Pediococcus pentosaceus* RTa11 (B) fermentierten Teigen über 24 h (Standardabweichungen siehe Anhang).

### 3.6.3 Eigenschaften bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen

Die mit guten Fermentationsleistungen evaluierten Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden bei 25, 30 und 35°C fermentiert und je weils zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12 und 24 h für die HPLC-Analysen Proben gezogen. Die wichtigsten Stoffwechselprodukte der Fermentationen waren Laktat, Acetat, Glukose und Saccharose. Diese Stoffwechselprodukte veränderten sich in Abhängigkeit von der Fermentationstemperatur und dem eingesetzten Stamm. MSB bildeten in erster Linie durch Verstoffwechslung von Glukose und anderen Zuckern Laktat im Teig. Am Anfang der Fermentationen war Laktat im Teig nicht nachweisbar (Abbildung 18). Bei den Fermentationen bei 35°C mit *L. plantarum* RTa12 und bei 25°C mit *P. pentosaceus* RTa11 wurden jedoch Laktatkonzentrationen von  $1,1 \pm 0,3$  mM und  $0,5 \pm 0,2$  mM im Teig analysiert, welche nicht erklärt werden können. Diese Gehalte nahmen während den Fermentationen innerhalb der ersten 24 h stetig zu. Bei 30 und 35°C wurde bei beiden Stämmen deutlich mehr Laktat detektiert als bei 25°C. Unabhängig von der Fermentationstemperatur war bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 nach 24 h mehr Laktat in den Teigen vorhanden als in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen.

Die Acetatkonzentrationen korrelierten bei den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen positiv mit der Temperatur, während bei den Teigen mit *P. pentosaceus* RTa11 keine eindeutige Korrelation zu erkennen war (Abbildung 18). Bei 25°C-Fermentationstemperatur wurde Acetat, unabhängig vom eingesetzten Stamm, erst nach 24 h nachgewiesen, während die Bildung bei 30 und 35°C schon früher einsetzte (12 bzw. 8 h). Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 mit 25 und 30°C-Fermentationstemperatur waren die Acetatgehalte geringer als bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa11. Der mit *P. pentosaceus* RTa11 bei 35°C fermentierte Teig enthielt geringere Mengen an Acetat als der mit *L. plantarum* RTa12 fermentierte Teig.



**Abbildung 18.** Konzentrationen [mM] von Laktat (□) und Acetat (○) mit Standardabweichung aus Zweifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb von 24 h bei 25°C (blaue Kurven), 30°C (grüne Kurven) und 35°C (gelbe Kurven). **A.** *Lactobacillus plantarum* RTa12, **B.** *Pediococcus pentosaceus* RTa11.

Weiter wurde das Verhältnis von Laktat zu Acetat in den Teigen bestimmt und so den Einfluß der Fermentationstemperaturen auf dieses Qualitätskriterium untersucht. Grundsätzlich waren niedrige Werte für das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat

im Teig erwünscht. Aufgrund der späten Acetatbildung in den Teigen während den Fermentationen konnte das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat für die Fermentationstemperatur von 25°C erst nach 24 h berechnet werden, während in den übrigen Teigen nach 8 bzw. 12 h (35 bzw. 30°C) das molare Laktat-Acetat-Verhältnis ermittelt wurde (Tabelle 13 und 14). Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 war das molare Laktat-Acetat-Verhältnis bei 35°C nach 24 h niedriger als bei niedrigen Fermentationstemperaturen von 25 und 30°C (Tabelle 13). Im Gegensatz dazu war bei den Fermentationen mit *P. pentosaceus* RTa11 das Verhältnis bei niedriger Fermentationstemperatur (25°C) nach 24 h kleiner als bei den anderen untersuchten Temperaturen (Tabelle 14). Grundsätzlich war das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat, unabhängig vom eingesetzten Stamm, bei fortgeschrittener Fermentation durch die gesteigerte Acetatbildung kleiner.

**Tabelle 13.** Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat analysiert in den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen bei 25, 30 und 35°C nach 0, 4, 8, 12 und 24 h.

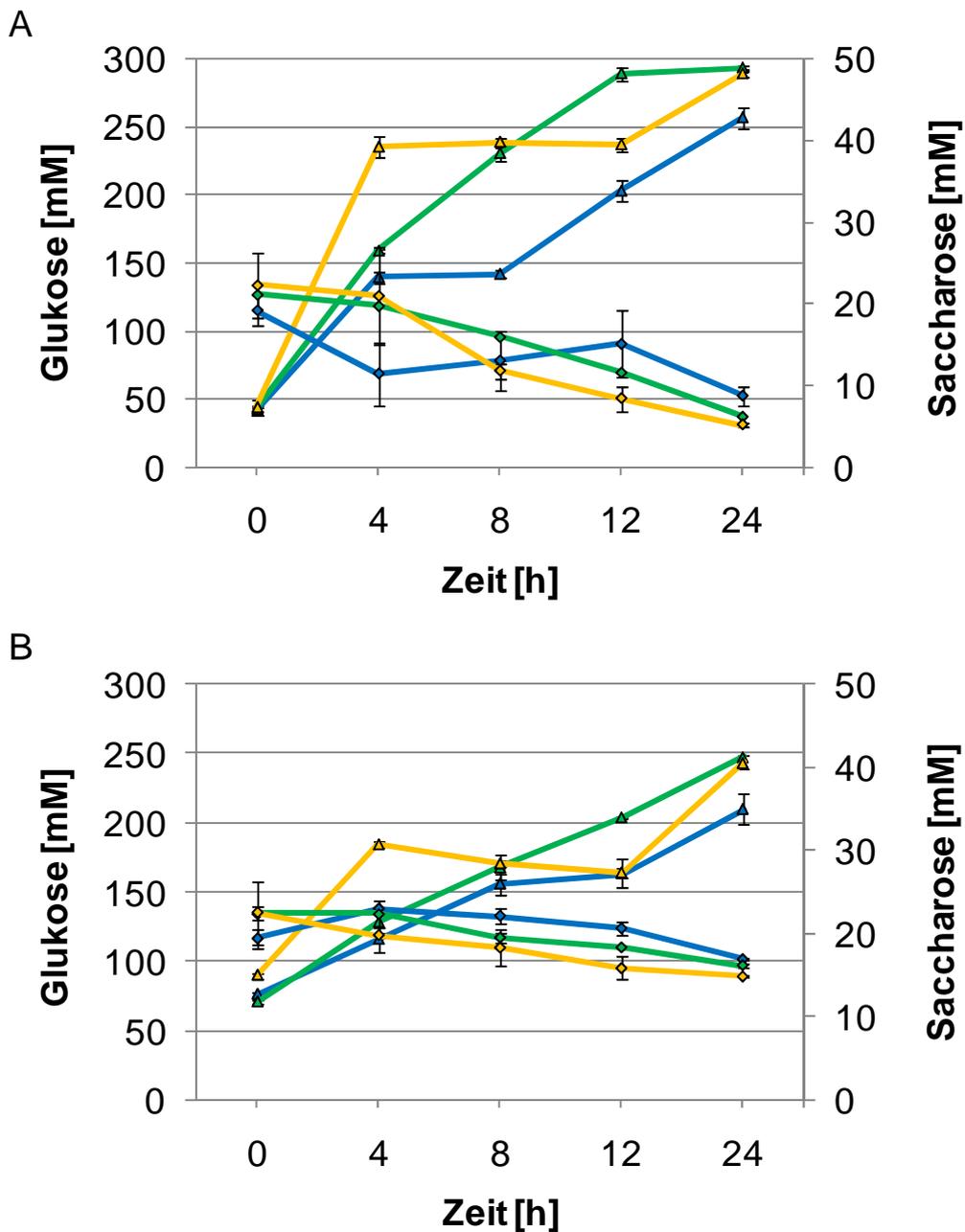
Zeit [h]	0	4	8	12	24
Ratio (bei 25°C)	0	0	0	0	45,2
Ratio (bei 30°C)	0	0	0	39,7	30,2
Ratio (bei 35°C)	0	0	37,8	26,8	24,7

**Tabelle 14.** Molares Verhältnis von Laktat zu Acetat analysiert in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen bei 25, 30 und 35°C nach 0, 4, 8, 12 und 24 h.

Zeit [h]	0	4	8	12	24
Ratio (bei 25°C)	0	0	0	0	19,8
Ratio (bei 30°C)	0	0	0	26,0	22,2
Ratio (bei 35°C)	0	0	54,5	39,3	35,0

Glukose war ein weiteres wichtiges Stoffwechselprodukt in den Teigen. Die Konzentration an Glukose stieg bei gleichen Anfangsgehalten bei beiden Stämmen bei 35°C Fermentationstemperatur deutlich schneller innerhalb der ersten 4 h als bei 25 und 30°C (Abbildung 19). Nach 8 h waren sowohl bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 als auch mit *P. pentosaceus* RTa11 nahezu äquimolare Mengen an Glukose bei 30 und 35°C erreicht (LP RTa12:  $230,0 \pm 4,8$  mM bzw.  $238,7 \pm 2,5$  mM; PP RTa11:  $167,7 \pm 9,3$  mM bzw.  $170,6 \pm 2,3$  mM). Die Glukosekonzentrationen waren nach 24 h Fermentation mit beiden Stämmen bei 30 und 35°C ähnlich (LP RTa12:  $292,0 \pm 2,5$  mM bzw.  $288,9 \pm 2,5$  mM; PP RTa11:  $247,5 \pm 0,1$  mM bzw.  $243,6 \pm 5,1$  mM). Bei 25°C lagen die Glukosekonzentrationen während der gesamten Fermentation deutlich unter den Mengen an Glukose, die in den Fermentationen bei 30 und 35°C analysiert wurden, mit Ausnahme der mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teige nach 12 h.

Aufgrund der großen Standardabweichung der Saccharosegehalte in den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen konnte keine positive Korrelation mit der Temperatur gefunden werden (Abbildung 19A). Nach 12 und 24 h zeigten die bei 25°C fermentierten Teige die höchste Konzentration an Saccharose auf, während die bei 30 und 35°C fermentierten Teige jeweils unterhalb von diesen Werten lagen. Bei den Teigen fermentiert mit *P. pentosaceus* RTa11 konnte nach 4 h Fermentation eine inverse Korrelation von Saccharosegehalt und Fermentationstemperatur festgestellt werden (Abbildung 19B). Je höher die Fermentationstemperatur war, desto niedriger waren die Saccharosegehalte im Teig.



**Abbildung 19.** Konzentrationen [mM] von Glukose ( $\Delta$ ) und Saccharose ( $\diamond$ ) mit Standardabweichung aus Zweifachbestimmungen während der Fermentation innerhalb von 24 h bei 25°C (blaue Kurven), 30°C (grüne Kurven) und 35°C (gelbe Kurven). **A.** *Lactobacillus plantarum* RTa12, **B.** *Pediococcus pentosaceus* RTa11.

Weitere in den Teigen analysierte Stoffwechselprodukte waren die Kohlenhydrate Maltose, Fruktose, Cellobiose, Trehalose sowie der Zuckeralkohol Mannitol (Abbildung 20 und 21).

Die Maltosegehalte während der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 zeigten sich unabhängig von der Temperatur und bewegten sich von  $6,5 \pm 0,1$  mM bis  $8,7 \pm 0,2$  mM (Abbildung 20). Bei den Fermentationen mit *P. pentosaceus* RTa11 war ausschließlich bis 4 h (30 und 35°C) bzw. 8 h (25°C) nach Fermentationsbeginn Maltose im Teig analysiert worden. Die Gehalte an Maltose in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen zeigten in Abhängigkeit von der Fermentationstemperatur bei 25°C nach 8 h Maltose im Teig, während bei 30 und 35°C keine Maltose mehr vorhanden war (Abbildung 21C).

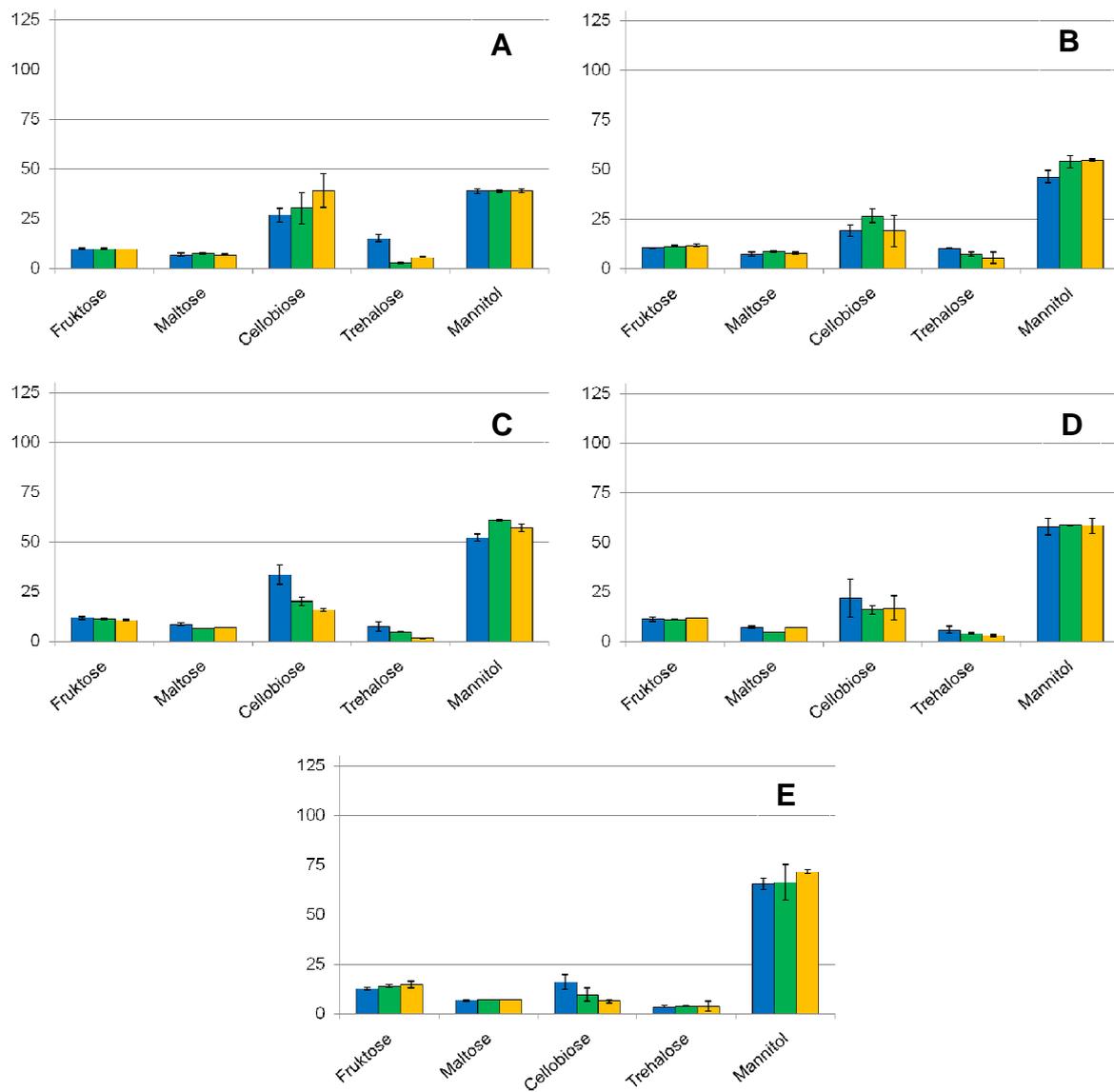
Die Fruktosekonzentrationen blieben während den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 (Abbildung 20) und *P. pentosaceus* RTa11 (Abbildung 21), unabhängig von der Fermentationstemperatur, weitestgehend konstant. Es konnten bei den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen höhere Fruktosegehalte analysiert werden als bei den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen. Nach 24 h konnte bei den mit *P. pentosaceus* RTa11 bei 30 und 35°C fermentierten Teigen eine Zunahme des Fruktosegehaltes im Vergleich zu den bei 25°C fermentierten Teigen festgestellt werden (Abbildung 21E; 25°C:  $31,2 \pm 0,5$  mM 30°C:  $34,6 \pm 0,1$  mM, 35°C:  $38,0 \pm 1,8$  mM).

Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 wurden sehr große Standardabweichungen für die Gehalte an Cellobiose analysiert, die nicht erklärt werden können (Abbildung 20). Aufgrund dessen ist eine Korrelation der Cellobiosekonzentrationen und der Fermentationstemperaturen nicht aussagekräftig. Dennoch wurden sehr hohe Cellobiosegehalte zu Fermentationsbeginn (0 h) in den Teigen analysiert ( $26,9 \pm 3,4$  mM (25°C),  $30,3 \pm 7,8$  mM (30°C) und  $39,1 \pm 8,5$  mM (35°C)), die innerhalb 24 h Fermentation abnahmen ( $16,1 \pm 3,8$  mM (25°C),  $9,6 \pm 3,5$  mM (30°C) und  $6,3 \pm 0,9$  mM (35°C)). Bei den Fermentationen mit *P. pentosaceus* RTa11 war ab 8 h Fermentation eine Tendenz der negativen Korrelation von Cellobiosegehalt und Fermentationstemperatur analysiert worden (Abbildung 21). Es wurden am Anfang (0 h) höhere Cellobiosegehalte in den Teigen ermittelt ( $19,1 \pm 0,8$  mM (25°C),  $21,6 \pm 2,5$  mM (30°C) und  $24,0 \pm 3,1$  mM (35°C)) als nach 24 h ( $12,4 \pm 0,3$  mM (25°C),  $10,9 \pm 0,3$  mM (30°C) und  $10,4 \pm 0,4$  mM (35°C)).

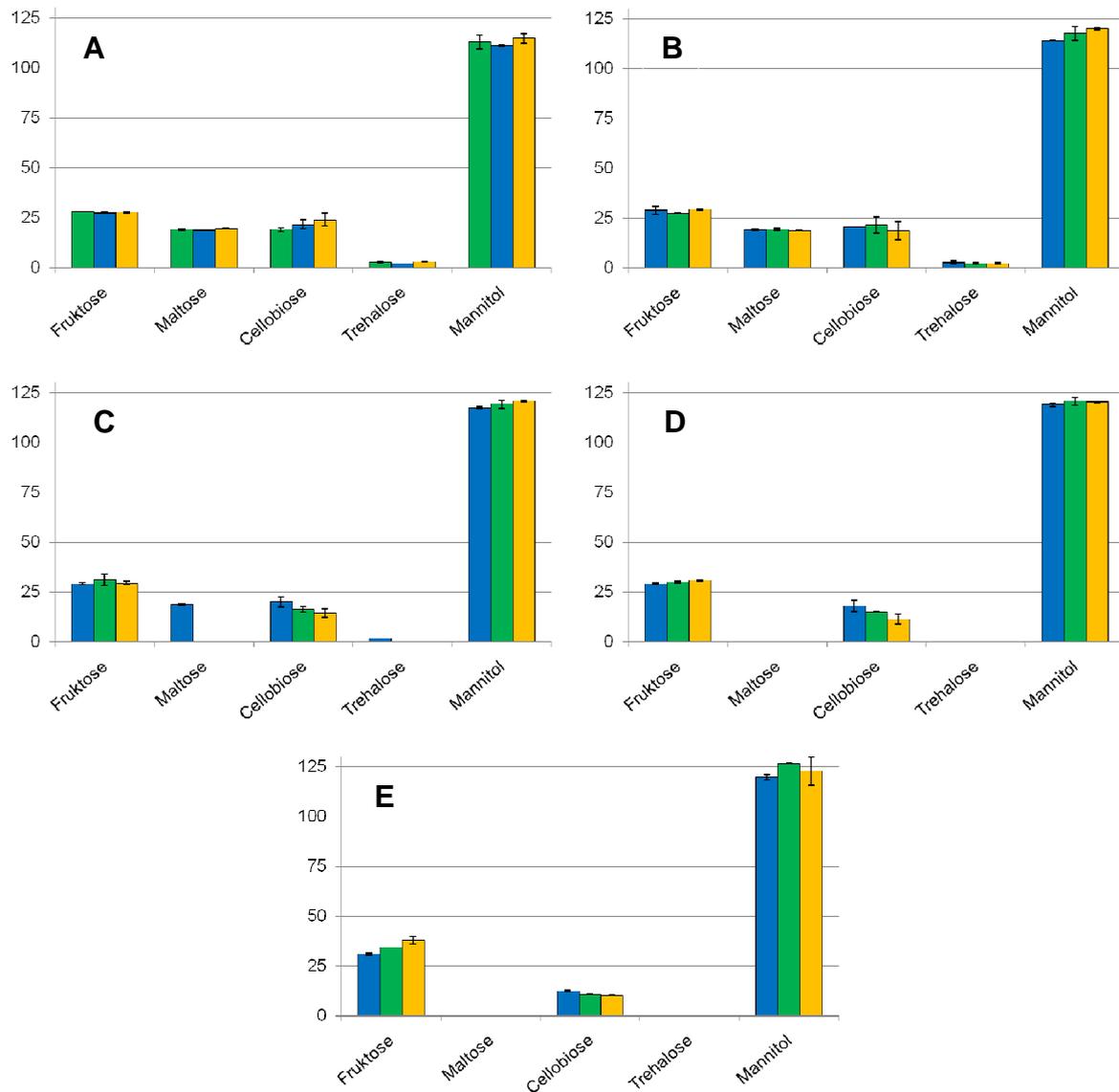
Die Trehalosegehalte waren in allen Teigen sehr niedrig. Sie bewegten sich insgesamt zwischen  $1,6 \pm 0,1$  mM und  $15,2 \pm 1,9$  mM. Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 konnte von 4 bis 12 h Fermentation eine Tendenz der negativen Korrelation von Trehalosegehalt und Temperatur beobachtet werden. Nach 24 h jedoch waren die Werte, unabhängig von der Temperatur, ähnlich. Bei 25°C-Fermentationstemperatur war in dem mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen Trehalose nach 8 h noch in geringen Konzentrationen präsent ( $1,7 \pm 0,0$  mM), während sie bei allen anderen Fermentationstemperaturen von da an nicht mehr im Teig nachweisbar war. Im Vergleich der Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 war weniger Trehalose im Teig vorhanden (LP RTa12:  $1,7 \pm 0,0$  mM bis  $2,9 \pm 0,1$  mM).

Die Mannitolmengen in den Teigen nahmen bei allen Fermentationen innerhalb 24 h zu (Abbildung 20 und 21). Die Gehalte waren bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 niedriger ( $38,9 \pm 1,1$  mM bis  $71,7 \pm 0,9$  mM) als bei den Fermentationen mit *P. pentosaceus* RTa11 ( $111,2 \pm 0,5$  mM bis  $126,7 \pm 0,2$  mM). Diese sehr unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Mannitol sind schwer erklärbar, da das Fermentationsmehl gleich war. Die Werte waren jedoch in einer Dreifachbestimmung reproduzierbar. Eine Korrelation zwischen den Fermentationstemperaturen und den Mannitolgehalten war nicht festzustellen, dennoch war die Zunahme der Mannitolmenge innerhalb 24 h bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 weitaus größer als bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa11 (LP RTa12, 35°C: 32,8 mM; PP RTa11, 35°C: 7,9 mM).

Es wurde in den Teigen keine Gentiobiose analysiert.



**Abbildung 20.** Konzentrationen [mM] von Fruktose, Maltose, Cellobiose, Trehalose und Mannitol während der Fermentation mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.



**Abbildung 21.** Konzentrationen [mM] von Fruktose, Maltose, Cellobiose, Trehalose und Mannitol während der Fermentation mit *Pediococcus pentosaceus* RTa11 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung.

An organischen Säuren wurden Citrat, Formiat, Propionat, Succinat, Iso-Butyrat und Butyrat untersucht (Abbildung 22 und 23).

Die Citratkonzentrationen waren in allen fermentierten Teigen, unabhängig von der Fermentationstemperatur, niedrig ( $0,5 \pm 0,1$  mM bis  $3,9 \pm 0,1$  mM). Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 korrelierten die Citratgehalte nach 8 h Fermentation negativ mit den Fermentationstemperaturen und es konnte eine Abnahme des Citratgehaltes innerhalb der 24stündigen Fermentation festgestellt werden (Abbildung 22). Bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa11 variierten die Citratgehalte bei 25, 30 und 35°C zwischen  $2,0 \pm 0,1$  mM und  $3,2 \pm 0,0$  mM ohne Zusammenhang zur Fermentationstemperatur (Abbildung 23).

Die Produktion von Formiat nahm während den 24stündigen Fermentationen mit beiden Stämmen zu (Abbildung 22 und 23). Die Gehalte bewegten sich von  $5,8 \pm 0,0$  mM bis  $21,6 \pm 0,7$  mM (*L. plantarum* RTa12) und  $1,5 \pm 0,0$  mM bis  $27,5 \pm 3,8$  mM (*P. pentosaceus* RTa11) innerhalb 24 h. Es konnte demnach kein signifikanter Unterschied auf die Formiatproduktion bezüglich des Einsatzes der beiden Stämme im Teig nachgewiesen werden. Nach 12 h war in den bei niedrigeren Temperaturen fermentierten Teigen bei beiden Stämmen weniger Formiat im Teig nachweisbar als bei höheren Temperaturen. Davor korrelierte die Formiatkonzentration nicht mit der Temperatur.

Innerhalb der ersten 4 h war in keinem der fermentierten Teige Propionat analysiert worden. Nach 8 h wurde Propionat ausschließlich bei den bei 35°C-Fermentationstemperatur fermentierten Teigen detektiert, während nach 12 h Propionat in den bei 30 und 35°C mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen in geringen Mengen vorhanden war ( $1,7 \pm 0,1$  mM (30°C);  $2,2 \pm 0,2$  mM (35°C)). Bei den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12 war Propionat nach 12 h bis zum Ende der Fermentation in allen Teigen in geringen Konzentrationen nachweisbar.

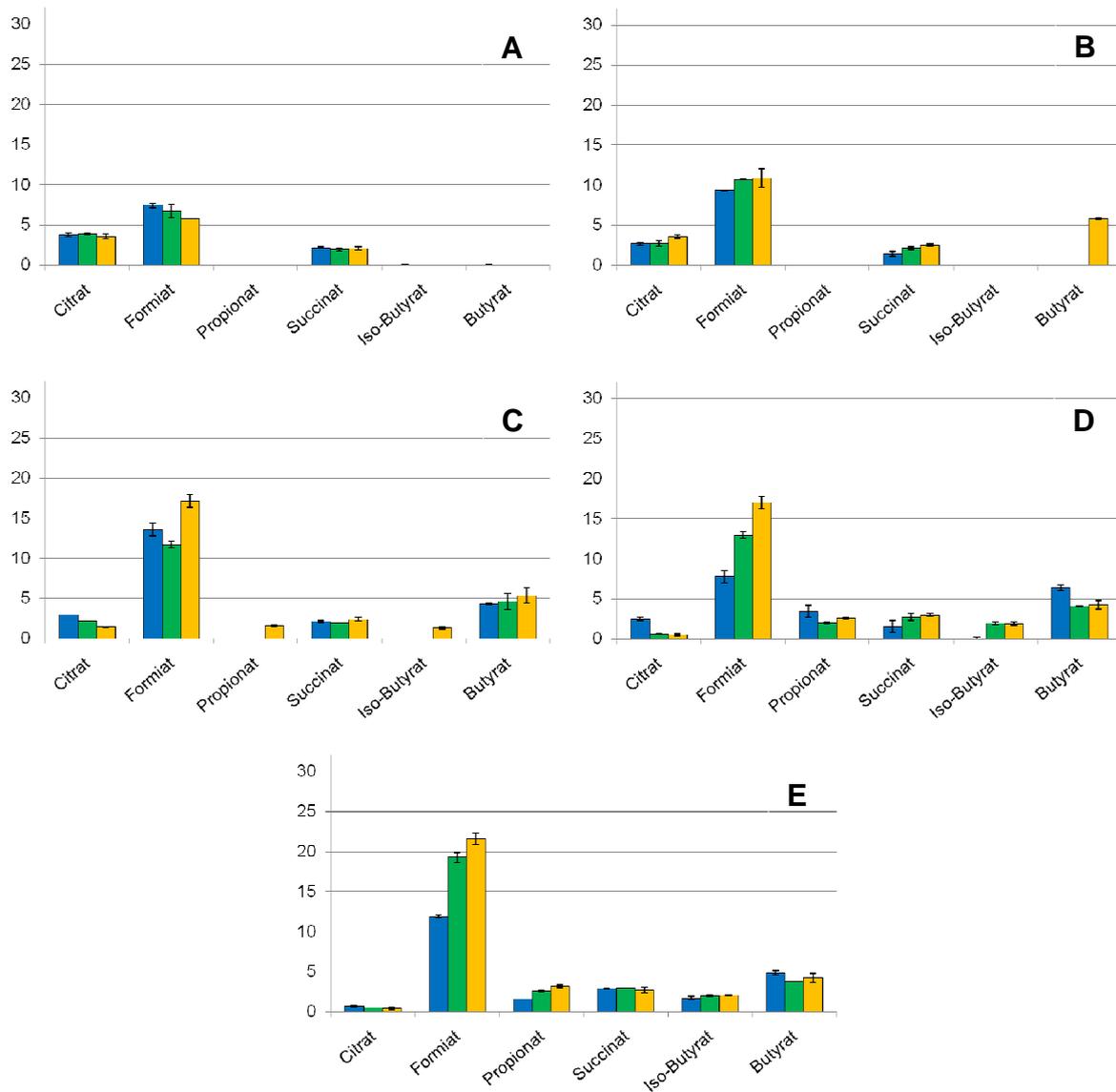
Die Succinatgehalte blieben während der Fermentation, unabhängig vom eingesetzten Stamm und der Fermentationstemperatur, relativ konstant und bewegten sich für beide Stämme zwischen  $1,2 \pm 0,3$  mM (0 h) und  $5,0 \pm 0,3$  mM (24 h). Eine Korre-

tion zwischen der Succinatkonzentration im Teig und der Fermentationstemperatur konnte nicht festgestellt werden.

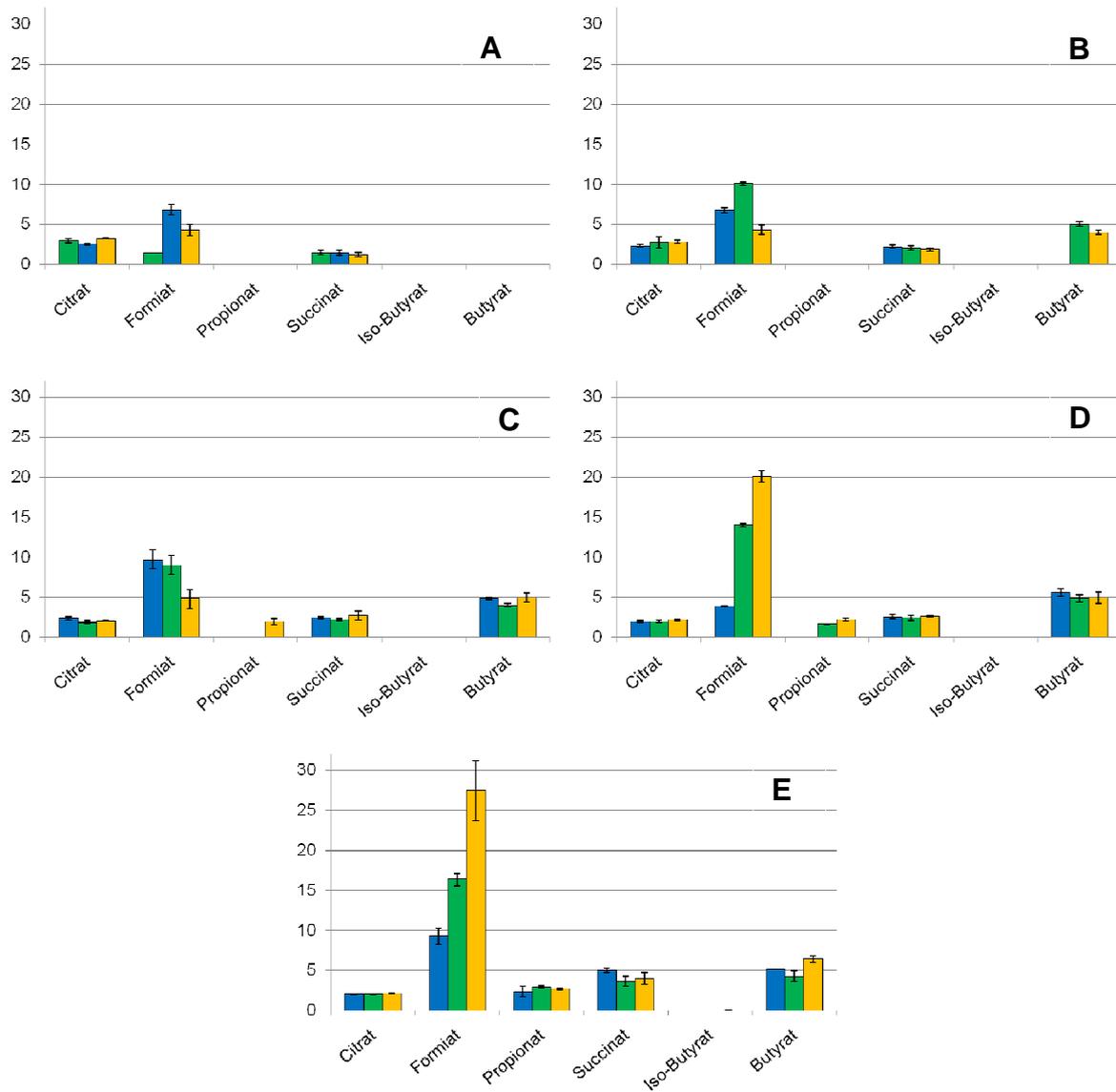
Iso-Butyrat war in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen bei keiner Temperatur detektiert worden. Bei den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen wurden bei höheren Fermentationstemperaturen (35°C) die Iso-Butyratgehalte schon nach 8 h analysiert, während bei 25°C und 30°C Iso-Butyrat erst nach 24 bzw. 12 h analysiert wurde.

Am Anfang der Fermentationen (0 h) war in keinem der Teige Butyrat analysiert worden. Bei 25- und 30°C-Fermentationstemperatur war bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 erst nach 8 h Butyrat im Teig nachweisbar, während bei 35°C schon nach 4 h Fermentation Butyrat detektiert werden konnte. Die Butyratgehalte bewegten sich bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12, unabhängig von der Temperatur, zwischen  $3,8 \pm 0,0$  mM und  $6,4 \pm 1,1$  mM. Bei den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen war Butyrat bei 25°C erst nach 8 h im Teig vorhanden, während sie bei 30 und 35°C schon nach 4 h analysiert werden konnte. Unabhängig von der Temperatur variierten die Butyratmengen in den Teigen zwischen  $4,0 \pm 0,0$  mM und  $6,4 \pm 0,4$  mM.

1-Propanol, Glycerin und Valeriat wurden, unabhängig von der Fermentationstemperatur und dem eingesetzten Stamm, in den Teigen nicht gefunden.



**Abbildung 22.** Konzentrationen [mM] von Citrat, Formiat, Propionat, Succinat, Iso-Butyrat und Butyrat während der Fermentation mit *Lactobacillus plantarum* RTa12 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.



**Abbildung 23.** Konzentrationen [mM] von Citrat, Formiat, Propionat, Succinat, Iso-Butyrat und Butyrat während der Fermentation mit *Pediococcus pentosaceus* RTa11 nach 0 h (A), 4 h (B), 8 h (C), 12 h (D) und 24 h (E) bei 25°C (blaue Balken), 30°C (grüne Balken) und 35°C (gelbe Balken). Die Fehlerbalken entsprechen den Abweichungen von dem Mittelwert einer Doppelbestimmung.

### 3.7 Verwertung von Kohlenhydraten

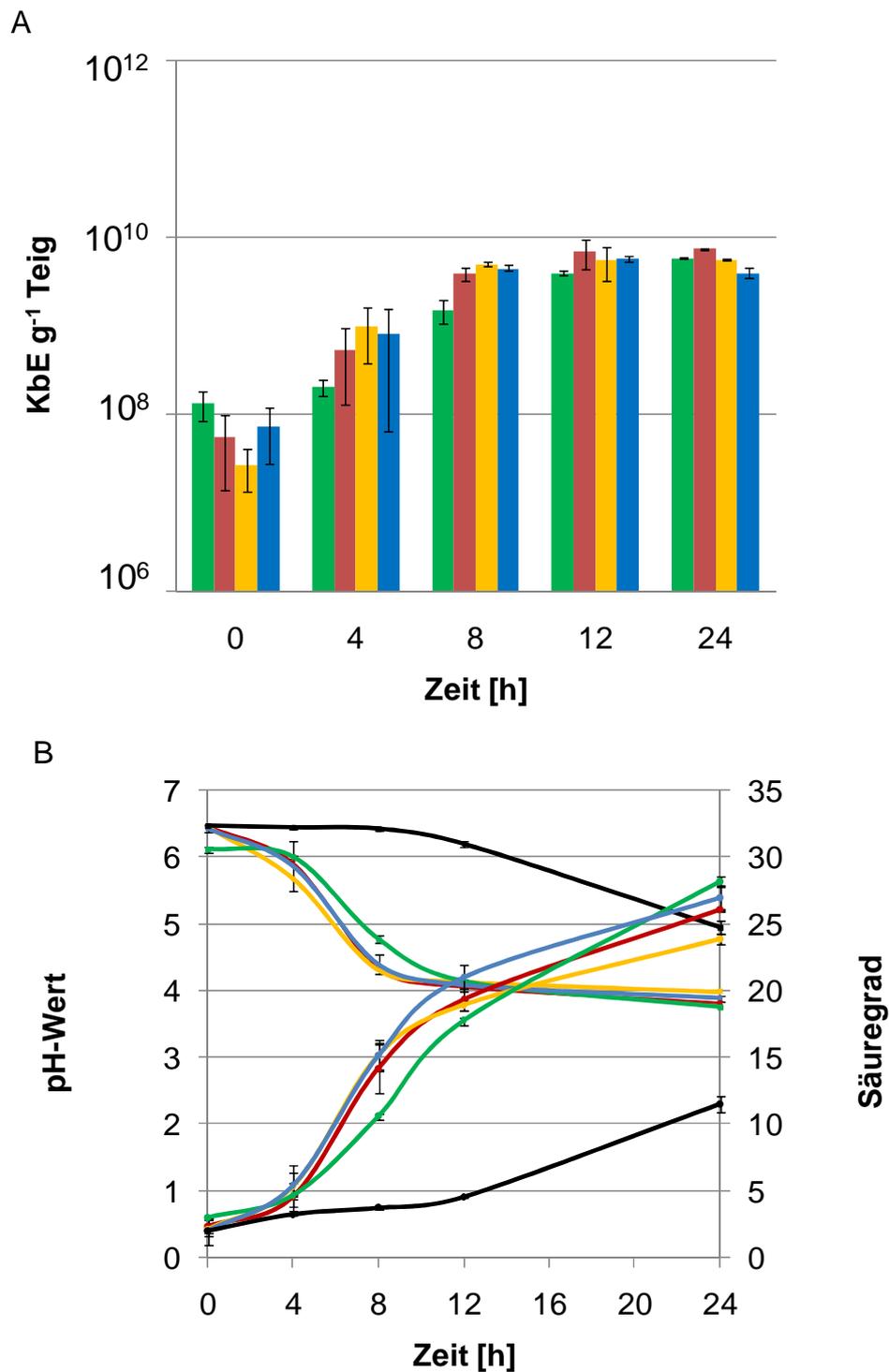
Um das Potential der ausgewählten Stämme *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 verschiedene Kohlenhydrate verwerten zu können zu ermitteln, wurden kommerzielle api<sup>®</sup>-50CH-Tests angewendet. Mit diesen Tests konnte eine Aussage über die ökologischen Ansprüche der Organismen getroffen werden. Die Ergebnisse der Tests wurden mit der apilab Software (Version 5.1) ausgewertet und ergaben folgende Zuordnung: *P. pentosaceus* RTa11 wurde mit einer widersprüchlichen Reaktion (Saccharosefermentation) mit einer Identität von 96,5% identifiziert. *L. plantarum* RTa12 wies keine widersprüchlichen Reaktionen auf und wurde mit 97,9% erkannt. Die Spezies *L. sakei* war nicht in der Datenbank enthalten. Deshalb wurde der Stamm als *L. fermentum* mit einer Identität von nur 53,5% identifiziert. Widersprüchliche Ergebnisse waren hier die Fermentationen von Laktose, Raffinose, N-Acetylglucosamin und Turanose.

Es wurden für 23 Kohlenhydrate keine positiven Reaktionen beobachtet. Alle Stämme konnten D-Ribose, D-Galaktose, D-Glukose, D-Fruktose, D-Maltose, D-Saccharose und N-Acetylglucosamin fermentieren. Die hauptsächlichsten Unterschiede waren bei der Verwertung von folgenden Kohlenhydraten zu beobachten, welche ausschließlich von *L. plantarum* RTa12 fermentiert wurden: D-Mannitol, D-Sorbitol, Laktose, Melezitose, Raffinose und 2-Ketoglukonat. Alle Stämme mit Ausnahme von *L. sakei* RTa14 verwerteten die Kohlenhydrate D-Mannose, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, D-Cellulose, D-Trehalose und D-Gentiobiose. Die beiden Laktobazillen konnten D-Melibiose und D-Turanose verwerten, während D-Arabinose, D-Tagatose und D-Xylose nur von *P. pentosaceus* RTa11 metabolisiert wurde.

### 3.8 Vergleich der Fermentationsleistungen der Isolate mit denen kommerzieller Starterkulturen

Für den Vergleich der Fermentationsleistungen der ausgewählten Stämme *L. plantarum* RTa12 (LP RTa12) und *P. pentosaceus* RTa11 (PP RTa11) mit denen kommer-

ziell erhältlicher Starterkulturen (BB LF1; BR) wurde Amaranth DP über 24 h bei 30°C fermentiert. Es wurden die MSB-Keimzahlen, die pH-Werte und die Säuregrade während den Fermentationen zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12 und 24 h ermittelt (Abbildung 24). Alle Fermentationen zeigten zu den ermittelten Zeitpunkten ähnliche MSB-Keimzahlen und waren, trotz der Unterschiede der MSB-Anfangskeimzahlen, über den Fermentationsverlauf nahezu identisch. Sie lagen bei  $5,7 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup> (LP RTa12),  $2,7 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup> (PP RTa11),  $1,3 \times 10^8 \pm 5,0 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup> (BB LF1) und  $1,3 \times 10^8 \pm 5,0 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup> (BR) am Anfang der Fermentation und  $7,6 \times 10^9 \pm 1,8 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (LP RTa12),  $5,7 \times 10^9 \pm 1,1 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (PP RTa11),  $4,0 \times 10^9 \pm 5,7 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (BB LF1) und  $5,7 \times 10^9 \pm 5,7 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup> (BR) am Ende der Fermentation nach 24 h (Abbildung 24A). Nach 8 h waren die MSB-Keimzahlen bei allen Teigen über 10<sup>9</sup> KbE g<sup>-1</sup> und blieben auf diesem Level bis zum Ende der Fermentation. Der Teig fermentiert mit dem Stamm PP RTa11, dessen MSB-Anfangskeimzahlen am niedrigsten waren ( $2,7 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$  KbE g<sup>-1</sup>), hatte schon nach 4 h tendenziell höhere MSB-Keimzahlen im Teig als die anderen Stämme ( $\emptyset = 1,0 \times 10^9 \pm 6,3 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup>). Die mitgeführten Leerteige (= Spontanfermentationen) zeigten den Einfluss der zugesetzten Starterkulturen im Teig. Die pH-Werte der mit kommerziellen Starterkulturen fermentierten Teige und die pH-Werte, fermentiert mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11, waren etwa nach 12 h kleiner gleich pH 4,0 (Abbildung 24B). Die Säuregradverläufe entsprachen den Beobachtungen der pH-Wert-Verläufe. Der Säuregrad stieg bei den spontan fermentierten Teigen viel langsamer an als bei den Fermentationen mit Starterkulturzusatz. Der pH-Wert- und Säuregradverlauf der inokulierten Teige waren sehr ähnlich. Es konnte eine leicht langsamere Säuerung und ein leicht langsamerer Säuregradanstieg bei den mit BR fermentierten Teigen beobachtet werden (Abbildung 24B: grüne Kurven; 8 h: pH-Wert  $4,8 \pm 0,1$ ; Säuregrad  $10,6 \pm 0,2$ ). Die Säuregrade am Ende der Fermentationen lagen zwischen  $23,8 \pm 0,4$  (PP RTa11) und  $28,1 \pm 0,4$  (BR).



**Abbildung 24.** MSB-Keimzahlen [ $\text{KbE g}^{-1}$ ] (A), pH-Wert- und Säuregradverlauf (B) von Amaranthfermentationen mit kommerziellen Starterkulturen und ausgewählten Stämmen. Grüne Balken und Kurven: Böcker Bio Reisstarter (BR); rote Balken und Kurven: *Lactobacillus plantarum* RTa12; gelbe Balken und Kurven: *Pediococcus pentosaceus* RTa11; blaue Balken und Kurven: Blessing Biotech *Lactobacillus fermentum* (LF1); schwarze Kurven: Leerteige.

## 4. Diskussion

Um Mikroorganismen mit guten Wachstumseigenschaften in Pseudocerealien zu isolieren und diese als potentielle Starterkulturen zu charakterisieren, wurden fünf Amaranthmehle von vier verschiedenen Anbauländern (Indien, Peru, Mexiko und Deutschland) für spontane Fermentationsexperimente verwendet. Das Fermentationsmuster in den Amaranthsauerteigen bezüglich der Milchsäurebakterien (MSB) war am Anfang der Experimente auf Kulturebene sehr dynamisch (Tag 1 bis 3). Die Beobachtung einer großen Anzahl von Kolonienmorphologien auf mMRS-5-Agarplatten ließ auf eine Vielzahl von Spezies und Stämmen schließen. Für den restlichen Fermentationszeitraum (Tag 4 bis 10) waren die wettbewerbsfähigen Stämme dominant, während die Anzahl an verschiedenen Morphologietypen sank. Am Ende der spontanen Fermentationen wurden sauerteigspezifische MSB wie *Lactobacillus* und *Pediococcus* detektiert. Diese Vielfalt an Isolaten wurde unabhängig vom Mehlsprungsland gefunden, was auf eine individuelle Säuretoleranz und einen an die Cerealienumwelt angepassten Metabolismus dieser Mikroorganismen zurückzuführen ist (GÄNZLE *et al.*, 2007). Im Teig vorhandene externe Elektronenakzeptoren (z. B. Fruktose) begünstigen die Wettbewerbsfähigkeit von MSB (GÄNZLE *et al.*, 2007) aufgrund der Verstärkung der Energieproduktion und Redoxstabilität dieser Mikroorganismen. In stabilen konventionellen Sauerteigsystemen wurden typische MSB, welche an deren Umwelt adaptiert waren, beobachtet (DE VUYST und NEYSENS, 2005). Die Mikrobiota pflanzenassoziierter Habitate wird von extrinsischen Faktoren wie Temperatur, und intrinsischen Faktoren wie Mehlkohlenhydrate, -enzyme, Wassergehalt und Wechselwirkungen mit anderen Bakterien beeinflusst (ARAÚJO *et al.*, 2002; GOBBETTI, 1998; WICK *et al.*, 2003). *P. pentosaceus*, *L. plantarum* und *L. sakei* sind typische Sauerteig-MSB (GOBBETTI *et al.*, 1999b; VAN DER MEULEN *et al.*, 2007; DE ANGELIS *et al.*, 2002) und wurden in anderen Arbeiten ebenso in Sauerkrautfermentationen entdeckt (HÜFNER *et al.*, 2007; PLENGVIDHYA *et al.*, 2007). *P. pentosaceus* wurde aus spontanen Fermentationen mit Sorghum isoliert (MOHAMMED *et al.*, 1991), *L. plantarum* konnte in Weizen- und Dinkelfermentationen beobachtet werden (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007) und ist sehr oft in anderen Sauerteigökosystemen vorhanden (DE VUYST und VANCANNEYT, 2007). Diese Beobachtung kann durch seinen adaptierten

Kohlenhydratmetabolismus in Cerealienfermentationen erklärt werden (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003). *L. sakei* wurde ebenso in Silage (KLAENHAMMER *et al.*, 2002; VOGEL *et al.*, 1993), fermentiertem Kohl (BJORKROTH *et al.*, 2002; MURCIA-MARTINEZ und COLLINS, 1990; VOGEL *et al.*, 1993) und rohen fermentierten Würstchen in Westeuropa (HAMMES und HERTEL, 1998; LEROY *et al.*, 2006) gefunden. Den Namen trägt das Bakterium vom Reisalkohol Sake, aus dem *L. sakei* das erste Mal isoliert und beschrieben wurde (syn. *L. sake*; BERGEY, 2005b). *P. pentosaceus* wurde in Kornsilage (KLEINSCHMIT *et al.*, 2006) und in Würstchenfermentationen (CHACON *et al.*, 2006) beobachtet, während *L. plantarum* in Fermentationen mit Käse detektiert wurde (SIRAGUSA *et al.*, 2007) und für kalziumangereicherte Sojamilch als Starterkultur verwendet wurde (TANG *et al.*, 2007). Seinen Namen trägt das Bakterium aufgrund seiner Eigenschaft zur Zucker-  
verwertung (vgl. Pentose = Zucker; BERGEY, 2005a).

Die Differenzierung der Stämme mittels RAPD-PCR wurde mit dem Primer M13V<sub>mod.</sub> und dem Primer 1254 durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen der Primer konnten in Abhängigkeit der Stämme verschiedene Bandenmuster erzeugt werden. Aufgrund dessen wurde eine weitere Differenzierung vorgenommen. Mit der Methode der RAPD-PCR ist für die Vielzahl der durchgeführten Analysen eine schnelle, kostengünstige und leicht durchführbare Methode angewandt worden (ROSSETTI und GIRAFFA, 2005). In den Arbeiten von GIRAFFA *et al.* (2001, 2004) und LOMBARDI *et al.* (2002) wurde erkannt, dass ein 15 bp großer M13 Primer für die Stammidentifizierung erfolgreich eingesetzt werden konnte. HAMAD *et al.* (1997) verwendeten zur Stammidentifizierung für aus Sorghumsauerteig isolierte MSB den Primer M13V nach STOLZ *et al.* (1993). Jedoch haben frühere Forschungsarbeiten gezeigt, dass es sich bei Stämmen mit gleichen Bandenmustern, dennoch um unterschiedliche Stämme handelt könnte (WEISS *et al.*, 2005). Eine genauere Differenzierung wäre mit der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) möglich. Bei dieser Methode wird im Gegensatz zur normalen Gelelektrophorese ein wechselndes Spannungsfeld aufgebaut und aufgrund dessen eine Größentrennung der DNA erzeugt. HUCH NÉE KOSTINEK *et al.* (2008) haben so in Kombination mit RAPD-PCR 178 MSB-Isolate aus Cassavasauerteigen auf Stammebene näher charakterisieren können.

Insgesamt wurden in den Spontanfermentationen mit Amaranth typischerweise in spontanen Sauerteigfermentationen vorkommende MSB gefunden. Dabei wurden in den vier verschiedenen Mehlen von vier verschiedenen Herstellern 6 Stämme der Spezies *P. pentosaceus*, 2 Stämme der Spezies *L. sakei* und 1 Stamm der Spezies *L. plantarum* gefunden. Nach GÄNZLE (2006a) waren in spontan fermentierten Sauerteigen (es wurden keine Angaben über die Mehlarart gemacht) homo- und fakultativ heterofermentative MSB wie *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. sakei* und *Pediococcus pentosaceus* zu finden. Weiter wurden in diesen Arbeiten obligat heterofermentative MSB wie *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella viridescens* und *W. cibaria* in Spontansauerteigen analysiert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Amaranthfermentationen wurden keine obligat heterofermentative MSB, wie z. B. *L. sanfranciscensis*, analysiert. *L. sanfranciscensis* wurde in anderen Studien in einer Vielzahl von Sauerteigisolaten nachgewiesen und ist als Sauerteigstarterkultur sehr bekannt (SCHEIRLINCK *et al.*, 2008 und 2009; FERCHICHI *et al.*, 2007). Wie von CORSETTI *et al.* (2007) gezeigt wurde kann eine schnelle Weizenteigsäuerung durch *P. pentosaceus* und *E. faecium* für die Teigreifung verantwortlich sein und somit Ursache für das Wachstum von *L. sanfranciscensis*. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass vergleichbare Stämme von *L. sanfranciscensis* auf mMRS-5-Agar kultivierbar sind und bei einem Vorhandensein im Teig nachweisbar gewesen wären. VOGELMANN *et al.* (2009) konnten in Sauerteigfermentationen aus Cerealien, Pseudocerealien und Cassava ebenfalls *L. sanfranciscensis* nicht nachweisen.

Die Anzahl der isolierten Stämme aus den Amaranthspontanfermentationen ist vergleichbar mit den Ergebnissen von HAMAD *et al.* (1997). Sie isolierten aus spontan fermentierten sudanesischen Sorghumsauerteigen von anfänglich sieben Stämmen nach 42 h Fermentation zwei dominante Stämme der Spezies *L. fermentum* und *L. reuteri*. In den Spontanfermentationen mit Amaranth in dieser Arbeit konnten durchschnittlich 1-4 Stämme pro Mehl nach 10 Tagen isoliert werden. Eine Korrelation der Anbauländer des Amaranthes und der isolierten Stämme konnte nur vermutet werden. *P. pentosaceus* kam in allen Mehlen, unabhängig vom Anbauland vor, während *L. sakei* und *Enterococcus* sp. nur in den Mehlen aus Südamerika (Mexiko (AM), Peru (AP)) vorhanden waren. *L. plantarum* hingegen war in den Mehlen aus

Südamerika (AM und AP) und aus Deutschland (SG) anwesend. SCHEIRLINCK *et al.* (2007) fanden heraus, dass bei belgischem Sauerteig vielmehr das Umfeld bei der Sauerteigherstellung für die typische mikrobielle Zusammensetzung verantwortlich war, weniger der Mehltyp. DE VUYST und VANCANNEYT (2007) sahen die mikrobielle Ökologie eines Sauerteiges ebenfalls nicht als Ergebnis des geografischen Ursprungs, sondern führten die Ursache auf unterschiedliche traditionelle Herstellungsgewohnheiten in den jeweiligen geografischen Regionen zurück. Beispielsweise enthielten die in Arbeiten von GOBETTI *et al.* (1994) und CORSETTI *et al.* (2001, 2003) untersuchten italienischen Weizensauerteige Stämme der Spezies *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* und *L. farciminis*, wohingegen in Sauerteig aus Umbrien (Zentralitalien) *L. sanfranciscensis* und *L. plantarum* die dominierenden Spezies waren (CORSETTI *et al.*, 2001). Sauerteige aus Foggia und Lecce (Süditalien) brachten typischerweise Stämme der Spezies *L. sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum* und *L. alimentarius* hervor. Eine größere Rolle für die Zusammensetzung eines Sauerteiges spielen technologische Fermentationsparameter, die Matrixkomposition und andere Faktoren (MEROETH *et al.*, 2003b, CORSETTI *et al.*, 2004), wie beispielsweise Lagerbedingungen der Körner oder des fertigen Mehles (Temperatur, Feuchte). Dies kann die Ursache für die unterschiedliche MSB-Zusammensetzung der Parallelfementationen sein.

Aus der Gesamtheit der isolierten Stämme aus den Amaranthsauerteigen wurde je Spezies der jeweils dominanteste Stamm ausgewählt. Es wurden die Stämme *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 für weitere Fermentationen herangezogen und näher charakterisiert. Hierfür wurde der kommerzielle api<sup>®</sup>-50CH-Test verwendet, um das metabolische Verhalten der Stämme bezüglich ihrer Spezieszugehörigkeit zu erkunden und um speziesspezifische Eigenschaften zu ermitteln. *L. sakei* war nicht in der Datenbank enthalten. Die hauptsächlich vorhandenen Mono- und Oligosaccharide des unfermentierten Sauerteiges waren Glukose, Saccharose, Fruktose und Maltose, welche von allen Stämmen im api<sup>®</sup>-Test sehr gut verwertet werden konnten. Eine Umsetzung dieser Kohlenhydrate im Teig war somit gegeben. Aufgrund dessen waren die Voraussetzungen für die Substratfermen-

tationen mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 in den Amaranthteigen möglich.

Die Stämme *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 wurden weiter verwendet um Amaranthteige zu inokulieren und deren Dominanz im Teig zu überprüfen. Im Gegensatz zu Spontansauerteigen werden geführte Sauerteige mit einer Starterkultur bzw. dem Anstellgut beimpft. Durch die Verwendung von Anstellgut können Fehlgärungen vermieden werden und bei gleich bleibender Mikroflora ein reproduzierbarer Säuerungsverlauf sowie eine standardisierte Brotqualität erreicht werden (GÄNZLE, 2006a). Die pH-Werte der hier untersuchten Sauerteige erreichten den Wert von etwa pH 4,0 am zweiten Tag der Fermentation und blieben auf diesem Level bis zum Ende. Die Säuregrade verhielten sich invers proportional, jedoch waren sie ebenso am zweiten Tag stabil bis zum Ende der Fermentation. Diese erreichten Werte von 21,7 bis 30,6. Die MSB-Keimzahlen waren nach zehn Tagen Fermentation bei  $10^8$  bis  $10^{10}$  KbE  $g^{-1}$  und der prozentuale Anteil aller initiierten Stämme an der MSB-Gesamtkeimzahl am Ende der Fermentation lag zwischen 58 und 100%. *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 zeigten die beste Wettbewerbsfähigkeit von allen inokulierten Stämmen (100% prozentualer Anteil). Vergleichbare Ergebnisse wurden in Arbeiten von Vogelmann *et al.* (2009) erzielt. Hier wurde Amaranth mit 10% eines Startermixes aus sieben verschiedenen Kombinationen von Starterkulturen versetzt. Es handelte sich um Stämme der Spezies *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paralimentarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. lactis*, *L. acetotolerans*, *L. paracasei*, *L. spicheri*, *L. helveticus*, *L. casei* und *L. curvatus*. Teilweise wurde mit Hefen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis*, *Issatchenkia orientalis* und *Picchia anomala* inokuliert. Bei den Fermentationen der Sauerteige konnten pH-Werte von 3,7-3,8 (diese Studie: 3,9) und Säuregrade von 26,4-30,4 (diese Studie: 24,2) analysiert werden. Experimente mit Buchweizen, einer anderen Pseudocerealie, zeigten ähnliche Ergebnisse (MOORE *et al.*, 2007). Hierfür wurden glutenfreie Buchweizensauerteige mit den Stämmen *L. plantarum* FST 1.11 und *L. plantarum* 2115KW inokuliert. Die finalen pH-Werte lagen bei 3,8 und 3,9, die Säuregrade variierten von 16,5 bis 16,2 und die MSB-Keimzahlen wurden bei  $10^9$  KbE  $g^{-1}$  für beide Stämme analysiert (diese Studie:  $10^{10}$  KbE  $g^{-1}$ ). In mit *L. plantarum* 20B initiierten Weizensauerteigen konnten niedrigere pH-Werte (<4,0) und niedrigere

Säuregrade (5,88) nach 8 h bei 30°C beobachtet werden (GOBBETTI *et al.*, 1999b). Diese Abweichungen könnten auf Unterschiede im Substrat zurückgeführt werden. Beispielsweise weist Amaranth einen doppelt so hohen Mineralstoffgehalt im Vergleich zu anderen Cerealien auf, und der Fettgehalt ist 2-3-mal höher als bei Weizen und Roggen. Allerdings ist Stärke im Amaranth in kleineren Mengen als in Cerealien vorhanden (SCHOENLECHNER *et al.*, 2008). Bezüglich dem Gehalt an Ballaststoffen liegen die Werte für Amaranth im Bereich der Cerealien (19,5-27,5% *A. cruentus* und 33,1-49,3% *A. hypochondriacus*; BRESSANI *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu den Fermentationen mit *L. plantarum* wird *P. pentosaceus* zwar häufig aus Sauerteigfermentationen isoliert und ist als Sauerteigstarterkultur bekannt, jedoch gibt es keine Literaturhinweise auf Fermentationen mit *P. pentosaceus* als Einzelstammstarterkultur.

Das Wachstum der potentiellen Starterkulturen im Teig, sowie die Entwicklung der pH-Werte und der Säuregrade, sind entscheidende Kriterien über die Anwendung einer Starterkultur. Aber auch die Produktion von organischen Säuren, Ethanol und Zuckeralkoholen im Teig, sowie die Umsetzung von Kohlenhydraten im Substrat, sind wichtige Parameter für die Qualität des späteren Broterzeugnisses. Organische Säuren wie Laktat, Acetat, Formiat, Propionat, Succinat, Citrat, Butyrat und Iso-Butyrat, der Ethylalkohol Ethanol und der Zuckeralkohol Mannitol haben teilweise geschmacksgebende Eigenschaften im Teig (BRANDT, 2006b; LÜCK und JAGER, 1995a, b) und sind bei der Aromabildung beteiligt. Zusätzlich zeigen Acetat, Formiat, Propionat und Butyrat antimykotische und konservierende Eigenschaften in Sauerteigen (CORSETTI *et al.*, 1998) und tragen zur Lebensmittelsicherheit bei. LILJEBERG und BJÖRCK (1996) analysierten die Verbesserung ernährungsphysiologischer Eigenschaften, wie Blutzuckersenkung, durch Laktat und Propionat in Sauerteigen. Im Teig vorhandene niedermolekulare Kohlenhydrate und deren Spaltprodukte wie Glukose, Fruktose, Maltose, Saccharose, Cellobiose, Trehalose und Gentiobiose dienen einerseits als Substrat und somit als Energiequelle für die MSB im Teig. Andererseits sind sie wichtige Aromapräkursoren beim Backprozess für die Bildung von Aromakomponenten, insbesondere in der Brotkruste (Maillardreaktion) (BRANDT, 2006a). Ihr Angebot hängt in erster Linie von der Aktivität mikrobieller, sowie getreideeigener Amylasen und der Anwesenheit von Enzyminhibitoren ab.

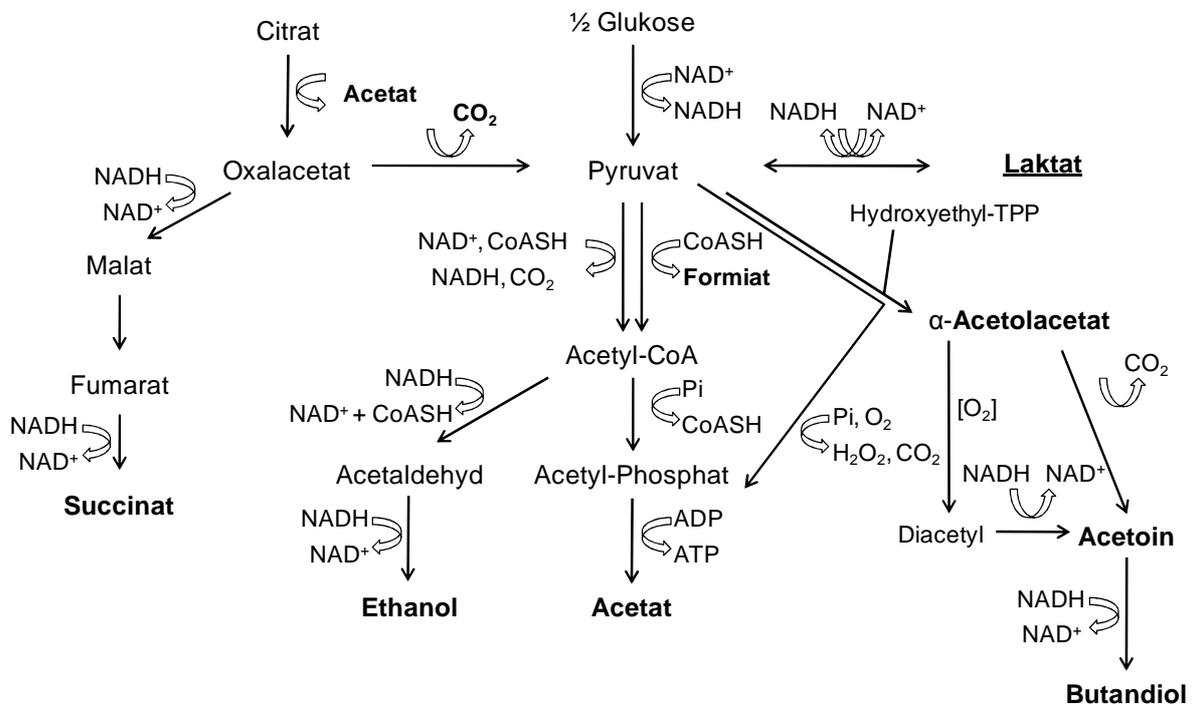
Während den Fermentationen mit *L. plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *P. pentosaceus* RTa11 zur Evaluation der Dominanz wurden die Metabolite im Teig untersucht. Hauptmetabolite in allen Teigen waren Laktat, Formiat, Glukose und Ethanol. Die Laktatgehalte, variierend von 136,6 bis 178,1 mM, waren in allen Teigen etwa gleich. Die Acetatgehalte lagen zwischen 1,9 und 7,6 mM. Ähnlich hohe Laktat- und niedrige Acetatkonzentrationen wurden in Sauerteigfermentationen mit Weizen und Dinkel beobachtet (VAN DER MEULEN *et al.*, 2007; BRANDT, 2001). Acetat trägt zur Aromabildung bei und verbessert die sensorische Qualität von Sauerteigweizenbrot (SPICHER, 1983). Weiter können positive Effekte bezüglich Klebrigkeit (RÖCKEN, 1996) und antimykotischer Effekte (CORSETTI *et al.*, 1998) durch Acetat im Teig ausgemacht werden. Das molare Verhältnis von Laktat zu Acetat stellt ein Qualitätskriterium im Teig dar. Dieses Verhältnis trifft eine Aussage über die sensorischen Eigenschaften fertiger Brote. Das optimale molare Verhältnis von Laktat zu Acetat in industriellen Weizen- und Dinkelsauerteigfermentationen beträgt 2,5 (RÖCKEN, 1996) und ist im Sauerteigbereich eine wichtige Kenngröße. Solche Kennzahlen sind für Pseudocerealienfermentationen nicht bekannt. Die molaren Verhältnisse in den Teigen zur Evaluation der Dominanz von *L. plantarum* RTa12, *P. pentosaceus* RTa11 und *L. sakei* RTa14 variierten von 23,4 bis 79,8. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Zusammensetzung des Amaranths im Vergleich zu Weizen- und Dinkelmehlen können durchaus nicht vergleichbare Werte entstehen. Um den Einfluss des Acetatgehaltes im Amaranthsauerteig auf die sensorischen Eigenschaften der Endprodukte zu analysieren, sollten in weiteren Experimenten Backversuche mit anschließenden sensorischen Verkostungen durchgeführt werden. Zur vermehrten Produktion von Acetat kann dem Teig Fruktose als alternativer Elektronenakzeptor zugesetzt werden (GOBBETTI *et al.*, 1999a; KORAKLI *et al.*, 2000; RÖCKEN, 1996). Geringe Acetatkonzentrationen könnten durch das Enzym Citrat-Lyase aus im Teig vorhandenem Citrat katabolisiert werden (GÄNZLE, 2006b; GOBBETTI und CORSETTI, 1996; HAMMES *et al.*, 1996; STOLZ *et al.*, 1995). Bezüglich der Glukose- sowie der Formiat- und Ethanolkonzentration schien eine Korrelation wahrscheinlich. Während die meisten Teige relativ geringe Glukosewerte bei hohen Formiat- und Ethanolgehalten zeigten, wurden gegensätzliche Werte für den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teig AM und den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teig

DP gefunden. Diese Ergebnisse konnten nicht den MSB-Keimzahlen sowie den Fermentationsparametern pH-Wert und Säuregrad zugeschrieben werden, welche ähnliche Werte in allen Teigen aufzeigten. Die stöchiometrischen Verhältnisse der Ergebnisse von Formiat und Ethanol können nicht erklärt werden, jedoch könnten sie mit dem Substrat Amaranth oder der residenten Mikrobiota in Verbindung gebracht werden. Pseudocerealien unterscheiden sich von konventionellen Cerealien in der Kornzusammensetzung, so z. B. im Proteingehalt (Weizen: 0,35%; Amaranth: 0,49%) und dem Fettgehalt (Weizen: 0,54%; Amaranth: 1,1%) (BECKER *et al.*, 1981). Zusätzlich kann die Zusammensetzung der Fettsäuren und Kohlenhydrate sowie die Konzentration an Vitaminen nicht mit der von konventionellem Weizen verglichen werden. Pseudocerealien enthaltende glutenfreie Brote zeigten signifikant höhere Gehalte an Protein, Fett, Ballaststoffen und Mineralstoffen als die Kontrollbrote (ALVAREZ-JUBETE *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Unterschiedlichkeit im Vergleich zu konventionellem Getreide sind keine vergleichbaren Werte zu erwarten. Der heterofermentative Stoffwechselweg, welcher Pyruvat für die Bildung von Formiat, Ethanol und/oder Acetat bildet, kann eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse liefern. Dennoch findet laut Literatur diese Biotransformation bei neutralen pH-Werten und unter aeroben Bedingungen im Sauerteig statt (gemessene End-pH-Werte von 4,0). Falls dieser Stoffwechselweg stöchiometrisch ausgeführt wurde, sollten 2 mol Formiat und 2 mol Acetat und/oder Ethanol pro mol Glukose resultieren. Die Relationen zwischen Formiat und Acetat/Ethanol im Teig erreichten dieses Gleichgewicht nicht. Da Formiat ein wichtiges Produkt von *Enterobacteriaceen* ist, wurde der Teig ebenso auf Endo-Agar evaluiert. Hierbei wurden weniger als 100 KbE g<sup>-1</sup> Teig am Ende der Fermentation zum Zeitpunkt der HPLC-Analysen beobachtet. Demzufolge scheinen *Enterobacteriaceen* eine unwahrscheinliche Quelle der hohen Formiatkonzentrationen zu sein. Die Präsenz von Formiat wurde in ähnlichen Studien mit Weizen und Roggen nicht untersucht und kann daher nicht verglichen werden (z. B. KORAKLI *et al.*, 2001). Die Ethanolkonzentrationen konnte teilweise auf das Vorhandensein von Pilzen, speziell *Mucor* spp., welche bekannt dafür sind, Ethanol zu produzieren, zurückgeführt werden (INDERLIED und SYPHERD, 1978). Diese waren ein Teil der autochthonen Flora des Teiges und waren nicht direkt von den

Starterkulturen beeinflusst, was wiederum auf geringe antimykotische Aktivitäten der Stämme schließen lässt.

*P. pentosaceus* ist ein homofermentatives MSB, während *L. sakei* und *L. plantarum* fakultativ heterofermentative MSB sind. In der Regel verwerten homofermentative MSB bevorzugt Glukose, die Verwertung von Maltose und Fruktose wird durch Glukose reprimiert und setzt erst nach Verbrauch der Glukose ein (GÄNZLE, 2006b), jedoch ist die Verwertung von Pentosen und die daraus sich ergebende Acetatbildung durchaus möglich (TITGEMEYER und HILLEN, 2002). Unter aeroben Bedingungen können die meisten fakultativ heterofermentativen Laktobazillen Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzen. NADH wird dabei über die NADH-Oxidase und NADH-Peroxidase-Reaktion zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert (GÄNZLE, 2006b). Unter anaeroben Bedingungen und der Abwesenheit von Elektronenakzeptoren, wie sie in konventionellen Sauerteigen vorherrschen, wird Glukose zu Laktat mittels homofermentativen MSB über die Glykolyse und anschließender Laktat-Dehydrogenase umgewandelt. Dabei entsteht als Zwischenprodukt Pyruvat, und  $\text{NAD}^+$  wird zu NADH reduziert. Beim weiteren Abbau von Pyruvat wird NADH wieder zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Über die Pyruvat-Formiat-Lyase können Formiat, Ethanol und Acetat von fakultativ heterofermentativen MSB gebildet werden. Das Enzym ist jedoch nur bei niedrigem Glukosegehalt, neutralem pH-Wert und anaeroben Bedingungen aktiv, und spielt demnach in Sauerteigen keine Rolle. Nach GÄNZLE (2006b) sind homofermentative MSB, wie die Pediokokken, in der Lage, Citrat zu Succinat oder Laktat zu katabolisieren, was wiederum die Bildung von Acetat oder Acetoin aus Pyruvat beeinflusst (Abbildung 25). Die Präsenz der Enzyme, welche für diesen metabolischen Prozess erforderlich sind, wurde exemplarisch in den kompletten genomischen Sequenzen von *L. plantarum* WCFS1 (GenBank: AL935263), *L. sakei* 23K (GenBank: CR936503) und *P. pentosaceus* ATCC 25745 (GenBank: CP000422) geprüft. Während bei *L. sakei* 23K alle Enzyme, welche für die Produktion von Acetat und Ethanol erforderlich sind, annotiert waren, waren nur die Sequenzen für die Acetaldehyd-Dehydrogenase und die Acetatkinase für *L. plantarum* WCFS1 und die Sequenzen für die Pyruvatdehydrogenase, die Phosphotransacetylase, die Alkoholdehydrogenase und die Acetatkinase für *P. pentosaceus* ATCC 25745 zu finden. Aufgrund dessen könnten diese Stoff-

wechselwege prinzipiell eingegangen werden und die Bildung von Acetat und Ethanol erfolgen.



**Abbildung 25.** Pyruvat-Stoffwechsel homofermentativer MSB nach KANDLER *et al.* (1993), CSELOVSZKY *et al.* (1992) und COCAIGN-BOUSQUET *et al.* (1996). Endprodukte des Stoffwechsels sind fettgedruckt, Hauptprodukte fettgedruckt und unterstrichen. CoA: Coenzym A; P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat; TPP: Thiamin-Pyrophosphat; [O<sub>2</sub>]: oxidative Decarboxylierung.

Für die Evaluation der industriellen Anwendung und Wettbewerbsfähigkeit der ausgewählten Stämme als Starterkulturen in Amaranthsauerteigproduktionen sind drei Schlüsselparameter erforderlich: die Fermentationscharakteristika innerhalb der ersten 24 h, die Dominanz gegenüber der autochthonen Mikroorganismenflora der spontanen Sauerteige und die Sensitivität gegenüber der Inkubationstemperatur. Dies charakterisiert die Leistungsfähigkeit der potentiellen Starterkulturen bezüglich den Ansprüchen der Industrie: die Kulturen sollten eine kurze lag-Phase haben und so einen schnellen Abfall des pH-Wertes garantieren; sie sollten über die autochthone Mikroorganismenflora dominant sein, um ein hygienisch einwandfreies Produkt sowie technologisch und sensorisch konstante Produktqualität zu garantieren; und sie sollten gegenüber kleineren Umweltveränderungen wie z. B. der Temperatur robust sein. Für diese Un-

tersuchungen wurden aufgrund der 100%igen Dominanz im Teig die beiden Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 gewählt.

Während der ersten 24 h wuchsen die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 ziemlich ähnlich. Die pH-Werte fielen bei *P. pentosaceus* RTa11 etwas früher, während beide Stämme nach 10 h Fermentation die gleichen Werte im Teig zeigten (pH 4,2). Nach 8 h Fermentation war die exponentielle Phase bei beiden Stämmen überschritten und sie zeigten bis zum Ende stabile MSB-Keimzahlen von  $10^9$  bis  $10^{10}$  KbE  $g^{-1}$ . GÄNZLE und BRANDT (2006) haben nach BÖCKER *et al.* (1995) für Typ-I-Sauerteige aus Roggen pH-Werte von 3,5-4,0 und mittlere Säuregrade von 5-20 analysiert. Typ-II-Sauerteige aus Weizen bzw. Roggen wiesen pH-Werte von 3,2-3,8 auf und zeigten höhere Säuregrade von >20. Die MSB-Keimzahlen dieser Teige waren nicht bekannt. Teilweise waren Sauerteig- und KAHMHEFEN vorhanden. Bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 waren die Säuregrade nach 6 h >5 und nach 14 h bei 20. Die pH-Werte waren nach 12 h bei 4,0 und nach 24 h bei 3,8. Bei der Fermentation mit *P. pentosaceus* RTa12 wurden nach 5 h Säuregrade >5 und nach etwa 16 h >20 gemessen. Die pH-Werte waren nach 24 h erst bei 4,0. Innerhalb 24 h wurden keine pH-Werte <4,0 gemessen. Schlussfolgernd konnte für beide Stämme zum Zeitpunkt 16 h Fermentation ein Säuregrad in den Teigen mit anschließendem geringem Zuwachs analysiert werden (etwa 20). Auch die pH-Werte bewegten sich nach 16 h etwa bei 4,0. Nach GÄNZLE und BRANDT (2006) setzt ein maßgeblicher Beitrag von MSB zum Fermentationsgeschehen in Teigen in der Regel voraus, dass diese in Keimzahlen von mehr als  $10^7$  KbE  $g^{-1}$  vorliegen und durch ihre Stoffwechselaktivität den pH-Wert des Teiges auf Werte von unter 5,0 absenken. Nach 16 h Fermentation wurden in den Fermentationen mit beiden Stämmen Keimzahlen von  $10^9$  KbE  $g^{-1}$  analysiert. Letztendlich kann nach einer Fermentationszeit von 16 h für beide Stämme eine Teigreifung vorausgesetzt werden.

Bezüglich der Analyse von Schimmelpilzen in den Amaranthteigen wurden bei der Evaluation der Fermentationscharakteristika innerhalb 24 h bei der Fermentation mit *L. plantarum* RTa12 ausschließlich innerhalb der ersten 16 h Schimmelpilze analysiert. Nach 24 h waren keine Pilze im Teig nachweisbar. Im Teig mit *P. pentosaceus* RTa11

waren hingegen bis zum Ende Pilze im Teig vorhanden. Aufgrund des Zerbrechens der Mycelfäden bei der Probenaufarbeitung war die Keimzahlbestimmung der Pilze schwierig. Es kann daher kein Rückschluss auf den Pilzgehalt in den Teigen gezogen werden. Aufgrund der Beobachtungen von Schimmelpilzen während den Fermentationen werden antimykotische Effekte der Stämme ausgeschlossen. Jedoch könnten verminderte Gehalte an antimykotischen Substanzen im Teig durchaus produziert werden. Es gibt nur wenige Studien zu antimykotischen Stoffwechselprodukten, und nur wenige Substanzen mit antimykotischer Wirkung wurden chemisch charakterisiert (GÄNZLE, 2006b). Nach SCHNÜRER und MAGNUSSON (2005) wurde *L. plantarum* die Produktion von Benzoesäure, Mevalonolacton, Methylhydantoin, cyclo(Gly-Leu), Phenyllactat, 4-Hydroxyphenyllactat, cyclische Dipeptide, cyclo(Phe-Pro) und cyclo(Phe-OH-Pro) zugeschrieben, welche ein breites Wirkspektrum gegen Schimmelpilze zeigten. Die Mehrzahl dieser Substanzen wurde noch nicht auf ihre Wirksamkeit in Sauerteigfermentationen geprüft. Die ebenfalls in den mit *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Amaranthsauerteigen analysierten organischen Säuren Propionat, Succinat, Butyrat und Iso-Butyrat wurden durch CORSETTI *et al.* (1998) in Kulturen auf Weizenhydrolysat und von GALAL *et al.* (1978) in Weizensauerteigen als antimykotisch wirksam beobachtet. In den mit *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Amaranthsauerteigen wurde hauptsächlich *Mucor* spp. gefunden. Man unterscheidet generell zwischen der Schimmelpilzflora des Getreidekorns auf dem Feld und des gelagerten Getreides (Feldflora und Lagerflora) (GÄNZLE, 2006a). Die Lagerflora setzt sich nach SPICHER *et al.* (1997) meist aus Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus*, *Eurotium* und *Penicillium* zusammen, welche höhere Toleranzen gegenüber niedrigen  $a_w$ -Werten zeigen. Die Feldflora besteht überwiegend aus *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium* und *Ulocladium* und ist gegenüber niedrigen Temperaturen toleranter (GÄNZLE, 2006a). REYES-VELÁZQUEZ *et al.* (2008) haben auf Getreidesilage am häufigsten *Mucor*, *Penicillium* und *Aspergillus* spp. gefunden. Einige Arten von *Aspergillus* spp. wuchsen schon bei einer Kornfeuchte von 14% bei Temperaturen von mehr als 5°C. *Penicillium* spp. wurden bereits bei Temperaturen unter 5°C, je doch erst bei Kornfeuchten von 18% beobachtet (WEIDENBÖRNER, 1999). Aufgrund der Mycotoxinbildung einiger Schimmelpilzarten ist das Vorhandensein von Pilzen im Teig für die

menschliche Ernährung kritisch. Ihnen werden akut toxische, teratogene, mutagene oder carcinogene Wirkungen zugeschrieben. Bei *Mucor* spp. ist eine Mykotoxinbildung jedoch nicht bekannt und die meisten Arten sind apathogen (ORLOWSKI, 1991). Die Anwendung in anderen Lebensmitteln wurde von NKWE *et al.* (2005) beschrieben. Hier wurde aus dem Malz und der Stammwürze von traditionellem botswanischem Sorghumbier unter anderem *Mucor* spp. isoliert. *Mucor* spp. findet Anwendung in der Herstellung von fermentiertem Reiswein im Orient, in der Ethylalkoholproduktion in Europa, in der Sufu- und Tempehherstellung oder in der Produktion fermentierter käseähnliche Lebensmittel aus Sojabohnen (ORLOWSKI, 1991).

Die Evaluation der Stoffwechselprodukte innerhalb der 24stündigen Fermentation mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 zeigte Glukose, Saccharose, Laktat und Acetat als zentrale Stoffwechselprodukte auf. Obwohl die MSB-Keimzahlen und die Glukosegehalte in den Teigen nach 8 h bis zum Ende der Fermentationen mit leichten Schwankungen konstant blieben, war ein Anstieg des Laktatgehaltes innerhalb 24 h zu verzeichnen. Es zeigte sich, dass Glukose im Teig einen intermediären Status einnahm. Es fand eine Verstoffwechsellung aufgrund des Wachstums der MSB statt, zusätzlich wurde Glukose, aufgrund der Aktivität von Teigenzymen, ständig neu gebildet (BRANDT, 2006a). BRANDT (2001) hatte innerhalb einer 24stündigen Fermentation mit *L. sanfranciscensis* LTH 2581 bei 30°C im Weizen weit niedrigere Glukosewerte analysiert. VAN DER MEULEN *et al.* (2007) fand in spontanen Weizen- und Dinkelfermentationen mit *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus hirae*, *Leuconostoc citreum* und *Lactobacillus curvatus* weniger als ein Drittel der analysierten Glukosekonzentrationen. Es wurden niedrigere Glukosegehalte, jedoch höhere Saccharosegehalte in den mit *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen analysiert. Aufgrund dessen waren vergleichbare Laktatkonzentrationen in den mit *L. plantarum* RTa12 fermentierten Teigen vorhanden. In den Arbeiten von VAN DER MEULEN *et al.* (2007) waren nach 24 h Fermentation die Laktatkonzentrationen in den Teigen halb so groß bzw. nur ein Viertel so hoch wie die Laktatkonzentrationen in den Teigen mit *L. plantarum* RTa12 bzw. *P. pentosaceus* RTa11 in Amaranth. Auch Acetat nahm proportional zur Laktatkonzentration in beiden Teigen mit Amaranth zu. Die Produktion fand jedoch erst nach Beenden der exponentiellen Phase statt. VAN DER MEULEN

*et al.* (2007) analysierte halb so große Acetatkonzentrationen in mit *L. plantarum*, *L. rossiae*, *L. brevis*, *L. paraplantarum* und *L. fermentum* fermentierten Weizen- und Dinkelsauerteige.

Bezüglich der Maltosekonzentrationen in den mit *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 fermentierten Teigen waren im Vergleich zu den Arbeiten von BRANDT (2001) in Weizensauerteigen geringere Konzentrationen analysiert worden, welche über den gesamten Fermentationsverlauf nahezu konstant waren (ca. 80 mM vs. 5 mM). Die HPLC-Analysen des mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 inkubierten mMRS-5-Mediums zeigten, dass Maltose von beiden Stämmen teilweise verstoffwechselt werden konnte (LP RTa12: 7,6 g von 10 g; PP RTa11: 7,3 g von 10 g). Weizen- und Amaranthkörner zeigen ähnliche Maltosegehalte. OGUNGBENLE (2003) wies auf einen Maltosegehalt in Pseudocerealien von 0,1% hin, während BRANDT (2006a) von Maltosegehalten in Spuren, welche während der Lagerung zunahm, berichtete. Vielmehr ist die Maltosefreisetzung aus Stärke während der Fermentation durch Amylasen von Interesse. Aufgrund des höheren Ausmahlungsgrades im Amaranthvollkornmehl sind Mehlenzyme in größeren Mengen enthalten als im Weizenauszugsmehl. Durch Amylaseaktivitäten im Teig wird im Amaranthteig mehr Maltose gebildet, jedoch wiederum durch andere Enzymtätigkeiten ( $\alpha$ -Glukosidase) zu Glukose verstoffwechselt. Dies zeigt sich in höheren Glukosewerten im Amaranthsauerteig im Vergleich zum Weizensauerteig nach BRANDT (2001). Weiter spielen Lagerbedingungen und Frischegehalt des Mehles eine große Rolle.

Die Untersuchungen bezüglich der Wettbewerbstests der ausgewählten Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 mit der autochthonen Flora zeigten, dass *P. pentosaceus* RTa11 etwas schneller wuchs und einen höheren prozentualen Anteil an der MSB-Gesamtkeimzahl nach 24 h aufwies. In den Teigen mit *L. plantarum* RTa12 wurden leicht höhere Säuregrade im Teig beobachtet. Die MSB-Gesamtkeimzahlen waren am Ende der Fermentation für beide Stämme etwa gleich. 8 h nach dem ersten Propagationsschritt waren beide Stämme der autochthonen Flora bezüglich der MSB-Keimzahlen überlegen. Es gelang beiden Stämmen schon 4 h nach dem zweiten Propagationsschritt mit Keimzahlen von  $10^9$  KbE  $g^{-1}$  Teig vorzuherrschen. Die mehleigene Flora wurde verdrängt. Es sollte im Labormaßstab die

Dominanz des Wachstums der beiden Stämme gegenüber der autochthonen Flora getestet werden. Beide Stämme zeigten sich als wachstumsstarke potentielle Starterkulturen und waren in der Lage, sich gegenüber einer schon im Mehl vorhandenen und herangewachsenen Flora durchzusetzen. Somit konnte ein sicheres Produkt gewährleistet werden.

Die Differenzen zwischen den Fermentationen mit den Stämmen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 bezüglich pH-Wert, Säuregrad und MSB-Keimzahlen bei unterschiedlichen Fermentationstemperaturen machte sich vor allem bei niedrigen Temperaturen (25°C) bemerkbar. Die pH-Werte waren bei niedrigeren Temperaturen höher als bei Fermentationstemperaturen von 30 und 35°C, während die Temperatur mit den Säuregraden positiv korrelierte. Dies könnte einerseits auf das schnellere Wachstum der beiden Stämme bei höheren Fermentationstemperaturen zurückzuführen sein. Andererseits sind aufgrund höherer Temperaturen im Teig teigeigene endogene amylolytische Enzyme wie beispielsweise  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Amylase (Temperatur-optimum 54-56°C ( $\alpha$ -Amylase) bzw. <50°C ( $\beta$ -Amylase); BRANDT, 2006a) aktiver als bei niedrigen Temperaturen. Bei erhöhter Amylaseaktivität im Teig ist der Gehalt an Monosacchariden bzw. Disacchariden größer, welche aus Stärke gebildet werden. Daher steht den Stämmen vermehrt Substrat für das Wachstum zur Verfügung. Weiter wird durch die produzierte Säure im Teig (hauptsächlich Laktat) während der Fermentation der pH-Wert erniedrigt. Die Enzymaktivitäten werden so beeinflusst (BOSKOV-HANSEN *et al.*, 2002). Bei pH-Werten von 4,9-5,0 arbeitet bevorzugt die  $\alpha$ -Amylase, während bei pH-Werten von 4,6-5,4 die  $\beta$ -Amylase aktiv ist (BRANDT, 2006a). Daher waren bei 25°C nach 8 h Fermentation bei höheren pH-Werten im Teig (pH 5,8 mit *L. plantarum* RTa12; pH 5,6 mit *P. pentosaceus* RTa11) verminderte MSB-Keimzahlen im Vergleich zu den Fermentationen bei 30 und 35°C gegeben (pH-Werte von 4,2-4,5). An diesem Messpunkt war der größte Unterschied der pH-Werte zwischen den unterschiedlich fermentierten Teigen gegeben, was sich auch in der Differenz der MSB-Keimzahlen widerspiegelte (LP RTa12:  $1,4 \times 10^9$  KbE g<sup>-1</sup>; PP RTa11:  $3,0 \times 10^8$  KbE g<sup>-1</sup>). Nach 24 h waren annähernd gleiche pH-Werte in allen Teigen vorzufinden (pH 3,8 bis 4,1). Dies machte sich ebenfalls in den MSB-Keimzahlen bemerkbar, die nach 24 h für beide Stämme bei allen drei Temperaturen etwa bei

$10^9$  bis  $10^{10}$  KbE  $g^{-1}$  Teig lagen. Die Unterschiede für beide Stämme bezüglich des Wachstums waren nicht signifikant. Die Wachstumsoptima für die Spezies *L. plantarum* und *P. pentosaceus* liegen gemäß Deutscher Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bei 30°C, was sich für einzelne Stämme unterscheiden kann (vgl. auch BERGEY, 2005a, b). Aufgrund dessen waren die Unterschiede bezüglich des Wachstums der Stämme nicht ausschließlich von der Temperatur abhängig. Vielmehr galt es, das Zusammenspiel mit der Teigmatrix und die Veränderungen mit der Temperatur zu betrachten. MOORE *et al.* (2007) haben gezeigt, dass die Stämme *L. plantarum* FST 1.11, *L. plantarum* 2115 KW und *L. sakei* 1.52 bei einem Temperaturoptimum von 30°C innerhalb der ersten 50 h in glutenfreiem Substrat Unterschiede im Wachstum bis zu einer Zehnerpotenz zeigten. Zusätzlich haben NEUMANN *et al.* (2006) bei Roggensauerteig eine mit höherer Sauerteigtemperatur einhergehende Beschleunigung der Säuerung festgestellt. Temperaturen unter 30°C führen zu einem guten Stand des Teiges, einer etwas strafferen Krume des Broterzeugnisses bei kleinerem Volumen und einem säuerlichen Geschmack des Brotes. Temperaturen über 30°C machen den Teig etwas feuchter, die Krume dehnbarer, etwas grobporiger und dunkler und führen zu einem mild-aromatischen Brotgeschmack. Die eingesetzten Stämme zeigten durch diese Versuchsanordnung, dass sie bei Temperturvariationen stabil wuchsen und mit ihnen fermentierte Teige nach 24 h auch bei niedrigeren Temperaturen ähnliche Keimzahlen und pH-Werte aufwiesen.

Zentrale Stoffwechselprodukte innerhalb dieser Fermentationen bei 25, 30 und 35°C waren Glukose, Saccharose, Laktat und Acetat. Der Einfluss der Fermentations-temperatur auf die Stoffwechselprodukte im Teig ist bei höheren Temperaturen von 30 und 35°C tendenziell eher gegeben als bei 25°C. Die Produktion von Glukose, Laktat und Acetat findet bei hohen Fermentationstemperaturen in größeren Mengen statt. Gründe dafür sind das schnellere Wachstum der Stämme im Teig bei höheren Temperaturen und demnach Bildung von organischen Säuren. Zusätzlich hängt nach BRANDT (2006a) das Angebot niedermolekularer Kohlenhydrate von der Aktivität mikrobieller sowie getreideeigener Amylasen und der Anwesenheit von Enzyminhibitoren ab. Der schnellere Anstieg von Glukose und Saccharose im Teig folgt demnach aus der verbesserten amylytischen Enzymaktivität bei höheren Tempera-

turen. Zusätzlich wird durch die vermehrte Laktatproduktion der pH-Wert erniedrigt und so die Enzymaktivitäten verbessert (BOSKOV-HANSEN *et al.*, 2002).

Beim Vergleich der Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 mit den kommerziell erhältlichen Reissauerteigstarterkulturen der Fa. Böcker GmbH Co. KG und den Roggen- und Weizensauerteigstarterkultur der Fa. Blessing Biotech GmbH wurden annähernd äquivalente pH-Werte und Säuregrade in den Teigen über 24 h Fermentation bei 30°C gemessen. Die MSB-Keimzahlen der Fermentationen waren mit kleineren Abweichungen ähnlich. Die Potenz der industriellen Anwendung der Starterkulturen *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 für Amaranthfermentationen wurde durch dieses Vorabscreening bezüglich mikrobiologischer und chemischer Parameter erwiesen. Es könnte eine Kombination beider Stämme in einer Starterkultur eine vorteilhafte Lösung der industriellen Anwendung darstellen, indem die Vorzüge beider Stämme ausgenutzt werden. Die Teige würden durch *P. pentosaceus* RTa11 innerhalb von 10 h Fermentation schneller gesäuert werden, während nach 24 h die Teige durch *L. plantarum* RTa12 niedrigere pH-Werte und höhere Säuregrade aufweisen würden.

In dieser Arbeit wurden MSB von spontanen Amaranthsauerteigfermentationen isoliert, identifiziert und durch ihre biochemischen und technologischen Eigenschaften charakterisiert. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf die Evaluation der technologischen Wichtigkeit der Stämme gelegt, da sie potentielle Kandidaten einer industriellen Anwendung sein könnten. Die Versuchsanordnungen in dieser Arbeit erzielten zwei vielversprechende Stämme, *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11, welche interessante Vorteile als Einzelstammkultur oder in Kombination zeigten. Im Mittelpunkt nachfolgender Forschungsarbeiten stehen die technologische Anwendbarkeit der Stämme und die sensorischen Qualitäten von mit diesen Stämmen fermentiertem Amaranthsauerteigen.

## 5. Zusammenfassung

Spontan fermentierte Sauerteige, hergestellt aus fünf Amaranthmehlen, wurden auf die Präsenz von Milchsäurebakterien (MSB), welche in der autochthonen Mikrobiota im Mehl vorherrschten, überprüft. Die vorherrschenden Stämme wurden als Starterkulturen für Amaranthsauerteige in Erwägung gezogen. Die Teige wurden mit täglichem Anfrischen im Labormaßstab für zehn Tage bei 30°C und einer TA 200 fermentiert. Alle 24 Stunden wurden pH-Werte und Säuregrade bestimmt sowie Proben für die Keimzahlbestimmung von MSB und Hefen mit kulturabhängigen Methoden gezogen. Die Isolate wurden während der Fermentation mit RAPD-PCR mit zwei unterschiedlichen Primern auf Stammebene und mittels Sequenzierung der 16S rDNA auf Speziesebene identifiziert. Die Stämme *Lactobacillus plantarum* RTa12, *L. sakei* RTa14 und *Pediococcus pentosaceus* RTa11 wurden ausgewählt und in weiteren Laborfermentationen als Starterkulturen verwendet. Die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 waren in diesen Experimenten vorherrschend, sowohl als Einzel- oder Mehrstammstarter, und wurden für weitere Versuche aufgrund guter Fermentationseigenschaften ausgewählt. Während der ersten 24 h wuchsen die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 ziemlich ähnlich. Die pH-Werte fielen bei *P. pentosaceus* RTa11 etwas früher, während beide Stämme nach 10 h Fermentation die gleichen Werte zeigten. Es wurde die Wettbewerbsfähigkeit der beiden Stämme gegenüber der autochthonen Mikroflora evaluiert. Hier überwuchsen beide Stämme die anderen MSB der spontan fermentierten Teige innerhalb der ersten acht Stunden und waren somit über die residierende Mikrobiota dominant. Der Einfluss der Temperatur auf die Fermentationscharakteristika konnte für die MSB-Keimzahlen, die pH-Werte und die Säuregrade während der Fermentation vor allem bei 25°C beobachtet werden. Tendenziell konnten bei höheren Fermentationstemperaturen von 30 und 35°C höhere MSB-Keimzahlen erreicht werden als bei niedrigen Fermentationstemperaturen von 25°C. Die pH-Werte waren bei höheren Fermentationstemperaturen (30 und 35°C) während der Fermentation bei beiden Stämmen jeweils niedriger als bei 25°C, jedoch erreichten sie nach 24 h denselben Wert von etwa pH 4,0. Von dieser Vielzahl an Fermentationen wurden von repräsentativen Teigproben mittels HPLC-

Analysen Stoffwechselprofile für Kohlenhydrate, organische Säuren, Mannitol und Ethanol erstellt. Hauptmetabolite waren hier vor allem Glukose, Saccharose, Laktat und Acetat. Um die potentiellen Starterkulturen mit kommerziell schon verfügbaren Starterkulturen zu vergleichen wurden in diesem Rahmen Fermentationen über 24 h bei 30°C durchgeführt. Beide Stämme konnten sowohl bezüglich der MSB-Keimzahlen, der pH-Werte als auch der Säuregrade mit den kommerziellen Starterkulturen konkurrieren. Aufgrund der Dominanz der beiden Stämme in Amaranthfermentationen, dem Säuerungsvermögen in kurzer Zeit, der Wettbewerbsfähigkeit gegenüber der autochthonen Mikrobiota, der Robustheit gegenüber kleineren Umwelteinflüssen, wie z. B. Temperaturschwankungen, und die Konkurrenzfähigkeit gegenüber kommerziell erhältlichen Sauerteigstartern sind die Stämme *L. plantarum* RTa12 und *P. pentosaceus* RTa11 interessante Kandidaten für die industrielle Anwendung als Starterkulturen in Amaranthsauerteigen.

## 6. Anhang

**Tabelle 15.** Vergleich der kompletten 16S rDNA-Sequenz des Isolates *Lactobacillus sakei* RTa14 (= Query; Accession No. FM 179608) mit *L.sakei* 23 K (= Sbjct; Accession No. CR936503; CHAILLOU *et al.*, 2005). Identisch zu 99,9% mit 1540 von 1542 Übereinstimmungen.

Query 1	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAA	60
Sbjct 306199	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAA	306258
Query 61	GGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG	120
Sbjct 306259	GGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG	306318
Query 121	GTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACC	180
Sbjct 306319	GTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACC	306378
Query 181	TAAACCCGCATGGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGC	240
Sbjct 306379	TAAACCCGCATGGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGC	306438
Query 241	GGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTG	300
Sbjct 306439	GGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTG	306498
Query 301	AGAGGGTAATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	360
Sbjct 306499	AGAGGGTAATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	306558
Query 361	TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG	420
Sbjct 306559	TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG	306618
Query 421	TTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGT	480
Sbjct 306619	TTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGT	306678
Query 481	AGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	540
Sbjct 306679	AGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	306738
Query 541	TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTAT G GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG	600
Sbjct 306739	TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTAT T GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG	306798
Query 601	TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT	660
Sbjct 306799	TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT	306858
Query 661	GCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA A ATATATGGAAGAAC	720
Sbjct 306859	GCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA G ATATATGGAAGAAC	306918
Query 721	ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTA	780
Sbjct 306919	ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTA	306978

**Tabelle 15 (Forts.).** Vergleich der kompletten 16S rDNA-Sequenz des Isolates *Lactobacillus sakei* RTa14 (= Query; Accession No. FM 179608) mit *L.sakei* 23 K (= Sbjct; Accession No. CR936503; CHAILLOU *et al.*, 2005). Identisch zu 99,9% mit 1540 von 1542 Übereinstimmungen.

Query 781	GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGA	840
Sbjct 306979	GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGA	307038
Query 841	GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC	900
Sbjct 307039	GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC	307098
Query 901	CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT	960
Sbjct 307099	CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT	307158
Query 961	TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGA	1020
Sbjct 307159	TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGA	307218
Query 1021	TAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC	1080
Sbjct 307219	TAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC	307278
Query 1081	GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTT	1140
Sbjct 307279	GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTT	307338
Query 1141	AGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA	1200
Sbjct 307339	AGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA	307398
Query 1201	ATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTT	1260
Sbjct 307399	ATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTT	307458
Query 1261	GCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC	1320
Sbjct 307459	GCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC	307518
Query 1321	AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA	1380
Sbjct 307519	AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA	307578
Query 1381	CGTCCC GGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCC	1440
Sbjct 307579	CGTCCC GGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCC	307638
Query 1441	GGTGAGGTAACCCTTCGGGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGT	1500
Sbjct 307639	GGTGAGGTAACCCTTCGGGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGT	307698
Query 1501	CGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCT	1542
Sbjct 307699	CGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCT	307740

**Tabelle 16.** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum* RTa12, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	2	4	5	6
<b>D(-)-Fruktose</b>	8,5±0,2	9,3±0,5	9,7±0,4	10,9±0,8	10,4±0,2
<b>D(+)-Glukose</b>	41,7±1,9	129,2±3,8	162,9±5,7	245,9±9,5	284,0±1,9
<b>D(+)-Saccharose</b>	21,9±3,1	24,6±0,7	19,5±4,2	24,0±6,4	18,1±1,3
<b>Cellobiose</b>	22,6±1,2	19,1±1,0	15,1±0,3	21,3±0,0	14,6±1,0
<b>D-Maltose</b>	5,4±0,2	5,7±0,4	5,4±0,1	6,7±2,1	5,4±0,2
<b>D(-)-Mannitol</b>	30,7±1,4	37,3±2,9	45,3±5,7	50,3±4,5	47,3±5,3
<b>Trehalose</b>	7,0±1,6	8,3±1,4	6,7±1,1	7,1±2,1	6,0±0,7
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	1,4±0,0	1,9±0,8
<b>Formiat</b>	6,1±0,3	8,1±0,2	9,1±0,7	10,0±1,3	10,1±0,2
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Laktat</b>	1,1±0,1	2,0±0,6	7,3±0,1	15,4±0,7	34,5±0,1
<b>Succinat</b>	1,6±0,4	1,8±0,1	2,3±0,1	2,2±0,2	1,8±0,1
<b>Citrat</b>	1,9±0,0	2,2±0,1	1,9±0,3	2,1±0,2	2,1±0,2
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	4,8±0,2	4,9±0,3

**Tabelle 16 (Forts.).** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum* RTa12, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	7	8	9	10	12
<b>D(-)-Fruktose</b>	10,1±0,3	10,3±0,5	9,8±0,2	9,8±0,8	10,3±0,4
<b>D(+)-Glukose</b>	249,5±4,1	263,8±5,4	263,8±4,7	250,4±11,4	263,8±9,7
<b>D(+)-Saccharose</b>	13,9±0,7	16,5±1,8	13,7±0,7	12,2±3,4	9,5±1,3
<b>Cellobiose</b>	12,7±0,3	11,2±0,4	12,2±0,9	11,1±3,2	10,2±1,1
<b>D-Maltose</b>	5,2±0,0	5,1±0,0	5,1±0,0	5,2±0,2	5,2±0,1
<b>D(-)-Mannitol</b>	44,0±1,8	52,9±5,2	51,6±0,9	51,1±10,8	51,7±9,8
<b>Trehalose</b>	5,2±0,2	5,4±0,5	5,0±0,0	5,8±1,2	5,6±0,3
<b>Gentiobiose</b>	3,5±0,7	6,5±0,3	5,2±0,5	5,2±2,5	7,4±2,6
<b>Formiat</b>	12,5±1,6	16,8±0,7	15,5±0,7	16,9±0,1	15,9±0,4
<b>Acetat</b>	0±0	0,9±0,4	1,9±0,3	2,9±0,2	4,2±0,1
<b>Propionat</b>	0±0	1,1±0,1	1,4±0,0	1,3±0,0	1,8±0,0
<b>Laktat</b>	64,1±0,3	87,9±0,1	105,6±0,2	120,7±0,1	139,4±0,7
<b>Succinat</b>	1,9±0,0	2,4±0,2	2,2±0,2	2,9±0,0	3,4±0,2
<b>Citrat</b>	2,5±0,8	1,6±0,0	2,0±0,0	1,6±0,2	2,2±0,1
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	1,6±0,4	1,4±0,4	1,5±0,0	1,3±0,0
<b>Butyrat</b>	5,3±0,3	5,1±0,2	5,9±0,3	5,5±0,6	6,0±0,6

**Tabelle 16 (Forts.).** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum* RTa12, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]		
	14	16	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	11,4±0,9	11,3±0,3	12,3±0,2
<b>D(+)-Glukose</b>	265,2±9,5	311,5±4,2	267,8±2,5
<b>D(+)-Saccharose</b>	8,3±1,3	7,3±0,2	4,8±0,1
<b>Cellobiose</b>	9,0±1,4	7,8±0,1	5,9±0,1
<b>D-Maltose</b>	5,1±0,0	5,1±0,0	5,1±0,0
<b>D(-)-Mannitol</b>	53,0±8,9	55,1±1,1	50,2±0,6
<b>Trehalose</b>	5,3±0,5	5,4±0,3	5,0±0,1
<b>Gentiobiose</b>	8,3±1,7	8,2±0,1	5,0±0,1
<b>Formiat</b>	17,2±0,4	17,2±0,0	18,8±0,2
<b>Acetat</b>	5,7±0,1	6,1±0,1	7,4±0,3
<b>Propionat</b>	2,3±0,1	2,2±0,3	2,4±0,1
<b>Laktat</b>	158,0±0,4	167,8±0,5	194,9±0,1
<b>Succinat</b>	2,9±0,1	2,9±0,4	2,8±0,3
<b>Citrat</b>	2,7±0,1	2,8±0,2	2,6±0,1
<b>Iso-Butyrat</b>	1,8±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1
<b>Butyrat</b>	5,2±0,5	5,5±0,3	4,9±0,8

**Tabelle 17.** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	2	4	5	6
<b>D(-)-Fruktose</b>	29,6±0,9	29,9±0,2	30,8±0,9	32,1±1,4	30,9±0,4
<b>D(+)-Glukose</b>	95,6±8,1	123,6±1,3	186,2±1,5	161,9±0,5	154,4±0,2
<b>D(+)-Saccharose</b>	33,6±4,2	26,5±4,6	31,4±1,0	24,3±1,3	21,9±1,6
<b>Cellobiose</b>	41,5±5,3	25,9±2,8	27,5±3,4	29,0±0,3	25,4±3,0
<b>D-Maltose</b>	20,6±0,5	20,5±0,6	21,0±1,0	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	84,4±1,3	113,8±1,5	119,9±3,5	118,6±2,4	117,0±2,8
<b>Trehalose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	8,9±0,0	9,5±0,2	11,7±0,4	12,0±0,0	12,5±0,6
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	1,2±0,5	1,5±0,6
<b>Laktat</b>	0,7±0,0	0,9±0,1	8,7±0,5	24,4±0,2	55,4±0,3
<b>Succinat</b>	2,3±0,5	2,0±0,5	2,4±0,3	2,3±0,4	2,3±0,2
<b>Citrat</b>	1,8±0,1	2,3±0,1	2,1±0,2	2,2±0,0	1,8±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	0±0	0±0	6,1±0,7	4,4±0,6	7,3±0,4

**Tabelle 17 (Forts.).** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	7	8	9	10	12
<b>D(-)-Fruktose</b>	31,5±1,1	31,0±0,6	31,2±0,1	33,2±1,3	33,4±0,5
<b>D(+)-Glukose</b>	199,4±3,0	138,0±0,0	164,2±2,0	164,0±7,7	166,3±1,6
<b>D(+)-Saccharose</b>	23,4±2,6	21,0±2,0	20,6±0,7	20,6±1,6	17,6±0,6
<b>Cellobiose</b>	25,0±2,4	22,6±3,3	23,1±1,6	23,5±1,0	18,8±1,0
<b>D-Maltose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	122,7±3,2	118,7±2,5	118,8±0,7	118,7±0,1	119,3±2,8
<b>Trehalose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	13,7±0,4	16,2±0,1	16,8±0,0	19,1±0,9	19,3±0,2
<b>Acetat</b>	0±0	1,2±0,3	2,2±0,1	1,9±0,2	4,4±0,1
<b>Propionat</b>	1,0±0,0	1,4±0,1	1,2±0,1	2,1±0,4	1,8±0,1
<b>Laktat</b>	83,2±0,3	98,2±0,3	111,8±0,2	120,3±0,0	134,8±0,1
<b>Succinat</b>	2,5±0,4	3,1±0,7	2,1±0,4	2,7±0,0	2,7±0,2
<b>Citrat</b>	2,0±0,1	1,9±0,0	1,9±0,0	2,0±0,0	2,1±0,2
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	6,6±0,2	6,0±0,5	5,0±0,4	5,6±0,4	4,3±0,6

**Tabelle 17 (Forts.).** Konzentrationen [mM] der Metabolite innerhalb der ersten 24 h der Fermentation bei 30°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]		
	14	16	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	36,5±1,5	34,2±0,6	38,1±2,9
<b>D(+)-Glukose</b>	224,7±5,4	169,5±0,9	177,5±4,8
<b>D(+)-Saccharose</b>	18,3±1,0	15,9±0,9	0±0
<b>Cellobiose</b>	18,8±1,4	16,0±0,9	0±0
<b>D-Maltose</b>	0±0	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	124,6±1,8	120,6±2,4	123,7±5,6
<b>Trehalose</b>	0±0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	20,1±1,0	18,9±0,4	27,7±1,0
<b>Acetat</b>	5,7±0,2	6,0±0,1	7,4±0,1
<b>Propionat</b>	2,4±0,3	2,4±0,1	2,8±1,7
<b>Laktat</b>	144,4±0,8	152,3±0,1	173,6±0,2
<b>Succinat</b>	2,7±0,3	3,0±0,6	2,6±0,2
<b>Citrat</b>	1,9±0,3	2,1±0,1	2,2±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	4,9±0,2	5,3±1,1	7,8±1,2

**Tabelle 18.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 25°C mit *L. plantarum* RTa12, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	9,8±0,1	10,5±0,2	11,8±0,7	11,4±1,1	12,7±0,6
<b>D(+)-Glukose</b>	41,3±2,5	139,3±4,1	141,8±2,5	202,8±7,6	256,6±7,6
<b>D(+)-Saccharose</b>	19,2±1,9	11,4±3,8	13,0±3,7	15,0±4,1	8,7±1,1
<b>Cellobiose</b>	26,9±3,4	19,0±2,9	33,6±4,8	22,0±9,7	16,1±3,8
<b>D-Maltose</b>	7,0±0,6	7,2±1,0	8,6±0,7	7,2±0,4	6,9±0,5
<b>D(-)-Mannitol</b>	38,9±1,1	46,3±3,1	52,1±1,6	57,8±4,3	65,6±2,9
<b>Trehalose</b>	15,2±1,9	10,2±0,2	7,4±2,1	5,9±1,8	3,6±0,5
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	7,5±0,3	9,4±0,1	13,6±0,8	7,8±0,8	11,9±0,2
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	3,4±0,1
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	3,4±0,2	1,7±0,0
<b>Laktat</b>	0±0	1,5±0,0	13,4±0,1	70,2±0,4	153,8±0,1
<b>Succinat</b>	2,2±0,1	1,4±0,3	2,1±0,1	1,5±0,4	2,9±0,0
<b>Citrat</b>	3,8±0,2	2,7±0,2	3,0±0,0	2,5±0,2	0,7±0,1
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	1,7±0,1
<b>Butyrat</b>	0±0	0±0	4,3±0,1	6,4±1,1	4,9±0,3

**Tabelle 19.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 30°C mit *L. plantarum RTa12*, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fructose</b>	9,9±0,1	11,4±0,4	11,2±0,1	10,9±0,1	14,1±0,7
<b>D(+)-Glucose</b>	42,7±1,9	158,5±1,1	230,0±4,8	288,4±5,3	292,5±2,5
<b>D(+)-Saccharose</b>	21,1±2,3	19,7±0,6	15,9±0,8	11,6±0,6	6,1±0,6
<b>Cellobiose</b>	30,3±7,8	26,5±3,6	20,2±2,2	16,0±3,8	9,6±3,5
<b>D-Maltose</b>	7,4±0,0	8,7±0,2	6,5±0,1	4,8±3,7	7,1±0,2
<b>D(-)-Mannitol</b>	38,9±0,4	54,0±3,1	60,7±0,4	58,8±5,5	66,5±8,8
<b>Trehalose</b>	2,7±0,3	7,3±1,1	4,9±0,3	4,1±2,6	3,9±0,2
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	6,7±0,8	10,7±0,0	11,7±0,4	12,9±0,5	19,3±0,7
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	3,5±0,3	6,1±0,3
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	2,0±0,4	2,6±0,1
<b>Laktat</b>	0±0	6,0±0,1	75,5±0,2	139,0±0,2	184,1±0,1
<b>Succinat</b>	2,0±0,2	2,1±0,2	1,9±0,0	2,7±0,1	2,9±0,0
<b>Citrat</b>	3,9±0,1	2,7±0,3	2,2±0,0	0,6±0,0	0,5±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	1,9±0,2	2,0±0,1
<b>Butyrat</b>	0±0	0±0	4,6±1,0	4,1±0,0	3,8±0,0

**Tabelle 20.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 35°C mit *L. plantarum* RTa12, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	9,9±0,0	11,6±0,7	10,7±0,2	12,0±0,1	14,8±1,7
<b>D(+)-Glukose</b>	43,8±5,5	235,1±7,6	238,7±2,5	236,9±5,1	288,9±2,5
<b>D(+)-Saccharose</b>	22,2±4,0	20,9±6,0	11,8±0,9	8,4±1,5	5,1±0,2
<b>Cellobiose</b>	39,1±8,5	19,0±7,9	15,7±0,9	16,8±6,1	6,3±0,9
<b>D-Maltose</b>	6,8±0,4	7,8±0,4	7,0±0,1	7,2±0,0	7,3±0,1
<b>D(-)-Mannitol</b>	38,9±1,0	54,7±0,5	57,3±1,9	58,3±3,7	71,7±0,9
<b>Trehalose</b>	5,6±0,2	5,6±2,6	1,6±0,1	3,1±0,5	3,9±2,4
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	5,8±0,0	10,8±1,2	17,2±0,8	17,0±0,8	21,6±0,7
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	2,8±0,3	6,0±0,1	7,7±0,4
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	1,6±0,1	2,6±0,1	3,2±0,2
<b>Laktat</b>	1,1±0,3	10,3±0,3	105,8±1,9	160,8±0,3	190,2±0,2
<b>Succinat</b>	2,0±0,2	2,6±0,1	2,4±0,3	3,0±0,2	2,7±0,4
<b>Citrat</b>	3,5±0,3	3,6±0,2	1,4±0,0	0,5±0,1	0,4±0,1
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	1,4±0,1	1,9±0,3	2,0±0,1
<b>Butyrat</b>	0±0	5,8±0,1	5,4±0,9	4,3±0,6	4,2±0,6

**Tabelle 21.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 25°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	28,0±0,3	28,9±2,0	29,2±0,5	29,2±0,4	31,2±0,5
<b>D(+)-Glukose</b>	76,0±1,1	115,8±8,6	155,9±7,6	163,6±10,6	210,0±11,3
<b>D(+)-Saccharose</b>	19,4±1,2	23,0±0,0	22,1±1,0	20,6±0,8	17,0±0,1
<b>Cellobiose</b>	19,1±0,8	20,5±0,0	20,0±2,4	18,0±2,8	12,4±0,3
<b>D-Maltose</b>	19,1±0,2	19,1±0,3	18,9±0,2	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	113,0±3,5	114,0±0,2	117,4±0,5	119,0±0,9	119,7±1,2
<b>Trehalose</b>	2,6±0,4	2,8±0,6	1,7±0,0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	1,5±0,0	6,8±0,3	9,7±1,2	3,9±0,0	9,3±1,0
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	7,0±0,0
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	2,4±0,6
<b>Laktat</b>	0,5±0,2	1,9±0,0	18,9±0,1	87,8±0,1	138,3±0,5
<b>Succinat</b>	1,5±0,3	2,2±0,2	2,4±0,1	2,6±0,2	5,0±0,3
<b>Citrat</b>	2,9±0,2	2,3±0,1	2,4±0,2	2,0±0,1	2,1±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	0±0	0±0	4,8±0,1	5,6±0,5	5,2±0,0

**Tabelle 22.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 30°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	27,5±0,2	27,5±0,3	31,0±2,9	30,0±0,5	34,6±0,1
<b>D(+)-Glukose</b>	70,6±1,0	128,4±7,7	167,7±9,3	204,0±1,1	247,5±0,1
<b>D(+)-Saccharose</b>	22,4±0,8	22,4±1,6	19,5±0,6	18,3±0,1	16,1±0,3
<b>Cellobiose</b>	21,6±2,5	21,6±4,1	16,3±1,6	15,2±0,3	10,9±0,3
<b>D-Maltose</b>	18,9±0,1	19,4±0,4	0±0	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	111,2±0,5	117,5±3,5	119,2±2,0	120,6±2,1	126,7±0,2
<b>Trehalose</b>	2,1±0,1	2,5±0,4	0±0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	6,8±0,6	10,1±0,1	9,0±0,6	14,0±0,2	16,4±0,7
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	0±0	4,7±0,1	7,0±0,1
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	0±0	1,7±0,1	2,9±0,2
<b>Laktat</b>	0±0	6,4±0,7	87,3±0,1	122,2±0,4	155,1±0,9
<b>Succinat</b>	1,4±0,3	2,0±0,3	2,2±0,5	2,4±0,3	3,6±0,6
<b>Citrat</b>	2,5±0,1	2,7±0,7	1,8±0,0	2,0±0,2	2,0±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	0±0	5,0±0,3	4,0±0,0	4,9±0,5	4,3±0,7

**Tabelle 23.** Konzentrationen [mM] der Metabolite nach 0, 4, 8, 12 und 24 h der Fermentation bei 35°C mit *P. pentosaceus* RTa11, analysiert mit HPLC.

Analyten	Zeit [h]				
	0	4	8	12	24
<b>D(-)-Fruktose</b>	27,7±0,3	29,3±0,2	29,6±0,8	30,6±0,1	38,0±1,8
<b>D(+)-Glukose</b>	89,6±2,2	184,5±1,7	170,6±2,3	164,0±3,9	243,6±5,1
<b>D(+)-Saccharose</b>	22,5±3,8	19,8±0,0	18,3±2,1	15,9±1,3	14,9±0,1
<b>Cellobiose</b>	24,0±3,1	18,8±4,7	14,3±2,1	11,4±2,3	10,4±0,4
<b>D-Maltose</b>	19,5±0,3	18,8±0,1	0±0	0±0	0±0
<b>D(-)-Mannitol</b>	115,0±2,4	120,0±0,8	120,7±0,3	120,3±0,2	122,9±7,1
<b>Trehalose</b>	2,9±0,1	2,4±0,4	0±0	0±0	0±0
<b>Gentiobiose</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Formiat</b>	4,3±0,7	4,3±0,6	4,8±1,2	20,1±0,7	27,5±3,8
<b>Acetat</b>	0±0	0±0	2,2±0,0	3,7±0,0	5,1±0,0
<b>Propionat</b>	0±0	0±0	1,9±0,4	2,2±0,2	2,7±0,1
<b>Laktat</b>	0±0	19,5±0,2	119,8±0,6	145,3±0,6	178,6±0,8
<b>Succinat</b>	1,2±0,3	1,9±0,2	2,7±0,6	2,6±0,1	4,0±0,8
<b>Citrat</b>	3,2±0,0	2,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,1	2,1±0,0
<b>Iso-Butyrat</b>	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Butyrat</b>	0±0	4,0±0,3	5,0±0,6	4,9±0,7	6,4±0,4

## 7. Literaturverzeichnis

ALVAREZ-JUBETE, L., E. K. ARENDT und E. GALLAGHER. 2009. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 22:1-18.

ARAÚJO, W. L., J. MARCON, W. MACCHERONI, JR., J. D. VAN ELSAS, J. W. L. VAN VUURDE und J. L. AZEVEDO. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 16:4906-4914.

BADIOUI, F., N. SAKLY, M. HASSINE und H. SAFFAR. 2006. Prevalence of celiac disease in Tunisian blood donors. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 30:33-36.

BECKER, R., E. L. WHEELER, K. LORENZ, A. E. STAFFORD, O. K. GROSSJEAN, A. A. BETSCHART und R. M. SAUNDERS. 1981. A compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.* 46:1175-1180.

BEJOSANO, F. P. und H. CORKE. 1998. Protein quality evaluation of *Amaranthus* wholemeal flours and protein concentrates. *J. Sci. Food Agric.* 76:100-106.

BERGEY, D. H. 2005a. Volume two: The Proteobacteria, S. 1079. *In*: D. J. BRENNER, N. R. KRIEG und J. T. STALEY (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. Ausgabe, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

BERGEY, D. H. 2005b. Volume two: The Proteobacteria, S. 1229. *In*: D. J. BRENNER, N. R. KRIEG und J. T. STALEY (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. Ausgabe, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

BJORKROTH, K. J., U. SCHILLINGER, R. GEISEN, N. WEISS, B. HOSTE, W. H. HOLZAPFEL, H. J. KORKEALA und P. VANDAMME. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:141-148.

BÖCKER, G., P. STOLZ und W. P. HAMMES. 1995. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfransisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl Brot.* 49:370-374.

- BOSKOV-HANSEN, H., M. F. ANDERSEN, L. M. NIELSEN, K.-E. BACK-KNUDSEN, A. S. MEYER, L. P. CHRISTENSEN und A. HANSEN. 2002. Chances in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread making. *Eur. Food Res. Technol.* 214:33-42.
- BRANDT, M. 2001. Mikrobiologische Wechselwirkungen von technologischer Bedeutung in Sauerteigen. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- BRANDT, M. 2006a. Bedeutung von Rohwarenkomponten, S. 41-55. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), *Handbuch Sauerteig*, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- BRANDT, M. 2006b. Bedeutung von Sauerteig für die Brotqualität, S. 21-39. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), *Handbuch Sauerteig*, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- BRESSANI, R., L. VELÁSQUEZ und E. ACEVEDO. 1990. Dietary fiber content in various grain amaranth species and effect of processing. *Amaranth Newsl.* 1:5-8.
- CAI, Y., H. OKADA, H. MORI, Y. BENNO und T. NAKASE. 1999. *Lactobacillus paralimentarius* sp. nov., isolated from sourdough. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1451-1455.
- CATASSI, C. und A. FASANO. 2008. Celiac disease, S. 1-27. In E. ARENDT und F. DAL BELLO (Hrsg.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, 1. Auflage, Elsevier Inc., Burlington, USA.
- CHACON, P. A., P. MUTHUKUMARASAMY und R. A. HOLLEY. 2006. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from fermented dry sausages at an organoleptically acceptable level of microencapsulated allyl isothiocyanate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3096-3102.
- CHAILLOU, S., M. C. CHAMPOMIER-VERGES, M. CORNET, A. M. CRUTZ-LE COQ, A. M. DUDEZ, V. MARTIN, S. BEAUFILS, E. DARBON-RONGERE, R. BOSSY, V. LOUX und M. ZAGOREC. 2005. *Nat. Biotechnol.* 23:1527-1533.

- COCAIGN-BOUSQUET, M., C. GARRIGUES, P. LOUBIERE und N. D. LINDLEY. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:253-267.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2008. Draft revised standard for gluten-free foods, Step 8. ALINORM 08/31/26.
- CORSETTI, A., M. DE ANGELIS, F. DELLAGLIO, A. PAPARELLA, P. F. FOX, L. SETTANNI und M. GOBBETTI. 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.* 94:641-654.
- CORSETTI, A., M. GOBBETTI, J. ROSSI und P. DAMIANI. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfransisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:253-256.
- CORSETTI, A., P. LAVERMICOCCA, M. MOREA, F. BARUZZI, N. TOSTIC und M. GOBBETTI. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 64:95-104.
- CORSETTI, A., L. SETTANNI, S. VALMORRI, M. MASTRANGELO und G. SUZZI. 2007. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory scale-fermentations. *Food Microbiol.* 24:592-600.
- CORSETTI, A., L. SETTANNI und D. VAN SINDEREN. 2004. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. *J. Appl. Microbiol.* 96:521-534.
- CROWLEY, P., T. SCHOBBER, C. CLARKE und E. ARENDT. 2002. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *Eur. Food Res. Technol.* 214:489-496.
- CSELOVSZKY, J., G. WOLF und W. P. HAMMES. 1992. Production of formate, acetate, and succinate by anaerobic fermentation of *Lactobacillus pentosus* in the presence of citrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:94-97.

- DE ANGELIS, M., L. MARIOTTI, J. ROSSI, M. SERVILI, P. F. FOX, G. ROLLÁN und M. GOBBETTI. 2002. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6193-6201.
- DE VUYST, L. und P. NEYSENS. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 16:43-56.
- DE VUYST, L. und M. VANCANNEYT. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 24:120-127.
- FASANO, A., I. BERTI, T. GERARDUZZI, T. NOT, R. B. COLLETTI, S. DRAGO, Y. ELITSUR, P. H. GREEN, S. GUANDALINI, I. D. HILL, M. PIETZAK, A. VENTURA, M. THORPE, D. KRYSZAK, F. FORNAROLI, S. S. WASSERMAN, J. A. MURRAY und K. HORVATH. 2003. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.* 163:286-292.
- FASANO, A. und C. CATASSI. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 120:636-651.
- FERCHICHI, M., R. VALCHEVA, H. PRÉVOST, B. ONNO und X. DOUSSET. 2007. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food. Microbiol.* 24:678-686.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 2007. Food labeling; Gluten-free labeling of foods. Proposed rule. *Fed. Reg.* 72:2795-2817.
- GALAL, A. M., J. A. JOHNSON und E. VARRIANO-MARSTON. 1978. Lactic and volatile (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) organic acids of San Francisco sourdough french bread. *Cereal Chem.* 55:461-468.
- GALLAGHER, E., T. R. GORMLEYA und E. K. ARENDT. 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci. Technol.* 15:143-152.

- GAMEL, T. H., J. P. LINSSEN, A. S. MESALLEM, A. A. DAMIR und L. A. SHEKIB. 2005. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *J. Sci. Food Agric.* 85:315-327.
- GAMEL, T. H., J. P. LINSSEN, A. S. MESALLEM, A. A. DAMIR und L. A. SHEKIB. 2006. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *J. Sci. Food Agric.* 86:82-89.
- GÄNZLE, M. G. 2006a. Mikrobiologie des Sauerteiges, S. 77-107. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), *Handbuch Sauerteig*, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- GÄNZLE, M. G. 2006b. Physiologie und Biochemie der Mikroflora des Sauerteiges, S. 109-183. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), *Handbuch Sauerteig*, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- GÄNZLE, M. G. und M. J. BRANDT. 2006. Begriffsbestimmungen und lebensmittelrechtliche Aspekte, S. 7-19. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), *Handbuch Sauerteig*, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.
- GÄNZLE, M. G., N. VERMEULEN und R. F. VOGEL. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* 24:128-138.
- GEREZ, C. L., G. C. ROLLÁN und G. F. DE VALDEZ. 2006. Gluten breakdown by lactobacilli and pediococci strains isolated from sourdough. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:459-464.
- GIRAFFA, G., C. ANDRIGHETTO, C. ANTONELLO, M. GATTI, C. LAZZI, G. MARCAZZAN, A. LOMBARDI und E. NEVIANI. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int. J. Food Microbiol.* 91:129-139.
- GIRAFFA, G., A. PARIS, L. VALCAVI, M. GATTI und E. NEVIANI. 2001. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 91:937-943.
- GOBBETTI, M. 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci. Technol.* 9:267-274.

- GOBBETTI, M. und A. CORSETTI. 1996. Co-metabolism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp *lindneri* CB1 citrate-negative strain: effect on growth, end-products and sourdough fermentation. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 203:82-87.
- GOBBETTI, M. und A. CORSETTI. 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. Food Microbiol. 14:175-187.
- GOBBETTI, M., A. CORSETTI, J. ROSSI, F. LAROSA und S. DEVINCENZI. 1994. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. Ital. J. food Sci. 1:85-94.
- GOBBETTI, M., M. DE ANGELIS, P. ARNAUT, P. TOSSUT, A. CORSETTI und P. LAVERMICOCCA. 1999a. Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiol. 16:409-418.
- GOBBETTI, M., M. DE ANGELIS, A. CORSETTI und R. DI CAGNO. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends Food Sci. Technol. 16:57-69.
- GOBBETTI, M., M. DE ANGELIS, R. DI CAGNO und C. G. RIZZELLO. 2008. Sourdough/lactic acid bacteria, S. 267-288. In E. ARENDT und F. DAL BELLO (Hrsg.), Gluten-Free Cereal Products and Beverages, 1. Auflage, Elsevier Inc., Burlington, USA.
- GOBBETTI, M., P. LAVERMICOCCA, F. MINERVINI, M. ANGELIS und A. CORSETTI. 1999b. Arabinose fermentation by *L. plantarum* in sourdough with added pentosans and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase: a tool to increase the production of acetic acid. J. Appl. Microbiol. 88: 317-324.
- GONZALEZ, R., C. CARRARA, E. TOSI, M. C. ANON und A. PILOSOFF. 2007. Amaranth starch-rich fraction properties modified by extrusion and fluidized bed heating. Food Sci. Technol. Res. 40:136-143.
- GORINSTEIN, S., E. PAWELZIK, E. DELGADO-LICON, R. HARUENKIT, M. WEISZ und S. TRAKHTENBERG. 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. J. Sci. Food Agric. 82:886-891.

GREEN, P. H. R. und C. CELLIER. 2007. Celiac disease. *N. Engl. J. Med.* 357:1731-1743.

HABOUBI, N. Y., S. TAYLOR und S. JONES. 2006. Celiac disease and oats: a systematic review. *Postgrad. Med. J.* 82:672-678.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

HAMAD, S. H., M. C. DIENG, M. A. EHRMANN und R. F. VOGEL. 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J. Appl. Microbiol.* 83:764-770.

HAMMES, W. P. und M. G. GÄNZLE. 1998. Sourdough breads and related products, S. 199-216. *In* B. J. B. WOOD (Hrsg.), *Microbiology of fermented foods*, 2. Auflage, Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.

HAMMES, W. P. und C. HERTEL. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49:125-138.

HAMMES, W. P., P. STOLZ und M. G. GÄNZLE. 1996. Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advances in Food Sci.* 18:176-184.

HUCH NÉE KOSTINEK, M., A. HANAK, I. SPECHT, C. M. DORTU, P. THONART, S. MBUGUA, W. H. HOLZAPFEL, C. HERTEL und C. M. FRANZ. 2008. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. *Int. J. Food Microbiol.* 128:258-267.

HÜFNER, E., T. MARKIETON, S. CHAILLOU, A.-M. CRUTZ-LE COQ, M. ZAGOREC und C. HERTEL. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2522-2531.

HURTADO-VALENZUELA, J. G., N. SOTELO-CRUZ, G. LÓPEZ-CERVANTES und A. M. CALDERÓN DE LA BARCA. 2008. Tetany caused by chronic diarrhea in a child with celiac disease: A case report. *Cases J.* 1:176.

INDERLIED, C. B. und P. S. SYPHERD. 1978. Glucose metabolism and dimorphism in *Mucor*. J. Bacteriol. 133:1282-1286.

JUNG, M. J., D. H. BAEK und S. D. KIMS. 2004. Identification of bacteria from fermented Korean traditional foods. GenBank direct submission.

KANDLER, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 49:209-224.

KLAENHAMMER, T., E. ALTERMANN, F. ARIGONI, A. BOLOTIN, F. BREIDT, J. BROADBENT, R. CANO, S. CHAILLOU, J. DEUTSCHER, M. GASSON, M. VAN DE GUCHTE, J. GUZZO, A. HARTKE, T. HAWKINS, P. HOLS, R. HUTKINS, M. KLEEREBEZEM, J. KOK, O. KUIPERS, M. LUBBERS, E. MAGUIN, L. MCKAY, D. MILLS, A. NAUTA, R. OVWERBEEK, H. PEL, D. PRIDMORE, M. SAIER, D. VAN SINDEREN, A. SOROKIN, J. STEELE, D. O'SULLIVAN, W. DE VOS, B. WEIMER, M. ZAGOREC und R. SIEZEN. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek 82:29-58.

KLEEREBEZEM, M., J. BOEKHORST, R. VAN KRANENBURG, D. MOLENAAR, O. P. KUIPERS, R. LEER, R. TARCHINI, S. A. PETERS, H. M. SANDBRINK, M. FIERS, W. STIEKEMA, R. M. K. LANKHORST, P. A. BRON, S. M. HOFFER, M. N. N. GROOT, R. KERKHOVEN, M. DE VRIES, B. USING, W. M. DE VOS und R. J. SIEZEN. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:1990-1995.

KLEINSCHMIT, D. H. und L. KUNG, JR. 2006. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. J. Dairy Sci. 89:3999-4004.

KORAKLI, M., A. ROSSMANN, M. G. GÄNZLE und R. F. VOGEL. 2001. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. J. Agric. Food Chem. 49:5194-5200.

KORAKLI, M., E. SCHWARZ, G. WOLF und W. P. HAMMES. 2000. Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*. Advances in Food Sci. 22:1-4.

LEROY, F. und L. DE VUYST. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Technol. 15:67-78.

LEROY, F., J. VERLUYTEN und L. DE VUYST. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106:270-285.

LESTER, D. R. 2008. Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods* 4:26.

LILJEBERG, H. G. und I. M. BJÖRCK. 1996. Delayed gastric emptying rate as a potential mechanism for lowered glycemia after eating sourdough bread: studies in humans and rats using test products with added organic acids or an organic salt. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:886-893.

LOMBARDI, A., L. DAL MAISTRO, P. DE DEA, M. GATTI, G. GIRAFFA und E. NEVIANI. 2002. A polyphasic approach to highlight genotypic and phenotypic diversities of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from dairy starter cultures and cheeses. *J. Dairy Res.* 69:139-149.

LÜCK, E. und M. JAGER. 1995a. Ameisensäure, S. 137-142. *In* E. LÜCK und M. JAGER (Hrsg.), *Chemische Lebensmittelkonservierung*, 3. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

LÜCK, E. und M. JAGER. 1995b. Propionsäure, S. 150-157. *In* E. LÜCK und M. JAGER (Hrsg.), *Chemische Lebensmittelkonservierung*, 3. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.

MÄKI, M., K. MUSTALAHTI und J. KOKKONEN. 2003. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N. Engl. J. Med.* 348:2517-2524.

MAKAROVA, K., A. SLESAREV, Y. WOLF, A. SOROKIN, B. MIRKIN, E. KOONIN, A. PAVLOV, N. PAVLOVA, V. KARAMYCHEV, N. POLOUCHINE, V. SHAKHOVA, I. GRIGORIEV, Y. LOU, D. ROHKSAR, S. LUCAS, K. HUANG, D. M. GOODSTEIN, T. HAWKINS, V. PLENGVIDHYA, D. WELKER, J. HUGHES, Y. GOH, A. BENSON, K. BALDWIN, J.-H. LEE, I. DÍAZ-MUNIZ, B. DOSTI, V. SMEIANOV, W. WECHTER, R. BARABOTE, G. LORCA, E. ALTERMANN, R. BARRANGOU, B. GANESAN, Y. XIE, H. RAWSTHORNE, D. TAMIR, C. PARKER, F. BREIDT, J. BROADBENT, R. HUTKINS, D. O'SULLIVAN, J. STEELE, G. UNLU, M. SAIER, T. KLAENHAMMER, P. RICHARDSON, S. KOZYAVKIN, B. WEIMER und D. MILLS. 2006.

Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:15611-15616.

MATUZ, J., T. BARTOK, K. MOROCZ-SALOMON und L. BONA. 2000. Structure and potential allergenic character of cereal proteins I. Protein content and amino acid composition. Cereal Res. Commun. 28:263-270.

MEROTH, C. B., W. P. HAMMES und C. HERTEL. 2003a. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 69:7543-7461.

MEROTH, C. B., J. WALTER, C. HERTEL, M. J. BRANDT und W. P. HAMMES. 2003b. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 69:475-482.

MOHAMMED, S. I., L. R. STEENSON und A.W. KIRLEIS. 1991. Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese kiswa. Appl. Environ. Microbiol. 1991. 57:2529-2533.

MOORE, M. M. 2005. Novel approaches in the structural development of gluten free bread. Dissertation, University College Cork, Cork, Irland.

MOORE, M. M., B. JUGA, T. J. SCHOBBER und E. K. ARENDT. 2007. Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread. Cereal Chem. 84:357-364.

MURCIA-MARTINEZ, A. J. und M. D. COLLINS. 1990. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 58:73-83.

NEUMANN, H., H. STEPHAN und J.-M. BRÜMMER. 2006. Roggen als Rohstoff und Technik der Roggensauerteigführung, S. 185-283. In M. J. BRANDT und M. G. GÄNZLE (Hrsg.), Handbuch Sauerteig, 6. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.

- NKWE, D. O., J. E. TAYLOR und B. A. SIAME. 2005. Fungi, aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia* 160:177-186.
- OGUNGBENLE, H. N. 2003. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54:153-158.
- OLUSEGUN, O. L. 1983. Handbook of tropical foods, S. 1-28. *In* H. T. CHAN, JR. (Hrsg.), *Food Science and Technology*, 1. Auflage, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- ORLOWSKI, M. 1991. *Mucor* Dimorphism. *Microbiol. Rev.* 55:234-258.
- PLENGVIDHYA, V., F. BREIDT, JR., Z. LU und H. P. FLEMING. 2007. DNA Fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7697-7702.
- REEVES, C. 2006. Getting the gluten out. *Food In Canada* October.
- REYES-VELÁZQUEZ, W. P., V. H. I. ESPINOZA, F. ROJO, C. JIMÉNEZ-PLASENCIA, E. DE LUCAS PALACIOS, J. HERNÁNDEZ-GÓBORA und A. RAMÍREZ-ÁLVAREZ. 2008. Occurrence of fungi and mycotocins in corn silage. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:182-185.
- RÖCKEN, W. 1996. Applied aspects of sourdough fermentation. *Advances in Food Sci.* 18:212-216.
- RÖCKEN, W. und P. A. VOYSEY. 1995. Sourdough fermentation in bread making. *J. Appl. Bacteriol.* 79:38-48.
- RODRIGO, L. 2006. Celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 12:6585-6593.
- ROSSETTI, L. und G. GIRAFFA. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J. Microbiol. Methods* 63:135-144.
- SANGER, F., S. NIKLEN und A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 :5463-5467.

SCHEIRLINCK, I., R. VAN DER MEULEN, L. DE VUYST, P. VANDAMME und G. HUYS. 2009. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *J. Appl. Microbiol.* 4:1081-1092.

SCHEIRLINCK, I., R. VAN DER MEULEN, A. VAN SCHOOR, M. VANCANNEYT, L. DE VUYST, P. VANDAMME und G. HUYS. 2007. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6262-6269.

SCHEIRLINCK, I., R. VAN DER MEULEN, A. VAN SCHOOR, M. VANCANNEYT, L. DE VUYST, P. VANDAMME und G. HUYS. 2008. Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2414-2423.

SCHNÜRER, J. und J. MAGNUSSON. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16:70-78.

SCHOENLECHNER, R., S. SIEBENHANDL und E. BERGHOFER. 2008. Pseudocereals, S. 149-190. *In* E. ARENDT und F. DAL BELLO (Hrsg.), *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, 1. Auflage, Elsevier Inc., Burlington, USA.

SHAHBAZKHANI, B., R. MALEKZADEH und M. SOTOUDEH. 2003. High prevalence of celiac disease in apparently healthy Iranian blood donors. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:475-478.

SILVA-SANCHEZ, C., A. P. BARBA DE LA ROSA, M. F. LEON-GALVAN, B. O. DE LUMEN, A. DE LEON-RODRIGUEZ und E. GONZALEZ DE MEJIA. 2008. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J. Agric. Food Chem.* 56:1233-1240.

SIRAGUSA, S., M. DE ANGELIS, R. DI CAGNO, C. G. RIZZELLO, R. CODA und M. GOBBETTI. 2007. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7283-7290.

SOOD, A., V. MIDHA, N. SOOD, G. AVASTHI und A. SEHGAL. 2006. Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, North India. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21:1622-1625.

SPICHER, G. 1983. Baked Goods, S. 1-80. In H. J. REHM und G. REED (Hrsg.), Biotechnology, 5. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland.

SPICHER, G. 1984. Die Mikroflora des Sauerteiges - XVII. Mitteilung: Weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Mikroflora handelsüblicher Sauerteig-Starter. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 178:106-109.

SPICHER, G., W. RÖCKEN und H. L. SCHMIDT. 1997. Getreide und Getreideerzeugnisse, S. 231-260. In G. MÜLLER, W. HOLZAPFEL, H. WEBER (Hrsg.), Mikrobiologie der Lebensmittel: Lebensmittel pflanzlicher Herkunft, Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland.

STOLZ, P. 1995. Untersuchungen des Maltosemetabolismus von Laktobazillen aus Sauerteigen. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.

STOLZ, P., G. BOECKER, R. F. VOGEL und W. P. HAMMES. 1993. Utilization of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. FEMS Microbiol. Lett. 109: 237-242.

STOLZ, P., R. F. VOGEL und W. P. HAMMES. 1995. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. 2. *Lactobacillus pontis*, *L. reuteri*, *L. amylovorus*, and *L. fermentum*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 201:402-410.

TANG, A. L., N. P. SHAH, G. WILCOX, K. Z. WALKER und L. STOJANOVSKA. 2007. Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids. J. Food Sci. 72:431-436.

TITGEMEYER, F. und W. HILLEN. 2002. Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. Antonie van Leeuwenhoek 82:59-71.

TORRIANI, S., Z. GIACOMO und F. DELLAGLIO. 1999. Used of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 65:4351-4356.

VAN DER MEULEN, R., I. SCHEIRLINCK, A. VAN SCHOOR, G. HUYS, M. VANCANNEYT, P. VANDAMME und L. DE VUYST. 2007. Population dynamics and metabolite target

analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4741-4746.

VOGEL, R. F., R. KNORR, M. R. A. MÜLLER, U. STEUDEL, M. G. GÄNZLE und M. A. EHRMANN. 1999. Non-dairy lactic fermentations: The cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:403-411.

VOGEL, R. F., M. LOHMANN, M. NGUYEN, A. N. WELLER und W. P. HAMMES. 1993. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lact. sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 74:295-300.

VOGELMANN, S. A., M. SEITTER, U. SINGER, M. J. BRANDT und C. HERTEL. 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int. J. Food Microbiol.* 130:205-212.

WEIDENBÖRNER, M. 1999. *Lebensmittelmykologie*, Behr's Verlag, Hamburg

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

WICK, M., P. STOLZ, G. BÖCKER und J. M. LEBAULT. 2003. Influence of several process parameters on sourdough fermentation. *Acta Biotechnol.* 23:51-61.

## **Mein herzlichster Dank gilt**

Herrn Prof. Dr. Herbert Schmidt für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Bearbeitung und Anfertigung der Doktorarbeit im Fachgebiet Lebensmittel-mikrobiologie des Institutes für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie.

Frau Dipl.-Ing. Dr. Agnes Weiss für die hervorragende fachliche Unterstützung, Ideen Anregungen und Betreuung der Arbeit. Danke auch für das Ermutigen und die Motivation während der ganzen Zeit.

Dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), der das Projekt mit der AiF-Nr. 15188 N förderte.

Markus Kranz und Johanna Hinrichs (FG Lebensmittelmikrobiologie), Dipl.-LM-Ing. Regina Schuster-Wolff-Bühning (FG Lebensmittel tierischer Herkunft), Herbert Götz und Dipl.-Ing. André Houben (FG Prozessanalytik und Getreidetechnologie) für die gute Zusammenarbeit und die hilfsbereite Unterstützung bei der Tätigung mancher Analysen.

Den Diplomanden David Bertsch und Sylvia Strütt für die motivierte Bearbeitung von Teilbereichen des Projektes.

Den Doktorandinnen Antje Vogel, Tina Slanec, Helen Stöber, Maike Schwidder, Andrea Kroj und Sabrina Polzin für die lustige und zusammenschweißende gemeinsame Zeit im Labor, die vielen außeruniversitären Aktivitäten und für einen schönen Lebensabschnitt, der mir stets in Erinnerung bleiben wird.

Allen Mitarbeitern des Fachgebietes Lebensmittelmikrobiologie für die netten gemeinsamen Stunden bei der Arbeit.

Meiner lieben Mutter, meiner Familie und meinen Freunden für die motivierende Unterstützung.

Ganz besonderer Dank geht an meinen geliebten Mann Tobi. Danke für all Deinen Beistand in jeglicher Hinsicht.