



Projekttitel:

Mikromail

Förderkennzeichen:

49VF150026

Name der Forschungsstelle(n):

Forschungsinstitut für Biotechnologie und Wasser (FIBW)

Kontakt:

Dr.-Ing. Katrin Schreiber, k.schreiber@vlb-berlin.org

Bewilligungszeitraum:

2.3.2016 – 31.8.2018

INNO-KOM

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

SCHLUSSBERICHT



**WISSEN
SCHAFFT
QUALITÄT**

Impressum

Herausgeber:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

www.vlb-berlin.org

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

Reg.-Nr.: 49VF150026

Kurtitel: MIKROMAIL

Laufzeit: 01.03.2016 bis 31.08.2018

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.**Seestraße 13****13353 Berlin****Zielstellung und Ergebnisse:**

Der Fokus in dem durchgeführten Forschungsprojekt liegt auf der gezielten Einflussnahme auf die Stabilität von stäbchenförmigen Bakterien. Der Forschungsschwerpunkt liegt dabei in der Untersuchung, inwieweit durch zielgerichtete Nährmedienprozessierung und/oder Zusammensetzung die Wachstumseigenschaften von Bakterienkulturen, insbesondere Milchsäurebakterien, nachhaltig positiv beeinflusst werden können. Eine zentrale Einflussnahme basiert dabei auf der Herstellung und der Verwendung von Nährmedien mit Maillardreaktionsprodukten (MRP), welche die Wachstumseigenschaften der Kulturen, darunter die Zellkonzentration und die Zellmorphologie, positiv beeinflussen können. Ziel des Projektes ist es daher, durch umfassende systematische Wachstumsstudien in unterschiedlichen Fermentationssystemen sowie umfassende physikalisch-chemische und mikrobielle Analysen der vorliegenden Matrizes und Mikroorganismen Grundlagen über die Nährstoffansprüche der verwendeten Lactobacillen, pleomorphievermittelnder Faktoren sowie der damit verbundenen Mechanismen, die Wirkung von MRP und Intermediaten auf Lactobacillen sowie die in der Nährmediensterilisation bzw. -präparation ablaufenden Reaktionen und Veränderungen zu erforschen. Diese Kenntnisse sollen weiterführen zur Entwicklung und Anpassung von optimierten Herstellprozessen in der Lebensmittel-, Getränke- und Biotechnologie. Insbesondere sollen Prozesskenntnisse zur Fermentation von Lactobacillen, zur Formulierung von Nährmedien und potentieller Supplemente für Lactobacillen und Milchsäurebakterien, zur Prozessierung von Nährmedien, sowie zur Herstellung stabiler Bakterienpräparate ermittelt werden, aus denen sich weitere für die Praxis relevante Entwicklungsarbeiten ableiten lassen.

Mit den gewählten Lösungsansätzen konnten wichtige Neuerkenntnisse über pleomorphievermittelnder Faktoren für Milchsäurebakterien ermittelt werden. Neben der erfolgreichen Identifikation von mindestens drei neuen MRP-sensitiven Lactobacillus-Stämmen (*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*) konnten für das Wachstum von Mikroorganismen wichtige Parameter unterschiedlich zusammengesetzter und prozessierter Nährmedien charakterisiert werden. In diversen Fermentationsstudien sowie der jeweiligen prozessbegleitenden Analytik der Kulturen wurden planmäßig die komplexen Zusammenhänge von Nährmedieninhaltsstoffen, thermischer Behandlung, Wachstumsbeeinflussung ausgewählter Kandidatenstämme und Einflussnahme auf die Stabilitätsverhalten bei weiterer Prozessierung (u.a. Herstellung trockener Präparate, Magen-Darm-Passage) untersucht. Darauf basierend wurden Ableitungen für die Praxis zur Herstellung von Mikroorganismenkulturen erstellt und neue Ansätze für weitere Entwicklungsrichtungen identifiziert. Interessanterweise konnte bei der weiterführenden Medien- und MRP-Charakterisierung eine von den MRP ausgehende DNA Strangbruchaktivität nachgewiesen werden. Diese könnte einen Ansatz für den hier teils positiven auf die Eigenschaften wirkenden Mechanismus liefern. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die in den thermisch behandelten Medien identifizierte heterocyclische Substanz Dihydrohydroxymaltol (DHHM) gelegt.

Veröffentlichungen und wissenschaftliche Beiträge:

- Senz, M.; Keil, C.; Schmacht, M.; Palinski, S.; Cämmerer, B.; Hageböck, M. (2019) *Influence of Media Heat Sterilization Process on Growth Performance of Representative Strains of the Genus Lactobacillus*. Fermentation (5) 20
- Schmacht, M., Degen, A., Dounia, S., Hageböck, M., Senz, M. (2018) *Usage of various process analytical technologies (PAT) for evaluation of Lactobacillus acidophilus fermentation*. 5th Bio-ProScale Symposium 2018, March 20th -22nd 2018, Berlin, Germany.
- Senz, M., Palinski, S., Dounia, S., Schmacht, M., Hageböck, M. (2017) *Impact of culture conditions on the stability properties of Lactobacillus acidophilus during further processing*. International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, The 4th Satellite Seminar, September 4th 2017, Berlin, Germany.
- Forschungsinhalte wurden im Rahmen verschiedener Lehrangebote präsentiert

Patentanmeldungen:

Es wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens kein Patent eingereicht

22.02.2019

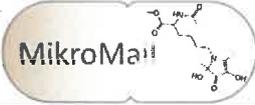
Datum

Projektleiter (Dr.-Ing. Katrin Schreiber)

Rechtsverbindliche Unterschrift
(Dr.-Ing. Josef Fontaine)

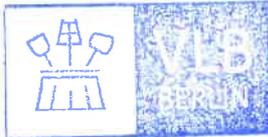
Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis
zu FuE Vorhaben

Reg.-Nr.:	49VF150026
FuE-Einrichtung:	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Titel:	MIKROMAIL 
Projektlaufzeit:	01.03.2016 bis 31.08.2018

Berlin, den 22.02.2019

Name und Telefonnummer des Projektleiters: Dr. Katrin Schreiber, 030 45080-168



Versuchs- und Lehranstalt
für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.

Seestraße 13 / 13353 Berlin

Firmenstempel

Unterschrift des Projektleiters
(Dr.-Ing. Katrin Schreiber)

Rechtsverbindliche Unterschrift
(Dr.-Ing. Josef Fontaine, GF)

1 Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens

Der Fokus in dem durchgeführten Forschungsprojekt liegt auf der gezielten Einflussnahme auf die Stabilität von stäbchenförmigen Bakterien. Der Forschungsschwerpunkt liegt dabei in der Untersuchung, inwieweit durch zielgerichtete Nährmedienprozessierung und/oder Zusammensetzung die Wachstumseigenschaften von Bakterienkulturen, insbesondere Milchsäurebakterien, nachhaltig positiv beeinflusst werden können. Eine zentrale Einflussnahme basiert dabei auf der Herstellung und der Verwendung von Nährmedien mit Maillardreaktionsprodukten (MRP), welche die Wachstumseigenschaften, darunter die Zellkonzentration und die Zellmorphologie, der Kulturen positiv beeinflussen können. Ziel des Projektes ist es daher, durch umfassende systematische Wachstumsstudien in unterschiedlichen Fermentationssystemen sowie umfassenden physikalisch-chemischen und mikrobiellen Analysen der vorliegenden Matrices und Mikroorganismen Grundlagen über die Nährstoffansprüche der verwendeten Lactobacillen, pleomorphievermittelnder Faktoren sowie der damit verbundenen Mechanismen, die Wirkung von MRP und Intermediaten auf Lactobacillen sowie die in der Nährmediensterilisation bzw. -präparation ablaufenden Reaktionen und Veränderungen zu erforschen. Diese Kenntnisse sollen weiterführen zur Entwicklung und Anpassung von optimierten Herstellprozessen in der Lebensmittel-, Getränke- und Biotechnologie. Insbesondere sollen Prozesskenntnisse zur Fermentation von Lactobacillen, zur Formulierung von Nährmedien und potentieller Supplemente für Lactobacillen und Milchsäurebakterien, zur Prozessierung von Nährmedien, sowie zur Herstellung stabiler Bakterienpräparate ermittelt werden, aus denen sich weitere für die Praxis relevante Entwicklungsarbeiten ableiten lassen.

2 Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse

AP 1: Ausführliche Versuchsplanung; Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen

Es wurde eine intensive Literatur- und Patentrecherche zu Morphologie-beeinflussenden Faktoren für stäbchenförmige Bakterien (Fokus Milchsäurebakterien) im Zusammenhang mit Zellstabilität, Nährmedienbestandteilen, Wachstumsfaktoren und MRP durchgeführt. In Kombination mit den in der eigenen Stammsammlung vorhandenen Informationen wurde eine Auswahl an 24 potentiellen Kandidatenstämmen getroffen. Eine Auflistung dieser für weitere Studien ausgewählten Bakterien ist Tabelle 7.1 im Anhang zu entnehmen.

Weiter wurden drei verschiedene Nährmedien für die kommenden Screening-Studien ausgewählt, mit denen die Einflussnahme unterschiedlicher Nährmedienbehandlungen sowie relevanter Inhaltsstoffe untersucht werden, welche als

1) „MRS-Medium filtriert“, 2) „MRS-Medium autoklaviert“ und 3) „GEM autoklaviert“ bezeichnet werden.

AP 2: Herstellung und Charakterisierung von Nährmedien mit unterschiedlichem Bräunungsgrad und Inhaltsstoffen

Es wurden planmäßig unterschiedliche Nährmedien mit unterschiedlichem Bräunungsgrad und somit unterschiedlichen Quantitäten an MRP hergestellt und diese anhand physiko-chemischer Parameter wie pH-Wert, antioxidative Kapazität, Profil von Mono-, Di- und Trisacchariden, organische Säuren, Absorptionsspektren und Bräunungsgrad (OD420nm) charakterisiert. Ausgewählte Daten sind dem Anhang Abb. 7.1 bis 7.5 zu entnehmen.

Folgende relevante Schlussfolgerungen können generell gezogen werden:

- Die durch die Temperaturbehandlung ablaufenden Maillardreaktionen spiegeln sich in der Abnahme der Glukosekonzentration im Medium wieder. Zudem kann eine leichte Zunahme von Acetat sowie eine Bildung von Fruktose beobachtet werden.
- Die Bildung von MRP kann mit zunehmender Temperaturbehandlung anhand der OD420nm erwartungsgemäß beobachtet werden. Dies geht mit einer Abnahme des pH-Wertes überein.
- Mit zunehmender Bildung von MRP konnte eine Zunahme des antioxidativen Potentials mit zwei unterschiedlichen Messmethoden nachgewiesen werden.

Die genannten Zusammenhänge können im Einzelnen und zusammen potentielle Einflüsse für das Wachstum darstellen und sind Bestandteil der Untersuchungen in den folgenden AP.

AP 3: Wachstumsstudien mit unterschiedlich prozessierten Nährmedien zur Identifikation von pleomorphen Lactobacillen

Mit den in AP 1 identifizierten Stämmen wurden umfangreiche Wachstumsstudien durchgeführt, wobei zunächst der Einfluss der Nährmedien-Zusammensetzung und –Temperaturbehandlung im Vordergrund standen.

Alle untersuchten Stämme befanden sich nach 18 h Kultivierung in der stationären Wachstumsphase. Basierend auf den maximalen Zellkonzentrationen wurden für die weiteren Studien im Batch-Fermentationsmodus Zeiten von 22 h zum Vergleich der Zellgrößenverteilung und Konzentration gewählt. Ausgewählte Daten der Studien sind Abb. 7.5 bis 7.7 im Anhang zu entnehmen.

Mit Hilfe der Screening-Versuche konnten zunächst drei Stämme dreier unterschiedlicher Spezies (*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*) identifiziert werden, welche sensitiv auf die thermische Behandlung der Medien reagieren und Populationen mit kleineren Zellen als im sterilfiltrierten MRS-Medium ausbilden. Die drei identifizierten Stämme könnten somit unterschiedliche Stabilitäten (bzw. Überlebensraten) während der weiteren Verarbeitung aufzeigen und wurden daraufhin weiter untersucht.

Diese ersten Ergebnisse konnten in weiteren, abgestuften Wachstumsversuchen bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Menge der Hitzeeinwirkung, ab der eine Reaktion durch Pleomorphie beobachtet werden kann, stammspezifisch ist.

AP 4: Etablierung eines chem. definierten Nährmediums zum Wachstum von Lactobacillen im Batch-Verfahren

Nach Sichtung aktueller Literatur und Patente wurden für die sehr anspruchsvollen Lactobacillen (diese hohen Ansprüche konnten für alle drei Spezies ermittelt werden) verschiedene chemisch definierte Nährmedien recherchiert (siehe u.a. Tabelle 7.2 im Anhang) und bzgl. der Anwendbarkeit für die drei Kandidatenstämme bewertet und eine Vielzahl an Wachstumsstudien durchgeführt.

Da trotz qualitativ hochwertiger Komponenten und zahlreicher bekannter Wachstumsfaktoren die Wachstumsleistung für alle drei Kandidatenstämme unerwartet schlecht ausfiel, wurden für die weiteren Experimente sterilfiltrierte Medien mit komplexen Komponenten wie Hefeextrakt, die zwar die für das grundsätzliche Wachstum essentiellen Wachstumsfaktoren, aber keine MRP beinhalten, verwendet. Mit dieser Maßnahme soll dem übergeordneten Projektziel, der Identifizierung wachstumsfördernder Komponenten und Methoden zu derer

Erzeugung, besser bzw. ohne unverhältnismäßig große Zeiteinbuße Rechnung getragen werden.

Aus den Kenntnissen der bisherigen Wachstumsstudien lässt sich schlussfolgern, dass die Minimalanforderungen für ein quantitativ hochwertiges Wachstum für die hier weiteruntersuchten Stämme deutlich über denen aus bekannten und teils universell angepriesenen chemisch definierten Medien liegt.

AP 5: Entwicklung eines kontinuierlichen Fermentationsprozesses (Chemostat) unter Verwendung eines chemisch definierten Mediums

Ein kontinuierlicher Fermentationsprozess konnte mit dem sehr anspruchsvollen Kandidatenstamm *Lb. acidophilus* etabliert werden. Die als geeignet ermittelten Prozessparameter waren eine Wachstumsrate μ von 0,1/h, 37°C und ein pH-Wert von 5,8. Eine wichtige, aus der Entwicklung resultierende Kenntnis war die, dass sich eine Submersbegasung, unabhängig von dem eingestellten Volumenstrom sowie der Begasung selbst (ob Luft oder - wie ursprünglich geplant - Stickstoff, so dass ein anaerobes definiertes Milieu entsteht) negativ auf das Wachstum in kontinuierlicher Kultur auswirkt. Zur Schaffung von definierten sauerstofffreien Bedingungen wurde die Kultur über eine Kopfbegasung mit Stickstoff überströmt. Diese Praxis, in der es schnell zu einem gewünschten Austrag des Sauerstoffs über die Phasengrenze an der Kultur-Oberfläche kam, bewies sich als nicht inhibierend für das Wachstum und wurde in folgenden Prozessen weiter erfolgreich genutzt. Als Basismedium wurden verschiedenste Konzentrationen der Einzelkomponenten, insbesondere der Kohlenstoffquelle Glukose, untersucht, wobei die Medien jeweils aus definierten Einzelkomponenten bestanden. Eine vollständige Reduktion komplexer Medienbestandteile, wie bspw. hydrolisiertem Pepton, konnte aufgrund der sehr hohen Nährstoffansprüche des Stammes nicht erreicht werden. Weitere, für die Mediencharakterisierung zielführende, Studien wurden mit aus definierten Einzelkomponenten hergestellten MRS Medium durchgeführt.

AP 6: Durchführung von Wachstumsstudien im kontinuierlichen geregelten Betrieb im Zweifachansatz (Test- und Referenzsystem) zur Identifikation von zellwachstums- und morphologieverändernden Faktoren

Mit dem in AP 5 etabliertem Prozessformat wurden diverse Fermentationen im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt. Ein erster entscheidender Untersuchungsgegenstand war der generelle Vergleich und eine Bestätigung der unter Batch-Bedingungen gefundenen Phänomene in kontinuierlicher Kultur. Dazu wurden die verschiedenen Charakteristika der Kulturen wie Zellgröße und Konzentration bei unterschiedlich thermisch behandelten Medien untersucht. Hier ließ sich zunächst ein sehr charakteristischer, die Zellgröße betreffender, Verlauf darstellen. Dabei kommt es zunächst während der exponentiellen Wachstumsphase zu einer starken Zunahme der Zelllänge. Anschließend folgt erwartungsgemäß eine durchschnittliche Verringerung der Zellgröße, wobei es in einem kontinuierlichen Glukose-limitierten Betrieb zu einer deutlichen zeitlichen Ausdehnung kommt, bis eine konstante Zellgröße erreicht ist. Diese Phase geht mit dem so genannten Fließgleichgewichtszustand (steady-state) der Kultur einher, was auch über weitere prozessbegleitende Parameter wie bspw. den Redoxwert detektierbar ist (siehe Anhang Abb. 7.8 und 7.9). Ein sehr interessantes und in dieser Weise nach unserem Wissensstand noch nicht untersuchtes Phänomen war, dass die unter Kohlenstofflimitierung wachsenden Milchsäurebakterien eine durchweg kleine Zellgröße aufwiesen. Übergeordnet ist dieses Phänomen für die potentielle Entwicklung einer kontinuierlichen Produktion von Starterkulturen eine relevante Kenntnis.

AP 7: Parallelisierte Wachstumsstudien im Batch-Kultivierungsverfahren unter Verwendung stat. Versuchsplanung zur Identifikation pleomorphievermittelnder Faktoren und Wechselwirkungen

Basierend auf den bisherigen Wachstumsstudien kristallisierte sich u.a. das im Medium herrschende Redoxpotential als stark variierende und vermutlich relevante Prozessgröße heraus. In parallelisierten Batch-Experimenten in Standkultur wurde der Einfluss unterschiedlicher zugegebener Reduktions- und Oxidationsmittel sowie der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstumsverhalten untersucht. Dabei konnte der pH-Wert als verantwortlicher Hauptfaktor für die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften ausgeschlossen werden. Die bezüglich des Wachstumsverhaltens beobachteten Effekte sind auch in verschiedenen Medien mit angeglichenem pH-Wert noch deutlich festzustellen. Der durch Chemikalien veränderte Redoxwert konnte ebenfalls nicht als entscheidende Prozessgröße zur Wachstumsbeeinflussung in diesem Testsystem identifiziert werden. Letztere Studien zeigten aber auch deutlich auf, dass für eine präzisere Bewertung regelbare Systeme (insbesondere Sauerstoffregulierbare Bioreaktorsysteme) notwendig sind.

AP 8: Einfluss der Zellmorphologie auf funktionale Eigenschaften der Bakterien

Für Milchsäurebakterien mit einer probiotischen Wirkung können verschiedene Wirkmechanismen als Ursache herangezogen werden, wobei entsprechende Studien, die den gesundheitsfördernden Effekt nachweisen, meist nur die Wirkung, nicht jedoch die Ursache erfassen können. Eine als generell wichtige Eigenschaft probiotischer Zellen ist die Fähigkeit zur Adhärenz der Mikroorganismen an Darmepithelzellen. In diversen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der Adhärenz der Zellen in Zellkultursystemen und der jeweiligen charakteristischen Hydrophobizität der Bakterienkultur beschrieben und publiziert. Um letztere zu bestimmen, wird meist ein sog. MATH-Test (Microbial Adherence to Hydrocarbon) durchgeführt, bei dem das Prinzip in der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Zellen zwischen Wasser und einer organischen Phase liegt. Dazu wird die Extinktion einer wässrigen Bakteriensuspension gemessen, eine definierte Menge an organischem Lösungsmittel (hier Hexadekan) dazugegeben und für eine festgelegte Zeit gemischt. Nach der Phasentrennung wird die Extinktion der wässrigen Phase erneut gemessen und in Bezug zur Ausgangsextinktion gesetzt. Dieses Testsystem sollte auch im vorliegenden Forschungsprojekt zum Einsatz kommen, um potentielle Einflüsse der Zellmorphologie auf die Hydrophobizität zu untersuchen.

Nach erfolgreicher Etablierung des sehr sensitiven Testsystems für die hier untersuchten Lactobacillus-Stämme wurden Kulturen mit unterschiedlichen mittleren Zellgrößen durch Wahl verschiedener Nährmedien hergestellt. Trotz der charakteristischen Wachstumsparameter (Zellkonzentration und Zellgröße) konnten keine signifikanten Unterschiede in dem durchschnittlichen Hydrophobizitätsverhalten der Kulturen nachgewiesen werden. Exemplarisch sind die Ergebnisse für die verschiedenen Kulturen von *Lb. acidophilus* im Anhang Abb. 7.10 dargestellt.

AP 9: Herstellung gefrorener Bakterienpräparate aus morphologisch unterschiedlichen Kulturen; Untersuchung der Zellrobustheit gegenüber Gefrier- Auftau-Zyklen

Um mögliche Einflüsse der Zellmorphologie auf das Stabilitätsverhalten der Milchsäurebakterien während des Einfrierens und Auftauens - eine für Starterkulturpräparate in der Praxis sehr relevante Eigenschaft - zu bewerten, wurden planmäßig wiederholte Tests zur Bewertung dieser durchgeführt. Dabei wurden die Kandidatenstämme in verschiedenen zu untersuchenden Medien kultiviert und nach Ernte mehrfachen definierten Einfrier-

Auftauzyklen unterzogen. Von den drei untersuchten *Lactobacillus*-Stämmen zeigten insbesondere *Lb. acidophilus* Kulturen eine Abhängigkeit des verwendenden Kultivierungsmediums und/oder der resultierenden mittleren Zellgröße der Kulturen. Hier zeigten die Kulturen mit der geringsten mittleren Zellgröße die höchste Stabilität gegenüber der Behandlung. Exemplarisch sind die Abnahmen der Lebendkeimzahl von *Lb. acidophilus* bei mehrfachen Einfrier- und Auftauzyklen sowie die unterschiedliche Zellgrößencharakteristik der verwendeten Kulturen im Anhang Abb. 7.11 dargestellt. Diese Ergebnisse bestätigen die postulierte mögliche Einflussnahme der Zellstabilität, hier bei den für Starterkulturen relevanten Prozessen des Einfrierens und Auftauens, durch die thermische Behandlung des Mediums bzw. unter Zusatz einzelner Medienbestandteile.

AP 10: Herstellung von gefriergetrockneten Bakterienpräparaten und Detektion der Zellstabilität entlang der Prozessierungsschritte

Um die Einflüsse der verschiedenen durch Nährmedienvariation hervorgerufenen Zellcharakteristika auf das Stabilitätsverhalten der Bakterien zu untersuchen, wurden die Kandidatenstämme bei unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und Lyophilisate hergestellt. Zur Bewertung der Viabilität und Vitalität wurden neben dem klassischen (aber für die Praxis relevantesten) Parameter der koloniebildenden Einheiten (KbE) auch Untersuchungen der Kulturen entlang der Prozessierungskette (vor und nach der Präparation und Gefrierdrying) mittels Elektroofptischer Analyse (EloTrace) und flowzytometrischen Verfahren erfolgreich durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen ist hervorzuheben, dass die mittels EloTrace durchgeführten Analysen zur Vitalitätsbestimmung der Zellen eine interessante Ergänzung zur klassischen Lebendkeimzahlbestimmung darstellen.

Für die Fragestellung, ob unterschiedliche Nährmedien und daraus resultierende Bakterienpopulationen mit unterschiedlichen Zellmorphologien die Stabilität beeinflussen, sind exemplarisch Ergebnisse von zwei Kandidatenstämmen im Anhang Abb. 7.12 dargestellt. Hier können erhöhte Stabilitäten bei der Verwendung von MRP, sei es im voll- oder teilweise autoklaviertem Medium, detektiert werden. Da es sich allerdings bei den Studien um verhältnismäßig geringe Viabilitäten nach dem Einfrierprozess und dem trockenen fertigen Produkt handelt, war eine Bestätigung unter optimierten Trocknungsbedingungen notwendig. Durch die seit Januar 2018 zur Verfügung stehenden Gefrierdryinganlage (49IZ170016), welche definierte Einfrier- und Vakuum-Zyklen und somit eine deutlich modernere und schonendere Trocknung mit erhöhten Überlebensraten ermöglicht, konnten in weiteren Studien Lyophilisate aus morphologisch unterschiedlichen Kulturen mit deutlich höheren Viabilitäten hergestellt werden. Dabei konnte der stabilitätserhöhende Effekt, unter Kultivierung in MRP-haltigen Nährmedien, während der Prozessierung sowie der Lagerung der Präparate deutlich aufgezeigt und bestätigt werden. Die Stabilitätseigenschaften während der Präparateherstellung sowie der anschließenden Lagerung sind exemplarisch für *L. acidophilus* in Abb. 7.13-2 dargestellt und unterstreichen die Praxisrelevanz der erzielten Erkenntnisse.

AP 11: Verwendung trockener Präparate für Studien zur Lagerstabilität der Bakterien (u.a. Anwendung beschleunigter Lagerstudien)

Um den Einfluss der Nährmedien und Zellcharakteristika auf die Stabilität der Milchsäurebakterien und auf die Lagerstabilität bewerten zu können, wurden planmäßig verschiedene Lagerstudien mit trockenen Präparaten der Kandidatenstämme durchgeführt. Im Anhang sind die exemplarischen Ergebnisse für Präparate, welche analog zu AP 10 hergestellt wurden, in Abb. 7.13 und 7.14 für zwei Kandidatenstämme dargestellt. Die Studien fanden jeweils unter definierten Bedingungen bei einer relativen Luftfeuchte von 11,3 % und einer

Temperatur von 37 °C (Abb. 7.13) bzw. 26 °C (Abb. 7.14) für mehrere Wochen statt. Auch hier konnten die sehr vielversprechenden Ergebnisse erhalten werden, dass ein genereller Trend in Richtung erhöhter Lagerstabilität unter Anwesenheit von MRP im Nährmedium zu verzeichnen ist. Studien unter optimierten Gefriertrocknungsbedingungen bestätigten die erhöhte Lagerstabilität von Zellpopulation, die in Anwesenheit von MRP kultiviert wurden und geringere mittlere Zellgrößen besaßen (siehe Abb. 7.13-2).

AP 12: Stabilitätsstudien von Bakterienpräparaten im In-vitro-Verdauungsmodell

Es wurden von den drei MRP-sensitiven Kandidatenstämmen Bakterienpräparate aus MRSDa und MRSDf Kulturen hergestellt und diese im, an der VLB etablierten, In-vitro-Verdauungsmodell bzgl. ihrer Stabilität untersucht. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass für *Lactobacillus johnsonii* La-2801 eine eher erhöhte Stabilität von MRSDa Kulturen für die Magenpassage (pH 2,5) detektiert werden konnte, dagegen für *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* La-0704 unter identischen Bedingungen eine erhöhte Stabilität von MRSDf Kulturen detektiert wurde. Für die Spezies *Lactobacillus acidophilus* konnte hingegen kein Unterschied in dem Stabilitätsverhalten detektiert werden (siehe exemplarisch Abb. 7.21).

AP 13: Darstellung der Einflussnahme der unterschiedlichen Kandidatenstämme auf die Mikrobiota im In-vitro-Testsystem

Für die Bewertung des Hemmverhaltens der eingesetzten Milchsäurebakterien und unterschiedlich angezogener Populationen wurden zunächst so genannte Hemmtests genutzt, die ein vereinfachtes aber aussagekräftigen Testsystem darstellen, um spezifische Inhibierungen von Mikroorganismen gegenüber anderen Mikroorganismen aufzuzeigen. Trotz diverser Kombinationen der verwendeten Milchsäurebakterien(-populationen), zu hemmenden Leitkeime sowie beeinflussenden Faktoren (pH, Konzentrationen) konnten keine spezifischen Inhibierungen ausgehend von den Milchsäurebakterien identifiziert werden. Abb. 7.22 im Anhang zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Hemmtests mit dem ubiquitär vorkommenden grampositiven Leitkeim *Staphylococcus aureus*, wobei ersichtlich wird, dass nur die Positivkontrolle einen charakteristischen Hemmhof ausbildet. Weitere Studien in flüssigen Kulturen mit vergesellschafteten Mikroorganismen, wobei als Ausgang verschieden hergestellte Bakterienpräparate dienten, konnten ebenfalls keine auf die Präparation oder verschiedenen Populationen zurückzuführende Beeinflussung von Leitkeimen identifizieren. Basierend auf den Test-Ergebnissen lässt sich keine spezifische Inhibierung der untersuchten Mikroorganismen darstellen. Daher können zum derzeitigen Zeitpunkt auch keine eindeutigen Aussagen bezüglich einer positiven oder negativen Beeinflussung von unterschiedlich kultivierten Milchsäurebakterien(-populationen) auf vergesellschaftete Mikroorganismen treffen.

AP 14: Übertragung der Kenntnisse auf weitere Mikroorganismen anderer Gattungen; Verwendung potentieller Markersubstanzen zur systematischen Identifikation von sensitiven Mikroorganismen

Es wurden diverse Wachstumsstudien mit lebensmittel- und getränkerelevanten Mikroorganismen, insbesondere Hefen und Essigsäurebakterien, bezüglich wachstums- und morphologiebeeinflussender Wirkungen von MRP durchgeführt. Dazu wurde das gängige komplexe Nährmedium YEPD (Hefeextrakt-Pepton-Glukose) verwendet, welches jeweils ein gutes Wachstum der Mikroorganismen gewährleistet. Durch die Ähnlichkeit der Zusammensetzung und thermische Behandlung wurde davon ausgegangen, dass die im Rahmen dieses Projektes identifizierte Markersubstanz Dihydrohydroxymaltol (DHHM) (siehe AP 16) ebenfalls in signifikanten Mengen enthalten ist. Bislang konnten in keiner anderen

Ordnung von Mikroorganismen die beschriebenen Sensitivitäten gegenüber MRP detektiert werden. Exemplarisch sind in Abb. 7.20 die Zellkonzentrationen relevanter Stämme dargestellt. Dabei waren keine Unterschiede in der erreichbaren Zellkonzentration oder der durchschnittlichen Zellgröße (nicht dargestellt) detektierbar. Basierend auf dem aktuellen Wissensstand ist davon auszugehen, dass eine generell hohe Sensitivität gekoppelt mit einem hohen Nährstoffbedarf von Milchsäurebakterien ausgeht, was die Ergebnisse erklären würde.

AP 15: Herstellung definierter MRP; weiterführende Charakterisierung definierter und komplexer MRP-Fraktionen

Wie in zahlreichen Wachstumsstudien unterschiedlich thermisch behandelter Medien konnte der Effekt der Inkubationsdauer der thermischen Behandlung selbst, aber auch der Einfluss unterschiedlicher Amin-haltigen Reaktionspartner (z.B. Unterschiede bei der Verwendung von verschiedenen Peptonen, Fleischextrakt und Hefeextrakt) aufgezeigt werden. Aus diesen Kenntnissen konnten erfolgreich die Rezeptur und die Herstellungsbedingungen für ein Konzentrat, welches reich an MRP ist und eine pleomorphiebeeinflussende Wirkung hat, erarbeitet werden. Hier konnte bereits eindeutig eine zielgerichtete Einflussnahme des Wachstums durch diese MRP-reiche Komponente dargestellt werden.

Zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen und Belegung aufgestellter Hypothesen wurden unterschiedliche Medienbestandteile, MRP-Konzentrate und daraus hergestellte, nach Molekulargößenbereich getrennte, Fraktionen bzgl. des Vorhandenseins aussagekräftiger Heterocyclen und α -Dicarbonyle charakterisiert (siehe Anhang Abb. 7.15 bis 7.17 sowie Tabelle 7.3). Weiter wurden diverse Wachstumsstudien mit den unterschiedlichen MRP-reichen Fraktionen durchgeführt (Abb. 7.18). Interessanterweise lässt aus den gezielt hergestellten MRP-Extrakten keine Größenfraktion aus den Bereichen <3 kDa, 3-10 kDa und >10 kDa feststellen, die schwerpunktmäßig für die Wirkung auf das Wachstumsverhalten verantwortlich ist. Allerdings zeigten die chemischen Analysen eine klare Zunahme der heterocyclischen Substanz DHHM in den Nährmedien. Diese ist zwar ein bekanntes Intermediat der Maillardreaktion (MR), aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes in Modellsystemen wäre eine Anreicherung mit zunehmender Hitze einwirkung von Hydroxymethylfurfural (HMF) bei den eingesetzten Medienbestandteilen erwartet worden. Diese Erwartungshaltung konnte nur bei dem separat hergestellten MR-Extrakt, bei dem Glukose und Pepton Nr. 3 als Mischung erhitzt wurden, beobachtet werden (Abb. 7.15). Aus den verschiedenen Studien konnte somit eine Markersubstanz, die charakteristisch ist und auch nicht erwartungsgemäß gebildet wurde, identifiziert werden.

AP 16: Charakterisierung definierter und komplexer MRP-Fraktionen bezüglich der Fähigkeit, die Bioverfügbarkeit von DNA und DNA-Intermediaten zu verbessern

Zur Klärung potentieller Wirkmechanismen wurden die hergestellten MRP-haltigen Matrices bezüglich der Fähigkeit der Nukleinsäurespaltung charakterisiert (Anhang Abb. 7.18 und 7.19).

Für die Bestimmung der Strangbruchaktivität wurde das PM2-Assay verwendet. Bei der hierfür verwendeten Phagen-DNA erzeugen Einzelstrangbrüche aus der ursprünglich superspiralisierten DNA eine zirkuläre, relaxierte Form. Ein Doppelstrangbruch hingegen erzeugt die lineare Variante der DNA. Die verschiedenen Formen lassen sich nach der Inkubation mit der entsprechenden Testsubstanz durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen und durch Anfärben sichtbar machen. Im Ergebnis zeigte sich, beginnend vom filtrierten MRSD bis hin zum autoklavierten Medium eine Tendenz für einen zunehmenden Strangbruch-induzierenden Effekt (Anhang Abb. 12). Evident wurde dies an der sukzessiven Abnahme der Bandenintensität für die mit der höchsten Mobilität im elektrischen Feld gewanderte superspiralisierte DNA.

Weiterführende Analysen der Heterocyclenanalytik der Medien lieferten den Befund, dass an heterocyclischen MRP im MRSD-Medium überwiegend DHHM gebildet wird. Deshalb wurde in weiteren Studien speziell dieses heterozyklische MRP, welches als Markersubstanz in den Fokus der Untersuchungen geriet, im PM2-Assay eingesetzt (Abb. 7.19).

Es zeigten sich für DHHM dosisabhängig DNA-Strangbruchinduzierende Effekte. Eine 24-stündige Behandlung mit einer 500 µM-konzentrierten wässrigen DHHM-Lösung resultierte in etwa derselben DNA-Strangbruchrate wie im Falle einer Inkubation mit 10 µM L-Ascorbinsäure. Diese Konzentration an DHHM entspricht in etwa dem Gehalt an DHHM im MRSD-Medium nach 5 Stunden Kochzeit. Der Zusatz von 500 µM DHHM zum filtrierten Medium als Matrix zeigte in etwa denselben Effekt bezüglich der Strangbruchrate wie das autoklavierte MRSD, welches 782 µM DHHM enthält.

Schlussfolgernd lässt sich aus den Ergebnissen postulieren, dass auch im Medium enthaltene DNA-Fragmente durch, während der Hitzesterilisierung gebildetes, DHHM in niedermolekulare Moleküle überführt und so den Milchsäurebakterien besser zugänglich gemacht werden.

AP 17: Zusammenführende Auswertung der Ergebnisse; Kalkulation entsprechender Kenngrößen aus Stabilitätsstudien; Identifikation pleomorphie- und stabilitätsvermittelnder Einflussfaktoren

Mittels an die Experimente zeitnah anschließenden Auswertungen konnten bislang mehrere Faktoren für die Sensitivität von Lactobacillen gegenüber MRP ausgeschlossen und identifiziert werden. Erwartungsgemäß konnten erste Studien eine eindeutige Spezies- und Stammabhängigkeit aufzeigen. Die in unkontrollierten Batchexperimenten identifizierten sowie ausgeschlossenen Faktoren werden derzeit unter definierten Bedingungen, bspw. im kontinuierlichen Fermentationsmodus im geregelten System, untersucht. Interessanterweise konnte bei der weiterführenden Medien- und MRP-Charakterisierung eine von den MRP ausgehende DNA-Strangbruchaktivität nachgewiesen werden. Diese könnte ein Ansatz für den hier teils positiven auf die Eigenschaften wirkenden Mechanismus liefern. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die in den thermisch behandelten Medien identifizierte Substanz DHHM gelegt. Hier liegt viel Potential für weiterführende Studien zur Identifikation solcher Markersubstanzen in industrierelevanten Nährmedien, bspw. auf Molke basierende Medien.

AP 18: Auswertung und Veröffentlichung der Ergebnisse; Erstellung von Zwischen- und Abschlussbericht

Die Erstellung der Zwischenberichte und des Abschlussberichtes verlief planmäßig. Forschungsergebnisse wurden und werden im Rahmen der VLB-Lehrveranstaltungen, Präsentationen sowie in gesonderten Fachartikeln/Peer Review Journalen veröffentlicht (siehe separate Auflistung Abschnitt 6).

3 Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages; Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit; Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

3.1 Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages

Innerhalb des Forschungsprojektes waren alle geleisteten Arbeiten in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Vorhabensplanung. Es konnten aus 24 untersuchten *Lactobacillus*-Stämmen drei MRP-sensitive Kandidaten (*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*) identifiziert und somit die Grund-Hypothese, auf die das Forschungsvorhaben beruht, bestätigt werden. In verschiedenen Studien konnten die Stabilitätserhöhenden Einflüsse thermisch behandelter Nährmedien sowie von gezielt zugesetzten MRP für einzelne Stämme dargestellt werden. Weiterführende Studien, die erste Anhaltspunkte zu potentiell funktionalen Eigenschaften wie dem Hydrophobizitätsverhalten (Indiz für Adhärenzverhalten) oder die spezifische Inhibierung von anderen Mikroorganismen liefern könnten, konnten bislang keine Unterschiede zwischen *Lactobacillus*-Populationen, die mit und ohne MRP kultiviert wurden, identifizieren. Ausführliche Charakterisierungen diverser gezielt hergestellter MRP-Extrakte lassen eine positiv wirkende DNA-Strangbruchaktivität der MRP, die wiederum zu einer verbesserten Nährstoffverfügbarkeit im Nährmedium führen könnte, als zugrundeliegenden Wirkmechanismen postulieren. Eine äußerst interessante Markersubstanz (DHHM) konnte in diesem Zusammenhang identifiziert werden und sollte in weiterführenden Studien intensiver untersucht werden. Im Rahmen der Studien konnten die mit MRP verbundenen Effekte allein für Milchsäurebakterien detektiert werden, was prinzipiell mit dem hohen Nährstoffangebot dieser Mikroorganismen zusammenhängen könnte.

3.2 Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Projektleitung wurde durch einen promovierten Ingenieur des Instituts geleistet. Darüber hinaus war weiteres wissenschaftliches Personal in Form eines studierten Mitarbeiters (M.Sc. Biotechnologie) sowie eines biologisch technischen Assistenten am Projekt beteiligt.

Die Projektleitung war mit der Gesamtkoordination aller Aspekte rund um die einzelnen Arbeitspakete betraut. So oblag der Person die Planung und Abwicklung der durchgeführten Versuche sowie die Beschaffung vorhabenbezogener Geräte, Materialien oder Dienstleistungen. Darüber hinaus war sie unter anderem für die projektbegleitenden Berichte verantwortlich, erstellte vorhabenbezogene Präsentationen und hielt Vorträge.

Am arbeitsintensivsten waren generell die Durchführung der Screeningversuche mit der Vielzahl an untersuchten Messreihen und zu analysierenden Parametern, sowie die Versuche zur Ausarbeitung einer geeigneten Fermentationsstrategie sowie die anschließenden Studien mit verschiedenen Bakterienpräparaten. Die Bearbeitung der komplexen Thematik und die teilweise parallel stattfindenden Entwicklungsarbeiten konnten nur durch den entsprechenden Personaleinsatz geleistet werden.

Die geleistete Arbeit war in Umfang und Form notwendig für einen erfolgreichen Abschluss des Projekts.

3.3 Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Personalausgaben als größte Position des zahlenmäßigen Nachweises ergeben sich aus den oben aufgeführten Tätigkeiten und waren gemäß der Zielsetzung des Antrages erforderlich.

3.3.1 Allgemeine Ausgaben

Die Allgemeinen Ausgaben wurden wie geplant berücksichtigt.

3.3.2 Material

Das benötigte Material wurde entsprechend dem tatsächlichen Verbrauch im Projekt beschafft.

3.3.3 Ausgaben für Einzelgeräte

Ohne den im Projekt angeschafften Bioreaktor wären die sehr zeitintensiven Fermentationsstudien im Batch-Verfahren, und vor allem im kontinuierlichen Verfahren, nicht möglich gewesen. Die Nutzung des automatischen Probenahmesystems EloTrace, welches neben der Vitalitätsmessung eine Aussage zur Biomasse und der Zellgröße ermöglichte, war ein entscheidender Mehrwert für die prozessbegleitende Analytik und wäre ohne das Leasing innerhalb des Projektes nicht möglich gewesen.

Beide Geräte wurde wie geplant projektbezogen angeschafft bzw. über die beantragte Zeit planmäßig geleast. Durch die Ausgaben konnte die Bearbeitung der einzelnen Arbeitspakete ermöglicht werden.

3.3.4 Ausgaben für weitere Zwecke

Für die in AP 15 und AP 16 durchzuführenden Analysen war das langjährige Spezialwissen und das analytische Know-how der lebensmittelchemischen Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Kroh der Technischen Universität Berlin unerlässlich. Die Vergabe der analytischen Dienstleistung wurde planmäßig durchgeführt und führte zu wesentlichen Neuerkenntnissen zur Identifizierung potentieller Markersubstanzen und Reaktionsmechanismen im Zusammenhang der hier zentral untersuchten MRP.

4 Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

4.1 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung; Anwendungspotential; Anwendungsbereiche in der mittelständischen Wirtschaft

Durch das Forschungsprojekt konnte grundsätzlich die These bestätigt werden, dass die thermische Sterilisation von komplexen Nährmedien einen Einfluss auf die Zelleigenschaften und das Stabilitätsverhalten von mind. drei wirtschaftlich interessanten Lactobacillus-Stämmen hat. Die hierbei gewonnenen Kenntnisse sind sowohl für die Herstellung entsprechender Nährmedien, aber auch für die Prozessführung von Mikroorganismen relevant. Das Berücksichtigen dieser Kenntnisse bei der Prozessentwicklung bzw. Prozessführung kann letztendlich zu einem höherwertigen Produkt (stabilere und höher konzentrierte Mikroorganismenkulturen bzw. -präparate) führen. Hierbei ist grundsätzlich eine flexible Anpassungsfähigkeit der Herstellungspraxis, die insbesondere bei kleinen und mittelständischen Betrieben eher gegeben

ist, von Vorteil. Letztere könnte sich in Form einer angepassten Mediensterilisation, der Variation von Nährmedienkomponenten oder der Berücksichtigung von Markersubstanzen (wie dem hier identifiziertem DHHM) bei der Prozessentwicklung, gestalten.

4.2 Darlegung der Ergebnisverwertung (eigene Nutzung, Technologietransfer, Know-how-Verkäufe u.a.)

Bereits innerhalb der Projektlaufzeit sind erste Inhalte der Forschungstätigkeit in den mikrobiologischen Lehrbetrieb sowie Veranstaltungen der VLB Berlin eingeflossen, wobei insbesondere die Bereiche Stabilitätsbeeinflussung und prozessbegleitende Analyseverfahren von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien thematisiert wurden. Da die VLB Berlin selbst im Rahmen von Forschungs- und Industrieprojekten auf die Herstellung stabiler Bakterienpräparate (z.B. als Starterkulturen für milchsäure oder essigsäure Gärgetränke) herstellt, bringen die hier erzielten Kenntnisse und Entwicklungsarbeiten einen direkten Nutzen für die Abteilung. Durch die aufgebaute Expertise rund um die Herstellung und die potentielle Beeinflussung stabiler (funktionaler) Milchsäurebakterien ist die Chance eigener Auftrags- und Entwicklungsarbeiten im kommerziellen Bereich (Dienstleistungs- und Beratungsangebot), sowie auf dem Projekt aufbauender Forschungstätigkeiten deutlich erhöht. Diese Punkte können bereits jetzt durch das rege Interesse an den bislang veröffentlichten Beiträgen aus dem Forschungsprojekt bestätigt werden (Abschnitt 6). Die aus den Projektergebnissen stammenden und in Bearbeitung befindlichen Folgeveröffentlichungen in renommierten Fachzeitschriften werden zu einem erhöhten nationalen und internationalen Ansehen der VLB führen. Gemeinsam mit den sich aus dem Projekt neu ergebenden Ansätzen führt das zu deutlich erhöhten Chancen für weitere innovative und erfolgreiche F&E Projekte.

4.3 Darlegung der Applikationsmöglichkeiten für die mittelständische Industrie

Die gewonnenen Kenntnisse sind für Hersteller von Starterkulturen und Probiotika relevant, aber auch für Hersteller dafür genutzter Nährmedien. Insbesondere bei Lohnherstellern, welche grundsätzlich das technische Know-how zur Herstellung von Kulturen unter GMP-Bedingungen haben, teils aber den Prozess (inkl. Nährmedium, Sterilisation des Mediums) auf den zu produzierenden Stamm abstimmen müssen, könnten die Ergebnisse relevant sein. Einerseits wird die Sensitivität verschiedener Milchsäurebakterien, welche aller der sog. delbrückii Gruppe angehören (siehe Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), aus wirtschaftlicher Sicht sehr wichtig sind, andererseits konnte in dieser Arbeit ein erster Hinweis für eine potentielle Markersubstanz geliefert werden, welche für eigene Entwicklungen berücksichtigt werden können. Weiterführende Entwicklungen könnten hier einen Marktvorteil durch qualitativ hochwertige Nährmedienbestandteile oder effektivere Prozesse entstehen.

4.4 Perspektive und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten

Das Potential einer anschließenden Entwicklungsarbeit wird seitens der VLB Berlin als sehr hoch eingestuft. Obwohl die hier untersuchten Einflüsse auf das Stabilitätsverhalten nicht grundsätzlich auf die Gattung *Lactobacillus* anwendbar ist, bilden bereits die auf MRP sensitiven untersuchten Stämme eine der wirtschaftlich wichtigsten Gruppen innerhalb der Milchsäurebakterien. Die dazu gehörenden Spezies besitzen allgemein sehr hohe Nährstoffansprüche

und werden intensiv als Starterkulturen für Joghurts sowie Probiotika genutzt. Vor diesem Hintergrund ist der gezielte Aufbau auf den Projekterkenntnissen, insbesondere die Nutzbarmachung von MRP, speziell der hier identifizierten potentiellen Markersubstanz des heterocyclischen MRP DHHM, eine sinnvolle Maßnahme. Hierbei können kurzgefasst zwei zweckmäßige Richtungen ausgemacht werden: 1. Die gezielte Applikation von (kontrolliert hergestellten) MRP und Einsatz dieser in Übereinstimmung mit herstellenden Betrieben von Milchsäurebakterien, 2. Die gezielt auf die Praxis abgestimmte Identifikation und Bewertung von MRP (und Markersubstanzen wie DHHM) in bestehenden industriellen Herstellungsprozessen. Die VLB arbeitet derzeit an der Erstellung einer auf diesen Forschungsprojekterkenntnissen basierende Projektskizze für ein anwendungsorientiertes FuE-Vorhaben. Eine erstrebenswerte frühzeitige Einreichung solch einer Skizze, die einen für die Praxis nahtloseren Übergang der Tätigkeiten ermöglicht hätte, war aus Kapazitätsgründen nicht möglich.

5 Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse

Es wurde im Rahmen des Forschungsvorhabens keine Schutzrechte beantragt.

6 Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen (Artikel in Zeitschriften, Seminare, Schulungen, Vorträge, Messen, Ausstellungen, Präsentationen)

Erfolgte Veröffentlichungen:

- Senz, M.; Keil, C.; Schmacht, M.; Palinski, S.; Cämmerer, B.; Hageböck, M. (2019) *Influence of Media Heat Sterilization Process on Growth Performance of Representative Strains of the Genus Lactobacillus*. Fermentation (5) 20
- Schmacht, M., Degen, A., Dounia, S., Hageböck, M., Senz, M. (2018) *Usage of various process analytical technologies (PAT) for evaluation of Lactobacillus acidophilus fermentation*. 5th Bio-ProScale Symposium 2018, March 20th -22nd 2018, Berlin, Germany.
- Senz, M., Palinski, S., Dounia, S., Schmacht, M., Hageböck, M. (2017) *Impact of culture conditions on the stability properties of Lactobacillus acidophilus during further processing*. International Symposium on Microbial Research and Biotechnology for Biomass Utilization, The 4th Satellite Seminar, September 4th 2017, Berlin, Germany.
- Neue Forschungsinhalte wurden im Rahmen der folgenden Lehrangebote präsentiert:
 - DACH User Meeting, Nutzung der Durchflusszytometrie für die Entwicklung fermentierter Getränke, 22. November 2017, VLB Berlin, Martin Senz
 - Durchflusszytometrie, Grundlagen- und Praxiskurs, 4. Mai 2018, VLB Berlin, Martin Senz

Geplante Veröffentlichungen:

- Weitere Verwendung von Forschungsergebnissen als Schulungsmaterial innerhalb der mikrobiologischen Lehrangebote der VLB Berlin
- *Influence of an complex MRS mixture of growth and stability performance of three sensitive Lb. acidophilus, Lb. johnsonii and Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*, beabsichtigtes Journal: Food Microbiology
- *Influence of media heat treatment on growth performance of different Lactobacillus strains*, beabsichtigtes Journal: International Journal of Food Microbiology

7 Anhang

7.1 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 7.1: Auswahl der für die Screening-Studien verwendeten Milchsäurebakterien

Nr.	Bezeichnung	interne Stamm-Nr.	Stamm-Nr. internationaler Stammsammlung
1	<i>Lactobacillus farciminis</i>	-	DSM20180
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La-0103	
3	<i>Lactobacillus brevis</i>	La-0410	
4	<i>Lactobacillus buchneri</i>	La-1501	
5	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>alactosus</i> (= <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>)	La-0605	
6	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> (= <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>)	La-0618	
7	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (= <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	La-0610	
8	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (= <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	La-0611	
9	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (= <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	La-0617	
10	<i>Lactobacillus confusus</i>	La-2201	
11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	La-1001	DSM 20019
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	La-0502	
13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	La-0704	DSM 20074
14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	La-07/101	DSM 20355
15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	La-07/102	
16	<i>Lactobacillus fermentum</i>	La-0808	
17	<i>Lactobacillus kefir</i>	La-2601	
18	<i>Lactobacillus pentosus</i>	La-3301	
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	La-1203	DSM 20079
20	<i>Lactobacillus ruminis</i>	La-2101	DSM 20403
21	<i>Lactobacillus salvarius</i> subsp. <i>salvarius</i>	La-2002	DSM 20555
22	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	NCFM
23	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	DSM 9126
24	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	-	DSM 20553

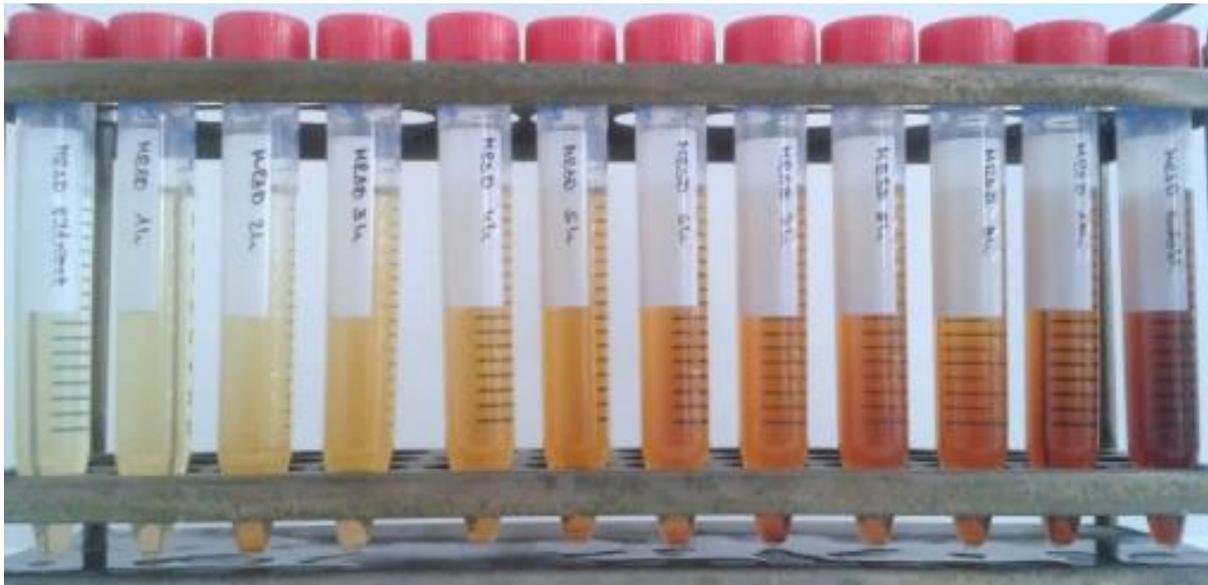


Abb. 7.1: Abhängigkeit der durch MRP verursachten Nährmedienbräunung (Nährmedium: MRS) und der zeitlich zunehmenden Behandlungsdauer (100°C). Von links nach rechts: sterilisiertes Medium, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h und 10h bei 100°C behandelt, autoklaviertes Medium.

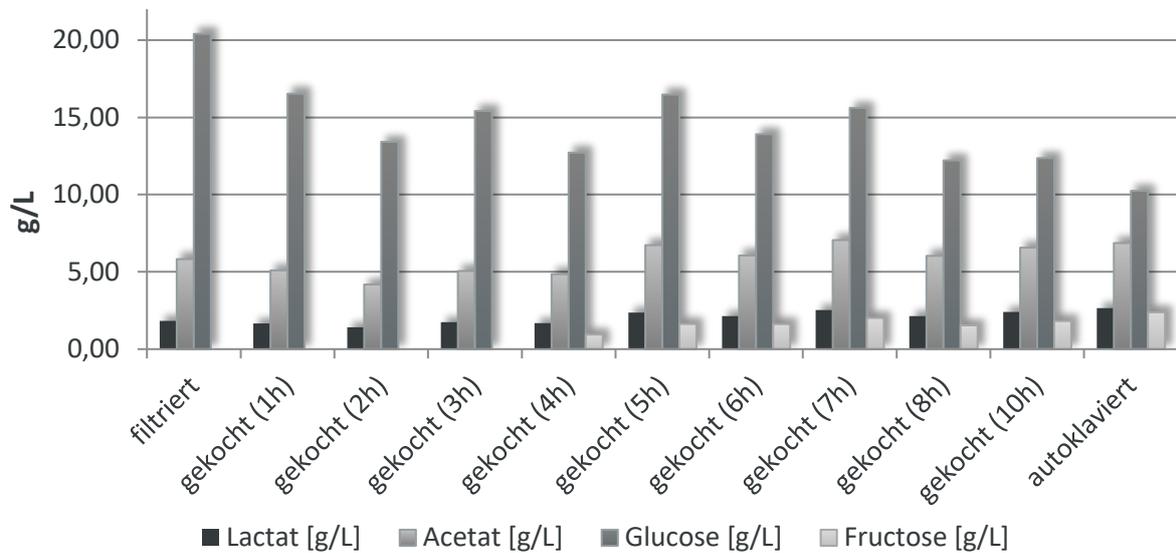


Abb. 7.2: Ergebnisse der mittels HPLC ermittelten Konzentrationen an Säuren und Zucker der unterschiedlich thermisch behandelten Medien.

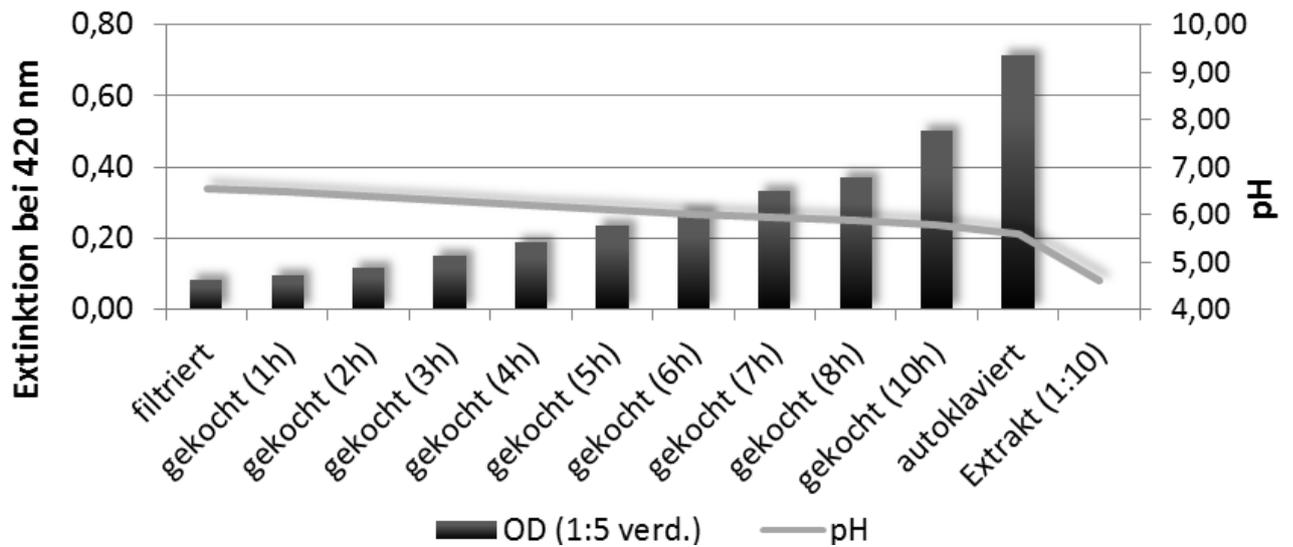


Abb. 7.3: Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 420nm (OD 420 nm) und pH-Werte der unterschiedlich thermisch behandelten Medien.

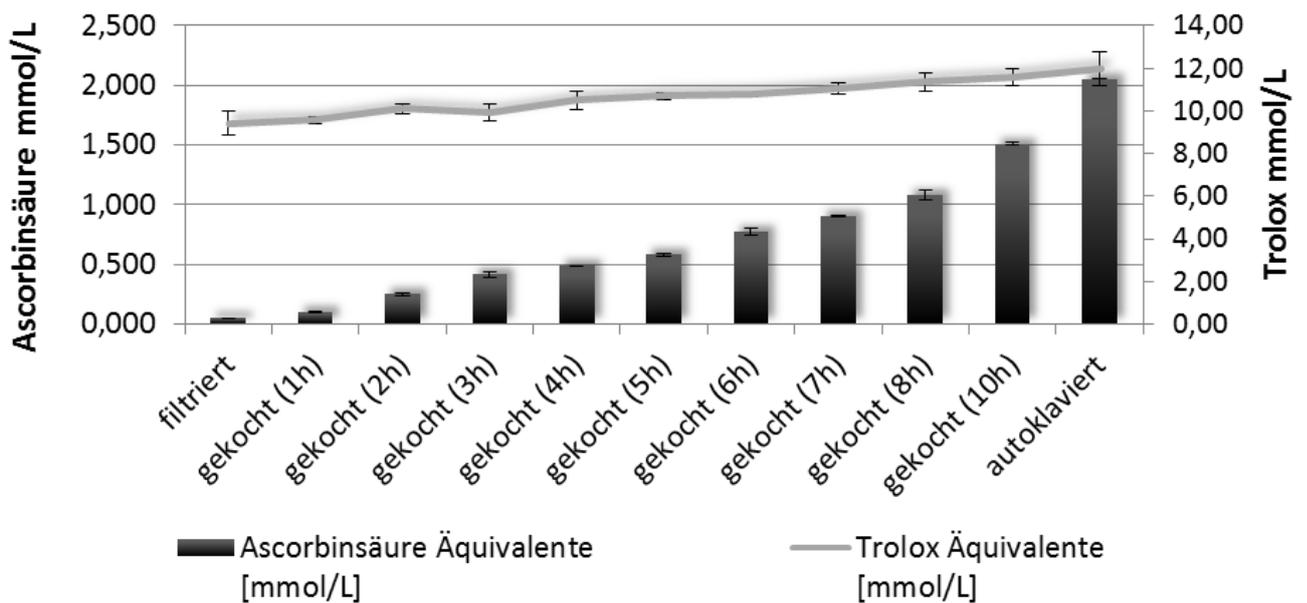


Abb. 7.4: Mittels zwei Methoden gemessene antioxidative Aktivität der unterschiedlich thermisch behandelten Medien; Trolox-Äquivalente in Dreifachbestimmung mit angegebener Standardabweichung, Ascorbinsäure-Äquivalente in Doppelbestimmung mit angegebener Mittelabweichung (filtrierte Probe nur Einfachbestimmung)

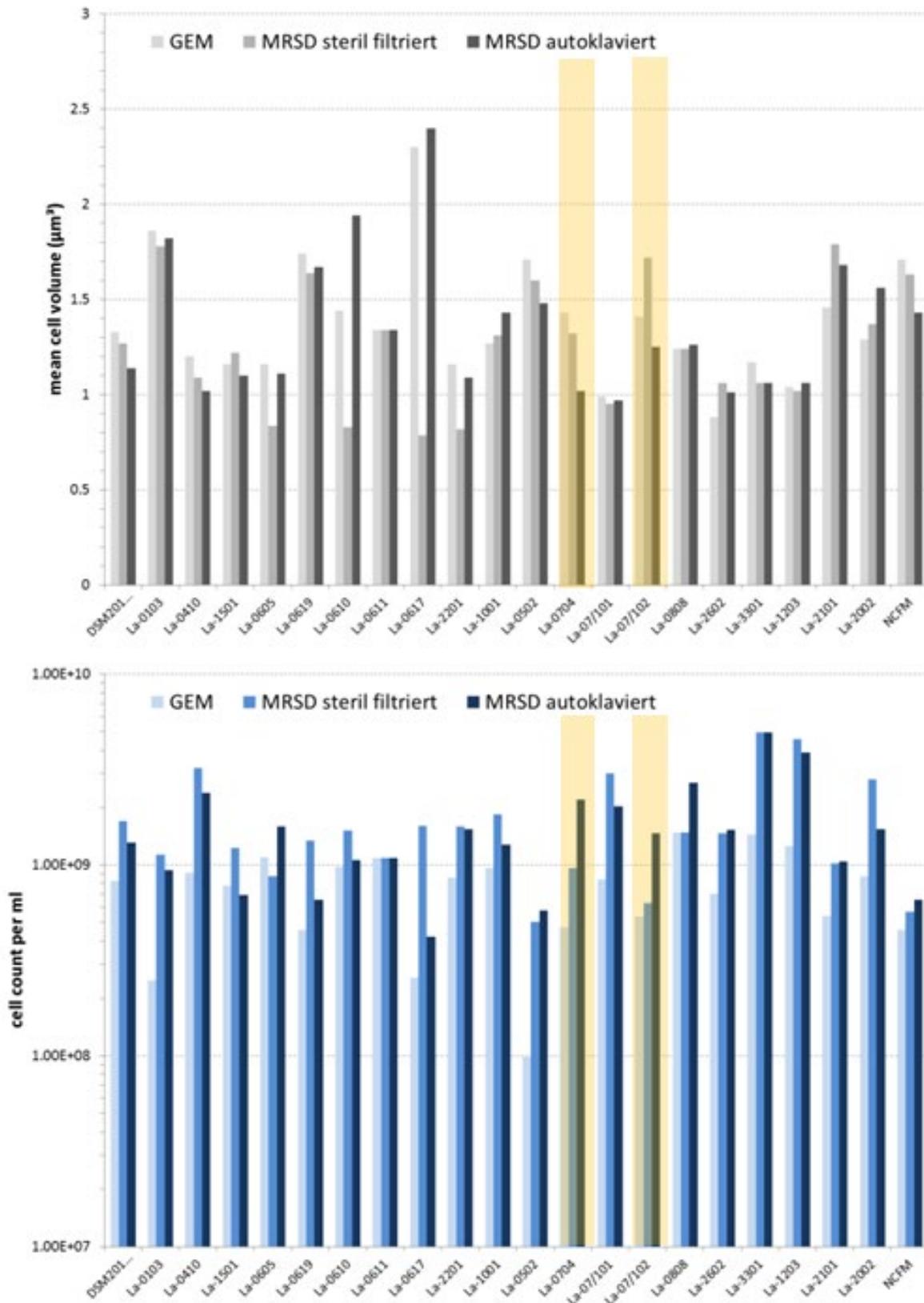


Abb. 7.5: Momentaufnahme der Wachstumscharakteristika untersuchter Lactobacillen nach 22 h Kultivierung bei 37°C in Standkultur. Oben: Mittlere Zellvolumen in μm^3 ; Unten: Zellkonzentration in Zellzahl/mL. Unter Berücksichtigung der gesamten Wachstumsverläufe wurden drei MRP-sensitive Kandidaten für weitere Untersuchungen identifiziert (zwei davon sind hier gelb markiert).

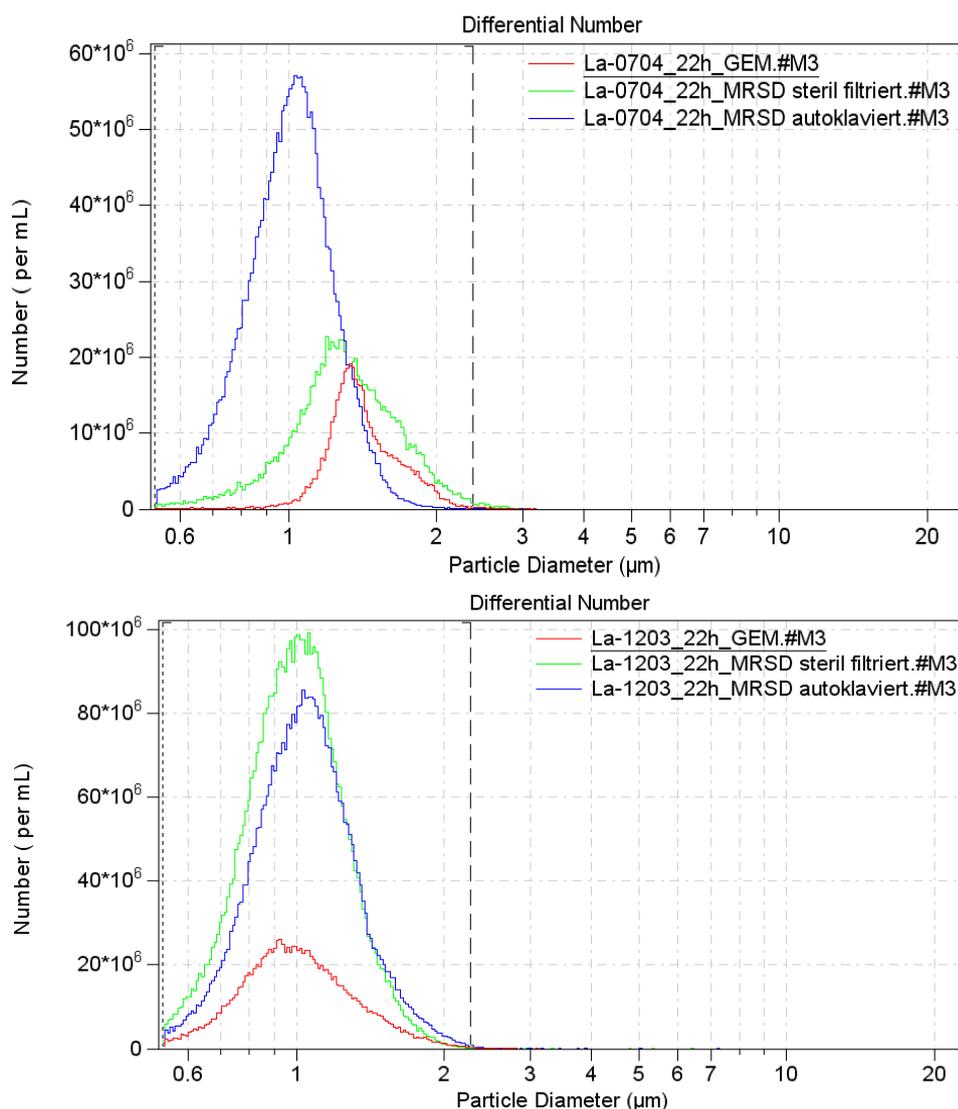


Abb. 7.6: Exemplarische Darstellung der Einflussnahme des Nährmediums sowie der Temperaturbehandlung des Mediums auf die Zellzahl und Zellgrößenverteilung (gemessen mittels Coulter Counter). Oben: Ein *L. de-broeckii*-Stamm, welcher sensitiv auf MRP reagiert, was an der Linksverschiebung der Zellgrößenverteilung bei Verwendung von autoklaviertem statt filtriertem MRSD-Medium zu erkennen ist; Unten: Ein *L. plantarum*-Stamm, welcher nicht sensitiv auf MRP reagiert.

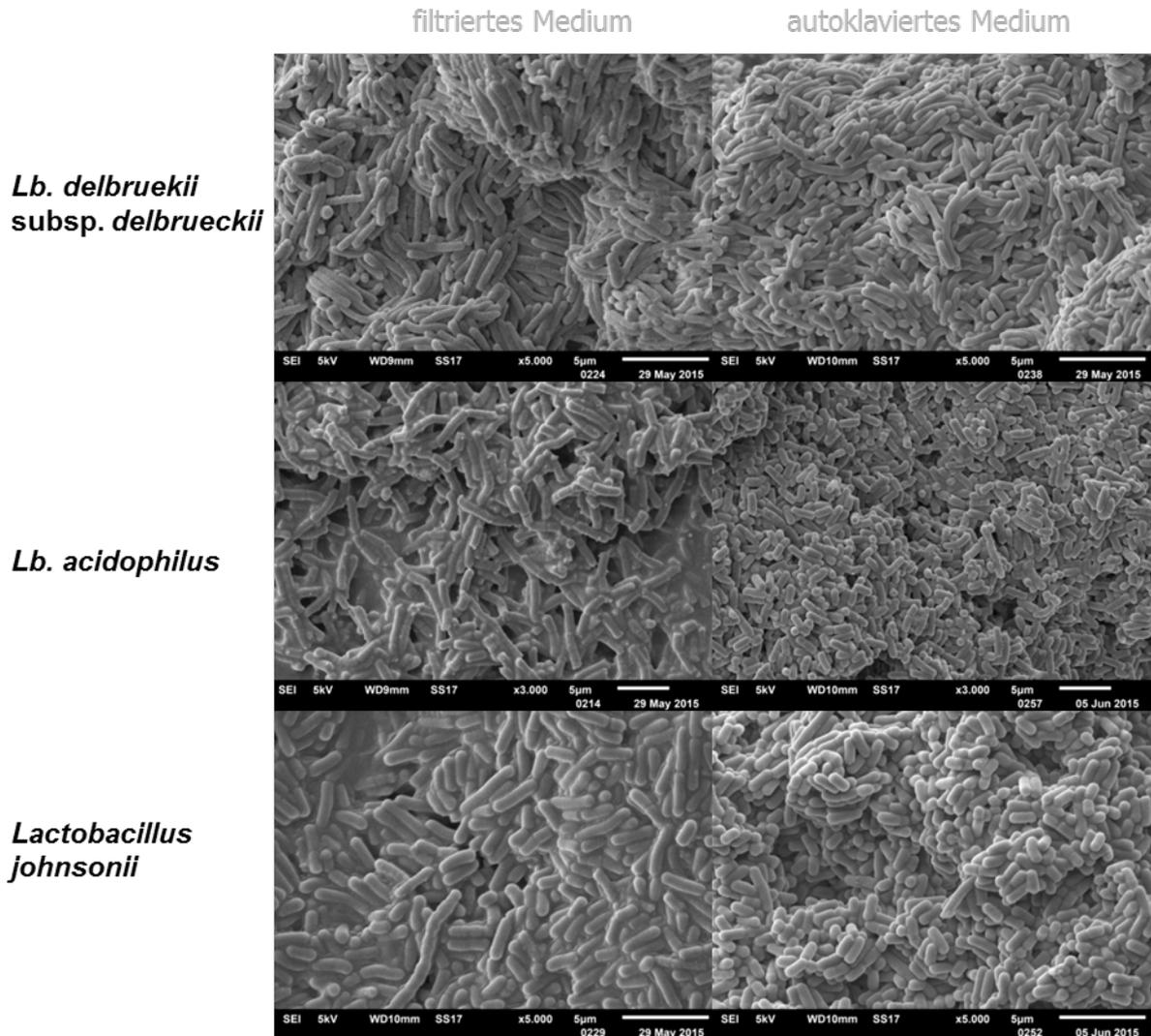


Abb. 7.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der identifizierten pleomorphen Lactobacillus Stämme. Visuell ist die Einflussnahme von Maillardreaktionsprodukten (MRP) im autoklavierten Medium (rechts) auf die Zellgröße der stäbchenförmigen Population im Vergleich zum filtrierten Medium ohne MRP (links) erkennbar.

Tabelle 7.2: Vergleich publizierter chemisch definierter Medien (CDM) zur Kultivierung von *Lactobacillus* spez.

Quelle:	Wegkamp et al., 2009	Elli et al., 1999	Zhang et al., 2009	Moretro et al., 1998	Ledesma et al., 1977
Etabliert für:	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]
Glucose	11	10	15	20	10
MgSo4 *7 H2O		0,5	1	0,15	0,15
MnSo4 * H2O		0,02		0,0152	0,0152
FeSo4 *7 H2O			0,004		
ZnSo4 *7 H2O			0,005		
Calciumlactate		1			
Kaliumacetat	1	10	0,9		
Natriumchlorid		0,02	3		
Ammoniumsulfat			1		
Ammoniumcitrat	0,6				
Cobalt(II)-sulfat	0,0025	0,5			
Kaliumhydrogenphosphat		3,1	3,1	1	0,2
Kaliumdihydrogenphosphat		1,5	6,4		
Di-Ammoniumhydrogencitrat		2			
Liponsäure			0,001		
Tween		1	0,5	0,55	1,1
Alanin	0,24	0,2	0,4	0,16	0,2
Histidin HCL	0,15	0,2	0,17	0,1	0,05
Lysin HCL	0,44	0,2	0,5	0,1	0,05
Phenylalanin	0,275	0,1	0,4	0,04	0,04
Prolin	0,675	0,2	0,7	0,04	0,04
Serin	0,34	0,1	0,5	0,08	1
Threonin	0,225	0,1	0,5	0,05	0,05
Cystein	0,13	0,1	0,2	0,2	0,2
Arginin	0,125	0,2	0,72	0,05	0,05
Asparagin		0,1	0,5	0,4	0,2
Asparaginsäure	0,42	0,3	0,05		
Isoleucin	0,21	0,1	0,24	0,05	0,05
leucin	0,475	0,2	1	0,06	0,06
Methionin	0,125	0,1	0,06	0,025	0,05
Tyrosin	0,25	0,1	0,3	0,04	0,04
Tryphophan	0,05	0,1	0,2	0,1	0,05
Valin	0,325	0,1	0,7	0,06	0,03
Glycin	0,175	0,2	0,3	0,1	0,05
Aminobuttersäure		0,1			
Glutamin			0,6	0,3	0,15
Glutaminsäure	0,5	0,3	0,6		
Nikotinsäure	0,001	0,01	0,009	0,001	0,001
Calciumpantothenat	0,001	0,01	0,0012	0,001	0,001

B12	0,001	0,00002			
4-Aminobenzosäure	0,01	0,0002	0,000056		
Myo-Inositol		0,01	0,02		
Pyridoxal HCL		0,01	0,0048	0,0005	0,0005
Riboflavin	0,001	0,01	0,0009	0,0005	0,0005
Biotin	0,0025	0,001	0,006	0,00001	0,00001
Folsäure		0,0002	0,00056	0,0001	0,0001
Thiamin	0,001		0,00056		
Thiaminchlorid				0,001	0,001
Bernsteinsäure				11,9	8,3
Ascorbinsäure	0,5	0,5			
Guanin	0,01	0,1	0,0056		
Thymin	0,005	0,1			
Cytidin		0,1			
2'-deoxyadenosin		0,1			
2'-deoxyuridin		0,1			
Adenin	0,01		0,011	0,025	0,05
Uracil	0,01		0,023	0,025	0,05
Inosin	0,005				
Pyridoxamin	0,005				
Pyridoxin	0,02				
Xanthin	0,01		0,0038	0,025	0,05
MOPS			15		
Tricine			1,5		
EDTA			0,0075		
Nitrilotriessigsäure			0,0075		
Glutathion			0,015		
Ammoniumheptamolybdat	0,0025		0,00019		
MnSO ₄ *4H ₂ O			0,00038		
Calciumchlorid * 2H ₂ O	0,05		0,04		
Cobaltchlorid * 6H ₂ O			0,00019		
Kupfersulfat * 5H ₂ O	0,0025		0,00019		
Zinksulfat	0,05				
FeCl ₂	0,03				
FeCl ₃	0,05				
MgCl ₂	0,2				
MnCl ₂	0,05				
Borsäure			0,00075		
Orotsäure	0,05				
kaliumsulfat			0,0023		
			0,00011		

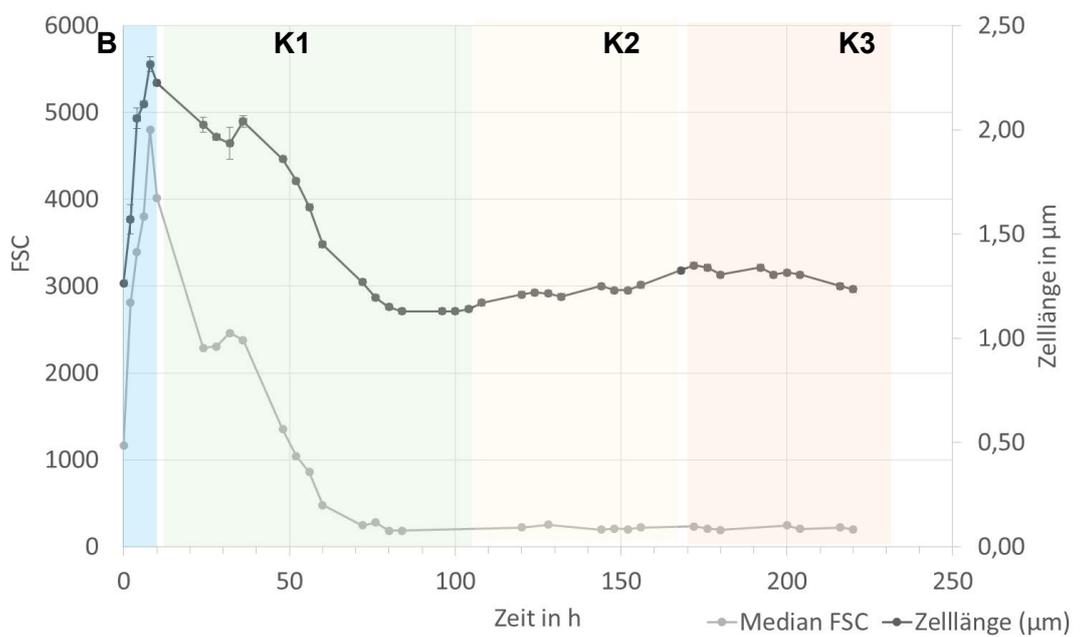


Abb. 7.8: Verlauf der Zellmorphologie über die verschiedenen Stadien einer kontinuierlichen Kulturführung (Chemostat) mit *Lb. acidophilus* La0107.

B: Batch-Phase mit halbkonz., sterilfiltriertem MRS; K1: Conti Phase 1: halbkonz., sterilfiltriertes MRS; K2: Conti Phase 2: halbkonz., sterilfiltriertes MRS ohne Glc und Proteose Pepton 3 + Maillard-Extrakt; K3: Conti Phase 3: halbkonz., sterilfiltriertes MRS

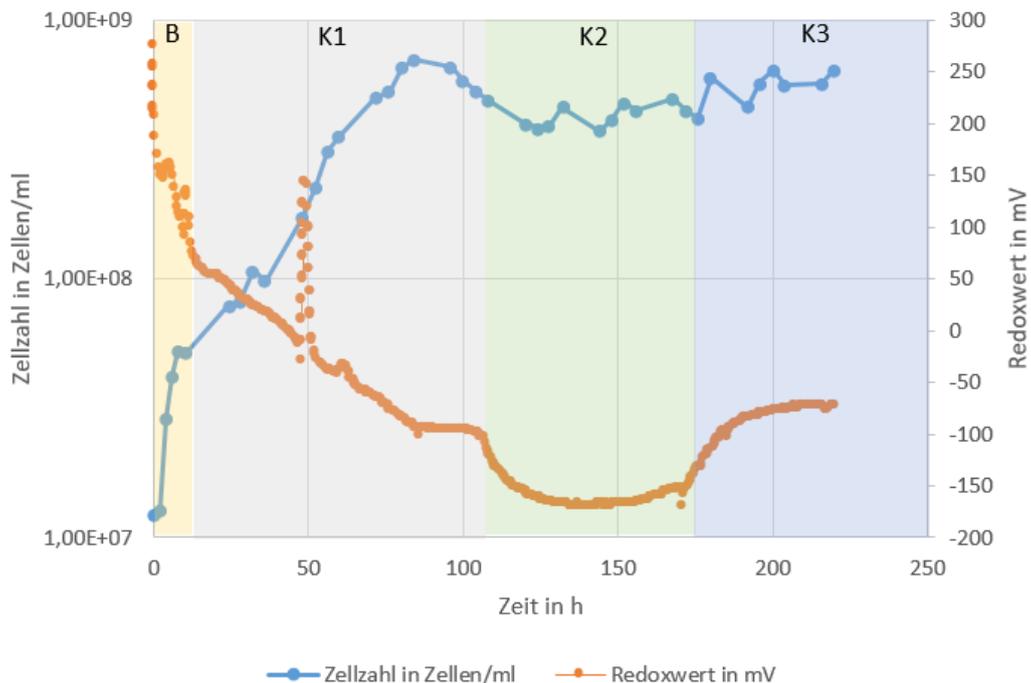


Abb. 7.9: Verlauf der Zellkonzentration und des online gemessenen Redoxwertes über die verschiedenen Stadien einer kontinuierlichen Kulturführung (Chemostat) mit *Lb. acidophilus* La0107.

B: Batch-Phase mit halbkonz., sterilfiltriertem MRS; K1: Conti Phase 1: halbkonz., sterilfiltriertes MRS; K2: Conti Phase 2: halbkonz., sterilfiltriertes MRS ohne Glc und Proteose Pepton 3 + Maillard-Extrakt; K3: Conti Phase 3: halbkonz., sterilfiltriertes MRS

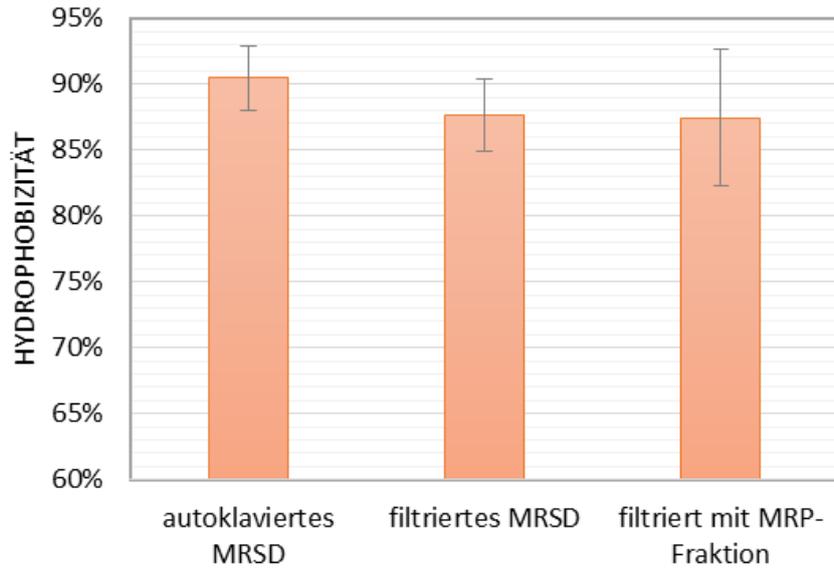


Abb. 7.10: Hydrophobizitätstest (MATH, Microbial Adherence to Hydrocarbon) von dreifach gewaschenen *Lb. acidophilus* Zellen, welche in drei unterschiedlichen Medien für 22 h kultiviert wurden.

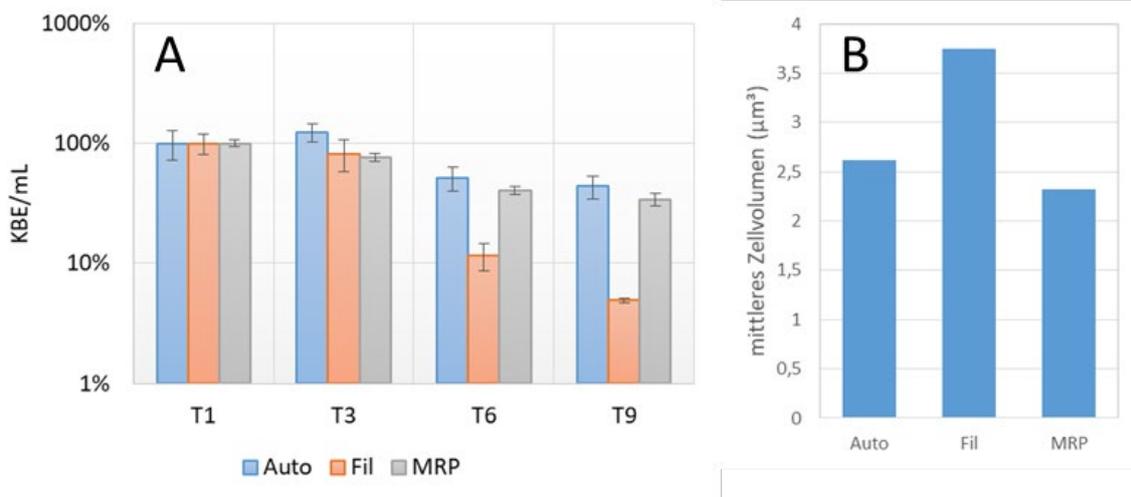


Abb. 7.11: Abnahme der Lebendkeimzahl von *Lb. acidophilus* bei mehrfachen Einfrier- und Auftauzyklen (A). Die Kulturen wurden in unterschiedlichen behandelten MRS Medien kultiviert, was zu unterschiedlichen mittleren Zellgrößen der Kulturen führte (B). Auto: MRS Medium welches standardmäßig autoklaviert wurde, Fil: MRS Medium welches sterilfiltriert wurde, MRP: MRS Medium, bei dem nur die Glukose und das enthaltene Pepton gemeinsam unter Bildung von Maillardreaktionsprodukten autoklaviert wurden und mit den restl. sterilfiltrierten Medienkomponenten aufgefüllt wurde.

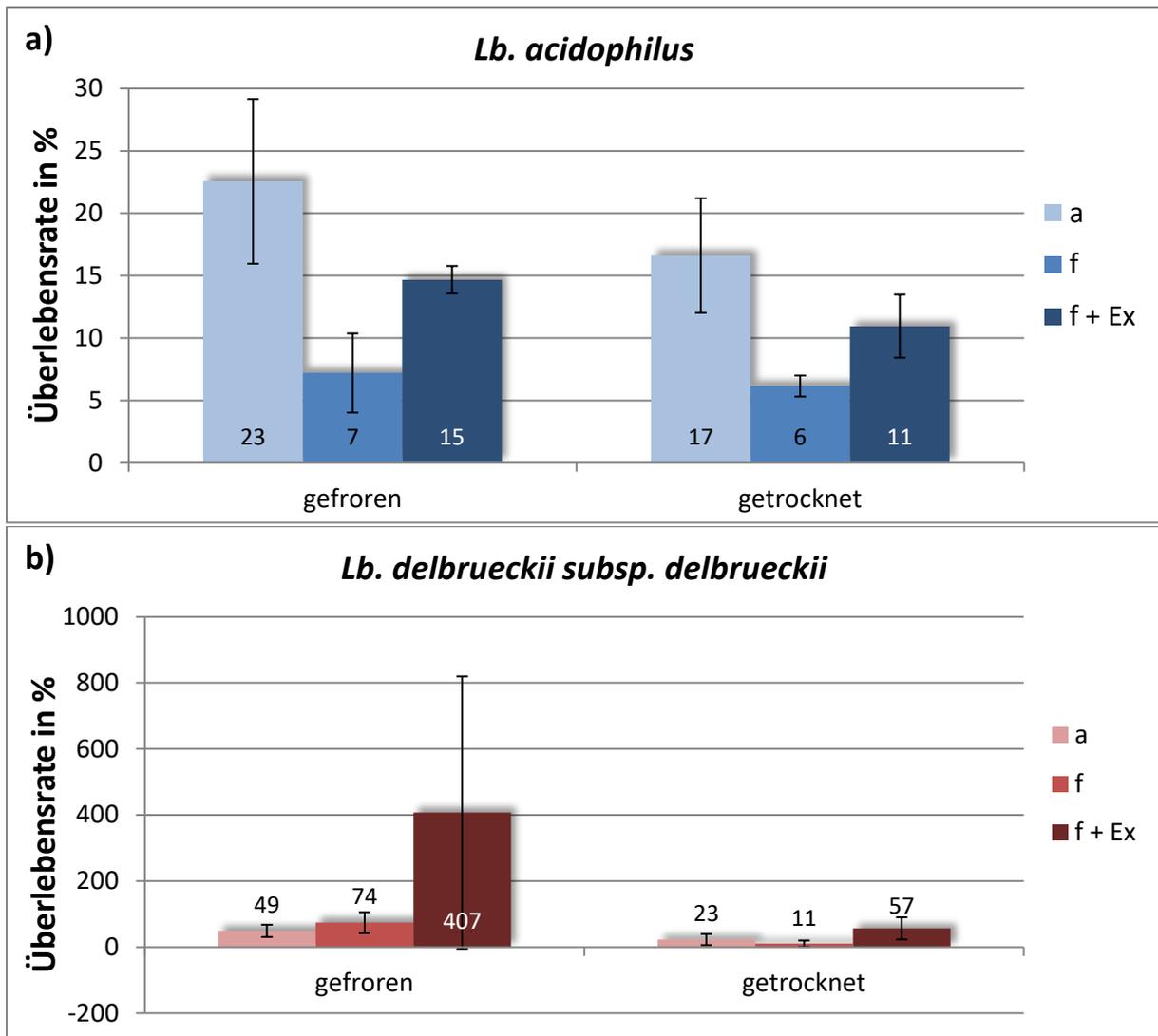


Abb. 7.12: Überlebensrate der Zellen nach verschiedenen Prozessierungsschritten a) *Lb. acidophilus*; b) *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*; echte Dreifachbestimmung; Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. *Bei dem deutlich erhöhten Wert muss bei der Probe von einem Ausreißer ausgegangen werden. a: autoklaviertes Medium, f: filtriertes Medium, f+Ex: filtriertes Medium mit separat bei dem nur die Glukose und das enthaltene Pepton gemeinsam unter Bildung von Maillardreaktionsprodukten autoklaviert wurden und mit den restl. sterilfiltrierten Medienkomponenten aufgefüllt wurde.

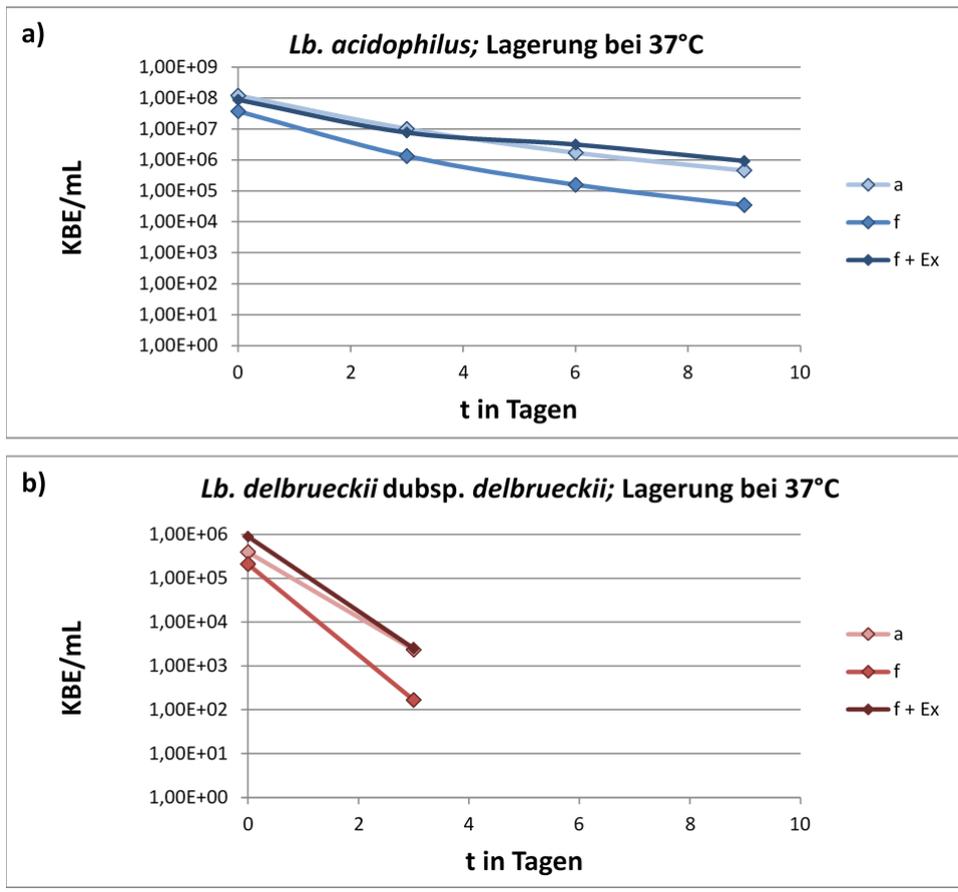


Abb. 7.13: Abnahme der KBE/mL mit der Lagerzeit der gefriergetrockneten Präparate bei 37°C; a) *Lb. acidophilus*; b) *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (ab dem 6. Tag waren <10 KBE/mL nachweisbar); t₀ = nach Trocknung; Ergebnis einer Dreifachbestimmung.
a: autoklaviertes Medium, f: filtriertes Medium, f+Ex: filtriertes Medium mit separat bei dem nur die Glukose und das enthaltene Pepton gemeinsam unter Bildung von Maillardreaktionsprodukten autoklaviert wurden und mit den restl. sterilfiltrierten Medienkomponenten aufgefüllt wurde.

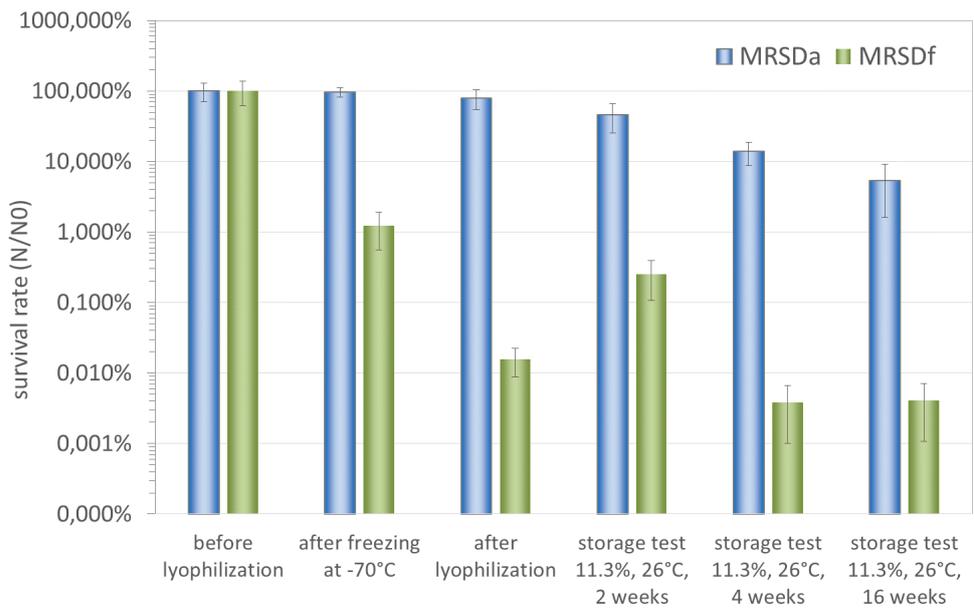


Abb. 7.13-2: Überlebensrate von *Lb. acidophilus* nach Kultivierung in MRSDf und MRSDa während der Präparation, Trocknung und anschließenden Lagerung bei 26°C. Versuche wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt.

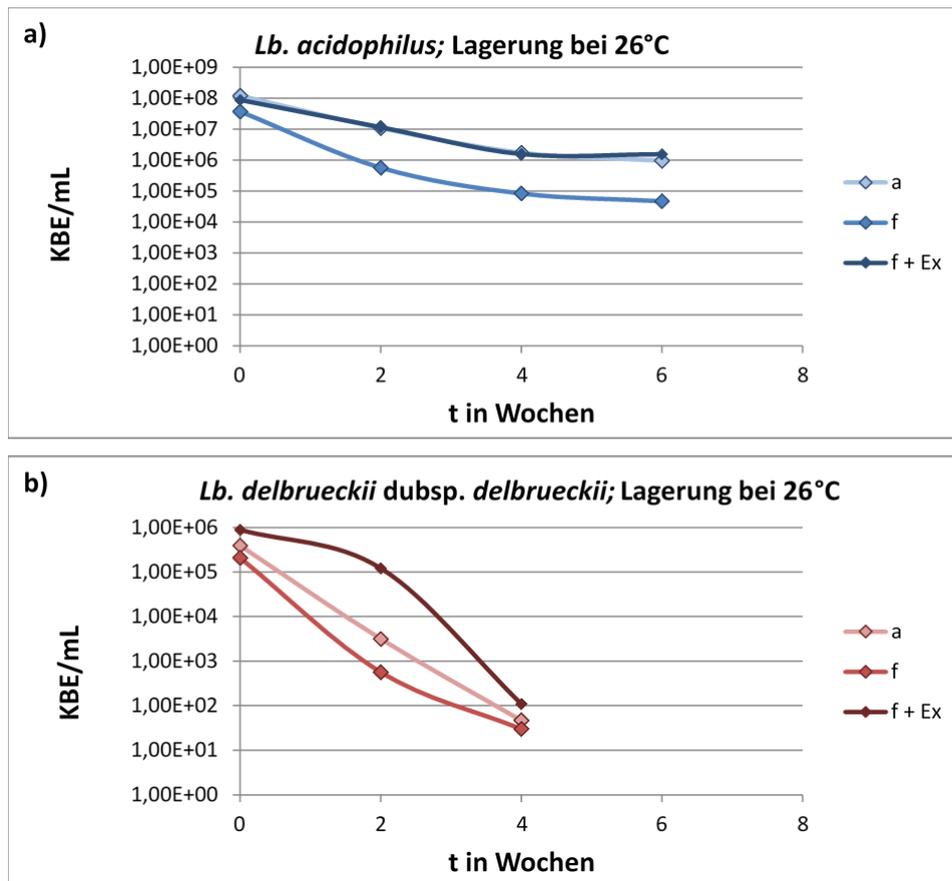


Abb. 7.14: Abnahme der KBE/mL mit der Lagerzeit der gefriergetrockneten Präparate bei 26°C; a) *Lb. acidophilus*; b) *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (in der 6. Woche waren <10 KBE/mL nachweisbar); t_0 = nach Trocknung; Ergebnis einer Dreifachbestimmung.

a: autoklaviertes Medium, f: filtriertes Medium, f+Ex: filtriertes Medium mit separat bei dem nur die Glukose und das enthaltene Pepton gemeinsam unter Bildung von Maillardreaktionsprodukten autoklaviert wurden und mit den restl. sterilfiltrierten Medienkomponenten aufgefüllt wurde.

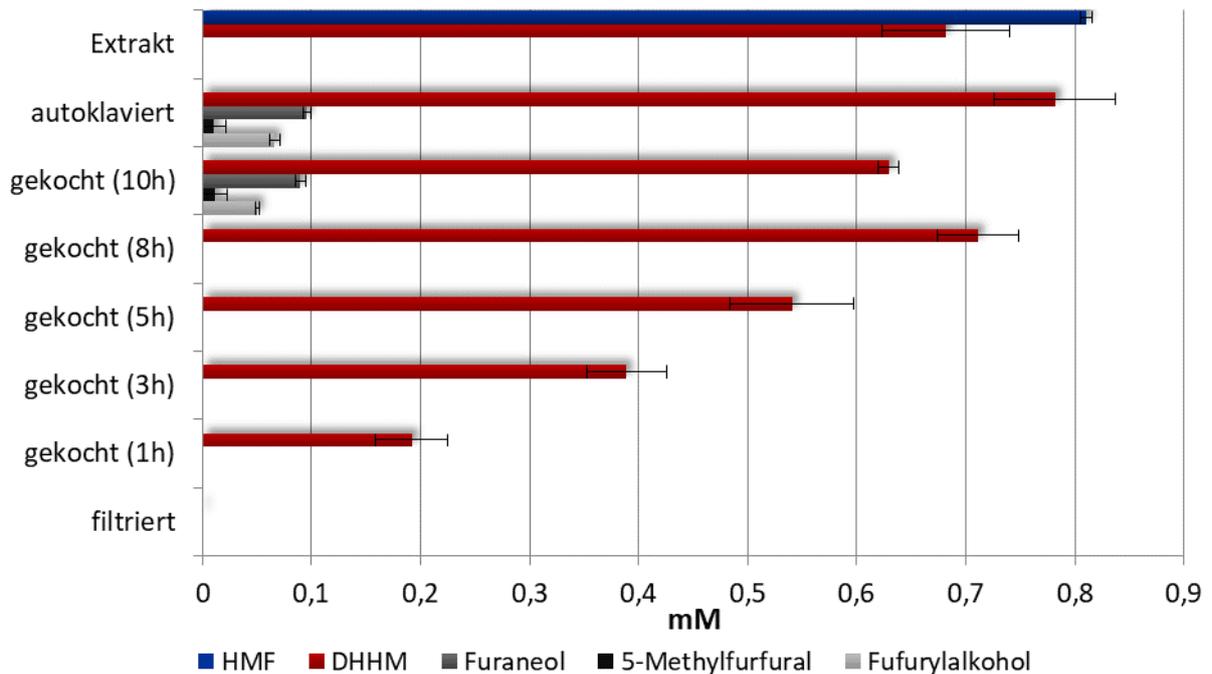


Abb. 7.15: Ergebnisse der Heterocyclenanalytik der unterschiedlich thermisch behandelten Medien; der Extrakt wurde vor der Bestimmung 1:10 verdünnt, um mit den MRSD-Medien unmittelbar vergleichbare Werte zu erhalten; Doppelbestimmung; Fehlerbalken stellen die Mittelabweichung dar

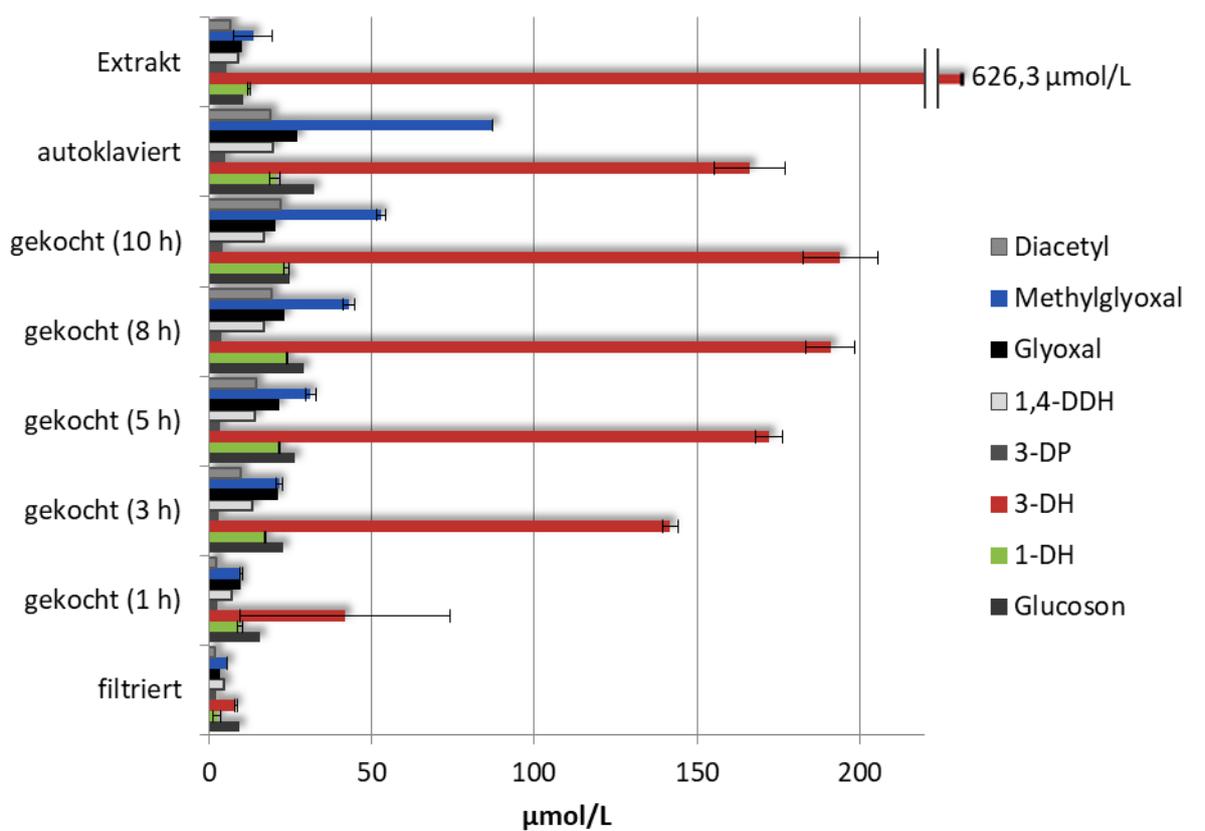


Abb. 7.16: Ergebnisse der α -Dicarbonylanalytik der unterschiedlich thermisch behandelten Medien; der Extrakt wurde vor der Bestimmung 1:10 verdünnt, um mit den MRSD-Medien vergleichbare Werte zu erhalten; Mittelwerte der Doppelbestimmung; Fehlerbalken der farblich hervorgehobenen Verbindungen stellen die Mittelabweichung dar; DH = Desoxyoson; DDH = Didesoxyhehosulose; DP = Desoxypentosen

Tabelle 7.3: Übersicht der Medienanalyse von unterschiedlich temperierten MRSD-Medien sowie eines hergestellten MRP-Extraktes

Medium	Lactat	Acetat	Glucose	Fructose	OD (1:5)	pH	Ascorbinsäure Äquivalente	Trolox Äquivalente	Furfurylalkohol	5-Methylfurfural	Furaneol	DHHM	HMF	Glucoson	1-DH	3-DH	3-DP	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl
Einheit	[g/L]				-	µg/mL	mmol/L							µmol/L							
filtriert	1,82	5,83	20,41	-	0,08	6,56	8,95	9,43	-	-	-	0	-	9,2	2,5	8,3	2,3	4,7	3,3	5,7	2,0
gekocht (1h)	1,67	5,10	16,53	-	0,10	6,47	18,19	9,56	-	-	-	0,19	-	15,8	9,5	41,7	2,4	6,9	9,6	9,8	2,2
gekocht (2h)	1,42	4,18	13,42	-	0,12	6,37	43,77	10,09	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
gekocht (3h)	1,74	5,05	15,41	-	0,15	6,29	73,14	9,90	-	-	-	0,39	-	22,7	17,4	141,7	3,0	13,4	21,3	21,6	9,8
gekocht (4h)	1,68	4,85	12,72	0,94	0,19	6,18	85,56	10,47	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
gekocht (5h)	2,36	6,73	16,48	1,63	0,23	6,11	102,60	10,69	-	-	-	0,54	-	26,2	21,7	172,2	3,5	14,0	21,7	31,3	14,4
gekocht (6h)	2,13	6,06	13,91	1,62	0,28	6,00	136,59	10,77	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
gekocht (7h)	2,54	7,06	15,61	2,02	0,33	5,95	158,69	11,05	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.
gekocht (8h)	2,14	6,04	12,22	1,54	0,37	5,88	190,22	11,36	-	-	-	0,71	-	29,1	24,1	191,0	3,9	16,9	23,2	42,9	19,1
gekocht (10h)	2,40	6,57	12,36	1,82	0,50	5,78	265,96	11,56	0,05	0,01	0,09	0,63	-	24,7	23,7	194,2	4,2	16,7	20,6	52,9	22,0
autoklaviert	2,66	6,87	10,25	2,38	0,71	5,58	362,04	11,99	0,07	0,01	0,10	0,78	-	32,3	20,3	166,3	5,1	19,6	27,1	87,2	19,0
Extrakt	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	-	-	-	0,68	0,81	10,5	12,5	626,3	5,6	8,8	10,3	13,6	6,5

k.D. = keine Daten vorhanden

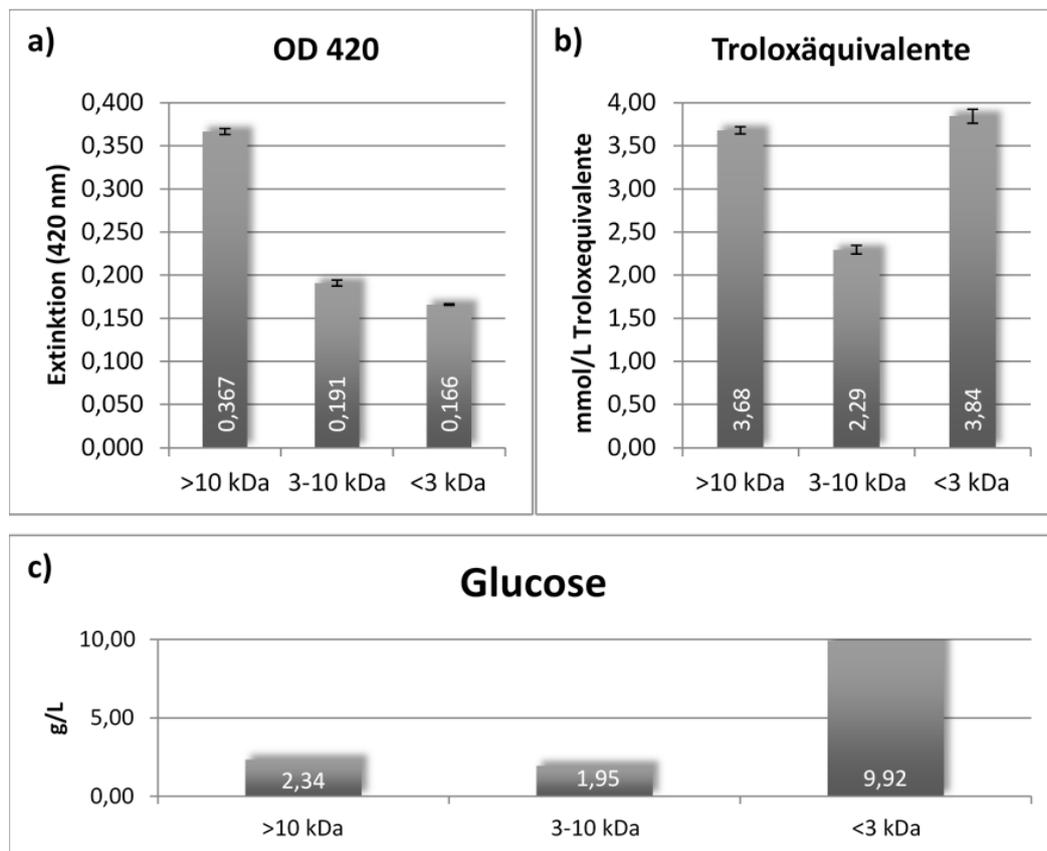


Abb. 7.17: Charakterisierung der einzelnen Fraktionen (1:10 verdünnt, für OD 1:50); a) OD (420 nm); Doppelbestimmung mit dargestellter Mittelabweichung; b) TEAC-Assay; Dreifachbestimmung mit dargestellter Standardabweichung; c) Glucosegehalt; Einfachbestimmung

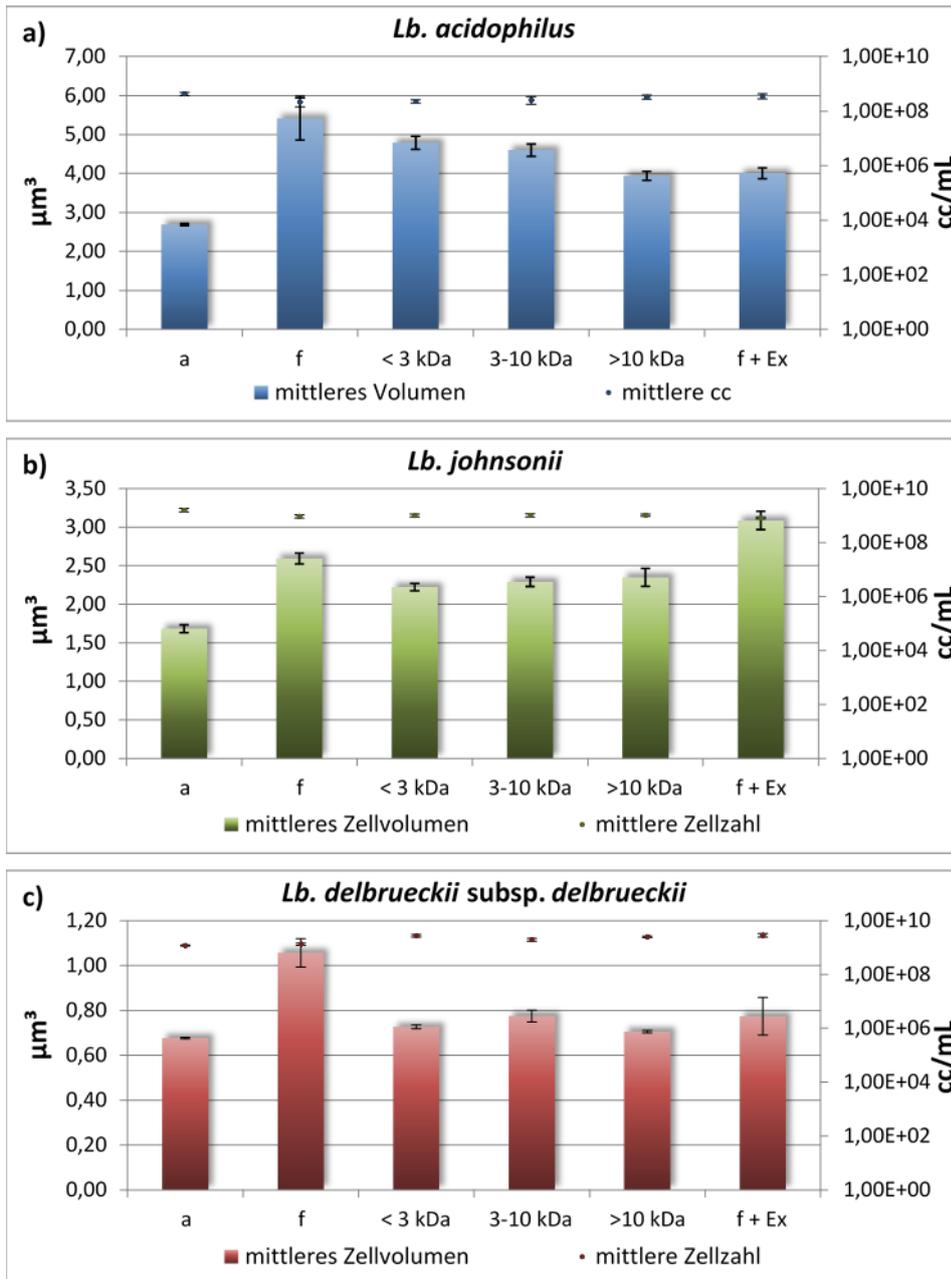


Abb. 7.18: Ergebnisse des Wachstumsexperimentes mit zudosierten Maillard-Extrakt-Fractionen in filtriertem MRSD; a) *Lb. acidophilus*; b) *Lb. johnsonii*; c) *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*; die Werte für die Fractionen basieren auf einer richtigen Dreifachbestimmung (Fermentation + CC-Messung), die der autoklavierten/ filtrierten Medien auf einer dreifachen CC-Messung; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; a = autoklaviert; f = filtriert; f + Ex = filtriertes MRSD + 10% Maillard-Extrakt

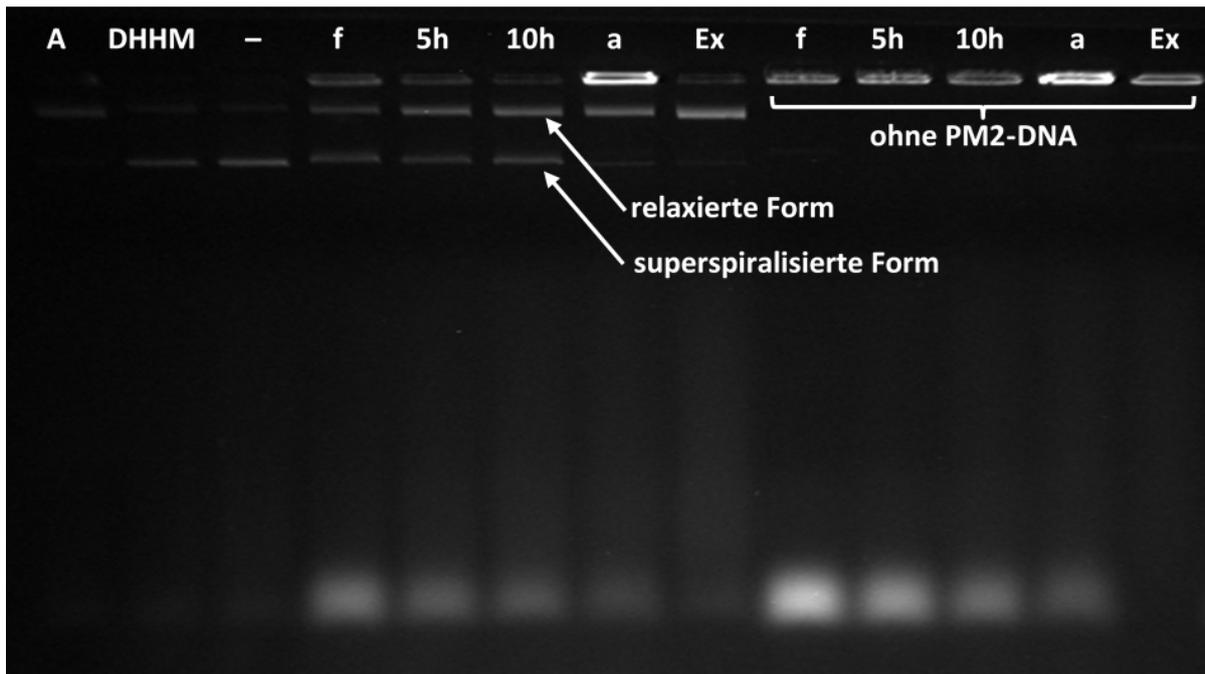


Abb. 7.19: PM2-Assay-Ergebnisse nach 24h Inkubation bei 37°C; die Abbildung zeigt eines der Ergebnisse der Doppelbestimmung; A = 10 µM L-Ascorbinsäure; DHHM = 10 µM DHHM; - = Negativprobe (H₂O); f = filtriertes MRSD; 5/10h = 5/10h lang gekochtes MRSD; a = autoklaviertes MRSD; Ex = Maillard-Extrakt autoklaviert 1:10 verdünnt

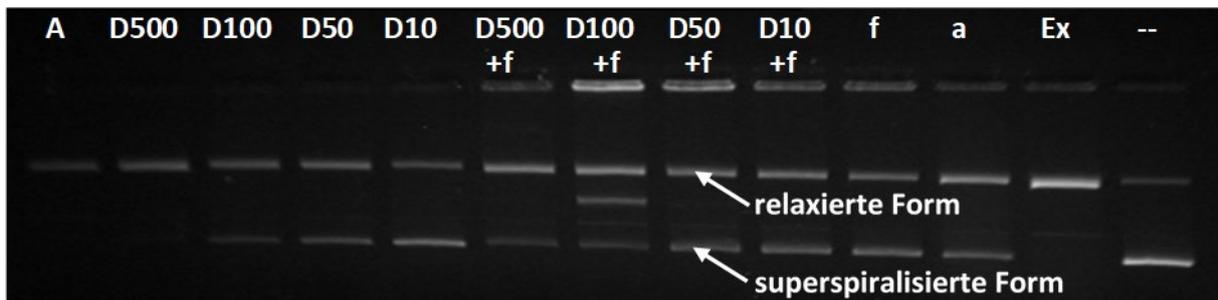


Abb. 7.19: PM2-Assay-Ergebnisse nach 24h Inkubation bei 37°C; die Abbildung zeigt eines der Ergebnisse der Doppelbestimmung; A = L-Ascorbinsäure 10 µM; D = DHHM; 500/100/50/10 = 500/100/50/10 µM; f = filtriertes MRSD; a = autoklaviertes MRSD; Ex = Maillard-Extrakt autoklaviert 1:10 verdünnt; -- = Negativprobe (H₂O)

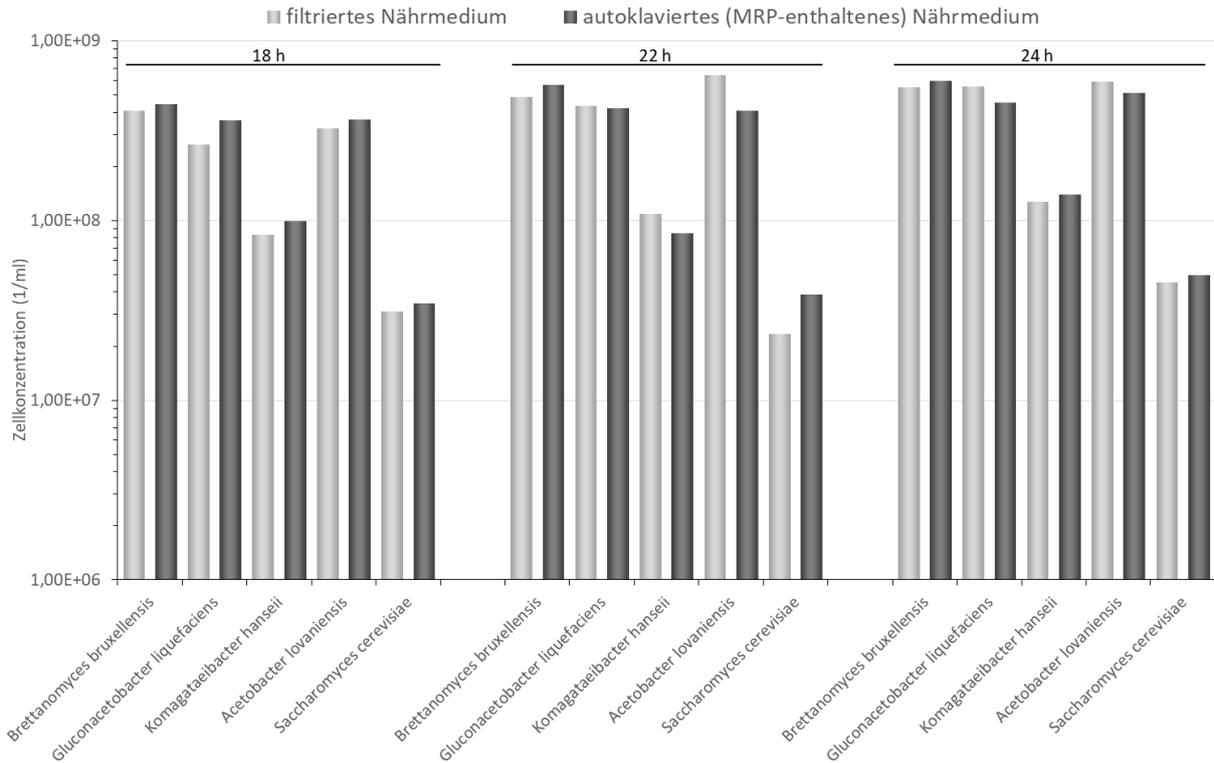


Abb. 7.20: Charakterisierung von zwei getränkerelevanten Hefen und drei getränkerelevanten Essigsäurebakterien auf dessen Empfindlichkeit gegenüber MRP. Dargestellt sind die Zellkonzentrationen nach unterschiedlichen Fermentationszeiten in filtriertem und autoklaviertem YEPD Medium.

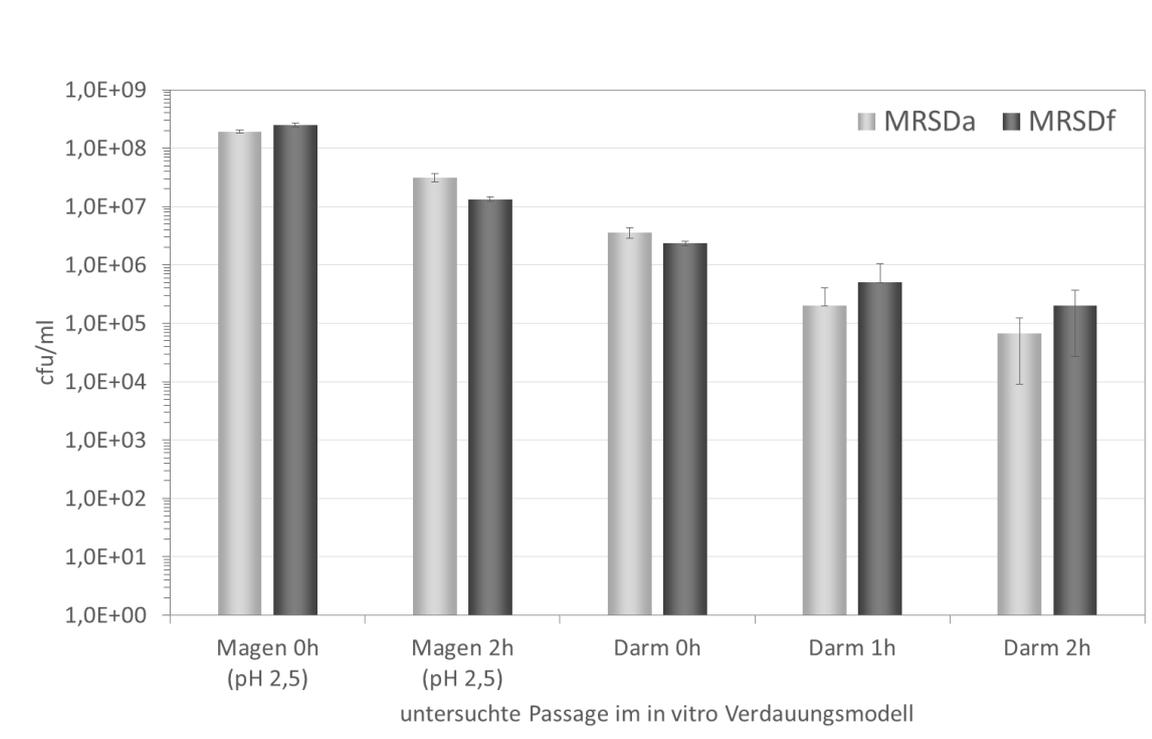


Abb. 7.21: Abnahme der Lebendzellkonzentration (cfu/ml) von *Lb. acidophilus* im In-vitro-Verdauungsmodell, bestehend aus einer 2-stündigen Magensaftphase und einer anschließenden Phase unter chemisch definierten Bedingungen, wie sie im Darm herrschen (pH, Gallensaft).

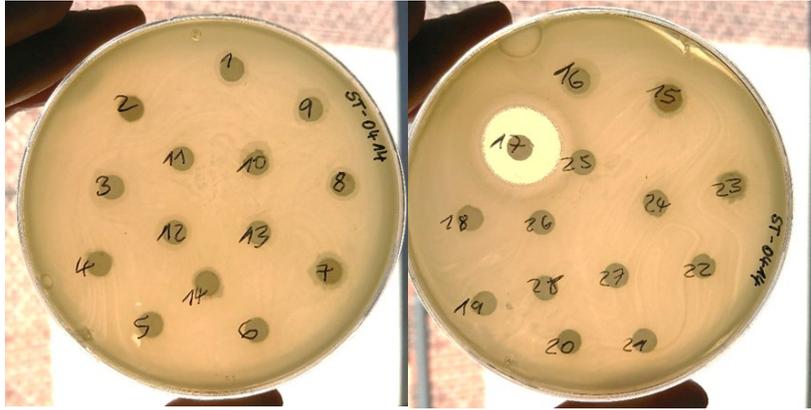


Abb. 7.22: Exemplarisch dargestellte Agarplatten eines sog. Spot-Hemmtests zur Bewertung der spezifischen Inhibierung eines Leitkeims (hier *Staphylococcus aureus*) durch verschiedene Spezies sowie Populationen der im Forschungsprojekt untersuchten Milchsäurebakterien (Spot 1-16 und 18-28). Spot 17 bildet die Positivkontrolle des Hemmtests mit 80%iger Milchsäure.