



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Zum Wachstumsverhalten verschiedener
Mikroorganismen zur
fermentativen Vorbehandlung von Weizenkleie

verfasst von / submitted by

Daniel Weissenböck, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears
on the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Wolfgang Kneifel

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Weissenböck, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Des Weiteren versichere ich, die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken als solche kenntlich gemacht zu haben. Diese Arbeit habe ich bisher keinem anderen Prüfungsamt in gleicher oder vergleichbarer Form vorgelegt. Sie wurde bisher nicht veröffentlicht.

Datum/Unterschrift

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Formelverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1. Weizenkleie.....	2
2.1.1. Zusammensetzung	2
2.1.2. Einsatz in der Humanernährung	3
2.1.3. Verwendung als Futtermittel	4
2.2. Turbidimetrie	4
2.3. Homo- und heterofermentative Milchsäuregärung	7
2.4. Untersuchte Mikroorganismen.....	8
2.4.1. Lactobacillales	8
2.4.2. Bifidobacterium	18
2.4.3. Bacillus	19
2.4.4. Escherichia	22
2.4.5. Saccharomyces.....	23
2.4.6. Wickerhamomyces anomalus.....	24
3. Material und Methoden.....	26
3.2. Herstellung der Nährmedien und Kohlenhydratquellen	27
3.2. Ermittlung der Keimzahl	31
3.3. Kohlenhydrat Screening.....	33
3.4. A3X Fermentation	36
4. Ergebnisse und Diskussion	38
4.1. <i>Lactobacillus</i>	38
4.2. <i>Pediococcus</i>	43
4.3. <i>Enterococcus</i>	44
4.4. <i>Lactococcus</i>	46
4.5. <i>Leuconostoc</i>	46
4.6. <i>Weissella</i>	48
4.7. <i>Bifidobacterium</i>	48
4.8. <i>Bacillus</i>	49
4.9. <i>Escherichia</i>	52
4.10. <i>Saccharomyces</i>	52

4.11. <i>Wickerhamomyces</i>	53
4.12. A3X Abbau	54
5. Schlussbetrachtung.....	56
6. Anhang	57
6.1. Liste verwendeter Mikroorganismen	57
7. Zusammenfassung	60
8. Abstract.....	61
9. Literaturverzeichnis	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Xylan	2
Abbildung 2: Strukturformel von Arabinoxylan	3
Abbildung 3: Turbidimetrie und Nephelometrie	5
Abbildung 4: Bioscreen C	6
Abbildung 5: Keimzahldiagramm	32
Abbildung 6: Pipettierschema für Kohlenhydratscreening.....	34
Abbildung 7: Auswertung der Rohdaten.....	35
Abbildung 8: Pipettierschema für A3X Versuch.....	36
Abbildung 9: Wachstumskurven von <i>L. acidophilus</i>	38
Abbildung 10: Wachstumskurven von <i>L. brevis</i>	39
Abbildung 11: Wachstumskurven von <i>L. casei</i>	39
Abbildung 12: Wachstumskurven von <i>L. hilgardii</i>	40
Abbildung 13: Wachstumskurven von <i>L. kisonensis</i>	40
Abbildung 14: Wachstumskurven von <i>L. otakiensis</i>	40
Abbildung 15: Wachstumskurven von <i>L. plantarum</i>	41
Abbildung 16: Wachstumskurven von <i>L. reuteri</i>	42
Abbildung 17: Wachstumskurven von <i>L. sanfranciscensis</i>	43
Abbildung 18: Wachstumskurven von <i>P. acidilactici</i>	43
Abbildung 19: Wachstumskurven von <i>P. pentosaceus</i>	44
Abbildung 20: Wachstumskurven von <i>P. parvulus</i>	44
Abbildung 21: Wachstumskurven von <i>E. casseliflavus</i>	44
Abbildung 22: Wachstumskurven von <i>E. faecalis</i>	45
Abbildung 23: Wachstumskurven von <i>E. faecium</i>	45
Abbildung 24: Wachstumskurven von <i>E. malodoratus</i>	45
Abbildung 25: Wachstumskurven von <i>L. raffinolactis</i>	46
Abbildung 26: Wachstumskurven von <i>L. lactis</i>	46
Abbildung 27: Wachstumskurven von <i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>	46
Abbildung 28: Wachstumskurven von <i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	47
Abbildung 29: Wachstumskurven von <i>L. pseudomesenteroides</i>	47
Abbildung 30: Wachstumskurven von <i>W. confusa</i>	48
Abbildung 31: Wachstumskurven von <i>B. adolescentis</i>	49
Abbildung 32: Wachstumskurven von <i>B. coagulans</i>	49
Abbildung 33: Wachstumskurven von <i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	49

Abbildung 34: Wachstumskurven von <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	50
Abbildung 35: Wachstumskurven von <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	50
Abbildung 36: Wachstumskurven von <i>B. thuringiensis</i>	50
Abbildung 37: Wachstumskurven von <i>B. toyonensis</i>	51
Abbildung 38: Wachstumskurven von <i>B. weihenstephanensis</i>	51
Abbildung 39: Wachstumskurven von <i>E. coli</i>	52
Abbildung 40: Wachstumskurven von <i>S. boulardii</i>	52
Abbildung 41: Wachstumskurven von <i>S. cerevisiae</i>	53
Abbildung 42: Wachstumskurven von <i>W. anomalus</i>	53
Abbildung 43: A3X Abbau der Positivkontrolle (<i>B. adolescentis</i>)	54
Abbildung 44: A3X Abbau der Negativkontrolle (<i>L. acidophilus</i>).....	54
Abbildung 45: A3X Abbau von <i>L. brevis</i>	54
Abbildung 46: A3X Abbau von <i>L. casei</i>	54
Abbildung 47: A3X Abbau von <i>L. kisonensis</i>	55
Abbildung 48: A3X Abbau von <i>L. plantarum</i>	55
Abbildung 49: A3X Abbau von <i>L. lactis</i>	55
Abbildung 50: A3X Abbau von <i>P. acidilactici</i>	55
Abbildung 51: A3X Abbau von <i>E. malodoratus</i>	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Lactobacillus ssp.</i>	11
Tabelle 2: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Pediococcus ssp.</i>	12
Tabelle 3: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Enterococcus ssp.</i>	14
Tabelle 4: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Lactococcus raffinolactis</i>	15
Tabelle 5: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Leuconostoc ssp.</i>	16
Tabelle 6: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Weissella confusa</i>	17
Tabelle 7: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	18
Tabelle 8: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Bacillus ssp.</i>	21
Tabelle 9: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>E. coli</i>	22
Tabelle 10: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>Saccharomyces ssp.</i>	23
Tabelle 11: Erwarteter Kohlenhydratabbau von <i>W. anomalus</i>	25
Tabelle 12: Medien und Anzuchtbedingungen für Keimzahlbestimmung	31
Tabelle 13: Anzuchtbedingungen für Bioscreen C	33
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen.....	57

Formelverzeichnis

Formel 1: Optische Dichte.....	5
Formel 2: Homofermentative Milchsäuregärung	7
Formel 3: Fakultativ heterofermentative Milchsäuregärung	7
Formel 4: Obligat heterofermentative Milchsäuregärung	8
Formel 5: <i>Bifidobacterium</i> Gärung.....	18
Formel 6: Gewogenes arithmetisches Mittel.....	32

Abkürzungsverzeichnis

A3X	3 ² -α-L-Arabinosyl-Xylobiose
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ARA	L-Arabinose
Arabinose	L-Arabinose
AXOS	Arabinoxylanoligosaccharide
FRU	D-Fruktose
Fruktose	D-Fruktose
GLU	D-Glucose
Glucose	D-Glucose
KBE	Koloniebildende Einheiten
LAC	Laktose
MAL	Maltose
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
OD	Optische Dichte
NTC	Negative Control
RPM	Revolutions per minute
<i>subsp</i>	Subspezies
XOS	Xylooligosaccharide
XYL	D-Xylose
Xylose	D-Xylose

1. Einleitung und Fragestellung

Weizenkleie ist ein Nebenprodukt der Mehlerstellung. Jährlich fallen große Mengen an, die nur beschränkte Einsatzgebiete finden. Obwohl Weizenkleie reich an Nährstoffen ist, ist die Verwendung in der Humanernährung sowie die Beimischung zu Tierfutter aufgrund der schlechten Verdaulichkeit und den nachteiligen sensorischen Eigenschaften limitiert. Daher ist die Entwicklung von Verfahren zur Aufwertung von Weizenkleie von großem kommerziellen Interesse. Neben physikalischen Methoden stellt auch die Fermentation als eines der ältesten von Menschen genutzten Verfahren zur Verbesserung von Lebens- und Genussmitteln ein vielversprechendes Forschungsfeld dar. Der erste Schritt zur Entwicklung von zielgerichteten Fermentationsverfahren ist die Auswahl geeigneter Starterkulturen. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, verschiedene Bakterien und Hefen auf die Verwertung von Mono-, Di- und Oligosacchariden zu untersuchen. Zum Einsatz kommen neben einer breiten Auswahl an *Milchsäurebakterien* und *Saccharomyces* Arten, die bereits intensiv zur Lebensmittelfermentation genutzt werden, auch Vertreter der Gattungen *Bacillus*, sowie *Escherichia coli*. Besonderes Augenmerk liegt auf der Metabolisierung von Pentosen und daraus aufgebauten Mehrfachzuckern. Mittels Echtzeitmessung der Trübung in Nährlösungen, denen die jeweiligen Kohlenhydrate zugesetzt werden, wird das Wachstum der Mikroorganismen bestimmt. Abschließend werden aus der großen Auswahl der untersuchten Mikroorganismen die vielversprechendsten Stämme für weiterführende Versuche ausgewählt.

2. Literaturübersicht

2.1. Weizenkleie

2.1.1. Zusammensetzung

Als Weizenkleie bezeichnet man die Rückstände des Weizenkorns, die beim Mahlvorgang vom Mehl getrennt werden. Diese bestehen aus der Samenschale (Testa), der Fruchthaut (Perikarp) sowie der Aleuronschicht, die den Mehlkörper (Endosperm) von den äußeren Kompartimenten des Korns trennt. Jene Schicht aus quaderförmigen, dickwandigen Zellen ist reich an Protein, Lipiden, Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen [PRÜCKLER et al., 2014]. Ebenso ist in Weizenkleie ein geringer Anteil an Stärke vorhanden, da ein vollständiges Abscheiden der Mehlfraction technisch nicht realisierbar ist. Etwa 25% der Trockenmasse des Weizenkorns fallen beim Mahlvorgang als Weizenkleie an, Schätzungen zufolge weltweit etwa 150 Millionen Tonnen pro Jahr [PRÜCKLER et al., 2014]. Die Zellwände der Aleuronschicht machen mehr als ein Drittel des Zellvolumens aus und bestehen zum größten Teil aus komplexen Polysacchariden. Hier kann zwischen Hexose Polymeren wie Zellulose und Pentose Polymeren wie beispielsweise Xylan unterschieden werden. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, ist Xylan eine Hemizellulose bestehend aus langen Ketten linear verbundener β – D (1 $\rightarrow$ 4) Xylopyranoseeinheiten. Xylooligosaccharide (XOS) stellen eine chemisch heterogene Gruppe von Xyloseoligomeren mit einer Länge von 2 – 10 Xylosemolekülen dar, welche aus der hydrolytischen Spaltung von Xylan entstehen. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise Xylobiose oder Xylotriose [AACHARY und PRAPULLA, 2011].

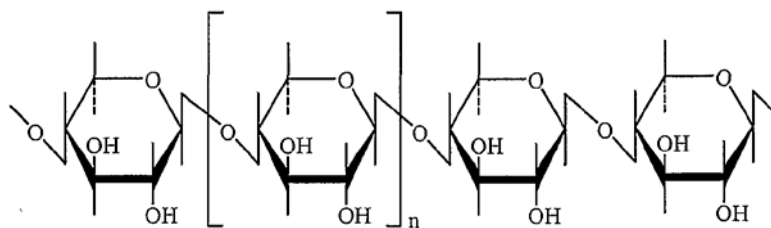


Abbildung 1: Strukturformel von Xylan

Ist das Xylanrückgrat an den Positionen C-2 und C-3 mit α – L – Arabinofuranose substituiert, spricht man von Arabinoxylan. Weiters können phenolische Verbindungen mit α – L – Arabinofuranoseeinheiten verestert sein und Querverbindungen zwischen den einzelnen Ketten bilden. 50% der in Weizenkleie vorkommenden Ballaststoffe entfallen auf Arabinoxylan, was einem Anteil von 11 bis 26 % der Trockenmasse entspricht. Der erste Schritt des Abbaus ist die Hydrolyse, die so entstandenen

Oligosaccharide werden Arabinoxylanoligosaccharide (AXOS) bezeichnet. Abbildung 2 zeigt schematisch die Strukturformel von Arabinoxylan.

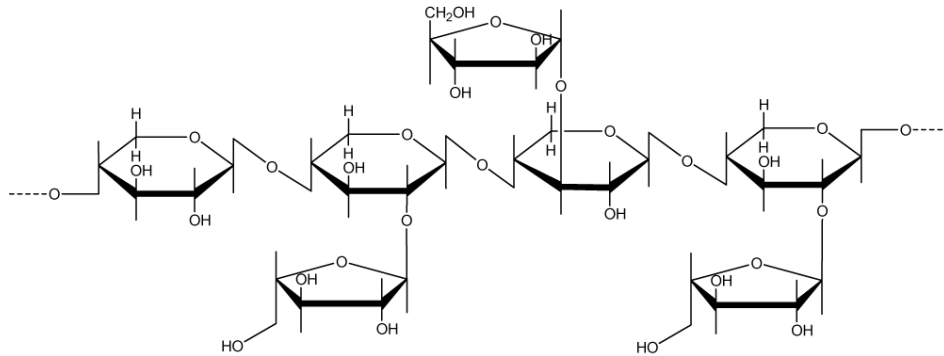


Abbildung 2: Strukturformel von Arabinoxylan

2.1.2. Einsatz in der Humanernährung

Studien legen nahe, dass Arabinoxylan sowie AXOS und XOS präbiotisch wirken. Sie sind für den menschlichen Körper unverdaulich und nicht resorbierbar, werden aber von der Darmflora metabolisiert. Dies fördert die Kolonisation des Dickdarms mit Bifidobakterien und verkürzt die Transitzeit. Ebenso vermindert eine arabinoxylanreiche Kost den postprandialen Glucose- und Triglyceridanstieg im Blut. Weiters könnte ein erhöhter Verzehr von Weizenkleie sowie kleiehaltiger Lebensmittel die Ballaststoffaufnahme in der Bevölkerung erhöhen [PRÜCKLER et al., 2014]. Mit phenolischen Verbindungen verestertes Arabinoxylan ist die einzige präbiotische Verbindung, die außerdem antioxidativ wirkt [BROEKAERT et al., 2011].

In Tierversuchen zeigte sich, dass eine Fütterung mit Weizenkleie das Wachstum von vorteilhaften Darmbakterien fördert und somit einem mikrobiellen Ungleichgewicht der Darmflora entgegensteuert, welches im Verdacht steht ein Risikofaktor für das Entstehen von Adipositas zu sein. Weiters zeigte sich bei hyperkalorischer Ernährung im Tierversuch eine langsamere Gewichtszunahme der Versuchstiere, eine geringere Adipozytengröße sowie niedrigere Cholesterinwerte und Entzündungsmarker [NEYRINCK et al., 2011]. Allerdings ist der Einsatz von Weizenkleie in Brotteig mit negativen sensorischen Eigenschaften, wie einem sandigen Mundgefühl sowie einer erhöhten Bitterkeit des Endproduktes assoziiert, daher findet nur ein geringer Teil der weltweit anfallenden Kleie in der Humanernährung Verwendung, der Großteil wird als Beiprodukt von niedrigem kommerziellem Wert als Viehfutter genutzt. Dennoch könnte man durch das verstärkte Integrieren von Kleie und Kleieprodukten in die Humanernährung sowohl zur Allgemeingesundheit beitragen, als auch die

Wertschöpfung in der getreideerzeugenden und -verarbeitenden Industrie erhöhen [PRÜCKLER et al., 2014].

Einige Verfahren zur Verbesserung der sensorischen Eigenschaften von Kleie sind bereits zugelassen, wie etwa die Oxidation bitter schmeckender, phenolischer Inhaltsstoffe mittels Ozon oder Extrusion. Diese Prozesse sind allerdings aufwendig und energieintensiv und könnten möglicherweise qualitätsrelevante Inhaltsstoffe zerstören. Ein kostengünstiges und seit Jahrtausenden genutztes Verfahren zur Verbesserung der sensorischen Eigenschaften vieler Lebensmittel ist die gezielte Umsetzung durch Mikroorganismen. Die Sauerteigfermentation wird seit jeher eingesetzt um das Wasserbindungsvermögen und das Volumen des Brotteiges zu erhöhen sowie einen charakteristischen Geschmack zu erzeugen [PRÜCKLER et al., 2014].

2.1.3. Verwendung als Futtermittel

Da nur wenig von der jährlich anfallenden Weizenkleie für die Humanernährung verwendet wird, wird der Großteil davon als Viehfutter genutzt. Aufgrund der schweren Verdaulichkeit ist der Einsatz hierfür allerdings ebenso begrenzt. Dennoch kann durch die Fütterung von Weizenkleie potenziell positive Effekte erzielt werden. Studien legen nahe, dass eine mit Weizenkleie angereicherte Kost die Prävalenz von *E. coli* assoziierter Diarrhö, die bei Ferkel häufig nach dem Absäugen auftritt, senken kann [MOLIST et al., 2010]. Weiters zeigte sich, dass eine Supplementierung mit AXOS die Futterverwertung von Masthühnern verbessern, sowie Salmonelleninfektionen wirksam vorbeugen kann [COURTIN et al., 2008] [ECKHAUT et al., 2008]. Allerdings wird auch vermutet, dass eine vermehrte Zufuhr von Weizenkleie die Bioverfügbarkeit von Spurenelementen wie Eisen, Zink und Kupfer senken kann [NEWTON et al., 1983].

2.2. Turbidimetrie

Der Goldstandard zur Bestimmung der Keimzahlen von Mikroorganismen ist seit jeher das Anzüchten auf Agarplatten und anschließende Auszählen. Da dieses Verfahren, vor allem bei einer großen Anzahl an Proben, zeitintensiv ist und erst nach einigen Stunden bis Tagen der Bebrütung Ergebnisse liefert, wurde eine zeitsparende Methode zur Echtzeitmessung von bakteriellem Wachstum entwickelt. Das Prinzip dahinter ist die Messung der Trübung einer Bakteriensuspension, die durch die darin enthaltene Zellmasse verursacht wird, mit Hilfe eines Photometers. Anders als bei Stoffen in Lösung, die einstrahlendes Licht absorbieren und für die das Lambert Beersche Gesetz die

Abhängigkeit der Absorption von der Stoffkonzentration beschreibt, wird das einstrahlende Licht nicht nur absorbiert sondern auch gestreut, das Lambert Beersche Gesetz ist somit nur eingeschränkt anwendbar. Die Intensität der Streuung wird neben der Konzentration der Partikel auch durch die deren Größe sowie der Intensität des einstrahlenden Lichts bestimmt.

Formel 1: Optische Dichte

$$OD = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right)$$

OD ... Optische Dichte

I_0 ... Intensität des einstrahlenden Lichts

I_1 ... Intensität des transmittierten Lichts

Wie aus Formel 1 ersichtlich stellt der dimensionslose Messwert den dekadischen Logarithmus der Intensität des eingestrahnten Lichtes, gebrochen durch die Intensität des transmittierten Lichtes, dar. Da die Bezeichnungen Extinktion oder Absorption im Zusammenhang mit dem Lambert Beerschen Gesetz für Stoffe in Lösung gebräuchlich sind, hat sich Optische Dichte als Bezeichnung dieser Größe etabliert.

Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau einer Apparatur zur Messung der Trübung. Monochromatisches Licht wird über eine Blende durch die Probe geleitet und die Intensität anschließend detektiert. Wird die Intensität des nicht gestreuten Lichts detektiert spricht man von Turbidimetrie, wird ein Detektor außerhalb des

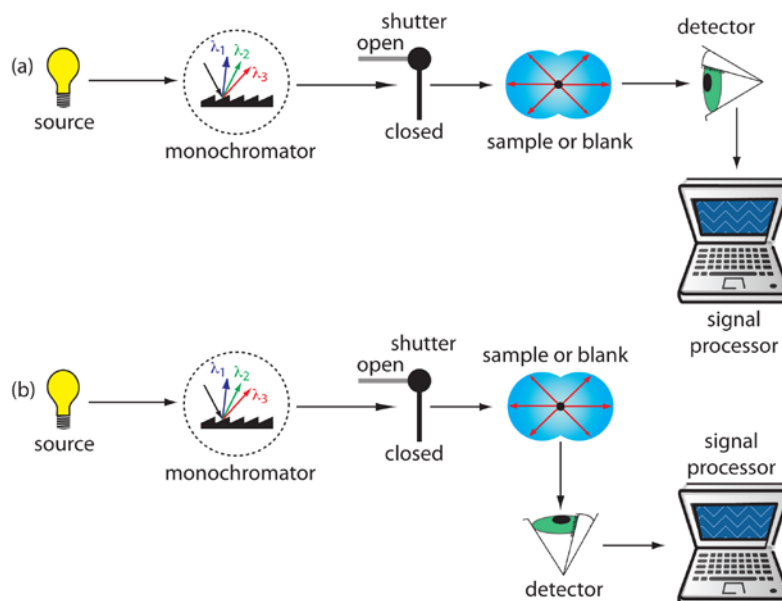


Abbildung 3: (a) Turbidimetrie und (b) Nephelometrie

Strahlengangs, der für gewöhnlich im 90° Winkel zu diesem ausgerichtet ist, verwendet um die Intensität des gestreuten Lichts zu ermitteln, wird dies Nephelometrie genannt. Weiters wurde festgestellt, dass die meisten Bakterien unabhängig von ihrer Größe die gleiche OD pro Einheit Trockensubstanz aufweisen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Zellmasse und OD ist laut Dalgaard et al. bis zu einem Wert von 0,3 gegeben. Ein Problem dieser Methode stellt die relativ hohe Detektionsgrenze von etwa 10^7 KBE pro Milliliter dar, bei der das Bakterienwachstum bereits deutlich verlangsamt ist und daher nur schwer Aussagen über maximale Wachstumsraten getroffen werden können. Trotzdem eignen sich photometrische Methoden als schnelle, nicht invasive Verfahren zur Ermittlung und Überwachung von Zellzahlen in Bakteriensuspensionen. Auch außerhalb des linearen Bereiches können semiquantitative Wachstumsdaten produziert werden [BEGOT et al., 1996] [DALGAARD et al., 1994].

Der Bioscreen C (Labsystem Co, Finnland) ist eine vollautomatische Apparatur zur Messung der optischen Dichte. Sie besteht aus einem Photometer mit Filtern von 405 bis 600nm, einem Heizsystem sowie einem Schlitten, in dem 2 Stück 100 Well Mikrotiterplatten Platz finden. Eine Schüttelvorrichtung homogenisiert die Proben wahlweise vor oder nach jeder Messung und eine spezielle Beschichtung auf der Innenseite der Wells verhindert Kondenswasserbildung. Bedient wird das Gerät über ein Interface an einem beliebigen Computer mit der entsprechenden Software, über die auch die Messdaten in verschiedenen Formaten exportiert werden können. Dieses Verfahren ist für Bakterien und Hefen anwendbar. Abbildung 4 zeigt den Bioscreen C [BEGOT et al., 1996] [MURAKAMI et al., 2008].



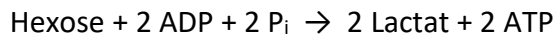
Abbildung 4: Bioscreen C

2.3. Homo- und heterofermentative Milchsäuregärung

Von Fermentation oder Gärung spricht man, wenn organische Stoffe wie Kohlenhydrate unter Ausschluss von Sauerstoff zu Säuren, Gasen und Alkoholen abgebaut werden. Diesen Prozess macht man sich bei der Herstellung von Lebensmitteln wie beispielsweise Milchprodukten, Wurstwaren, Eingelegtem oder Sauerteig zu Nutze. Mikroorganismen können anhand ihrer fermentativen Aktivität in 3 Gruppen untergeteilt werden:

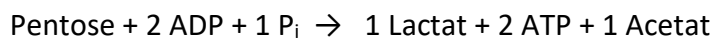
Gruppe A: Obligat homofermentativ (Formel 2): Hexosen werden fast ausschließlich zu Milchsäure mittels Glykolyse abgebaut. Diese Organismen verfügen über Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase aber nicht über Phosphoketolase, daher können Pentosen und Gluconat nicht fermentiert werden.

Formel 2: Homofermentative Milchsäuregärung



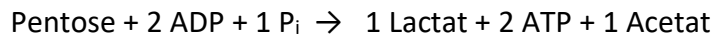
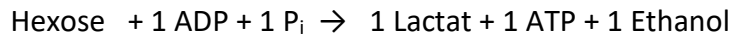
Gruppe B: Fakultativ heterofermentativ (Formel 3): Hexosen werden ebenso fast ausschließlich zu Milchsäure abgebaut. Diese Organismen verfügen sowohl über Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase als auch über Phosphoketolase, daher können Pentosen und oft auch Gluconat fermentiert werden. In der Gegenwart von Hexosen werden Enzyme des Pentosestoffwechsel unterdrückt.

Formel 3: Fakultativ heterofermentative Milchsäuregärung



Gruppe C: Obligat heterofermentativ (Formel 4): Diesen Organismen fehlt das Enzym Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase, das die Spaltung von Fruktose-1,6-bisphosphat katalysiert, daher werden sowohl Hexosen als auch Pentosen im Phosphoketolase Weg über Xylose – 5 Phosphat abgebaut. Dabei entstehen neben Milchsäure auch Ethanol, Essigsäure und Kohlendioxid. Da bei der Produktion von Ethanol kein zusätzliches ATP erzeugt wird, ist die Energieausbeute bei der Verwertung von Pentosen höher. Am Verhältnis von Essigsäure zu Milchsäure kann bestimmt werden, ob bevorzugt Pentosen oder Hexosen metabolisiert werden [HAMMES und HERTEL, 2009].

Formel 4: Obligat heterofermentative Milchsäuregärung



2.4. Untersuchte Mikroorganismen

2.4.1. Lactobacillales

Als *Lactobacillales* oder *Milchsäurebakterien* wird eine morphologisch sehr heterogene Ordnung von grampositiven, nicht sporenbildenden Bakterien bezeichnet, die in der Lage sind, Kohlenhydrate zu Milchsäure zu fermentieren.

2.4.1.1. Lactobacillus

Lactobacillus stellt eine Gattung gram-positiver, teilweise kokkoider Stäbchen innerhalb der Familie der *Lactobacillaceae* dar. *Lactobacillen* sind anaerob oder aerotolerant. Das natürliche Habitat muss reich an Kohlenhydraten sein, daher sind *Lactobacillen* häufig auf menschlichen und tierischen Schleimhäuten, sowie auf Pflanzenmaterial und in Abwässern anzutreffen. Diese Gattung spielt eine wichtige Rolle bei der Fermentation sowie beim Verderb von Lebensmitteln. Alle untersuchten Vertreter dieser Gattung sind in der Lage Glucose (GLU) und Fruktose (FRU) zu metabolisieren [HAMMES und HERTEL, 2009].

Lactobacillus acidophilus

L. acidophilus präsentiert sich als Stäbchen mit abgerundeten Enden und kommt paarweise oder in kurzen Ketten vergesellschaftet vor. Riboflavin, Pantothensäure, Folsäure und Niacin werden für das Wachstum gebraucht. Isoliert kann *L. acidophilus* aus dem menschlichen Intestinaltrakt sowie aus Mund- und Vaginalflora werden. Die von ihm durchgeführte Fermentation ist als obligat homofermentativ beschrieben, Laktose (LAC) und Maltose (MAL) können verwertet werden, Arabinose (ARA) und Xylose (XYL) nicht. Weiters hat sich gezeigt, dass vereinzelte Stämme von *L. acidophilus* XOS metabolisieren können [CRITTENDEN et al., 2002] [HAMMES und HERTEL, 2009] [McLAUGHLIN et al., 20015].

Lactobacillus brevis

L. brevis formt kurze Ketten aus stäbchenförmigen Zellen. Diese Art benötigt Kalziumpantothenat, Niacin, Thiamin und Folsäure zum Wachsen. Isoliert kann *L. brevis* aus Milch, Käse, Sauerkraut, Sauerteig, Silage, Kuhdung, sowie menschlichen Fäkalien werden. Der Kohlenhydratstoffwechsel ist obligat heterofermentativ, mehr als 90% der Stämme verwerten ARA und MAL, einige auch XYL. Prückler et al. zeigten bereits, dass *L. brevis* Potential für die Fermentation von Weizenkleie aufweist, ebenso zeigen Untersuchungen, dass *L. brevis* in der Lage ist, XOS zu metabolisieren [ANAIEVA et al., 2012] [CRITTENDEN et al., 2002] [HAMMES und HERTEL, 2009] [IMMERZEEL et al., 2014] [MICHLMAYER et al., 2013] [PRÜCKLER et al., 2015].

Lactobacillus casei

L. casei präsentiert sich als Stäbchen mit geraden Enden; Riboflavin, Folsäure, Kalziumpantothenat und Niacin werden für das Wachstum benötigt. Das natürliche Habitat dieser Art sind Milchprodukte, Käse, Silage, Sauerteig, Kuhdung sowie menschliche Schleimhäute. *L. casei* betreibt fakultativ heterofermentative Milchsäuregärung, allerdings wird kein Wachstum auf ARA und XLY beschrieben. Neue Untersuchungen legen allerdings nahe, dass bestimmte Stämme von *L. casei* XOS und AXOS verwerten können [HAMMES und HERTEL, 2009] [McLAUGHLIN et al., 2015].

Lactobacillus hilgardii

L. hilgardii weist stäbchenförmige Morphologie mit runden Enden auf und ist oft mit langen Filamenten ausgestattet. Das pH-Wert Optimum liegt bei 4,5 bis 5,5, ein Wachstum ist auch in Anwesenheit von 15-18% Ethanol möglich. Erstmals isoliert wurde *L. hilgardii* aus kalifornischem Tafelwein, mittlerweile ist eine Verbreitung auch in vielen anderen Weinerzeugnissen nachgewiesen. Der Kohlenhydratstoffwechsel präsentiert sich obligat heterofermentativ mit einer Verwertung von XOS und MAL, allerdings ist diese Gattung nicht fähig, ARA zu verstoffwechseln [HAMMES und HERTEL, 2009].

Lactobacillus otakiensis

L. otakiensis wird aus dem traditionellen japanischen Sauergemüse „Sunki“ isoliert und wurde von Watanabe et al. 2009 erstbeschrieben. Diese heterofermentativen, unbeweglichen Stäbchen produzieren Säure aus GLU, FFR, MAL, ARA und XYL. Die

Verwertung von LAC unterscheidet sich zwischen den einzelnen Stämmen [WATANABE et al., 2009].

Lactobacillus kisonensis

Gemeinsam mit *L. otakiensis* wurde die sehr eng verwandte Art *L. kisonensis* 2009 entdeckt. Der Kohlenhydratstoffwechsel ist ebenso heterofermentativ charakterisiert, MAL, XYL und ARA können von dieser Art verwertet werden [WATANABE et al., 2009].

Lactobacillus plantarum

L. plantarum präsentiert sich als gerade Stäbchen mit abgerundeten Enden, die Milchsäuregärung erfolgt fakultativ heterofermentativ. Kalziumpantothenat und Niacin werden für das Wachstum benötigt. Isoliert kann *L. plantarum* aus Milchprodukten, Sauerkraut, Sauergemüse, Kuhdung, Jauche sowie aus der menschlichen Mundhöhle werden. *L. plantarum* kann als Starterkultur für die Fermentation Spanischer Oliven verwendet werden. In Sauerteig zeigen die Stoffwechselprodukte von *L. plantarum* antifungale Eigenschaften und können den Teig vor Schimmelbefall schützen. Manche Stämme können ARA und XYL fermentieren. Weiters legen Untersuchungen auch nahe, dass *L. plantarum* in der Lage ist, XOS zu metabolisieren. In ersten Versuchen zeigte *L. plantarum* bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Fermentation von Weizenkleie zur Sauerteigherstellung [ANAIEVA et al., 2012] [CODA et al., 2011] [CRITTENDEN et al., 2002] [DE CASTRO et al., 2002] [HAMMES und HERTEL, 2009] [PRÜCKLER et al., 2015].

Lactobacillus reuteri

L. reuteri präsentiert sich als gebogene Stäbchen mit runden Enden, die einzeln, paarweise oder zu unregelmäßigen Clustern vereinigt vorkommen können. Das natürliche Habitat sind Fleischprodukte, Sauerteig sowie Fäkalien. Diese obligat heterofermentative Art verwertet ARA und MAL, aber keine XYL. Ebenso sind keine Stämme bekannt, die in der Lage sind, XOS zu metabolisieren [CRITTENDEN et al., 2002] [HAMMES und HERTEL, 2009].

Lactobacillus sanfrancisciensis

L. sanfrancisciensis, veraltet auch *L. brevis* var. *lindneri* genannt, zeigt ein schlechtes Wachstum auf MRS, das durch die Zugabe von frisch hergestelltem Hefeextrakt und Verringerung des pH-Wertes des Mediums auf 5,6 verbessert werden kann. Außerdem

bewirkt der Austausch von GLU mit MAL ein besseres Wachstum. Das natürliche Habitat dieser obligat heterofermentativen Art ist Weizen- und Roggensauerteig. Obwohl die Literatur angibt, dass diese Art unfähig ist ARA und XXL zu metabolisieren, wurden bei Fermentationsversuchen mit Sauerteig auf Weizenkleiebasis bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt. Tabelle 1 bietet eine Übersicht des erwarteten Kohlenhydratabbaus der Gattung *Lactobacillus* [HAMMES und HERTEL, 2009] [PRÜCKLER et al., 2015].

Tabelle 1: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Lactobacillus* ssp.

	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>L. acidophilus</i>	A	+	+	+	+	-	-	?	?
<i>L. brevis</i>	B oder C	+	+	+	+	+	?	+	?
<i>L. casei</i>	B	+	+	+	+	-	-	?	?
<i>L. hilgardii</i>	C	+	+	+	+	-	+	?	?
<i>L. kisonensis</i>	C	+	+	+	+	+	+	?	?
<i>L. otakiensis</i>	C	+	+	~	+	+	+	?	?
<i>L. plantarum</i>	B	+	+	+	+	~	~	+	?
<i>L. reuteri</i>	C	+	+	+	+	+	-	-	?
<i>L. sanfranciscensis</i>	C	+	+	+	+	-	-	?	?

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

2.4.1.2. *Pediococcus*

Eine weitere Gattung in der Familie der *Lactobacillaceae* stellen die *Pediokokken* dar. Sie sind die einzigen Milchsäurebakterien, die sich in Tetradformation anordnen. Sie produzieren Milchsäure, eine Gasbildung ist nicht beschrieben. Vertreter dieser Gattung können eine Vielzahl verschiedener Kohlenhydrate wie Hexosen, Pentosen sowie Triosen und Polymere wie Stärke abbauen; die meisten Arten betreiben homofermentative. Bis auf wenige Ausnahmen können *Pediokokken* nicht ohne Kohlenhydratquelle wachsen. Ebenso wie *Lactobacillen* benötigen *Pediokokken* keine Eisenquelle, aber ein reichliches Manganangebot. *Pediokokken* stellen eine ubiquitäre Kontamination in Brauereien sowie in Wein und Cider dar. Milchsäuregärung, GLU und FRU können von allen untersuchten Stämmen verwertet werden. Tabelle 2 zeigt den

erwarteten Kohlenhydratabbau der Gattung *Pediococcus* [HOLZAPFEL et al., 2009] [MICHELMAYER et al., 2013].

Tabelle 2: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Pediococcus* ssp.

	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>P. acidilactici</i>	A	+	+	?	-	?	+	?	?
<i>P. parvulus</i>	A	+	+	-	?	-	-	?	?
<i>P. pentosaceus</i>	A	+	+	?	+	?	+	?	?

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

Pediococcus acidilactici

Diese Art kommt einzeln, in Paaren oder zu unregelmäßigen Clustern vergesellschaftet vor. Alle Stämme wachsen selbst bei 50°C. Charakteristisch für diese Art ist die Unfähigkeit MAL zu metabolisieren und Stärke zu hydrolysieren. Mehr als 90% der Stämme können FRU sowie XYL verwerten, einige auch ARA und LAC. Der Type Strain wurde aus Gerste isoliert [HOLZAPFEL et al., 2009].

Pediococcus parvulus

P. parvulus ist unfähig, Pentosen und LAC zu metabolisieren sowie Stärke zu hydrolysieren. Manche Stämme dieser Art produzieren Schleim. Das natürliche Habitat von *P. parvulus* ist Sauerkraut, fermentiertes Gemüse, Bier, Wein und Cider. Der Type Strain wurde aus Silage isoliert [HOLZAPFEL et al., 2009].

Pediococcus pentosaceus

Vertreter dieser Art sind weniger hitzeresistent als *P. acidilactici*, das Temperaturoptimum liegt bei 30°C. Seine Fähigkeit, MAL zu metabolisieren, unterscheidet ihn von *P. acidilactici*. Die meisten Stämme metabolisieren ARA und LAC, viele auch XYL, allerdings ist diese Art unfähig Stärke zu hydrolysieren. Bei der Umsetzung von Pentosen entsteht eine äquimolare Mischung aus Acetat und Lactat. Das natürliche Habitat von *P. pentosaceus* ist Gerste, Malz, Hopfen, Heu, Äpfel Zitrusfrüchte sowie Erdbeeren. Einige Stämme werden zur Fermentation von Wurstwaren, Sojamilch,

Gurken, grünen Bohnen und Silage verwendet. Der Type Strain wurde aus getrockneter Amerikanischer Bierhefe isoliert [HOLZAPFEL et al., 2009].

2.4.1.3. *Enterococcus*

Ein weiterer Vertreter der *Milchsäurebakterien* ist die zur Familie der *Enterococcaceae* zählende Gattung der *Enterokokken*. Diese fakultativ anaeroben Diplokokken sind teilweise beweglich und können in einem weiten Temperaturbereich von 10-45°C wachsen, wobei die Optimaltemperatur mit 37°C angegeben wird. *Enterokokken* betreiben homofermentative Milchsäuregärung und zeigen sich anspruchsvoll in Bezug auf den Nährstoffbedarf. Derzeit gibt es in der Literatur keine Hinweise darauf, dass Vertreter der Gattung *Enterococcus* in der Lage sind XOS oder AXOS zu metabolisieren. Tabelle 3 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau der Gattung *Enterococcus* [CRITTENDEN et al., 2002] [SVEC und DEVRIESE, 2009].

Enterococcus casseliflavus

E. casseliflavus präsentiert sich gelb pigmentiert und beweglich und besitzt die Fähigkeit ARA und XYL zu metabolisieren. Das natürliche Habitat ist meistens Pflanzenmaterial, Verwendung findet diese Art bei der Fermentation von Oliven nach Spanischer Art [DE CASTRO et al, 2002] [SVEC und DEVRIESE, 2009].

Enterococcus faecalis

E. faecalis, veraltet auch *Streptococcus faecalis*, ist unbeweglich und fermentiert LAC, nicht jedoch ARA und XYL. *E. faecalis* ist die am häufigsten vorkommende *Enterococcus* Gattung im menschlichen Darm. Ein Großteil aller *Enterokokken* Infektionen werden durch *E. faecalis* verursacht, die zum Teil massive Komplikationen auslösen können, da diese Art meist intrinsisch immun gegen β -Lactam Antibiotika ist und außerdem Resistenzen gegen zahlreich andere antibiotische Medikamente entwickeln kann. Eine *E. faecalis* Infektion kann Endokarditis, Harnwegsinfektionen sowie Sepsis auslösen [SVEC und DEVRIESE, 2009].

Enterococcus faecium

Diese Art ist in der Lage ARA zu verwerten. Stämme bovinen und caninen Ursprungs sind meist auch fähig XYL zu metabolisieren. Ebenso wie *E. faecalis* ist *E. faecium* ein großer

Bestandteil der menschlichen Darmflora. Obwohl nur ein kleiner Teil aller *Enterokokken* Infektionen auf *E. faecium* zurückzuführen ist, führt auch dieser Nosokomialkeim aufgrund seiner zahlreichen Resistenzen immer wieder, vor allem in Krankenhäusern, zu Problemen [SVEC und DEVRIESE, 2009].

Enterococcus malodoratus

Diese Art ist kaum mit dem Menschen assoziiert, häufig werden diese Bakterien in Milchprodukten nachgewiesen. Daten über Pathogenität liegen keine vor. Der Type Strain wurde aus Gouda Käse isoliert. *E. malodoratus* ist nicht fähig ARA zu metabolisieren, allerdings können einige Stämme XYL verwerten [SVEC und DEVRIESE, 2009].

Tabelle 3: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Enterococcus ssp.*

	Fermen tation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>E. casseliflavus</i>	A	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	A	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	A	+	+	+	+	+	?	-	-
<i>E. malodoratus</i>	A	+	+	+	+	-	?	-	-

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

2.4.1.4. *Lactococcus*

Die Gattung *Lactococcus* aus der Familie der *Streptococcaeae* präsentiert sich als ovale, fakultativ anaerobe Kokken, die paarweise oder in kurzen Ketten vergesellschaftet auftreten. *Lactococcus ssp.* ist unbegeißelt und bildet keine Endosporen aus [TEUBER, 2009].

Lactococcus raffinolactis

L. raffinolactis produziert Säure aus GLU, FRU, LAC und MAL. Die meisten Stämme können XYL, einige auch ARA verwerten. Das natürliche Habitat ist vor allem Rohmilch. Tabelle 4 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *L. raffinolactis* [TEUBER, 2009]

Tabelle 4: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Lactococcus raffinolactis*

	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>L. raffinolactis</i>	A	+	+	+	+	?	+	?	?

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

2.4.1.5. *Leuconostoc*

Die Gattung *Leuconostoc* aus der Familie der *Leuconostocaceae* ist phenotypisch eng mit *Lactobacillus* und *Pediococcus* verwandt und betreibt heterofermentative Milchsäuregärung. Sie ist anspruchsvoll in Sachen Nährstoffbedarf und kann in Pflanzenmaterial, Milchprodukten, Fleisch und fermentierten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Die Morphologie der einzelnen Zellen ist von den Wachstumsbedingungen abhängig. In Milch treten die Zellen meistens kokkoid in Erscheinung, in einem glucosehaltigen Medium eher stäbchenförmig. Auch auf Agarplatten gezüchtet kann *Leuconostoc* irrtümlich leicht als Stäbchen klassifiziert werden. Seine Fähigkeit, die organoleptischen Eigenschaften sowie die Textur von fermentierten Lebensmitteln wie Butter, Milch, Käse oder Fleisch positiv zu beeinflussen macht ihn für eine kommerzielle Nutzung interessant. Das Temperaturoptimum liegt bei 20-30°C. Die Zellen sind unbeweglich, gram-positiv und bilden keine Sporen. *Leuconostoc* besitzt keine Aldolase, allerdings eine aktive Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase, daher wird GLU über eine Kombination aus dem Hexosemonophosphat und Pentosephosphat Weg metabolisiert. Tabelle 5 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *Leuconostoc ssp.* [HOLZAPFEL et al., 2009].

Leuconostoc lactis

L. lactis weist komplexe Aminosäureanforderungen auf und ist nicht fähig Dextran aus Saccharose zu produzieren. Diese Art kann LAC besser als andere Vertreter der Gattung *Leuconostoc* metabolisieren, ebenso produziert *L. lactis* reichlich Säure und kann zum Gerinnen von Rohmilch führen. Alle Stämme können FRU, LAC und MAL metabolisieren, einige auch ARA und XYL. Weiters sind Vertreter dieser Art beschrieben worden, die XOS metabolisieren können [HOLZAPFEL et al., 2009] [OHARA et al., 2006].

Leuconostoc mesenteroides

Alle Stämme dieser Art fermentieren FRU, ARA und MAL, einige auch LAC und XYL. Ein Wachstum ist zwischen 5°C und 30°C möglich, das Temperaturoptimum liegt zwischen 20°C und 30°C. Milch wird selten angesäuert oder geronnen [HOLZAPFEL et al., 2009].

Tabelle 5: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Leuconostoc* ssp.

	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>L. lactis</i>	B oder C	+	+	+	+	-	-	+	?
<i>L. mesenteroides</i> <i>subsp. cremoris</i>	B oder C	+	-	~	-	-	-	?	?
<i>L. mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>	B oder C	+	+	~	+	+	~	?	?
<i>L. pseudo-</i> <i>mesenteroides</i>	B oder C	+	+	~	+	~	+	?	?

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides

Diese Unterart von *L. mesenteroides* produziert Dextran aus Saccharose, vor allem in einem Temperaturbereich von 20°C bis 25 °C. Zellen, die Exopolysaccharide bilden, können ein Erhitzen von 85°C überstehen. Mit Hefeextrakt versetzte Milch wird von einigen Stämmen angesäuert und geronnen. Alle Stämme dieser Art können MAL, FRU und ARA metabolisieren, einige auch LAC und XYL [HOLZAPFEL et al., 2009].

Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris

Diese Unterart bildet lange Ketten, in Flüssigmedien wird häufig ein Ausflocken beobachtet. *L. mesenteroides subsp. cremoris* zeigt weniger metabolische Aktivität als die anderen Unterarten von *L. mesenteroides*. Als einziger Vertreter der Gattung *Leuconostoc* besitzt er nicht die Fähigkeit, FRU zu verwerten; auch Saccharose kann nicht gespalten werden. Ebenso ist er unfähig, MAL, ARA und XYL zu metabolisieren, manche Stämme können allerdings LAC verstoffwechseln. *L. mesenteroides subsp. cremoris* wächst fakultativ anaerob bei einer optimalen Wachstumstemperatur zwischen 18°C und 25°C [HOLZAPFEL et al., 2009].

Leuconostoc pseudomesenteroides

Diese Art wächst in einem Temperaturbereich von 10°C bis 37°C und kann FRU, MAL sowie XYL metabolisieren. Einige Stämme sind auch in der Lage, ARA und LAC zu metabolisieren [HOLZAPFEL et al., 2009].

2.4.1.6. *Weissella*

Weitere Vertreter der Familie der *Leuconostocaceae* sind *Weissellen*. Diese Gattung wurde erst 1997 erstbeschrieben und präsentiert sich als gram-positive, unbewegliche und nicht sporenbildende, kurze Stäbchen mit abgerundeten Enden. Sie sind fakultativ anaerob und betreiben heterofermentative Milchsäuregärung. Kohlenhydrate werden über den Hexose-Monophosphat-Pathway und den Phosphoketolase-Pathway verstoffwechselt, als Endprodukte des Glucosestoffwechsels entstehen CO₂, Ethanol und Acetat. Die Unterscheidung der *Weissellen* von *Leuconostoc* und heterofermentativen *Lactobacillen* gestaltet sich oft schwierig [BJÖRKROTH et al., 2009].

Weissella confusa

W. confusa kann MAL und XYL verwerten, allerdings keine ARA. Neue Untersuchungen legen nahe, dass einige Stämme Gene für β -Xylosidase tragen und auch tatsächlich in der Lage sind XOS abzubauen [PATEL et al., 2013]. Weiters zeigen einige Stämme die Fähigkeit, FRU und LAC zu metabolisieren. Das natürliche Habitat sind fermentierte, pflanzliche Lebensmittel, aber auch griechischer Käse sowie das fermentierte mexikanische Getreideerzeugnis *Pozol*. Durch die Fähigkeit Exopolysaccharide aus Saccharose zu produzieren kann *W. confusa* bei der Sauerteigerstellung verwendet werden um das Teigvolumen und die Weichheit der Krume positiv zu beeinflussen. Tabelle 6 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *W. confusa* [BJÖRKROTH et al., 2009] [KATINA et al., 2009].

Tabelle 6: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Weissella confusa*

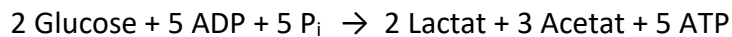
	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>W. confusa</i>	B oder C	+	?	?	+	+	-	?	?

A: homofermentativ; B: fakultativ heterofermentativ; C: obligat heterofermentativ; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

2.4.2. Bifidobacterium

Die Gattung *Bifidobacterium* präsentiert sich als gram-positive, unbewegliche, nicht gasbildende, anaerobe Stäbchen. Bifidobakterien können anhand ihrer ökologischen Nische in 4 Gruppen unterteilt werden: (1) Menschliche Darmflora, Mund- und Vaginalflora, (2) tierische Darmflora, (3) Insekten und (4) Abwässer. *Bifidobakterien* besitzen Enzymsysteme, die die Hydrolyse komplexer Kohlenhydrate wie etwa Amylose, Amylopektin und Xylan katalysieren. Wie obligat heterofermentative Milchsäurebakterien exprimieren *Bifidobakterien* keine Aldolase. Hexosen werden über einen speziellen Stoffwechselweg abgebaut, in dem Fruktose-6-Phosphoketolase eine

Formel 5: *Bifidobacterium* Gärung



Schlüsselrolle spielt. Die in Formel 5 dargestellte *Bifidobacterium* Gärung ermöglicht eine Ausbeute von 2,5 ATP pro metabolisierter GLU und somit mehr als bei der gewöhnlichen Milchsäuregärung. Dieses Enzym gilt als taxonomischer Marker für die Familie der *Bifidobacteriaceae* [BIAVATI und MATTARELLI, 2009].

Bifidobacterium adolescentis

B. adolescentis ist in der Lage, XYL sowie XOS und AXOS zu metabolisieren. Neue Studien zeigen, dass bestimmte Stämme das Enzym Arabinofuranohydrolase exprimierten, das es ihnen ermöglicht, Arabinoxyylan aus Weizen abzubauen, indem Arabinofuranosylgruppen an der C3 Position des doppelt substituierten Xylopyranosylrestes am Xyloserückgrat abgespalten werden. Andere Stämme zeigen hervorragendes Wachstum auf XOS. Tabelle 7 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *B. adolescentis* [AMARETTI et al., 2013] [BIAVATI und MATTARELLI, 2009] [CRITTENDEN et al., 2002] [McLAUGHLIN et al., 2015] [PASTELL et al., 2009] [VAN JAERE et al., 1997].

Tabelle 7: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Bifidobacterium adolescentis*

	Fermentation	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>B. adolescentis</i>	Bif.	+	+	+	+	+	+	+	+

Bif: *Bifidobacterium* Gärung; +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

2.4.3. *Bacillus*

Eine weitere untersuchte Gruppe von Bakterien ist die Gattung *Bacillus*. Diese stäbchenförmigen Bakterien können entweder gram-positiv oder gram-negativ sein und sind in der Lage eine extrem widerstandsfähige Endospore zu bilden. *Bacillus* gilt als anspruchslos und wächst auf Standardmedien wie Nähragar oder Trypton Soja Agar, Arten aus sehr nährstoffarmen Habitaten benötigen spezielle, beziehungsweise niedrig konzentrierte Medien. Die meisten Stämme nutzen GLU oder andere fermentierbare Kohlenhydrate als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Die meisten Arten sind mesophil mit einem Temperaturoptimum bei 30°C. Weil die meisten *Bacillus* Arten aerob wachsen und Säure durch die Oxidation von Kohlenhydraten bilden, entsteht weniger Säure als bei einer Fermentation. Außerdem neutralisiert der Ammoniak, der beim Abbau von Pepton freigesetzt wird, zusätzlich saure Valenzen. Die meisten Vertreter der Gattung *Bacillus* zeigen wenig bis keine Pathogenität für Mensch und Tier. Als Ausnahme sind *B. anthracis* als Milzbranderreger, sowie *B. cereus* als Auslöser von Lebensmittelvergiftungen und *B. thuringiensis* als Pathogen für Invertebraten zu nennen. Tabelle 8 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau der Gattung *Bacillus* [LOGAN und DE VOS, 2009]

Bacillus coagulans

Diese Art präsentiert sich als fakultativ anaerobe, gram-positive, bewegliche Stäbchen. Sie ist thermophil, die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 59°C. Der optimale pH-Wert liegt bei 7, ein Wachstum ist im Bereich von 4 bis 11 möglich. Vertreter dieser Art können Stärke hydrolysieren. Einige Stämme von *B. coagulans* werden aufgrund ihrer Fähigkeit Milchsäure durch die Fermentation von Pentosen zu produzieren in Bioreaktoren zur Verwertung von Zellulose und Hemizellulose verwendet [Bischoff et al., 2010] [LOGAN und DE VOS, 2009] [OU et al., 2011]

Bacillus subtilis

B. subtilis präsentiert sich als gram-positive, bewegliche Stäbchen, die in der Lage sind, Stärke zu hydrolysieren. *B. subtilis* wurde lange Zeit als obligat aerob klassifiziert, nun wurde aber gezeigt, dass auch ein anaerobes Wachstum möglich ist, indem Nitrat und Nitrit als Elektronenakzeptoren verwendet werden, ebenso kann *B. subtilis* in Abwesenheit von Elektronenakzeptoren Fermentation betreiben. Das natürliche Habitat

von *B. subtilis* ist vor allem in Böden, in denen viele verschiedene Polysaccharide zu finden sind. Daher exprimiert diese Art eine Vielzahl an Enzymen, die diese aufspalten. *B. subtilis* ist in der Lage, Glykolyse und den Zitratzyklus zu betreiben. *B. subtilis* wächst auch mit ARA als alleinige Kohlenhydratquelle und kann XYL hervorragend verwerten [LINDNER et. al, 1994] [LOGAN und DE VOS, 2009] [Mota et al., 2001].

Bacillus subtilis subsp. inaquosorum

B. subtilis subsp. inaquosorum ist eine weitere Unterart von *B. subtilis*. Diese fakultativ anaeroben Stäbchen haben ein Temperaturoptimum von 30°C und sind in der Lage, zylindrische Sporen zu bilden. Der Type Strain wurde erstmals aus Wüstenboden isoliert [ROONEY et al., 2009].

Bacillus subtilis subsp. spizizenii

Phänotypisch ist *B. subtilis subsp. spizizenii* nicht von *B. subtilis subsp. subtilis* unterscheidbar, der Type Strain wurde erstmals aus Tunesischem Bodenmaterial isoliert [LOGAN und DE VOS, 2009].

Bacillus subtilis subsp. subtilis

Diese Unterart wurde aus einem traditionellen japanischen Gericht aus fermentierten Sojabohnen isoliert [LOGAN und DE VOS, 2009].

Bacillus thuringiensis

B. thuringiensis, benannt nach dem Ort der Erstbeschreibung Thüringen, sind gram-positive, fakultativ anaerobe, bewegliche Stäbchen. Diese Art produziert vor allem Endotoxine und kristalline Proteine, die für Insekten und andere Invertebraten wie Nematoden, Milben und Protozoen tödlich sind. Die minimale Wachstumstemperatur liegt bei 10-15°C, die maximale bei 40-45°C. Säure wird ohne Gasfreisetzung aus GLU und wenigen anderen Kohlenhydraten produziert. Ähnlich wie sein enger Verwandter *B. cereus* kann *B. thuringiensis* Kohlenhydrate ohne exogene Elektronenakzeptoren fermentieren. Stärke kann hydrolysiert werden, ARA und XYL können nicht metabolisiert werden. Vereinzelt werden durch *B. thuringiensis* verursachte Lebensmittelvergiftungen beschrieben [LOGAN und DE VOS, 2009].

Tabelle 8: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Bacillus ssp.*

	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>B. coagulans</i>	+	?	?	?	+	+	?	?
<i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	+	?	?	?	+	+	?	?
<i>B. subtilis subsp. spizizenii</i>	+	?	?	?	+	+	?	?
<i>B. subtilis subsp. subtilis</i>	+	?	?	?	+	+	?	?
<i>B. thuringiensis</i>	+	?	?	?	-	-	?	?
<i>B. toyonensis</i>	+	?	?	?	-	-	?	?
<i>B. weihenstephanensis</i>	+	?	?	?	-	-	?	?

+: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

Bacillus toyonensis

B. toyonensis präsentiert sich als fakultativ anaerobe, gram-positive, bewegliche Stäbchen. Das Temperaturoptimum liegt bei 35°C, ein Wachstum ist zwischen 10°C - 45°C möglich. *B. toyonensis* zählt wie *B. weihenstephanensis* und *B. thuringiensis* zur *Bacillus cereus* Gruppe und wurde aufgrund dieser nahen Verwandtschaft früher *B. cereus* var. *toyoi* genannt. Es liegt daher nahe, dass *B. toyonensis* ebenso wie *B. cereus* Säure ohne Gasbildung aus GLU und wenigen anderen Kohlenhydraten, nicht jedoch ARA und XYL, produziert. Stärke kann von dieser Art für gewöhnlich hydrolysiert werden [LOGAN und DE VOS, 2009]. *B. toyonensis* wurde 1966 in Japan erstbeschrieben und 1975 vom japanischen Ministerium für Land- und Forstwirtschaft unter dem Markennamen *TOYOCERIN*® als probiotischer Futtermittelzusatz freigegeben. Seitdem kommt es bei Schweinen, Geflügel, Rind, Nagetieren sowie in Aquakulturen zum Einsatz. Viele weitere Staaten haben seitdem den Einsatz erlaubt. Auch die Europäische Union erlaubt den Einsatz von *B. toyonensis* zur Stabilisierung der Darmflora von Nutztieren. In diversen Zulassungsverfahren haben etliche Studien die Nichttoxizität dieser Art bestätigt [EFSA, 2015] [JIMENEZ et al, 2013].

Bacillus weihenstephanensis

B. weihenstephanensis, benannt nach der deutschen Stadt Freising-Weihenstephan, dem Ort der Erstbeschreibung, präsentieren sich als gram positive, fakultativ anaerobe,

sporenbildende Stäbchen. Zellmorphologie und Metabolismus ist *B. cereus* sehr ähnlich, die Unterscheidung erfolgt durch die Fähigkeit bei 7°C aerob, sowie die Unfähigkeit bei 43°C zu wachsen. Type Strain: DSM 11821 [LECHNER et al., 1998].

2.4.4. Escherichia

Die Gattung *Escherichia* präsentiert sich als gram-negative, zylindrische Stäbchen. Säure wird unter Gasproduktion aus den meisten fermentierbaren Kohlenhydraten produziert.

Tabelle 9: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *E. coli*

	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-

G: Gemischte Säuregärung, +: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

Escherichia coli

E. coli kommt vor allem im unteren Verdauungstrakt von Menschen und anderen warmblütigen Tieren vor, wo sie als Teil der Dickdarmflora existieren. Bestimmte Stämme von *E. coli* werden bereits als probiotische Präparate zur Behandlung von Diarrhö sowie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa eingesetzt. Obwohl die meisten Stämme nicht pathogen sind, können einige Serotypen intestinale und extraintestinale Infektionen hervorrufen. Aufgrund verschiedener Virulenzfaktoren können diese Stämme teilweise schwere Erkrankungen auslösen. *E. coli* betreibt gemischte Säuregärung, bei der GLU über die Glucolyse zu Pyruvat abgebaut wird und ATP durch Substratkettenphosphorylierung entsteht. Anschließend wird das Pyruvat weiter abgebaut, wobei neben Milchsäure auch Acetat, Ethanol, Succinat, Forminat sowie Wasserstoff und Kohlendioxid entsteht. Auch von *E. coli* ist bekannt, dass Stämme dieser Art Pentosen verwerten. In Gemischen mit verschiedenen Kohlenhydraten werden diese in einer bestimmten Reihenfolge verwertet, wobei GLU das präferierte Substrat ist und ARA vor XYL metabolisiert wird. XOS und AXOS können nicht metabolisiert werden. Tabelle 9 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *E. coli* [DESAI und RAO, 2009] [IMMERZEEL et al., 2014][SCHEUTZ und STROCKBINE, 2005] [VON BUENAU et al., 2005].

2.4.5. Saccharomyces

Saccharomyces, zu Deutsch *Zuckerhefen*, bilden eine Gattung in der Ordnung der echten Hefen. Diese zur Abteilung der Schlauchpilze zählenden Mikroorganismen können GLU ausgezeichnet fermentieren und spielen seit dem Altertum eine wichtige Rolle bei der Produktion alkoholischer Getränke sowie Teigwaren. Tabelle 10 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau der Gattung *Saccharomyces* [NEIMAN, 2005] [VAN ZYL et al., 1989].

Tabelle 10: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *Saccharomyces ssp.*

	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>S. boulardii</i>	+	+	-	+	-	-	?	?
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	+	-	-	?	?

+: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae ist einer der am besten erforschten Mikroorganismen und gilt als eukaryotischer Modellorganismus. Die Zellen haben einen Durchmesser von 5 µm und sind rund bis oval, die Vermehrung erfolgt vegetativ durch Knospung. Bei fehlendem Stickstoffangebot und der Anwesenheit nicht fermentierbarer Kohlenhydrate wird die Sporulation, eine Form der geschlechtlichen Vermehrung eingeleitet, bei der haploide Ascosporen gebildet werden. *S. cerevisiae* ist ein fakultativ anaerober Organismus und kann ein breites Spektrum an Kohlenhydraten zu CO₂ und Ethanol vergären. Bei Vorhandensein von hohen Glucosekonzentrationen kann die Fermentation auch unter aeroben Bedingungen stattfinden, da durch die GLU die Transkription von respiratorischen Genen gehemmt wird. Dieses als Crabtree-Effekt bekannte Phänomen steigert die intrazelluläre Pyruvatkonzentration und hemmt das Zellwachstum deutlich. Wenn kein Zucker mehr zu Verfügung steht, kann *S. cerevisiae* unter aeroben Bedingungen das zuvor erzeugte Ethanol zur zusätzlichen Energiegewinnung oxidieren. Das Temperaturoptimum liegt bei etwa 30°C, wobei die optimale Temperatur für die Fermentation ein wenig über der des Zellwachstums liegt, die Generationszeit liegt dann ungefähr bei 2 Stunden. *S. cerevisiae* gilt als druckempfindlich, ab einem Umgebungsdruck von 8 bar wird die Gärung eingestellt.

XYL wird nur in kleinen Mengen verwertet wenn gleichzeitig Cosubstrate wie GLU, Ribose oder Raffinose vorliegen. Sie wird langsam über Xylitol zu Xylulose metabolisiert,

die unter Ethanol Produktion fermentiert werden kann. Dabei werden nur kleine Mengen zum Zellwachstum verwendet. Obwohl viele andere Hefen und Pilze Pentosen besser verwerten können, wird aufgrund der hohen Ethanol Toleranz von *S. cerevisiae* immer noch versucht, diese zur Verwertung von XYL und xylosehaltigen Polysacchariden einzusetzen. Rekombinante Stämme von *S. cerevisiae*, die Gene für extensiven XYL Abbau tragen, sind daher Gegenstand intensiver Forschung [DIAZ-MONTANO und DE JESUS RAMIREZ CORDOVA, 2009] [GONG et al., 1983] [NEIMAN, 2005] [VAN ZYL et al., 1989].

Saccharomyces boulardii

S. boulardii ist eng verwandt mit *S. cerevisiae* und wurde 1923 in Indochina vom französischen Mykologen Henri Boulard von den Schalen der Litschifrukt erstmals isoliert und in den 1950er Jahren in Frankreich für die Behandlung von Antibiotika assoziierter Diarrhö zugelassen. Mittlerweile hat sich *S. boulardii* als gut erforschtes Präbiotikum bewährt, das auf vielfältige Weise wirkt und als sicher in der Anwendung gilt. Ein Temperaturoptimum von 37°C sowie die Fähigkeit, die Magenpassage in großer Zahl zu überleben, sind beste Voraussetzungen für den Einsatz als Probiotikum. Nach oraler Gabe kann *S. boulardii* von *Clostridium difficile* produzierte Toxine durch spezielle Proteasen zerstören und das Wachstum von Pathogenen wie *Candida albicans*, *Salmonella typhimurum* und *Yersinia enterocolitica* hemmen. Weiters wird die Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Dickdarm, die bei Darmerkrankungen vermindert ist, stimuliert. Eine Therapie mit *S. boulardii* ist bei Antibiotika assoziierter Diarrhö, Reisediarrhö, *Clostridium difficile* Infektionen, sowie Reizdarmsyndrom, Morbus Crohn und Diarrhö in Zusammenhang mit HIV Infektionen angezeigt [McFARLAND und BERNASCONI, 1993] [McFARLAND et al., 1994] [McFARLAND, 2010] [GUSLANDI et al., 2000].

2.4.6. *Wickerhamomyces anomalus*

W. anomalus, veraltet auch *Pichia anomala* oder *Hansuela anomala*, ist eine heterothallische, ascomycetische Hefe und bildet hutförmige Ascosporen. Sie gehört zur Familie der *Saccharomycetacea* und zählt zu den Nicht-*Saccharomyces* Weinhefen. Erstmals isoliert wurde sie aus einem Bayrischen Bier. *W. anomalus* ist eine Crabtree negative Hefe, was bedeutet, dass, anders als bei der Bäckerhefe, unter aeroben Bedingungen kaum ethanolische Gärung betrieben wird, dafür aber vermehrt Ethyl-

Acetat freigesetzt wird. Unter Sauerstofflimitation verlangsamt sich das Wachstum, was bedeutet, dass der respiratorische Metabolismus bevorzugt wird. Aufgrund ihrer Fähigkeit, unter hohem osmotischen Druck und niedrigem pH-Wert zu überleben, ist *W. anomalus* ein weit verbreiteter Verderbskeim in Milchprodukten und Backwaren sowie in salzreichen Lebensmitteln und Silage. Andererseits kann *W. anomalus* auch zur Fermentation von Lebensmitteln verwendet werden. Bei der spontanen Gärung von Wein spielt *W. anomalus* eine Rolle und trägt durch das produzierte Ethyl-Acetat positiv zum Aroma des Fertigproduktes bei. *W. anomalus* ist in Sauerteig weit verbreitet und ist dort neben *S. cerevisiae* die dominierende Hefe. Auch in anderen traditionellen Lebensmitteln wie Balinesischen Reiswein, Kakao und Kaffee wird diese Spontangärung genutzt. Weiters zeigt *W. anomalus* eine starke antifungale Wirkung und kann Futtermittel sowie Brotteig vor einem Schimmelbefall schützen und dient gleichzeitig als zusätzliche Proteinquelle [PASSOTH et al., 2005] [CODA et al., 2011]. In Sauerteig kann *W. anomalus* das Wachstum von Milchsäurebakterien positiv beeinflussen, indem Vitamine und Aminosäuren bereitgestellt werden. *W. anomalus* wächst ausgezeichnet auf GLU und FRU, sowie gut auf XYL. Schwaches Wachstum zeigt sich auf ARA und LAC, keines auf Zellulose [FREDLUND et al., 2002]. *W. anomalus* wächst bei 37°C und kann Teil der menschlichen Darmflora sein. Bei immungeschwächten Patienten kann *W. anomalus* gelegentlich Nosokomialinfektionen auslösen, aber aufgrund der guten Behandelbarkeit mit antifungalen Präparaten stellt dies keine große Gefahr dar. Tabelle 11 zeigt den erwarteten Kohlenhydratabbau von *W. anomalus* [DANIEL et al., 2011].

Tabelle 11: Erwarteter Kohlenhydratabbau von *W. anomalus*

	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS
<i>W. anomalus</i>	+	+	+	+	+	+	?	?

+: Abbau erwartet; - Abbau nicht erwartet, ~: keine eindeutige Aussage möglich; ? keine Daten vorhanden

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Chemikalien und Geräte

Chemikalien

3²- α -L-Arabinosyl-Xylobiose (Megazyme Unlimited Corporation, Wicklow, Irland)

Arabinose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Bakteriologischer Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

Brain Heart Infusion Boullion (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

Einwegimpfösen

Einwegpipetten + Pipettierhilfe

Einwegspatel

Fruktose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Hefeextrakt (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

Laktose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Maltose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Malzextrakt (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

MRS Agar (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

MRS Boullion (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

M17 Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

M17 Boullion Pulvers (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

NaCl

Oxyrase

Paraffinöl

Pentopan Mono BG (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA)

Sojapepton (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

Trypton (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)

Weizen Arabinoxylan (Megazyme Unlimited Corporation, Wicklow, Irland)

Xylose (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Zucker- und fleischextraktfreie MRS Boullion (Conda Pronadisa, Madrid, ESP)

Geräte

Bioscreen C (Labssystem Co, Finnland)

IKA MS 3 Basic Kleinschüttler (IKA Werke GmbH & CoKG, Staufen im Breisgau, BRD)

Eppendorf Centrifuge 5810 (Eppendorf AG, Hamburg, BRD)

Eppendorf Xplorer plus Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, BRD) und Spitzen

Eppendorf Reference 2 Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, BRD) und Spitzen

Spectronic Genesys 10 Bio Spectralphotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

3.2. Herstellung der Nährmedien und Kohlenhydratquellen

BHI Agar

37,0 g des BHI (Brain Heart Infusion) Boullion Pulvers (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) und 10,0 g bakteriologischer Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 1000 mL destilliertem Wasser bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nun wird der flüssige Agar im Wasserbad auf 50°C temperiert und in Petrischalen gegossen.

BHI Bouillon

37,0 g des BHI (Brain Heart Infusion) Boullion Pulvers (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

E. Coli Agar

10,0 g Trypton, 10,0 g GLU 10,0 g NaCl und 15,0 g bakteriologischer Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nun wird der flüssige Agar im Wasserbad auf 50°C temperiert und in Petrischalen gegossen.

E. Coli Bouillon

10,0 g Trypton, 10,0 g GLU und 10,0 g NaCl werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

Doppelt konzentrierte, zuckerfreie E. Coli Bouillon

20,0 g Trypton und 20,0 g NaCl werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

Hefeagar

3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g Malzextrakt, 5,0 g Sojapepton, 10,0 g GLU und 15,0 g bakteriologischer Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nun wird der flüssige Agar im Wasserbad auf 50°C temperiert und in Petrischalen gegossen.

Hefebouillon

3,0 g Hefeextrakt, 3,0 g Malzextrakt, 5,0 g Sojapepton und 10,0 g GLU werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

Doppelt konzentrierte, zuckerfreie Hefe Universalbouillon

20,0 g Sojapepton werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

MRS Agar:

68,2 g des MRS Agar Pulvers (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) werden in 1000 mL destilliertem Wasser bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nun wird der flüssige Agar im Wasserbad auf 50°C temperiert und in Petrischalen gegossen.

MRS Bouillon

52,2 g des MRS Bouillon Pulvers (Merck KGaA, Darmstadt, BRD) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

Doppelt konzentrierte zuckerfreie MRS Bouillon ohne Fleischextrakt

48,0g der zucker- und fleischextraktfreien MRS Bouillon (Conda Pronadisa, Madrid, ESP) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

M17 Agar

48,25 g des M17 Agar Pulvers (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 950 mL destilliertem Wasser bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Anschließend werden 10 g Laktosemonohydrat in 50 mL destilliertem Wassergelöst und durch einen 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter filtriert und dem noch flüssigen Agar hinzugefügt und dieser in Petrischalen gegossen.

M17 Boullion

37,25 g des M17 Boullion Pulvers (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 950mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Anschließend werden 10,0 g Laktosemonohydrat in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und durch einen 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter filtriert und der Boullion hinzugefügt.

Nähragar

10,0 g Sojapepton, 10,0 g GLU und 15,0 g bakteriologischer Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bis zur vollständigen Auflösung gekocht und anschließend bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nun wird der flüssige Agar im Wasserbad auf 50°C temperiert und in Petrischalen gegossen.

Nährbouillon

10,0 g Sojapepton und 10,0 g GLU werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

Doppelt konzentrierte, zuckerfreie Nährbouillon

20,0 g Sojapepton und 10,0 g GLU werden in 1000 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert.

2% Kohlenhydratlösungen

Jeweils 5,0 g GLU, FRU, LAC, MAL, ARA, XYL und XOS werden in jeweils 250 mL destilliertem Wasser aufgelöst, durch mittels 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter steril filtriert und in sterile Gefäße überführt.

1% A3X Lösung

30mg 3²- α -L-Arabinosyl-Xylobiose (Megazyme Unlimited Corporation, Wicklow, Irland) (CAS No. 144938-89-6) (A3X) werden in 3 mL destilliertem Wasser aufgelöst, durch mittels 0,45 μ m Spritzenaufsatzfilter steril filtriert und in sterile Gefäße überführt.

2% AXOS Lösung

500 mg niedrig viskoses Weizen Arabinoxylan (Megazyme Unlimited Corporation, Wicklow, Irland) (CAS No. 9040-27-1) werden in 25 mL destilliertem Wasser aufgelöst. Anschließend werden 250 mg Xylanase (Pentopan Mono BG, Sigma Aldrich Inc., St. Louis, USA) hinzugegeben und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Hydrolyse des Arabinoxylan zu AXOS zu erzielen. Anschließend wird die Lösung 30 Minuten auf 80 °C erhitzt und dann 10 Minuten bei 3220 RPM, anschließend weitere 20 min bei 10000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Spritze aufgenommen und mittels 0,45 μ m Spritzenaufsatzfilter in sterile Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren gelagert.

Mikroorganismen

Alle Stämme wurden von der Kryobank des Instituts für Lebensmittelwissenschaften der Universität für Bodenkultur Wien zu Verfügung gestellt. Die Tabelle im Anhang bietet eine Übersicht der verwendeten Stämme.

3.2. Ermittlung der Keimzahl

Bakteriensuspensionen aus der Kryokultur werden mittels steriler Einwegimpfösen fraktioniert auf Agarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bebrütet. Für fakultativ anaerobe Stämme wird ein Streifen Anaerocult® A (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, BRD) mit destilliertem Wasser befeuchtet und gemeinsam mit den ausgestrichenen Platten in einen Anaerobentopf überführt um anaerobe Bedingungen zu schaffen.

Tabelle 12: Medien und Anzuchtbedingungen für Keimzahlbestimmung

Organismus	Medium	Temperatur	Milieu
<i>Bacillus</i>	Nähragar / -bouillon	30°C	aerob
<i>Bifidobacterium</i>	BHI Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> Agar / Bouillon	37°C	aerob
<i>Enterococcus</i>	MRS Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Lactobacillus</i>	MRS Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Lactococcus</i>	M17 Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Leuconostoc</i>	MRS Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Pediococcus</i>	MRS Agar / Bouillon	35°C	anaerob
<i>Saccharomyces</i>	Hefe Agar / Bouillon	25°C	aerob
<i>Wickerhamomyces</i>	Hefe Agar / Bouillon	25°C	aerob
<i>Weissella</i>	MRS Agar / Bouillon	35°C	anaerob

Anschließend werden 10 mL Bouillon in sterilen Epprovetten vorgelegt, jeweils eine Kolonie von der bebrüteten Agarplatte mittels steriler Einwegöse in das Flüssigmedium überimpft und erneut 24 Stunden bebrütet. Aus Tabelle 12 sind die verwendeten Medien sowie Bebrütungstemperaturen für jede Gattung ersichtlich. Weiters wird aufgelistet, für welche Organismen ein anaerobes Milieu geschaffen wird.

Aus den für 24 Stunden bebrüteten Proben wird eine Verdünnungsreihe erstellt: Jeweils 1 mL einer Verdünnungsstufe wird mit 9 mL Medium versetzt. Zusätzlich werden Verdünnung mit den Konzentrationen 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8 sowie 1:20, 1:40, 1:60 und 1:80 hergestellt. Jeweils 1000 µL jeder Verdünnungsstufe werden in Semimikroküvetten überführt und die OD bei 600 nm gegen das Nährmedium als Leerwert bestimmt. Ebenso werden je 100 µL jeder Verdünnung im Doppelansatz auf Agarplatten ausgespatelt und für 48 Stunden bebrütet. Nach dem Auszählen der gewachsenen Kolonien wird das gewogene arithmetische Mittel der Kolonienzahl wie aus Formel 6 ersichtlich berechnet.

$$c = \frac{\sum c}{(n1 * 1) + (n2 * 0,1)} * d$$

c gewogenes arithmetisches Mittel der Kolonienzahl

Σc Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden

n1 Anzahl der Petrischalen der niedrigsten Verdünnungsstufe

n2 Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe

d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Alle Angaben in KBE/mL

Nun wird, wie in Abbildung 5 gezeigt, ein Diagramm erstellt, indem die OD auf der Abszisse und die Keimzahl logarithmisch auf der Ordinate aufgetragen wird. Anschließend werden Regressionsgerade und –Gleichung sowie der Korrelationskoeffizient bestimmt. Die mittlere Keimzahl aller untersuchten Stämme beträgt bei einer OD von 0,6 $3,4 \cdot 10^8$ KBE/mL, der mittlere Korrelationskoeffizient beträgt 0,958. Abbildung 5 zeigt beispielhaft das Diagramm des Stammes Lb279.

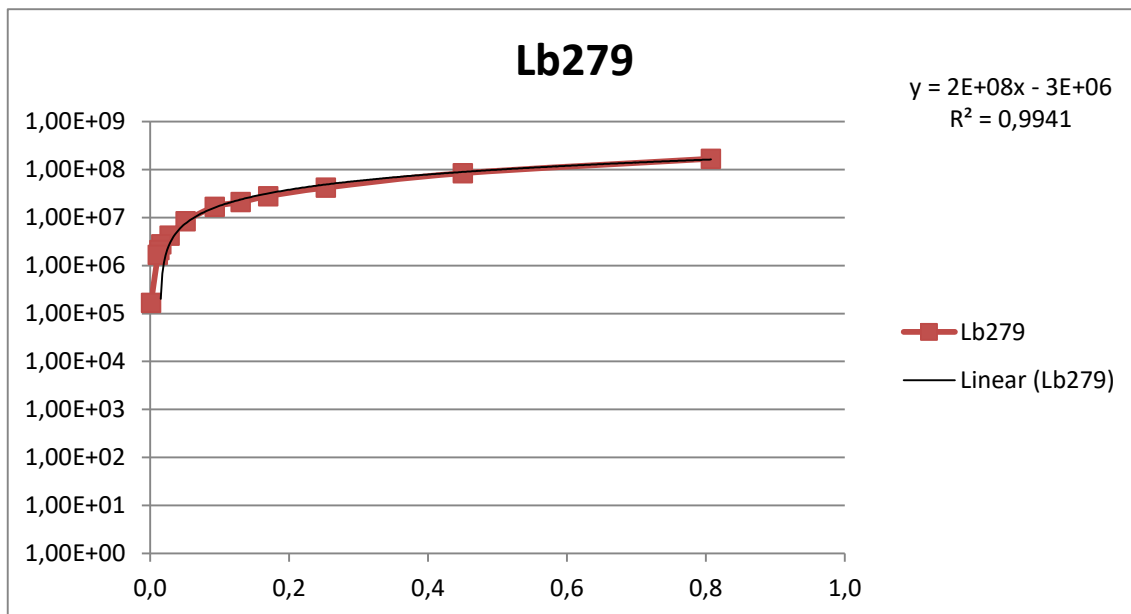


Abbildung 5: Keimzahldiagramm

3.3. Kohlenhydrat Screening

Analog zu den vorhergegangenen Versuchen werden die Organismen wieder unter den in Tabelle 12 angeführten Bedingungen zuerst 24 Stunden auf Agarplatten, danach 24 Stunden in Bouillon angezüchtet. Nun wird die Suspension in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3220 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgegossen und die entstandenen Pellets in sterilem destillierten Wasser gewaschen, um die Zellmasse von restlichem Zucker und Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen zu reinigen. Dieser Vorgang wird 2-mal durchgeführt. Nun wird noch ein letztes Mal zentrifugiert und das entstandene Pellet in doppelt konzentrierter, zuckerfreier Bouillon, die aus Tabelle 13 ersichtlich ist, resuspendiert. Mit dem Spectronic Genesys 10 Bio Spectralphotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) werden die Suspensionen auf eine OD von 0,6 eingestellt. Da diese später noch 1:1 verdünnt werden, beträgt die OD zu Beginn des Experiments in den

Tabelle 13: Anzuchtbedingungen für Bioscreen C

Organismus	Medium (zuckerfrei, doppelt konzentriert)	Temperatur	Milieu	Dauer
<i>Bacillus</i>	Nähragar /-Bouillon	30°C	aerob	48 h
<i>Bifidobacterium</i>	BHI Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> Agar /Bouillon	37°C	aerob	48 h
<i>Enterococcus</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Lactobacillus</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Lactococcus</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Leuconostoc</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Pediococcus</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h
<i>Saccharomyces</i>	Hefe Agar /Bouillon	25°C	aerob	144 h
<i>Wickerhamomyces</i>	Hefe Agar /Bouillon	25°C	aerob	144 h
<i>Weissella</i>	MRS Agar /Bouillon	35°C	anaerob	48 h

Ansätzen etwa 0,3. Für die Analyse mittels Bioscreen werden zunächst 4,5 mL der 8 vorbereiteten Kohlenhydratlösungen, sowie 4,5 mL destilliertes Wasser für die Leerkontrollen mit jeweils 0,5 mL Oxyrase vereinigt. Bei Versuchen mit aeroben Ansätzen entfällt dieser Schritt. Nun werden je 150 µL der Lösungen in 100 Well Mikrotiterplatten (Honeycomb Platten) vorgelegt und anschließend entweder 150 µL der zuvor eingestellten Suspension oder 150 µL der Bouillon als Leerkontrolle zugegeben. Dies erfolgt im Doppelansatz. Anaerobe Ansätze werden zusätzlich mit je 2 Tropfen Paraffinöl pro Well überschichtet. Durch die Vereinigung der Suspensionen in

doppelt konzentrierter Bouillon mit destilliertem Wasser oder den Kohlenhydratlösungen entstehen kohlenhydratfreie beziehungsweise Ansätze mit einem Kohlenhydratgehalt von 1%. Analog dazu liegen nun auch Leerkontrollen von allen verwendeten Medien ohne Inoculum vor.

Abbildung 6 zeigt das Pipettierschema für die Bioscreen Versuche. In der jeweils ersten Spalte der beiden Platten werden 150 µL H₂O vorgelegt. In der jeweils 2. bis 9. Spalte werden spaltenweise 150 µL der 2%igen Zuckerlösungen vorgelegt. In den letzten Spalten wird in jeweils 2 Wells 150 µL H₂O oder Zuckerlösung vorgelegt. Anschließend werden in den ersten beiden Reihen, mit Ausnahme der letzten Spalte jeweils 150 µL

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
1	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	H ₂ O
2	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	H ₂ O
3	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	GLU
4	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	GLU
5	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	FRU
6	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	FRU
7	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	LAC
8	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	LAC
9	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	MAL
10	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	MAL

	101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
101	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	ARA
102	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	ARA
103	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	XYL
104	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	XYL
105	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	XOS
106	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	XOS
107	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	AXOS
108	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	AXOS
109	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	
110	H ₂ O	GLU	FRU	LAC	MAL	ARA	XYL	XOS	AXOS	

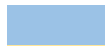
	Medium		Strain 4		Strain 8
	Strain 1		Strain 5		Strain 9
	Strain 2		Strain 6		Strain 10
	Strain 3		Strain 7		

Abbildung 6: Pipettierschema für Kohlenhydratscreening

der Suspension eines Strains hinzugefügt. Analog dazu werden 9 weitere Strains mit den Zuckerlösungen vereinigt. In der jeweils letzten Spalte jeder Platte wird anschließend doppelt konzentrierte, zuckerfreie Bouillon hinzugegeben. Somit liegt nun in der jeweils ersten Spalte das Inoculum ohne Kohlenhydratquelle vor, in den Spalten 2 bis 9 das Inoculum mit Kohlenhydratquelle. In den Wells 91 und 92 liegt das zuckerfreie Medium ohne Inoculum vor, in den übrigen Wells der jeweils letzten Spalten das Medium ohne Inoculum mit Kohlenhydratquelle als Blindwert vor. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob Medium, H₂O und Kohlenhydratlösungen nicht kontaminiert sind. Durch das Inokulieren in zuckerfreiem Medium kann das Wachstumsverhalten der untersuchten Mikroorganismen ohne Kohlenhydratquelle untersucht werden.

Nun werden die Platten in den Bioscreen eingesetzt und die Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm in 15 Minuten Intervallen durchgeführt. Vor jeder Messung findet ein 5 sekündiger Schüttelvorgang statt. Messdauer und Temperatur sind ebenfalls aus Tabelle 13 ersichtlich. Nach Abschluss der Messung werden die Platten autoklaviert und entsorgt. Die Rohdaten werden zur weiteren Auswertung exportiert.

Zunächst wird von jedem Doppelansatz zu jedem Messpunkt der Mittelwert bestimmt, anschließend werden die Leerwerte am jeweiligen Messpunkt von den Versuchsproben abgezogen. Anschließend werden Liniendiagramme jedes Stammes mit allen untersuchten Kohlenhydraten erstellt. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Auswertung der

	A	B	C	D	G	H	I	L	N	C
1	Label	BLANK	BLANK		Lb 22	Lb 22				
2	Info	GLU	GLU		GLU	GLU				
3	Time	OD	OD	Mittelwert	OD	OD	Mittelwert		OD Lb22 - BLANK	
4	00:01:26	0,140	0,137	0,139	0,472	0,468	0,470		0,332	
5	00:15:06	0,195	0,132	0,164	0,435	0,432	0,434		0,270	
6	00:30:06	0,218	0,121	0,170	0,441	0,446	0,444		0,274	
7	00:45:06	0,153	0,117	0,135	0,475	0,490	0,483		0,348	
8	01:00:06	0,137	0,118	0,128	0,533	0,539	0,536		0,409	
9	01:15:06	0,123	0,122	0,123	0,596	0,599	0,598		0,475	
10	01:30:06	0,134	0,133	0,134	0,641	0,659	0,650		0,517	
11	01:45:06	0,149	0,147	0,148	0,738	0,743	0,741		0,593	
12	02:00:06	0,160	0,157	0,159	0,803	0,810	0,807		0,648	
13	02:15:06	0,168	0,164	0,166	0,852	0,868	0,860		0,694	
14	02:30:06	0,172	0,169	0,171	0,853	0,923	0,888		0,718	
15	02:45:06	0,176	0,172	0,174	0,921	0,951	0,936		0,762	
16	03:00:06	0,179	0,175	0,177	0,921	0,932	0,927		0,750	
17	...									
18	...									
19	46:00:06	0,239	0,244	0,242	1,785	1,757	1,771		1,530	
20	46:15:06	0,239	0,244	0,242	1,787	1,759	1,773		1,532	
21	46:30:06	0,241	0,244	0,243	1,786	1,756	1,771		1,529	
22	46:45:06	0,240	0,245	0,243	1,786	1,757	1,772		1,529	
23	47:00:06	0,242	0,245	0,244	1,791	1,764	1,778		1,534	
24	47:15:06	0,242	0,245	0,244	1,783	1,756	1,770		1,526	
25	47:30:06	0,242	0,245	0,244	1,783	1,753	1,768		1,525	
26	47:45:06	0,241	0,246	0,244	1,780	1,758	1,769		1,526	
27	48:00:06	0,241	0,247	0,244	1,790	1,762	1,776		1,532	

Abbildung 7: Auswertung der Rohdaten

Messreihe GLU eines Stammes von *Lactobacillus casei*. Als vielversprechende Stämme werden all jene angesehen, bei denen die Endkeimzahl auf ARA, XYL oder XOS vergleichbar mit jenen in GLU ist.

3.4. A3X Fermentation

Da die Ansätze mit dem hydrolytisch gespaltenen Weizenarabinoxylan nicht interpretierbare Ergebnisse lieferten, wird ein weiterer Versuch mit einem hochreinen A3X Präparat durchgeführt. Aus Kostengründen werden hierfür folgende Stämme ausgewählt, die bereits im Kohlenhydratscreening vielversprechende Ergebnisse lieferten: Lb22, Lb182, Lb344, Lb346, Le7, Pd1, En21 sowie Lb213 als Negativkontrolle und Bf70 als Positivkontrolle. Die Anzucht sowie die Vorbereitung der Stämme in doppelt konzentrierter, zuckerfreier MRS Boullion wird, genau wie in Absatz 3.2. beschrieben, durchgeführt. Allerdings werden die Bakteriensuspensionen diesmal auf eine OD von 0,1 verdünnt. Weiters werden 1%ige Lösungen von GLU und A3X hergestellt und mit Hilfe eines 0,45 µm Spritzenaufsatzfilters sterilisiert. Anschließend wird Oxyrase hinzugegen, sodass eine Oxyrase Konzentration von 10% V/V erreicht wird. Ebenso wird steriles destilliertes Wasser mit einer Oxyrase Konzentration von 10% v/v vorbereitet. Nun wird nach dem in Abbildung 8 gezeigten Pippettierschema jeweils 100 µL Wasser oder 100µL der Kohlenhydratlösungen vorgelegt und anschließend mit entweder 100 µL der Bakteriensuspensionen oder mit 100µL der doppelt konzentrierter zuckerfreier

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
1	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		H2O
2	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		H2O
3	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		
4	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		
5	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		A3X
6	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		A3X
7	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		
8	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		
9	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		GLU
10	H2O	H2O		A3X	A3X		GLU	GLU		GLU

	Medium		Lb344		En21
	Lb22		Lb346		Lb213
	L182		Le7		Bf70
	Lb244		Pd1		

Abbildung 8: Pipettierschema für A3X Versuch

Bouillon vereinigt. Anschließend werden die Ansätze mit jeweils 2 Tropfen Paraffinöl überschichtet und die Mikrotiterplatte wird in den Bisocreen C eingesetzt. Die Bebrütung findet für 48 Stunden bei 37°C statt, das Messintervall beträgt 15 min, wobei vor jeder Messung ein 5 sekündiger Schüttelvorgang stattfindet. Nach Abschluss der Messung werden die Platten autoklaviert und entsorgt und die Messdaten wie bereits in Kapitel 2.3. beschrieben ausgewertet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. *Lactobacillus*

Lactobacillus acidophilus

Alle untersuchten Stämme von *L. acidophilus* verwerteten FRU, MAL und LAC etwa so gut wie GLU; kein Stamm war allerdings in der Lage XYL oder XOS zu metabolisieren. Anders als erwartet, zeigte Lb215 ebenfalls schwaches Wachstum auf ARA. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 9 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. acidophilus*.

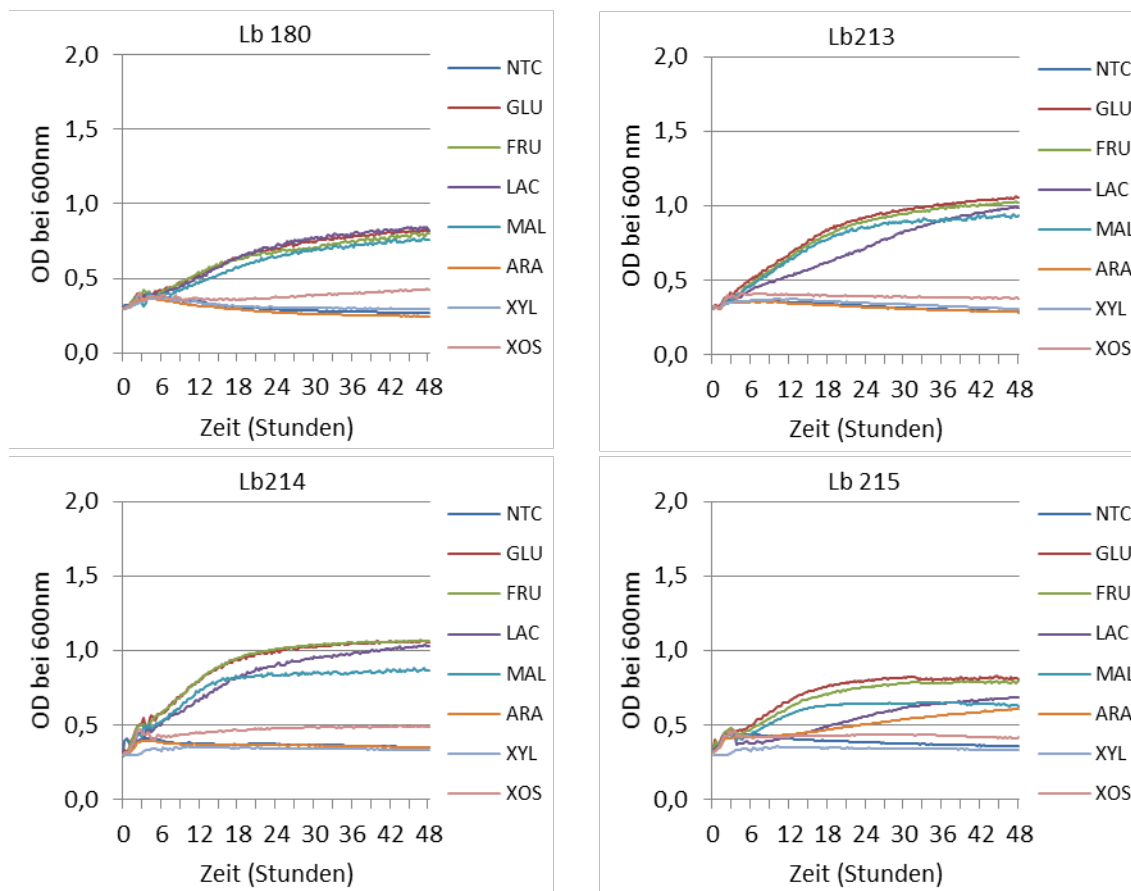


Abbildung 9: Wachstumskurven von *L. acidophilus*

Lactobacillus brevis

L. brevis zeigte ein schnelles und gutes Anwachsen auf nahezu allen Kohlenhydratquellen. Einzig der Stamm Lb183 zeigte nur ein schwaches Wachstum auf XOS und keines auf ARA. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 10 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. brevis*.

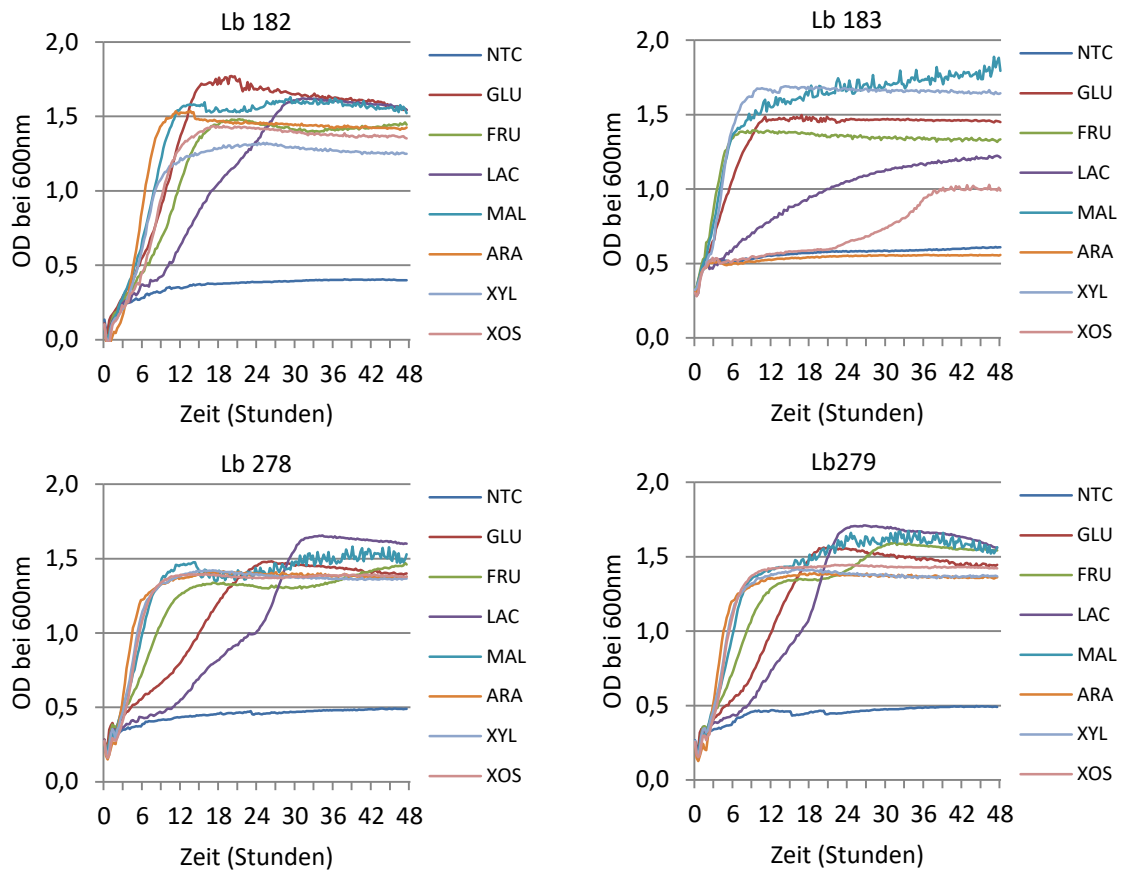


Abbildung 10: Wachstumskurven von *L. brevis*

Lactobacillus casei

Beide untersuchten Stämme von *L. casei* wuchsen schnell und gut auf Hexosen und Hexose haltigen Disacchariden an. In den Pentose haltigen Medien zeigte sich eine etwa 24 Stündige Latenzzeit, in der die OD und damit auch die Keimzahl annähernd konstant blieb. Danach setzte wider Erwarten ein rasches Wachstum ein, sodass nach weiteren 24 Stunden die Endkeimzahl mit jener in auf GLU vergleichbar war. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 11 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. casei*.

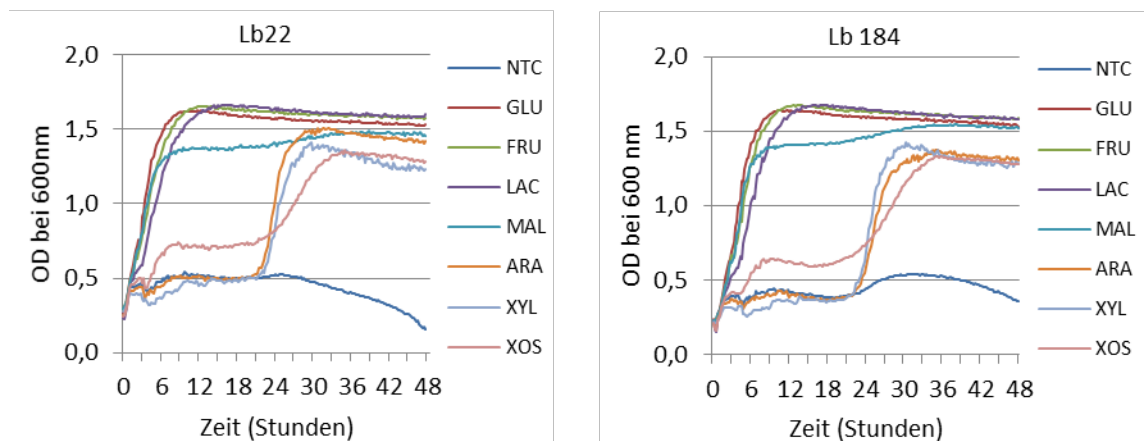


Abbildung 11: Wachstumskurven von *L. casei*

Lactobacillus hilgardii

Beide untersuchten Stämme wuchsen auf fast allen Kohlenhydratquellen schnell und gut an. Anders als aus der Literatur ersichtlich war der Stamm Lb334 in der Lage ARA zu metabolisieren. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Der Stamm Lb335 war nicht in der Lage ARA oder XOS zu metabolisieren. Abbildung 12 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. hilgardii*.

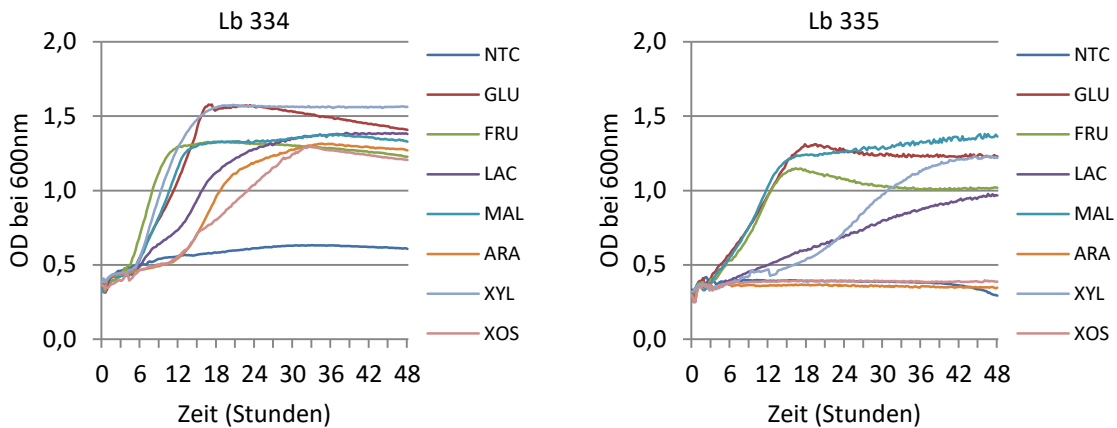


Abbildung 12: Wachstumskurven von *L. hilgardii*

Lactobacillus kisonensis

L. kisonensis zeigte ein schnelles und gutes Wachstum auf allen Kohlenhydratquellen, kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 13 zeigt die Wachstumskurven von *L. kisonensis*.

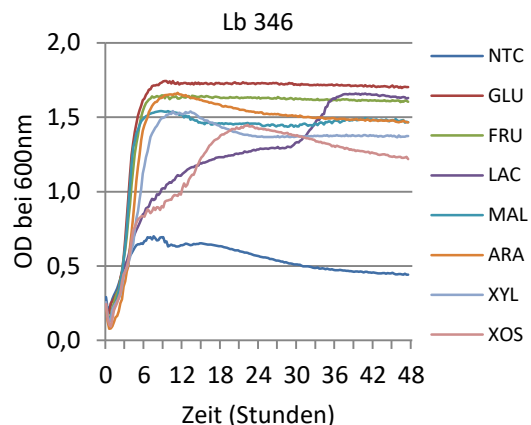


Abbildung 13: Wachstumskurven von *L. kisonensis*

Lactobacillus otakiensis

L. otakiensis wuchs hervorragend auf GLU, FRU, MAL und ARA an, wobei das schnellste Wachstum auf ARA beobachtet werden konnte. Ein langsamerer Anstieg der OD zeigte sich in LAC. Wider Erwarten konnten XYL und XOS nicht verwertet werden.

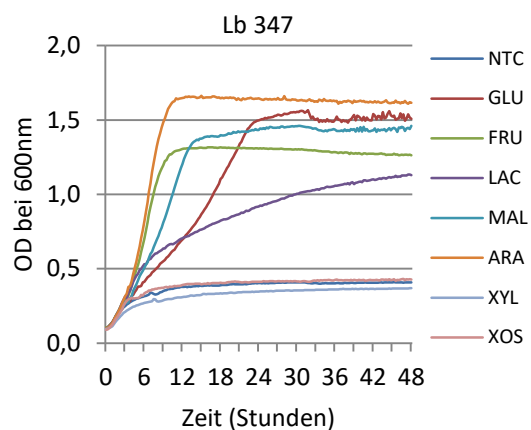


Abbildung 14: Wachstumskurven von *L. otakiensis*

Ebenso zeigte sich kein Wachstum in NTC. Abbildung 14 zeigt die Wachstumskurven von *L. otakiensis*.

Lactobacillus plantarum

Die Stämme Lb195 und Lb334 von *L. plantarum* zeigten gutes Wachstum auf allen bereitgestellten Kohlenhydratquellen wobei auf XYL eine Latenzzeit von etwa 12 Stunden beobachtet werden konnte, in der die Keimzahl annähernd konstant blieb, bevor ein rasches Wachstum einsetzte. Die Keimzahl in NTC stieg während der gesamten Zeit nicht. Der Stamm Lb342 war, anders als erwartet, nicht in der Lage XOS zu metabolisieren, ebenso zeigte sich kein Wachstum auf XYL und in NTC, sowie ein Schwaches auf ARA. Abbildung 15 zeigte die Wachstumskurven aller Stämme von *L. plantarum*.

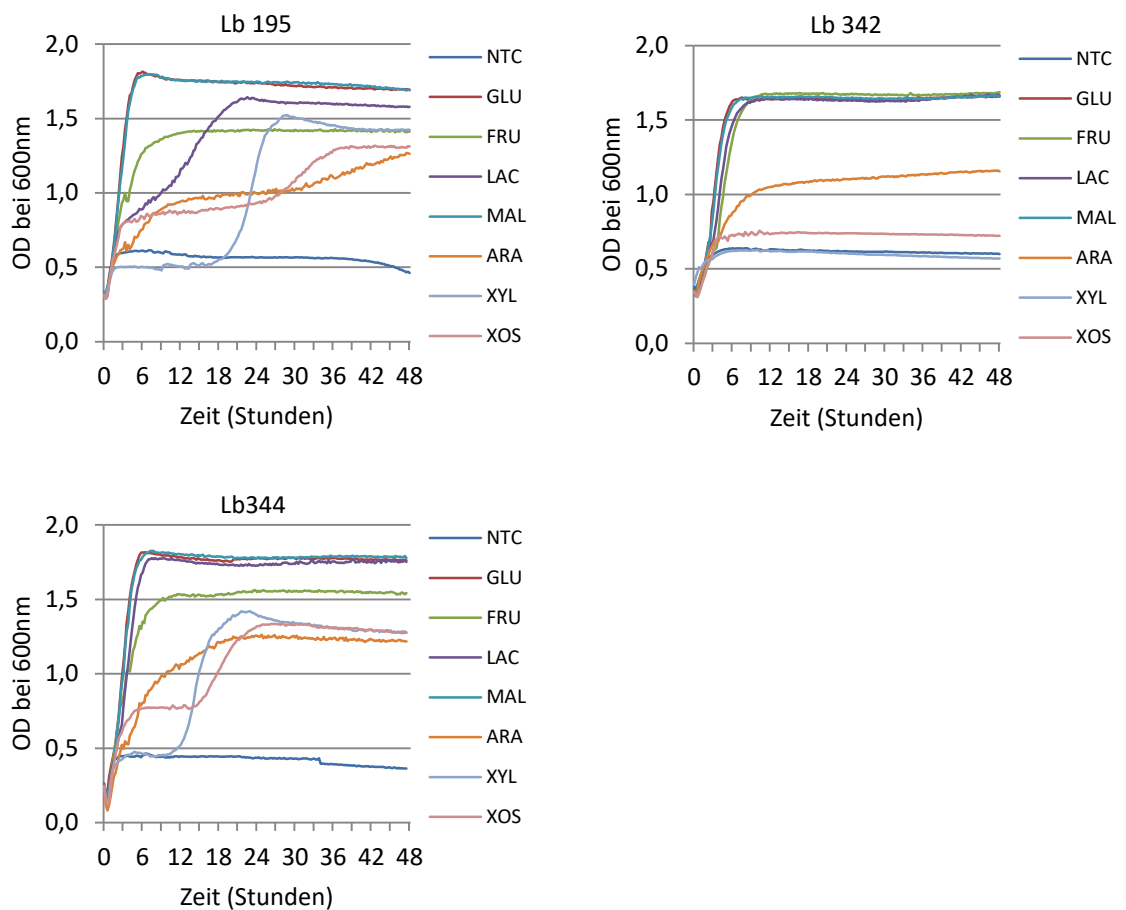


Abbildung 15: Wachstumskurven von *L. plantarum*

Lactobacillus reuteri

Der Stamm Lb162 von *L. reuteri* zeigte gleich nach Beginn der Messungen einen Abfall der OD in allen Kohlenhydratlösungen und nach etwa 12 Stunden einen raschen Anstieg. Stamm LB 164 zeigte ein gutes Wachstum auf allen Kohlenhydratquellen, in FRU, ARA, XYL und XOS setzte das Wachstum mit einer Zeitverzögerung von einigen Stunden ein. Stamm Lb196 verwertete neben GLU auch FRU, LAC und MAL ausgezeichnet. Das Wachstum auf ARA war deutlich schlechter, jenes auf XYL und XOS setzte erst deutlich zeitverzögert ein. Insgesamt fällt auf, dass alle Stämme von *L. reuteri* anders als in der Literatur angegeben, XYL zumindest teilweise verwerten können. Keine Veränderung der Zellzahlen zeigte sich in NTC. Abbildung 16 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. reuteri*.

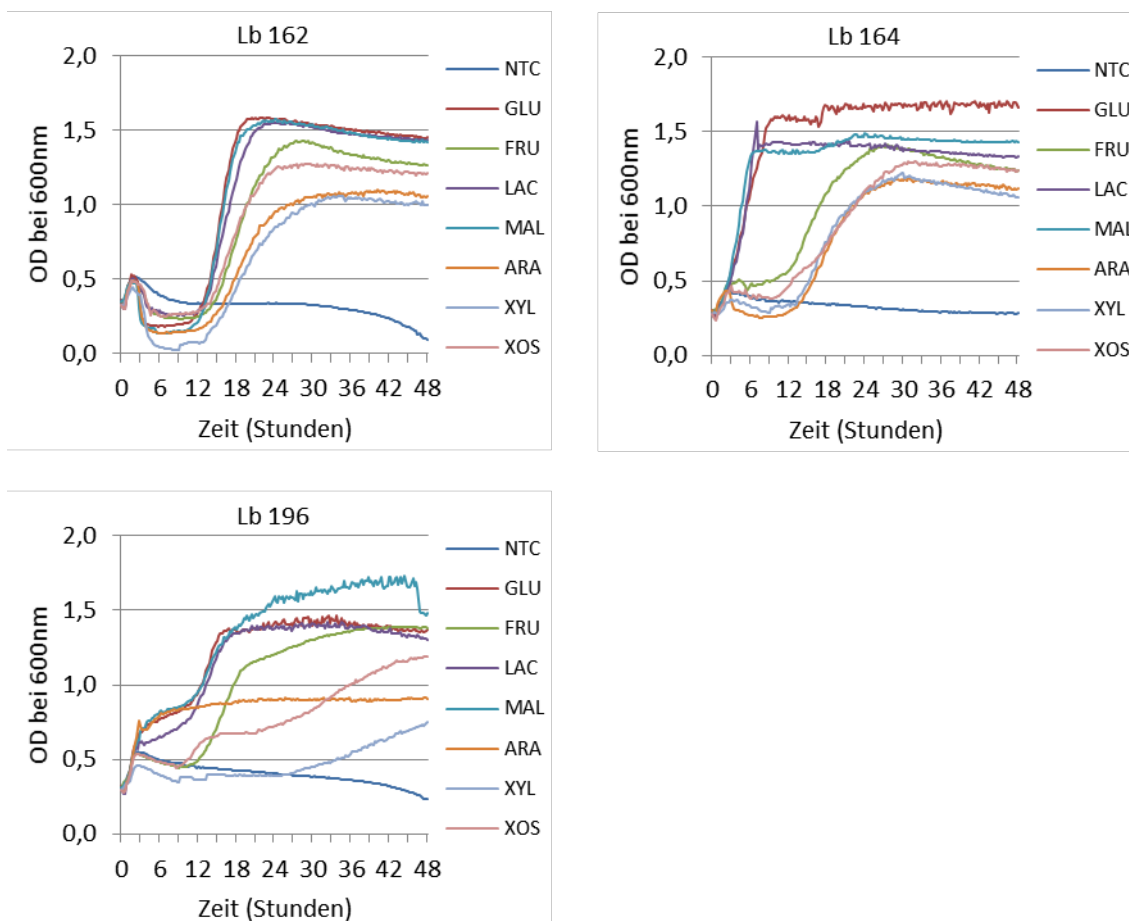


Abbildung 16: Wachstumskurven von *L. reuteri*

Lactobacillus sanfranciscensis

Beide Stämme von *L. sanfranciscensis* wuchsen hervorragend auf allen untersuchten Kohlenhydraten an, entgegen der Erwartung auch in den Pentose haltigen Medien.

Gleich nach Beginn der Messung setzte bei Stamm Lb224 eine geringfügige Steigerung der OD in NTC ein, die dann aber rasch wieder auf den Ausgangswert abfiel. Der Stamm Lb352 zeigte dieses Verhalten nicht. Abbildung 17 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. sanfranciscensis*.

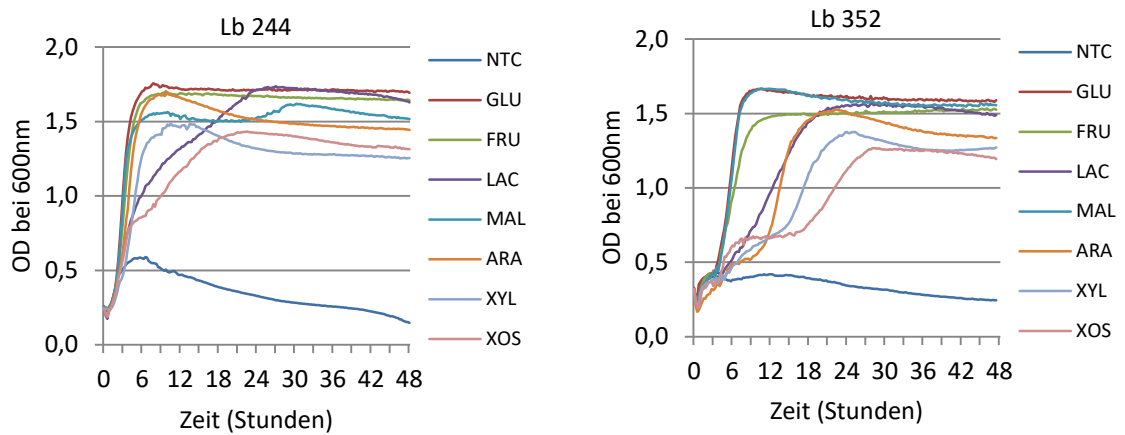


Abbildung 17: Wachstumskurven von *L. sanfranciscensis*

4.2. *Pediococcus*

Pediococcus acidilactici

P. acidilactici verwertete alle untersuchten Kohlenhydratquellen ausgezeichnet. Anders als in der Literatur angegeben konnte auch LAC und MAL sehr gut verwertet werden. In NTC zeigte sich eine geringfügige Steigerung der Keimzahl. Abbildung 18 zeigt die Wachstumskurven von *P. acidilactici*.

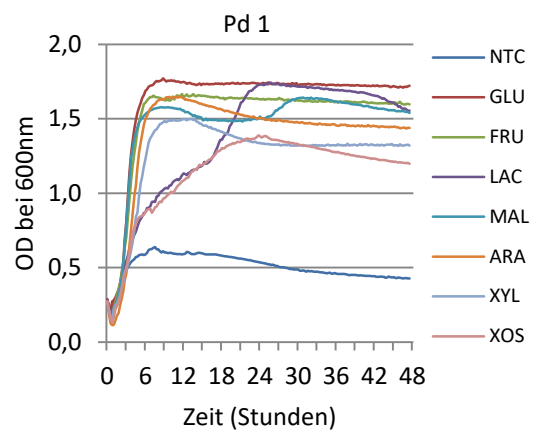


Abbildung 18: Wachstumskurven von *P. acidilactici*

Pediococcus pentosaceus

Die Wachstumskurven von *P. pentosaceus* zeigten ein ähnliches Bild wie bei *P. acidilactici* mit einer raschen Vermehrung in allen Kohlenhydratlösungen, ebenso zeigte sich ein schwacher Anstieg des OD Wertes in NTC. Abbildung 19 zeigt die Wachstumskurven von *P. pentosaceus*.

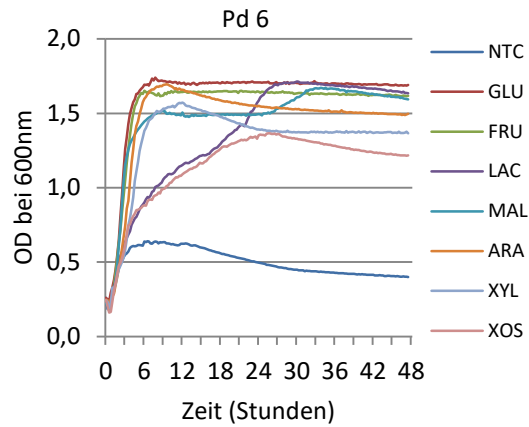


Abbildung 19: Wachstumskurven von *P. pentosaceus*

Pediococcus parvulus

Der untersuchte Stamm von *P. parvulus* zeigte nach einer etwa 18 stündigen Latenzzeit ein gutes Wachstum auf GLU, FRU, MAL und wider Erwarten auch auf LAC. In NTC zeigte sich nach der Latenzzeit ein sehr geringer Anstieg der OD, jener auf ARA, XYL und XOS war noch geringer, was bedeutet, dass *P. parvulus* diese Kohlenhydrate wie erwartet nicht metabolisierte. Abbildung 20 zeigt die Wachstumskurven von *P. parvulus*.

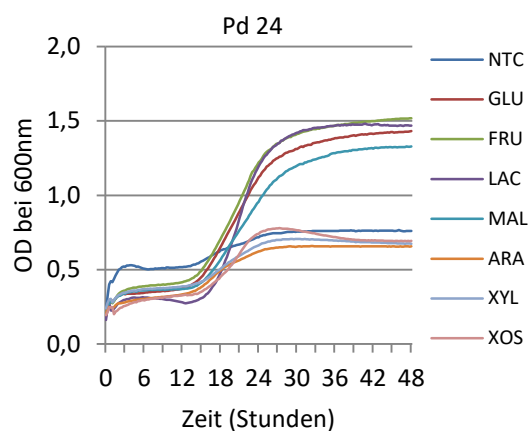


Abbildung 20: Wachstumskurven von *P. parvulus*

4.3. Enterococcus

Enterococcus casseliflavus

E. casseliflavus wuchs schwach auf allen untersuchten Kohlenhydraten an, es zeigte sich zuerst in allen Ansätzen ein Anstieg der Keimzahl, der von einem Abfallen gefolgt wurde. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 21 zeigt die Wachstumskurven von *E. casseliflavus*.

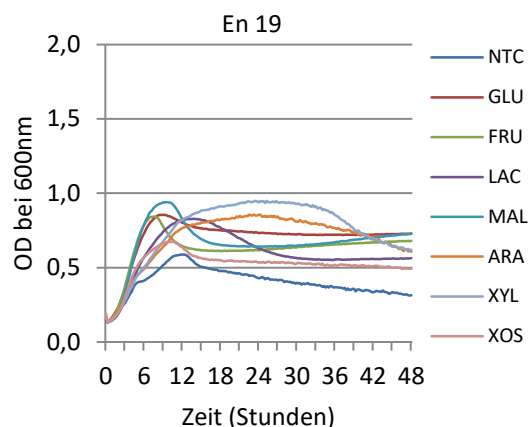


Abbildung 21: Wachstumskurven von *E. casseliflavus*

Enterococcus faecalis

E. faecalis wuchs auf FRU, LAC und MAL ähnlich gut wie auf GLU an. Wie erwartet war dieser Organismus nicht in der Lage Pentosen und Pentose haltige Oligosaccharide abzubauen. Ebenso zeigte sich kein Wachstum in NTC. Abbildung 22 zeigte die Wachstumskurven von *E. faecalis*.

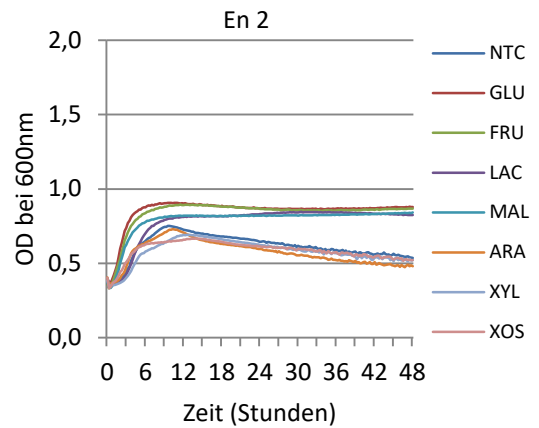


Abbildung 22: Wachstumskurven von *E. faecalis*

Enterococcus faecium

En. faecium konnte alle untersuchten Kohlenhydrate verwerten, wobei XYL und XOS erst zeitverzögert metabolisiert wurden und das Zellwachstum weniger stark ausfiel. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 23 zeigte die Wachstumskurven von *E. faecium*.

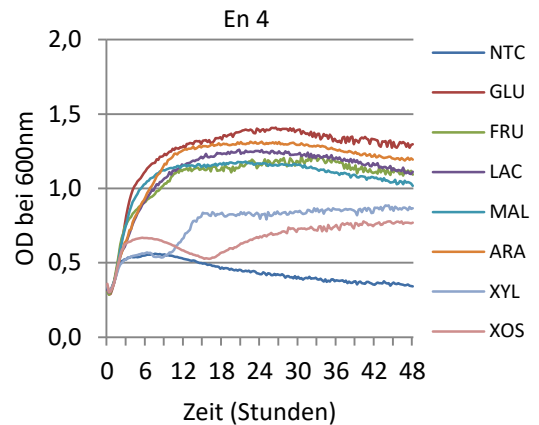


Abbildung 23: Wachstumskurven von *E. faecium*

Enterococcus malodoratus

En. malodoratus verwertete GLU und FRU ausgezeichnet, wobei die Endkeimzahl mit jenen der schnell wachsenden *Lactobacillus* Stämme vergleichbar war. Ein gutes Wachstum zeigte sich, anders als in der Literatur beschrieben, auch auf ARA, XYL und XOS. MAL und LAC wurden ebenfalls gut verwertet, kein Wachstum zeigte sich hingegen in NTC. Abbildung 24 zeigt die Wachstumskurven von *E. malodoratus*.

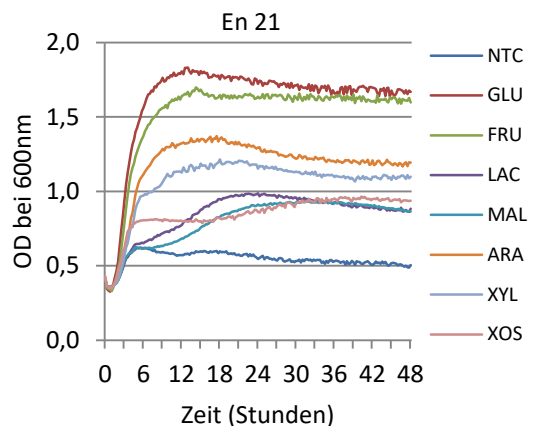


Abbildung 24: Wachstumskurven von *E. malodoratus*

4.4. *Lactococcus*

Lactococcus raffinolactis

L. raffinolactis wuchs gut in GLU, FRU, LAC und MAL an. Obwohl in der Literatur gegenteiliges angegeben wird, war dieser Stamm nicht in der Lage ARA, XYL oder XOS zu metabolisieren, ebenso zeigte sich kein Wachstum in NTC. Abbildung 25 zeigt die Wachstumskurven von *L. raffinolactis*.

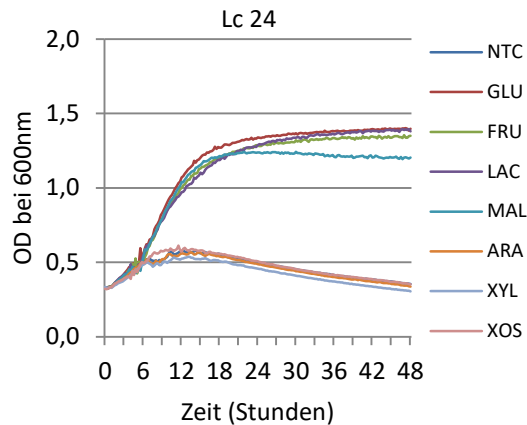


Abbildung 25: Wachstumskurven von *L. raffinolactis*

4.5. *Leuconostoc*

Leuconostoc lactis

L. lactis wuchs auf allen untersuchten Kohlenhydratquellen schnell und gut an, wider Erwarten konnten auch Pentosen und XOS gut verwertet werden. In NTC zeigte sich 3 Stunden nach Beginn des Experiments eine leichte Steigerung der OD, die aber rasch wieder abfiel und zum Ende der Messungen wieder den Ausgangswerte erreichte. Abbildung 26 zeigt die Wachstumskurven von *L. lactis*.

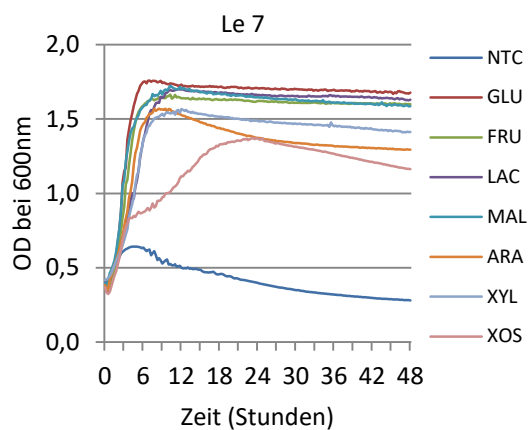


Abbildung 26: Wachstumskurven von *L. lactis*

L. mesenteroides subsp. cremoris

L. mesenteroides subsp. cremoris wuchs hervorragend auf GLU, FRU, LAC und MAL an. Kein Wachstum zeigte sich neben NTC auch in ARA und XYL. Die OD in XOS stieg nur geringfügig über jene in NTC. Abbildung 27 zeigt die Wachstumskurven von *L. mesenteroides subsp. cremoris*.

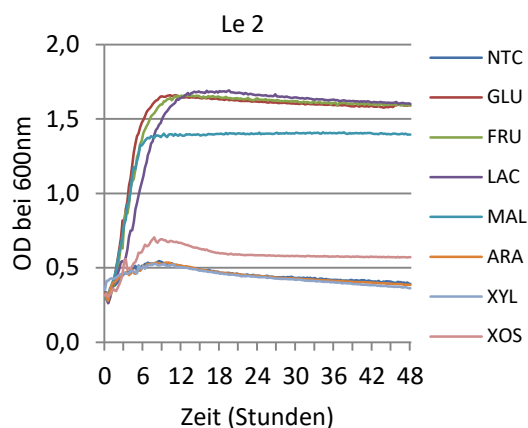


Abbildung 27: Wachstumskurven von *L. mesenteroides subsp. cremoris*

L. mesenteroides subsp. mesenteroides

Beide untersuchten Stämme von *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* konnten GLU, FRU, LAC und MAL gut verwerten. Der Stamm Le3 zeigte weiters ein schwaches Wachstum auf ARA und XYL, keines hingegen auf XOS und in NTC. Der Stamm Le6 konnte nach einer etwa 18 stündigen Latenzzeit ARA, XYL und XOS schnell und gut verwerten. Kein Wachstum zeigte sich in NTC. Abbildung 27 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*.

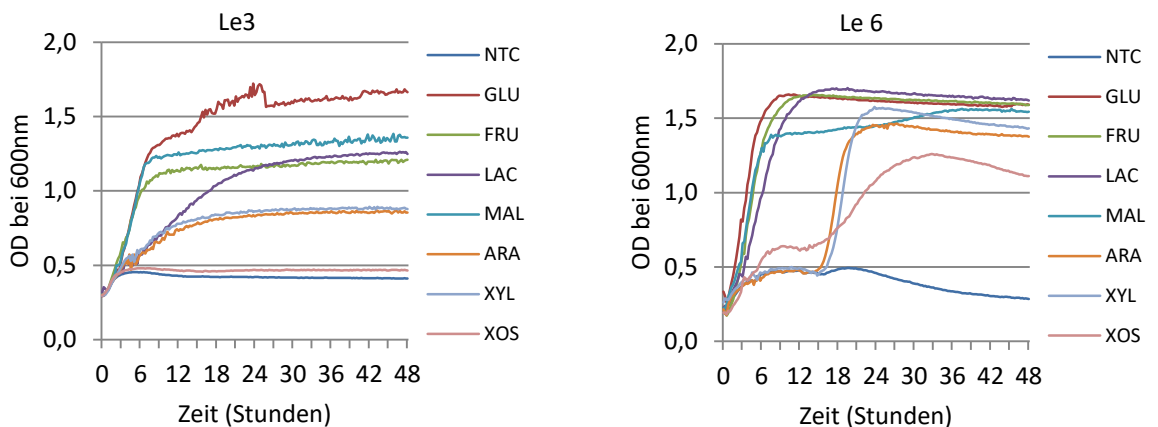


Abbildung 28: Wachstumskurven von *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*

L. pseudomesenteroides

L. pseudomesenteroides konnte alle angebotenen Kohlenhydrate ausgezeichnet verwerten. Auch in NTC zeigte sich anfangs eine schwache Steigerung der OD, die aber nach 48 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückgefallen war. Abbildung 29 zeigt die Wachstumskurven von *L. pseudomesenteroides*.

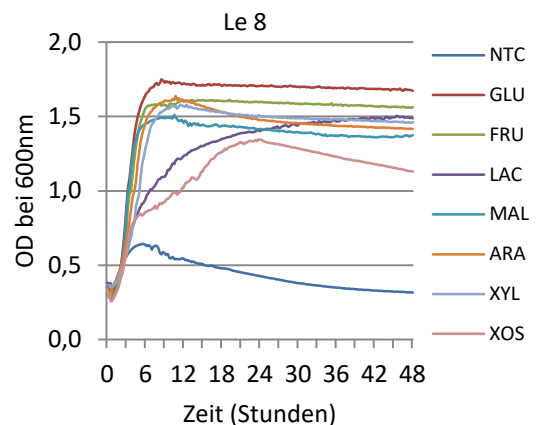


Abbildung 29: Wachstumskurven von *L. pseudomesenteroides*

4.6. *Weissella*

Weissella confusa

Alle untersuchten Stämme von *W. confusa* verwerteten neben GLU auch MAL ausgezeichnet. Gut verwertet wurden weiters LAC, FRU und XOS. Ein schwächeres Wachstum zeigte sich auf XYL. Keiner der untersuchten Stämme war in der Lage ARA zu metabolisieren, außerdem zeigte sich kein Wachstum in NTC. Abbildung 30 zeigt die Wachstumskurven alle Stämme von *W. confusa*.

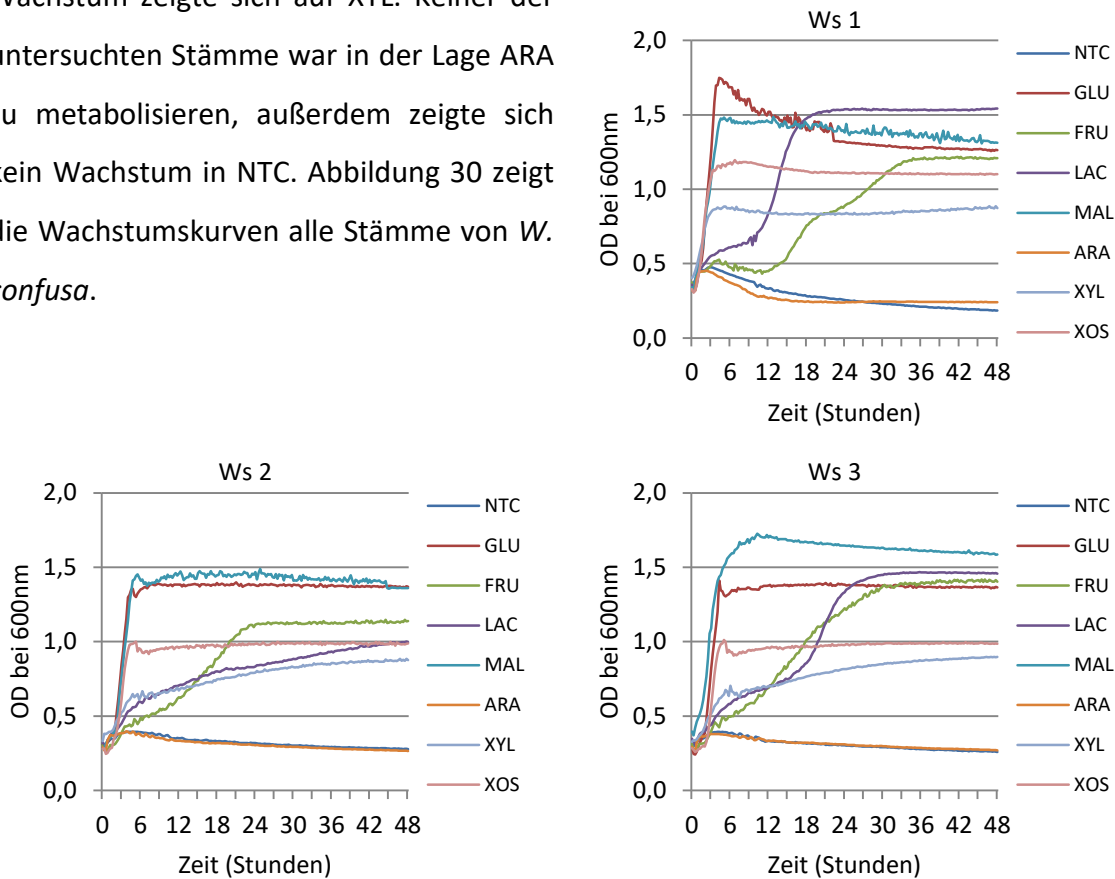


Abbildung 30: Wachstumskurven von *W. confusa*

4.7. *Bifidobacterium*

Bifidobacterium adolescentis

Beide Stämme von *B. adolescentis* konnten wie erwartet alle bereitgestellten Kohlenhydrate hervorragend verwerten. Stamm Bf68 zeigt jedoch auf ARA, XYL und XOS ein langsames Wachstum, nach 48 Stunden war die Keimzahl aber mit jenen in den anderen Kohlenhydratlösungen vergleichbar. Weiters zeigte B70 nach etwa 6 Stunden eine kurze Erhöhung der Keimzahl, die dann aber wieder abfiel und zu Versuchsende wieder auf dem Ausgangswert ankam. Stamm Bf70 zeigte nach 48 Stunden eine geringfügig höhere OD als zu Beginn der Messung. Abbildung 31 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *B. adolescentis*.

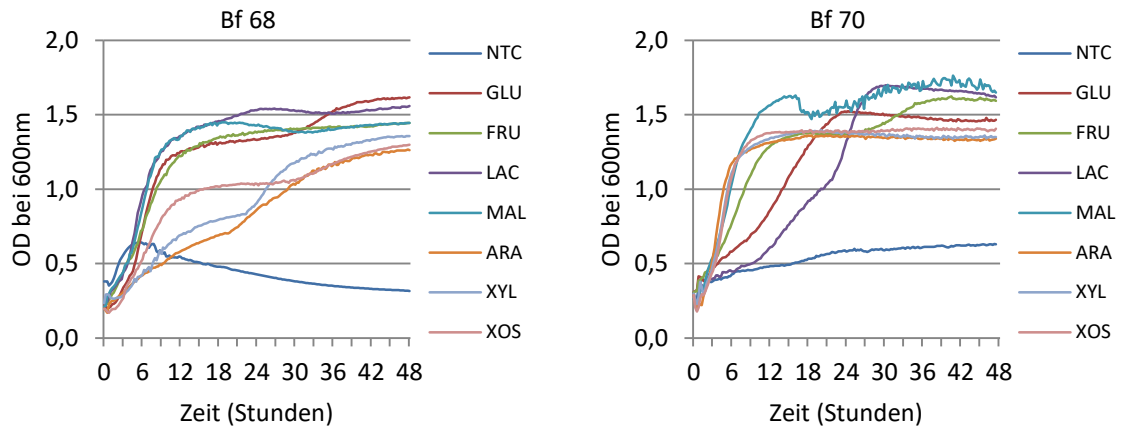


Abbildung 31: Wachstumskurven von *B. adolescentis*

4.8. *Bacillus*

Bacillus coagulans

B. coagulans zeigte in keinem Medium Wachstum. Nach 48 Stunden war die OD auf LAC, ARA, XYL und XOS sowie in NTC zwar geringfügig höher als jene auf GLU, FRU und MAL, allerdings lassen die niedrigen Endwerte trotzdem nicht auf eine signifikante Erhöhung der Keimzahl schließen. Abbildung 32 zeigt die Wachstumskurven von *B. coagulans*.

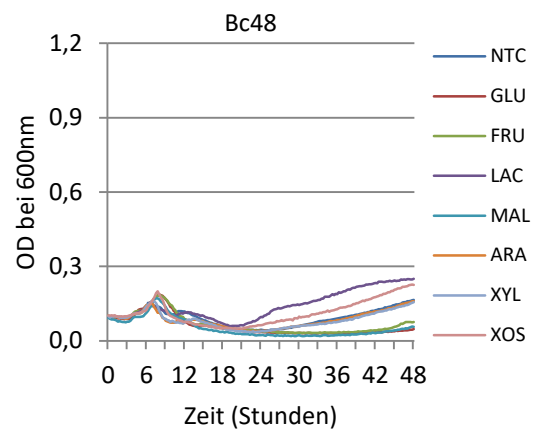


Abbildung 32: Wachstumskurven von *B. coagulans*

Bacillus subtilis subsp. inaquosorum

B. subtilis subsp. inaquosorum zeigte auf GLU, FRU und XOS zu Beginn der Messungen einen kurzen Anstieg. Nach 12 Stunden begann die Keimzahl in NTC zu steigen, sodass sie nach 48 Stunden mit einem Wert von 0,6 gemeinsam mit jener auf LAC und XOS die Höchste war. Abbildung 33 zeigt die Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. inaquosorum*.

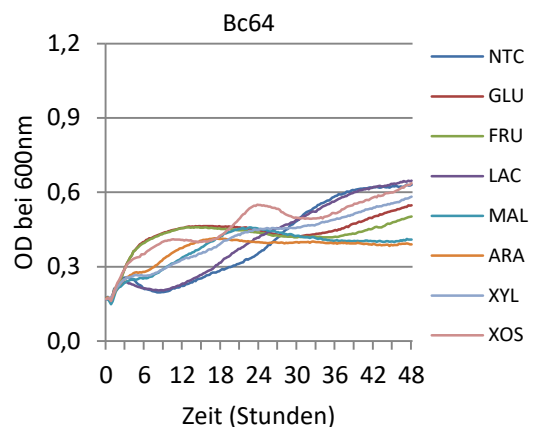


Abbildung 33: Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. inaquosorum*

Bacillus subtilis subsp. spizizenii

B. subtilis subsp. spizizenii zeigte minimales Wachstum auf GLU und FRU, alle anderen Kohlenhydrate konnten nicht verwertet werden. Ebenso zeigte sich kein Wachstum in NTC. Abbildung 34 zeigt die Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. spizizenii*.

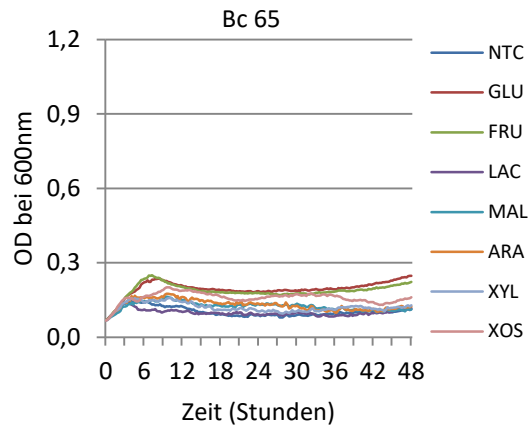


Abbildung 34: Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. spizizenii*

Bacillus subtilis subsp. subtilis

B. subtilis subsp. subtilis zeigte ein ausgezeichnetes Wachstum auf FRU. Die Keimzahlen in allen anderen Kohlenhydratlösungen stiegen nur sehr schwach und waren nach 48 Stunden niedriger als jene in NTC. Gar kein Wachstum zeigte sich auf MAL, ARA und XOS. Abbildung 35 zeigt die Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. subtilis*.

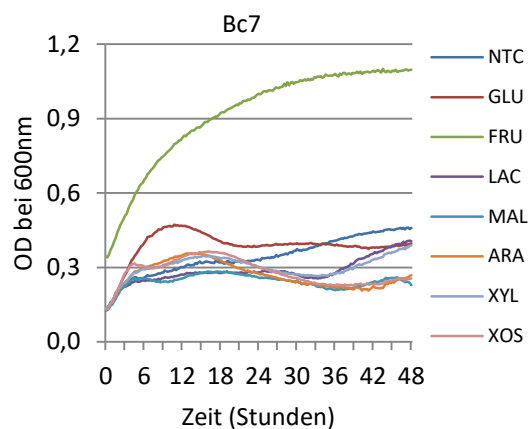


Abbildung 35: Wachstumskurven von *B. subtilis subsp. subtilis*

Bacillus thuringiensis

B. thuringiensis zeigte ein gutes Wachstum auf GLU, FRU und MAL. Auf XOS zeigte sich ein schwächeres Wachstum mit einem anschließenden Abfallen. Dasselbe Muster mit niedrigeren OD Werten zeigte sich in allen übrigen Kohlenhydratquellen, sowie in NTC. Abbildung 36 zeigt die Wachstumskurven von *B. thuringiensis*.

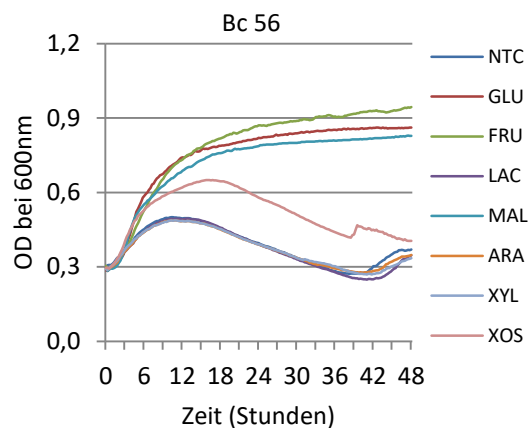


Abbildung 36: Wachstumskurven von *B. thuringiensis*

Bacillus toyonensis

Beide untersuchten Stämme von *B. toyonensis* wuchsen gut auf GLU, FRU und MAL. Ein schwächeres Wachstum mit anschließendem Abfall der OD zeigten beide Stämme auf XOS. In NTC stieg die OD ebenfalls zuerst schwach an und fiel anschließend wieder ab, die Wachstumskurven von allen anderen Kohlenhydratlösungen waren mit jener von NTC ident, was darauf schließen lässt, dass LAC, ARA und XYL nicht verwertet wurden. Abbildung 37 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *B. toyonensis*.

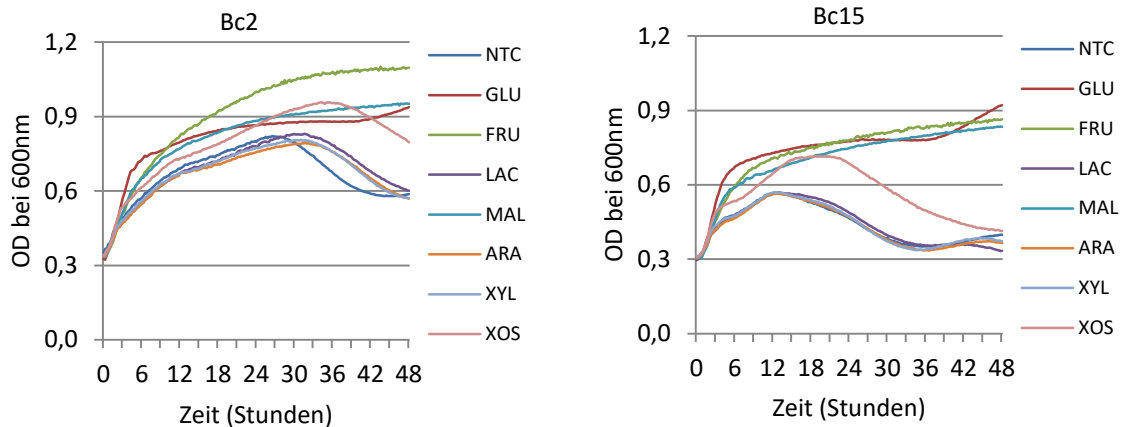


Abbildung 37: Wachstumskurven von *B. toyonensis*

Bacillus weihenstephanensis

B. weihenstephanensis zeigte passables Wachstum auf GLU, sowie schwächeres auf FRU, MAL, und XOS. Dieser Organismus war, wie aus der Literatur ersichtlich, nicht in der Lage, ARA und XYL zu metabolisieren. Kein Wachstum zeigte sich außerdem in NTC. Abbildung 38 zeigt die Wachstumskurven von *B. weihenstephanensis*.

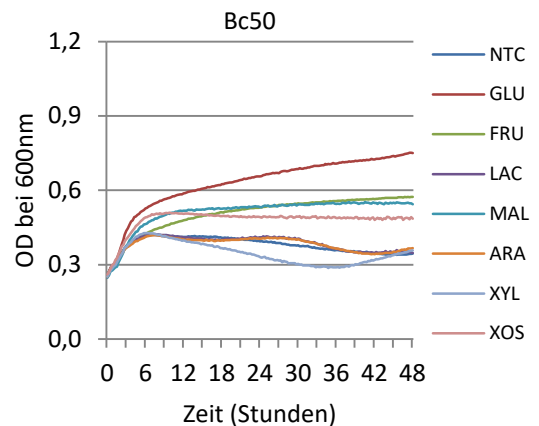


Abbildung 38: Wachstumskurven von *B. weihenstephanensis*

4.9. *Escherichia*

Escherichia coli

Die Stämme Ec1 und Ec21 von *E. coli* zeigten Wachstum auf allen Kohlenhydratquellen, ebenso Stamm Ec22 der jedoch deutlich schwächer anwuchs. Weiters zeigte sich, dass die Stämme Ec21 und Ec22 nach 48 Stunden die höchste Keimzahl auf XOS aufwiesen. Kein Wachstum zeigten alle 3 untersuchten Stämme in NTC. Abbildung 39 zeigt die Wachstumskurven aller Stämme von *E. coli*.

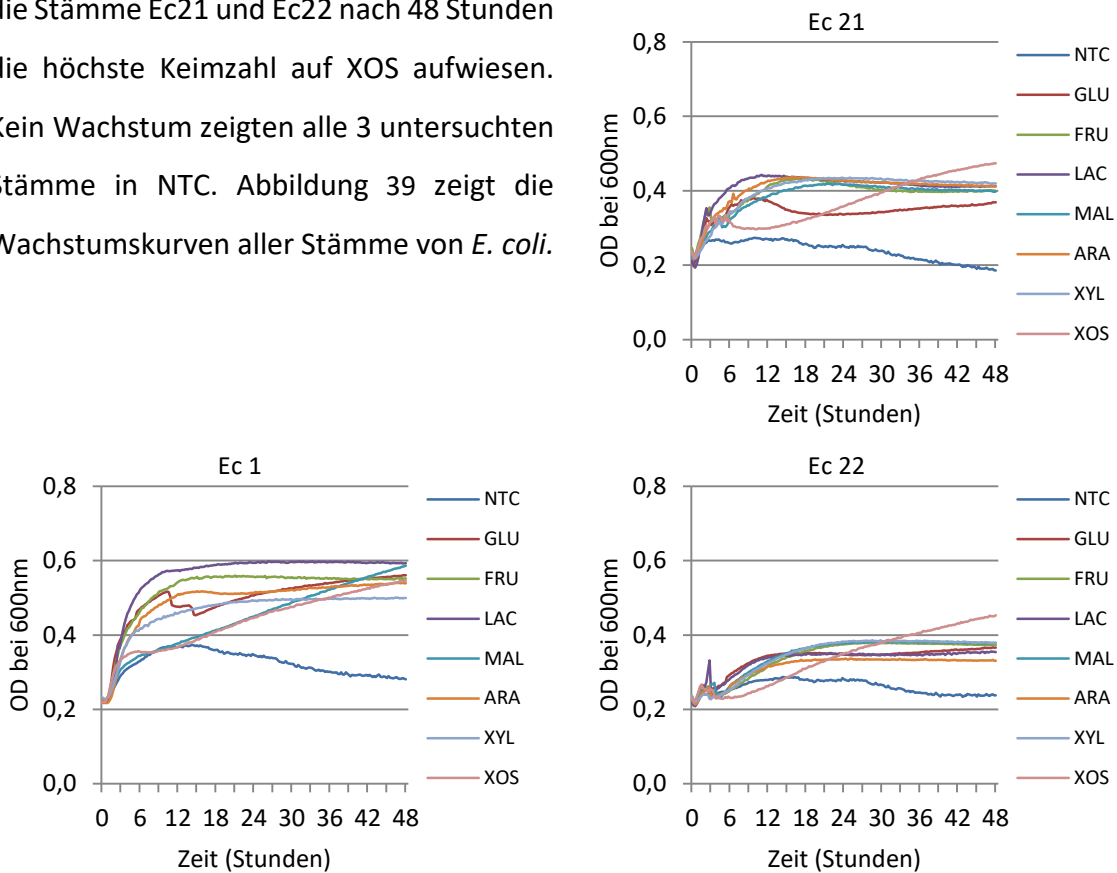


Abbildung 39: Wachstumskurven von *E. coli*

4.10. *Saccharomyces*

Saccharomyces boulardii

S. boulardii zeigte ausgezeichnetes Wachstum auf GLU, FRU und MAL. Weiters zeigte sich ein schwächeres Wachstum in NTC, wobei das Wachstum auf LAC, ARA, XYL und XOS schwächer war als jenes in NTC. Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit nichtverwertbarer Kohlenhydraten das Zellwachstum hemmt. Abbildung 40 zeigt die Wachstumskurven von *S. boulardii*.

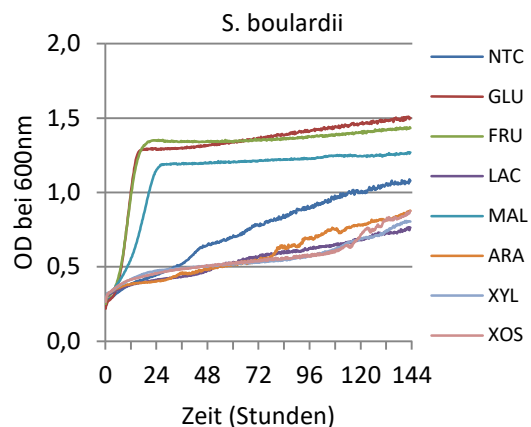


Abbildung 40: Wachstumskurven von *S. boulardii*

Saccharomyces cerevisiae

Ähnlich wie die sehr nahe verwandte *S. boulardii* wuchs auch der untersuchte Stamm von *S. cerevisiae* hervorragend auf GLU, FRU und MAL. Ein deutlich schwächeres Wachstum zeigte sich in NTC sowie auf ARA. Genau wie bei *S. boulardii* dürfte auch hier die Anwesenheit von LAC, XYL oder XOS das Zellwachstum negativ beeinflussen. Abbildung 41 zeigt die Wachstumskurven von *S. cerevisiae*.

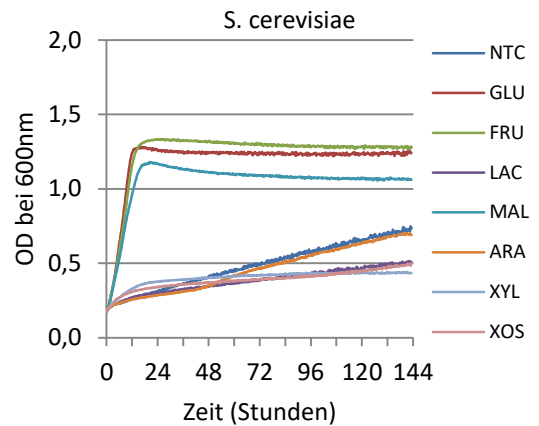


Abbildung 41: Wachstumskurven von *S. cerevisiae*

4.11. *Wickerhamomyces*

Wickerhamomyces anomalus

W. anomalus wuchs gut auf GLU, FRU und MAL. Das Wachstum auf ARA war ebenso stärker als jenes in NTC. Das Wachstum in allen übrigen Kohlenhydratquellen war nicht von jenem in NTC verschieden, was bedeutet, dass die Anwesenheit nicht verwertbarer Kohlenhydrate das Wachstum nicht negativ beeinflusst. Abbildung 42 zeigt die Wachstumskurven von *W. anomalus*.

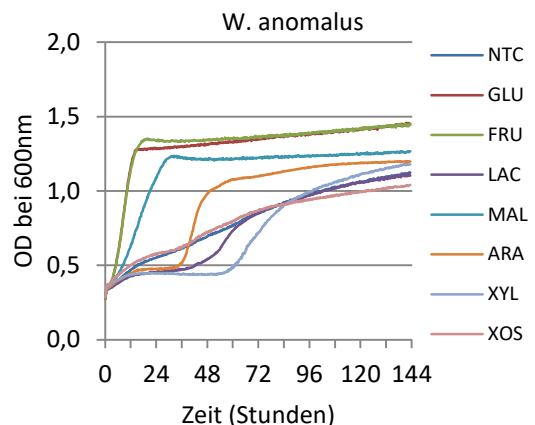


Abbildung 42: Wachstumskurven von *W. anomalus*

4.12. A3X Abbau

Für diesen weiterführenden Versuch wurden neben den *Lactobacillus* Arten *brevis*, *casei*, *kisonensis* und *plantarum* auch *E. malodoratus*, *L. lactis* und *P. acidilactici* ausgewählt, da diese bereits ihm vorhergegangenen Versuchsaufbau Pentosen ähnlich gut verwerteten wie GLU in der Positivkontrolle. Wie bereits im ersten durchgeführten Versuch im Bioscreen C waren alle untersuchten Stämme in der Lage GLU zu verwerten. Die Keimzahl in NTC blieb nach einem schwachen Anstieg zu Beginn der Messungen bei allen untersuchten Mikroorganismen konstant. Der als Negativkontrolle verwendete Stamm von *L. acidophilus* war wie erwartet nicht in der Lage, A3X abzubauen. Allein in der Positivkontrolle *B. adolescentis* stieg die Keimzahl in A3X stärker als in GLU und war am Ende des Versuches auch deutlich höher als jene auf GLU. Eine minimal höhere Endkeimzahl auf A3X gegenüber der kohlenhydratfreien Leerkontrolle zeigte sich bei *L. brevis*, *L. plantarum* und *L. kisonensis*. Abbildung 44 zeigt die Wachstumskurven der Negativkontrolle, Abbildung 43 jene der Positivkontrolle. Abbildung 46 bis Abbildung 51 zeigen die Wachstumskurven aller untersuchten Mikroorganismen.

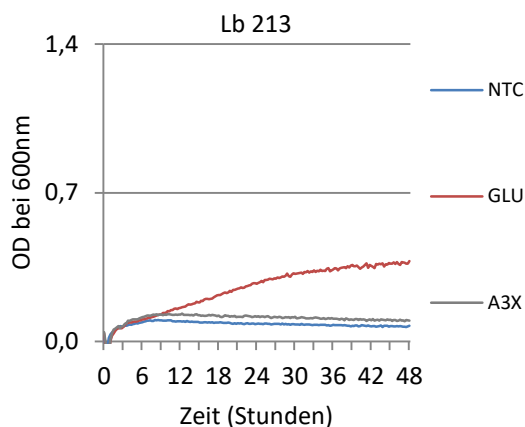


Abbildung 44: A3X Abbau der Negativkontrolle (*L. acidophilus*)

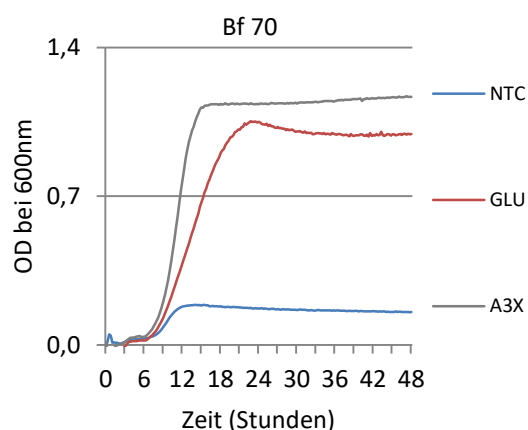


Abbildung 43: A3X Abbau der Positivkontrolle (*B. adolescentis*)

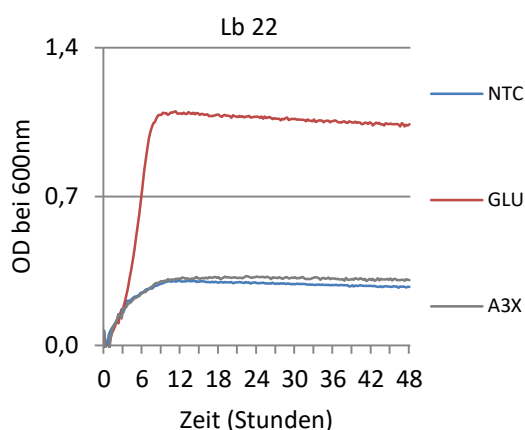


Abbildung 46: A3X Abbau von *L. casei*

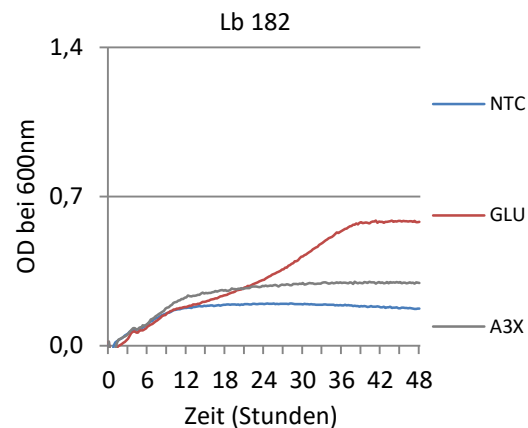


Abbildung 45: A3X Abbau von *L. brevis*

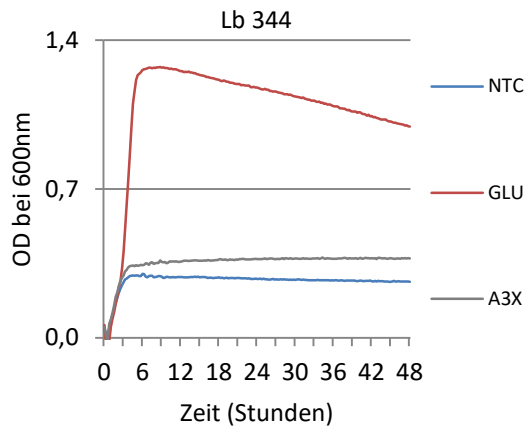


Abbildung 48: A3X Abbau von *L. plantarum*

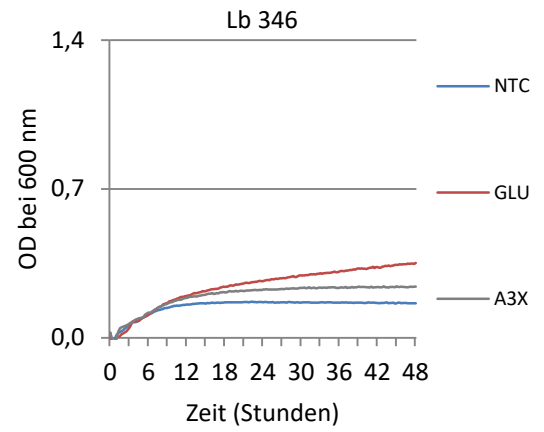


Abbildung 47: A3X Abbau von *L. kisonensis*

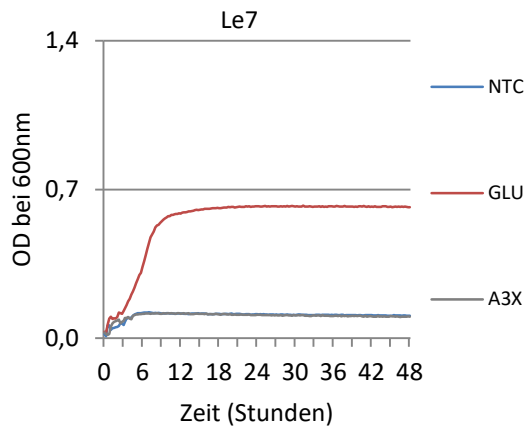


Abbildung 49: A3X Abbau von *L. lactis*

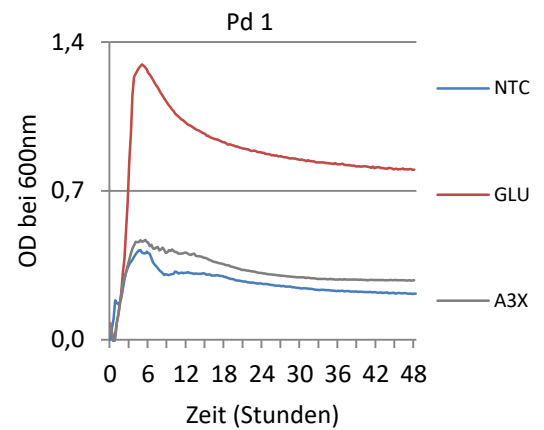


Abbildung 50: A3X Abbau von *P. acidilactici*

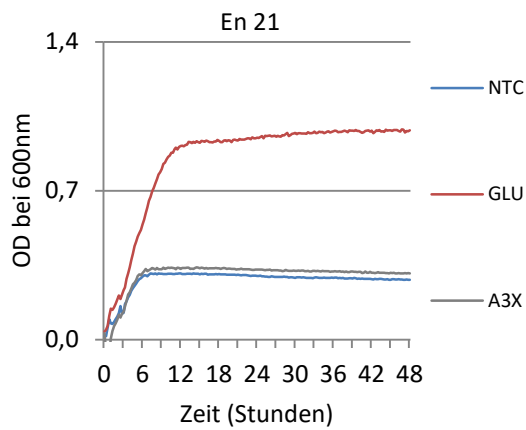


Abbildung 51: A3X Abbau von *E. malodoratus*

5. Schlussbetrachtung

Nahezu alle Vertreter der *Lactobacillales* waren in der Lage, neben GLU auch FRU, MAL und LAC zu metabolisieren. Die *Lactobacillus*-Gattungen *brevis*, *casei*, *hilgardii*, *kisonensis*, *reuteri*, *plantarum* sowie *sanfranciscensis* zeigten zumindest teilweise ein Wachstum auf Pentose und pentosehaltigen Oligosacchariden. Ebenso waren auch *P. acidilactici* und *P. pentosaceus*, *E. malodoratus*, *L. lactis* und *L. pseudomesenteroides* sowie *B. adolescentis* und *E. coli* in der Lage Pentosen abzubauen. Mit Ausnahme von *B. adolescentis* war jedoch kein untersuchter Stamm in der Lage, das A3X Präparat abzubauen.

Die untersuchten Vertreter der Hefen waren ebenfalls nicht in der Lage LAC, XYL und XOS zu metabolisieren. ARA konnte nur von *Wickerhamomyces anomalus*, jedoch schlecht, verwertet werden.

In der gesamten Gattung *Bacillus* zeigte sich in keinem Medium ein Verhalten das auf bakterielles Wachstum schließen lassen würde. Die Annahme liegt daher nahe, dass das Medium, das für die Bioscreen C Untersuchungen für die Gattung *Bacillus* verwendet wurde, nicht alle Nährstoffe bietet, die für ein Wachstum benötigt werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen, müsste daher zuerst ein geeignetes Medium ohne Kohlenhydratquelle gefunden werden. Allerdings wäre auch denkbar, dass *Bacillus* ssp. mehr als eine Kohlenhydratquelle zum Wachstum benötigt und daher das verwendete Versuchsdesign für diese Gattung ungeeignet ist.

Ein nächster Schritt in der Kleinenutzung in Form eines Fermentationsverfahrens könnte beispielsweise die Herstellung eines Extrakts mittels Hitze und Druck sein, der erneuten Fermentationsversuchen unterzogen wird. Neben *B. adolescentis* bieten sich auch Vertreter der heterofermentativen *Milchsäurebakterien* an. Aus zeitlichen sowie Kostengründen wurde hierzu aber kein Versuch auf A3X durchgeführt.

6. Anhang

6.1. Liste verwendeter Mikroorganismen

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen

	Art	Kurzbezeichnung	Synonyme	Type Strain
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lb 180	ATCC 4356	X
2		Lb 213	LMG 11469, ATCC 4355	
3		Lb 214	LMG 18178	
4		Lb 215	LMG 18239, ATCC 53545	
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb182	LMG 6906, ATCC 14869	X
6		Lb183	LMG 7934, ATCC 27305	
7		Lb278		
8		Lb279		
9	<i>Lactobacillus casei</i>	Lb22		
10		Lb184		
11	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Lb334	DSM 20176, ATCC 8290	X
12		Lb 335		
13	<i>Lactobacillus kisonensis</i>	Lb346	DSM 19906	X
14	<i>Lactobacillus otakiensis</i>	Lb347	DSM 19908	
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lb195	ATCC 14917	X
16		Lb342		
17		Lb344		
18	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lb196	LMG 9213, ATCC 23272	X
19		Lb162	LMG 13046, DSM 20053	
20		Lb164	LMG 18238, ATCC 55148	
21	<i>Lactobacillus sanfrancisciensis</i>	Lb244	LMG 16002, ATCC 27651	X
22		Lb352	DSM 20663, ATCC 43332	
23	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pd1	LMG 11384, DSM 20284	X
24	<i>Pediococcus parvulus</i>	Pd24	DSM 20332, ATCC 19371	X
25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pd6	DSM 20336, ATCC 33316	X
26	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	En19	DSM 20680, ATCC 25788	X
27	<i>Enterococcus faecalis</i>	En2	DSM 20478, ATCC 19433	X
28	<i>Enterococcus faecium</i>	En4	DSM 20477, ATCC 19434	X
29	<i>Enterococcus malodoratus</i>	En21	DSM 20681, ATCC 43197	X
30	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	Lc24	LMG 13095, ATCC 43920	X
31	<i>Leuconostoc lactis</i>	Le7	ATCC 19256	X
32	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	Le3		
33	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	Le6		
34	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>	Le2	ATCC 19254	X
35	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Le8	ATCC 49371	X

Art		Kurzbezeichnung	Synonyme	Type Strain
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lb 180	ATCC 4356	
2		Lb 213	LMG 11469, ATCC 4355	
3		Lb 214	LMG 18178	
4		Lb 215	LMG 18239, ATCC 53545	
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	Lb182	LMG 6906, ATCC 14869	X
6		Lb183	LMG 7934, ATCC 27305	
7		Lb278		
8		Lb279		
9	<i>Lactobacillus casei</i>	Lb22		
10		Lb184		
11	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Lb334	DSM 20176, ATCC 8290	X
12		Lb 335		
13	<i>Lactobacillus kisonensis</i>	Lb346	DSM 19906	X
14	<i>Lactobacillus otakiensis</i>	Lb347	DSM 19908	
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lb195	ATCC 14917	X
16		Lb342		
17		Lb344		
18	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lb196	LMG 9213, ATCC 23272	X
19		Lb162	LMG 13046, DSM 20053	
20		Lb164	LMG 18238, ATCC 55148	
21	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Lb244	LMG 16002, ATCC 27651	X
22		Lb352	DSM 20663, ATCC 43332	
23	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pd1	LMG 11384, DSM 20284	X
24	<i>Pediococcus parvulus</i>	Pd24	DSM 20332, ATCC 19371	X
25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pd6	DSM 20336, ATCC 33316	X
26	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	En19	DSM 20680, ATCC 25788	X
27	<i>Enterococcus faecalis</i>	En2	DSM 20478, ATCC 19433	X
28	<i>Enterococcus faecium</i>	En4	DSM 20477, ATCC 19434	X
29	<i>Enterococcus malodoratus</i>	En21	DSM 20681, ATCC 43197	X
30	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	Lc24	LMG 13095, ATCC 43920	X
31	<i>Leuconostoc lactis</i>	Le7	ATCC 19256	X
32	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	Le3		
33	<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i>	Le6		
34	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>	Le2		
35	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Le8	ATCC 49371	X

	Art	Kurzbezeichnung	Synonyme	Type Strain
36	<i>Weissella confusa</i>	WS1	ATCC 10881	X
37		WS2		
38		WS3		
39	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bf68	LMG 11579	
40		Bf70	LMG 10502	X
41	<i>Escherichia coli</i>	Ec 1	DSM 613, ATCC 11303	
42		Ec 21	DSM 498, ATCC 23716	
43		Ec 22	DSM 11250	
44	<i>Bacillus coagulans</i>	Bc 48	ATCC 7050	X
45	<i>Bacillus subtilis inaquosorum</i>	Bc 64	DSM 22148	
46	<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	Bc 65	DSM 15029	X
47	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	Bc 7	LMG 7135, ATCC 6051	X
48	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bc 56	LMG 7138, ATCC 10792	X
49	<i>Bacillus toyonensis</i>	Bc 2		
50		Bc 15		
51	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Bc 50	DSM 11821	X
52	<i>Saccharomyces boulardii</i>		ATCC 74012	X
53	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		ATCC 18824	X
54	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		ATCC 8168	X

7. Zusammenfassung

Weizenkleie ist ein Beiprodukt der Mehlerzeugung, das bisher nur in geringem Maße kommerzielle Nutzung findet. Um eine höhere Wertschöpfung durch Fermentation zu ermöglichen, wird im Zuge dieser Arbeit der Kohlenhydratmetabolismus von 54 Mikroorganismenstämmen gescreent, um zu ermitteln, welche Stämme in der Lage sind, Pentosen und daraus aufgebaute Mehrfachzucker, wie zum Beispiel Arabinoxylan, die in der Weizenkleie vorliegen, zu verwerten. Zuerst wurden die einzelnen Stämme aus Kryokulturen auf Agarplatten ausgestrichen und angezüchtet. Anschließend wurden sie in ein flüssiges Medium überimpft und erneut bebrütet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:10⁸ mit frischem Medium erstellt und die optische Dichte bei 600 nm als Wachstumsindikator photometrisch bestimmt. Gleichzeitig wurden die Suspensionen auf Agarplatten ausgestrichen und die mittlere Keimzahl bestimmt.

Die jeweiligen Stämme wurden anschließend entweder in zuckerfreier Bouillon oder in derselben Nährlösung mit jeweils 1% GLU, FRU, LAC, MAL, ARA, XYL und XOS in Mikrotiterplatten inkubiert und im Bioscreen C Analyser in regelmäßigen Abständen die optische Dichte bei 600 nm mit dem jeweiligen Medium als Leerwert gemessen sowie Wachstumskurven für jeden Stamm in jeder Bouillon erstellt. Mit in den Vorversuchen vielversprechenden Stämmen wurde der Versuch mit einem hochreinen AXOS Präparat wiederholt.

L. brevis, *L. sanfrancisciensis*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. kisonensis*, *B. adolescentis*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* sowie *L. lactis* und *L. pseudomesenteroides* zeigten zwar Pentoseabbau, allerdings war *B. adolescentis* als einziger Stamm in der Lage das AXOS Präparat abzubauen. Neben *B. adolescentis* könnten dennoch auch heterofermentative Milchsäurebakterien für weiterführende Versuche, wie beispielsweise die Fermentation von Weizenkleieextrakt oder eine Solid State Fermentation auf Weizenkleie, herangezogen werden. Weiters zeigte sich, dass der gewählte Versuchsaufbau für die Gattung *Bacillus* offensichtlich ungeeignet ist.

8. Abstract

Wheat bran is a milling byproduct of low commercial interest. To create additional value, microorganisms were screened for their ability to ferment pentose and pentose containing oligo- and polysaccharides, such as arabinoxlan, which can be found in the bran matrix. Starting with cryo cultures, each strain of interest was grown on agar plates, then inoculated into liquid media and incubated again. Subsequently, a serial dilution of the suspension from 1:2 to 1:10⁸ was done with sterile broth and the optical density at 600 nm was measured via photometry using the broth as blank sample. Simultaneously, the cell suspensions were streaked onto agar plates and after incubation the cultivated plate count was determined.

Strains of interest were then incubated in micro well plates with either 300 µL carbohydrate free broth or with the same broth containing either 1% GLU, FRU, LAC, MAL, ARA, XYL or XOS and the optical density at 600nm was measured using a Bioscreen C analyser with pure broth as blank sample. Growth curves for each strain in each carbohydrate solution were created. With strains indicating pentose utilisation based on the pre trials, a second run with an Arabinoxylanoligosaccharide source of high purity was performed.

L. brevis, *L. sanfrancisciensis*, *L. reuteri*, *L. casei*, *b. plantarum*, *L. kisonensis*, *B. adolescentis*, *P. parvulus*, *P. pentosacaeus*, *L. lactis* and *L. pseudomesenteroides* showed promising results for Pentose degradation, but all strains except *B. adolescentis* failed to metabolize AXOS. Nevertheless, further tests with *B. adolescentis* and heterofermentative *Lactobacillales* are encouraged, for example also fermentation trials with wheat bran extract or a solid state fermentation on wheat bran as the next steps. Lastly, it was shown that the chosen design was not suitable for cultivation and maintaining growth of *Bacillus* ssp.

9. Literaturverzeichnis

- AACHARY AA, PRAPULLA SG (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications.
- AMARETTI A, BERNARDI T, LEONARDI A, RAIMONDI S, ZANONI S, ROSSI M (2013). Fermentation of xylo-oligosaccharides by *Bifidobacterium adolescentis* DSMZ 18350: kinetics, metabolism, and β -xylosidase activities. *Appl Microbiol Biotechnol*; 97; 7; pp 3109-3117. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*; Vol:10
- ANANIEVA M, MANDADZHIEVA T, KOLIANDOVA I, STOYANOVSKI S, ILIEV I, IVANOVA I (2012). Utilization of xylooligosaccharides from different *Lactobacillus* strains. *J. BioSci. Biotech.*; SE/ONLINE: 147-150
- APPRICH S, TIRPANALAN Ö, HELL J, REISINGER M, BÖHMDORFER S, SIEBENHANDL-EHN S, NOVALIN S, KNEIFEL W (2013). Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT Food Sci. Technol.*; 56: 222-231
- BEGOT C, DESNIER I, DAUDIN JD, LABADIE JC, LEBERT A (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods*; 25: 255-232
- BISCHOFF KM, LIU S, HUGHES SR, RICH JO (2010). Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans*. *Biotechnol Lett*; 32:823–828
- BROEKAERT WF, COURTIN CM, VERBEKE K, VAN DE WIELE T, VERSTRAETE W, DELCOUR JA (2011). Prebiotic and Other Health- Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; 51:2, 178-194, DOI: 10.1080 / 10408390 903044768
- CODA R, CASSONE A, RIZZELLO CG, NIONELLI L, CARDINALI G, GOBBETTI M (2011). Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Appl. Environ. Microbiol.*; 77 (10): 3484-3492
- COTTE JF, CASABIANCA H, CHARDON S, LHERITIER J., GRENIER-LOUSTALOT MF (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J. Chromatogr.*; 1021: 145-155.
- COURTIN CM, BROEKAERT WF, SWENNEN K, LESCROART O, ONAGBESAN O, BUYS J, DECUYPERE E, VAN DE WIELE T, MARZORATI M, VERSTRAETE W, HUYGHEBART G,

- DELCOUR JA (2008). Dietary Inclusion of Wheat Bran Arabinoxyloligosaccharides Induces Beneficial Nutritional Effects in Chickens. *Cereal Chem.*; 85:2: 607
- CRITTENDEN R, KARPPINEN S, OJANEN S, TENKANEN M, FAGERSTRÖM R, MÄTTÖ J, SAARELA M, MATTILA-SANDHOLM T, POUTANEN K (2002). In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J. Sci. Food Agric.*; 82: 781-789
- DANIEL H-M, MOONS M-C, HURET S, VRANCKEN G, DE VUYST L (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*; 99: 63-73
- DE CASTRO A, MONTANO A, CASADO F-J, SANCHEZ A-H, REJANO L (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol*; 19; pp: 637–644
- DESAI TA & RAO CV (2010). Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*; 1524–1532 Vol. 76, No. 5 0099-2240 /10 /\$12.00 doi:10.1128/ AEM.01970-09
- DIAZ-MONTANO CM & DE JESUS RAMIREZ CORDOVA J (2009). The Fermentative and Aromatic Ability of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* Yeasts In: Satyanarayana T & Kunze G (Hrsg.). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Verlag
- ECKHAUT V, VAN IMMERSEEL F, DEWULF J, PASMANS F, HAESBROUCK F, DUCATELLE R, COURTIN CM, DELCOUR JA, BROEKAERT (2008). Arabinoxyloligosaccharides from Wheat Bran Inhibit *Salmonella* Colonization in Broiler Chickens. *Poult. Sci.*; 87:2329–2334 doi:10.3382/ps.2008-00193
- FREDLUND E, DRUVEFORS U, BOYSEN ME, LINGSTEN K-J, SCHNÜRER J (2002). Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research*; 2; 395-402
- FREDLUND E, BLANK LM, SCHNÜRER J, SAUER U, PASSOTH V (2004). Oxygen- and Glucose-Dependent Regulation of Central Carbon Metabolism in *Pichia anomala*. *Appl. Environ. Microbiol*; 70 (10); 5905-5911. 10.1128/AEM.70.10.5905-5911.2004.
- GONG C-S, CLAYPOOL TA, McCracken LD, MAUN CM, UENG PP, TSAO GT (1983). Conversion of Pentoses by Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*; Vol. XXV, Pp. 85-102
- IMMERZEEL P, FALCK P, GALBE M, ADLERCREUTZ P, NORDBERG KARLSSON E, STALBRAND H (2014). Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and

- utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. *LWT Food Sci. Technol.*; 56: 321 - 327
- JIMENEZ G, URDIAIN M, CIFUENTES A, LOPEZ-LOPEZ A, BLANCH AR, TAMAMES J, KÄMPFER P, KOLSTO A-B, RAMON D, MARTINEZ JF, CODONER FM, ROSELLO-MORTA R (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.*; 36: 383-391
- KATINA K, MAINA NH, JUVONEN R, FLANDER L, JOHANSSON L, VIRKKI L, TENKANEN M, LAITILA A (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol.*; 26: 734-743
- LECHNER S, MAYR R, FRANCIS KP, PRÜß BM, KAPLAN T, WIEßNER-GUNKEL E, STEWART GSAB, SCHERER S (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 48: 1373-1382
- LINDNER C, STÜLKE J, HECKER M (1994). Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*; 140: 753-757
- McFARLAND LV, BERNASCONI P (1993). *Saccharomyces boulardii*: A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. *Microbial ecology in health and disease*; Vol 6: 157-171
- McFARLAND LV, SURAWICZ CM, GREENBERG RN (1994). A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination With Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease. *JAMA*; 271(24):1913-1918. doi:10.1001/jama.1994.03510480037031.
- McFARLAND LV (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.*; 16(18): 2202 - 2222
- McLAUGHLIN HP, O'CONNELL MOTHERWAY M, LAKSHMINARAYANAN B, STANTON C, ROSS RP, BRULC J, MENON R, O'TOOLE PW, VAN SINDEREN D (2015). Carbohydrate catabolic diversity of bifidobacteria and lactobacilli of human origin. *Int. J. Food Microbiol.*; 203: 109-121
- MICHLMAYR H, HELL J, LORENZ C, BÖHMDORFER S, ROSENAU S, KNEIFEL W (2013) Arabinoxylan Oligosaccharide Hydrolysis by Family 43 and 51 Glycosidases from *Lactobacillus brevis* DSM 20054. *Appl. Environ. Microbiol.*; 79: 21:p. 6747–6754

- MOLIST F, GOMEZ DE SEGURA A, PEREZ JF, BHANDARI SK, KRAUSE OD, NYACHOTI CM (2010). Effect of wheat bran on the health and performance of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88+. *Livestock Science.*; 133:1-3: 214-217
- MOTA LJ, SARMENTO LM, DE SA-NOGUEIRA I (2001). Control of the Arabinose Regulon in *Bacillus subtilis* by AraR In Vivo: Crucial Roles of Operators, Cooperativity, and DNA Looping. *J Bacteriol*; 4190–4201 0021-9193/01/\$04.0010 DOI: 10.1128/JB.183.14.4190–4201.2001
- MURAKAMI CJ, BURTNER CR, KENNEDY BK, KAEBERLEIN M (2008). A Method for High-Throughput Quantitative Analysis of Yeast Chronological Life Span. *J. Gerontol. Biol. Sci.*; 68: 113 - 121
- NEIMAN AM (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; p. 565-584
- NEWTON GL, HALE OM, PLANK CO (1983). Effect of wheat bran in practical diets on mineral absorption by pigs at two ages. *Can. J. Anim. Sci.*; 63:399-408
- NEYRINCK AM, POSSEMIERS S, DRUART C, VAN DE WIELE T, DE BACKER F, CANI PD, LARONDELLE Y, DELZENNE NM (2011). Prebiotic Effects of Wheat Arabinoxylan Related to the Increase in Bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE* 6(6): e20944. doi:10.1371 / journal. pone. 0020944
- OHARA H, OWAKI M, SONOMOTO K (2006) Xylooligosaccharide Fermentation with *Leuconostoc lactis*. *J. Biosci. Bioeng*; 101: 415-420
- OU MS, INGRAM LO, SHANMUGAM KT (2011). L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 38:599–605
- PASSOTH V, FREDLUND E, DRUVEFORS UÄ, SCHNÜRER J (2005). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res*; 6; pp: 3–13
- PASTELL H, WESTERMANN P, MEYER AS, TUOMAINEN P, TENKANEN M (2009). In Vitro Fermentation of Arabinoxylan-Derived Carbohydrates by Bifidobacteria and Mixed Fecal Microbiota. *J Agric Food Chem*; 57; 8598-8606
- PATEL A, FALCK P, SHAH N, IMMERZEEL P, ADLERCREUTZ P, STALBRAND H, PRAJAPATI JB, HOLST O, NORDBERG KARLSSON E (2013). Evidence for xylooligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from Indian fermented foods and vegetables. *FEMS Microbiol. Lett.*; 346: 20-28

- PRÜCKLER M, SIEBENHANDL-EHN S, APPRICH S, HÖLTINGER S, HAAS C, SCHMID E, KNEIFEL W (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT Food Sci. Technol.*; 56: 211-221
- PRÜCKLER M, LORENZ C, ENDO A, KRALER M, DÜRRSCHMID K, HENDRIKS K, SOARES DA SILVA F, AUTERITH E, KNEIFEL W (2015). Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. *Food Microbiol.*; 49: 211-219
- ROONEY AP, PRICE NPJ, EHRHARDT C, SWEZEY JL, BANNAN JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*; 59: 2429–2436
- VAN LAERE KMJ, BELDMAN G, VORAGEN AGJ (1997). A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl Microbiol Biotechnol*; 47: 231-235
- VON BUENAU R, JAEKEL L, SCHUBOLTZ E, SCHWARZ S, STROFF T, KRUEGER M (2005). *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. *J. Dairy Sci.*; 88: 317 – 323
- WATANABE K, FUJIMOTO J, TOMII Y, SASAMOTO M, MAKINO H, KUDO Y, OKADA S (2009). *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. And *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *Int J Syst Evol Microbiol*; 59: 754–760
- BLAVATI B & MATTARELLI P (2012). *Bifidobacterium* In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 5*. Springer Verlag
- BJÖRKROTH AJ, DICKS LMT, HOLZAPFEL WH (2009). *Weissella*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3*. Springer Verlag
- HAMMES WP & HERTEL C (2009). *Lactobacillus*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3*. Springer Verlag
- HOLZAPFEL WH, BJÖRKROTH AJ, DICKS LMT (2009). *Leuconostoc*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3*. Springer Verlag

HOLZAPFEL WH, FRANZ CMAP, LUDWIG W, DICKS LMT (2009) *Pediococcus*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition Volume 3. Springer Verlag

LOGAN NA & DE VOS P (2009) *Bacillus*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition Volume 3. Springer Verlag

SCHEUTZ F & STROCKBINE N A (2005). *Escherichia*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition Volume 2. <http://www.springer.com/life+sci/book/978-0-387-95041-9>. Springer Verlag

SVEC P & DEVRIESE LA (2009). *Enterococcus*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition Volume 3. Springer Verlag

TEUBER M (2009). *Lactococcus*. In: Whitman WB (Hrsg.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition Volume 3. Springer Verlag

Bildquellen:

Strukturformel von Xylan: <http://www.intechopen.com/source/html/41661/media/image5.png> [27.09.2016]

Strukturformel von Arabinoxylan: http://patentimages.storage.googleapis.com/WO2004031477A1/imgf000005_0001.png [27.09.2016]

Turbidimetrie und Nephelometrie: <http://chemwiki.ucdavis.edu/@api/deki/files/12514/=Figure10.64.jpg?revision=1> [27.09.2016]

Bisocreen C: <http://www.aecam.co.za/Catalogues/Bisocreen%20Brochure.pdf> [27.09.2016]