

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	86 (1995)
Heft:	3
Artikel:	Mikrobiologie der Brotteigherstellung. Teil VI, Vermehrung von Milchsäurebakterien in Weizenmehlmedien = Microbiology of dough preparation. Part VI, Growth of lactic acid bacteria on wheat-meal-media
Autor:	Merseburger, Tobias / Ehret, Aloise / Geiges, Otto
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-983636

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 26.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Mikrobiologie der Brotteigherstellung

VI. Vermehrung von Milchsäurebakterien in Weizenmehlmedien

Microbiology of Dough Preparation

VI. Growth of Lactic Acid Bacteria on Wheat-Meal-Media

Key words: Lactic acid bacteria, Wheat meal, Malate

*Tobias Merseburger¹, Aloise Ehret², Otto Geiges³, Daniel Kammerer
und Wilhelm Schmidt-Lorenz*

Einleitung

Zur Herstellung von Weizenbrotteigen werden heute in der Schweiz vor allem rasche Verfahren eingesetzt. Die gesamte Gärzeit der Teige beträgt noch höchstens zwei Stunden. Der Trieb und der Geschmack der Brote hängt deshalb weitgehend von der Qualität und Aktivität des zugesetzten Triebmittels ab. Diese rasch hergestellten Brote befriedigen mit ihren guten Volumenausbeuten. Die traditionellen Arten der Teigbereitung mit langen Gärzeiten und mehrstufigen Führungen ergeben jedoch geschmacklich bessere Brote.

Die Untersuchungen von Roggensauerteigbroten haben gezeigt, dass vor allem Milchsäurebakterien für die typischen Sauerteigeigenschaften verantwortlich sind (1). Von Schulz und Stephan (2) wurde unter anderem auch der Zusatz von Milchsäurebakterien zur Verbesserung der Qualität von Weizenmehlbroten vorgeschlagen. Hochstrasser (3) konnte zeigen, dass die Hefezellzahlen in mit Presshefe und Sauerteig angesetzten Weizenmehlbroten gleich hoch sind, die Koloniezahlen der Milchsäurebakterien in den mit Sauerteig angesetzten Brotteigen aber um einen Faktor 1000 höher liegen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen zur Herstellung von Bakterienstarterkulturen für den Einsatz in Weizenbrotteigen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Vermehrungstemperaturen von fünf Milchsäurebakterienstämmen bestimmt.

¹ Givaudan-Roure Flavors AG, 8600 Dübendorf

² Agrano AG, 4123 Allschwil

³ Ingenieurschule, 8820 Wädenswil

In einem zweiten Schritt wurde *L. plantarum*, der von Hochstrasser (3) am häufigsten aus Teigen isoliert worden war, als Teststamm ausgewählt. Damit wurde die Vermehrung und der Stoffwechsel in Weizenmehlmedien mit und ohne Zusatz von Salzen oder Weizenkeimen untersucht. Anschliessend wurden mit Zellen aus verschiedenen Vermehrungsphasen Weizenmehlteige hergestellt und darin die Bakterienvermehrung und deren Stoffwechsel bestimmt.

In einem letzten Schritt wurden fünf aus Weizenmehlteigen isolierte Milchsäurebakterienstämme vermehrt und deren Stoffwechselprodukte bestimmt.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Die folgenden Milchsäurebakterienstämme wurden für die Versuche verwendet: *Leuconostoc mesenteroides* m2, *Pediococcus pentosaceus* t1, *Lactobacillus brevis* b1, *Lactobacillus plantarum* p3 und *Lactobacillus sanfrancisco* s2.

Alle Stämme waren von Hochstrasser (3) aus Weizenmehlspontanhebeln der handwerklichen Praxis isoliert und identifiziert worden.

Die Stammkulturen lagerten bei 4 °C in Röhrchen mit Schraubdeckel auf MRS-Agar und wurden jeweils nach vier Monaten zuerst auf MRS-Agar-Platten ausgestrichen und dann in neue Röhrchen mit frischem Medium überimpft.

Bestimmung der Vermehrungstemperaturen

Die Bestimmung der Vermehrungstemperaturen wurde in einem Temperatur-Gradient-Inkubator (TGI, Scientific Industries Inc, New York, USA) durchgeführt, welcher in einem auf 20 ± 2 °C eingestellten Klimaraum stand. Als Temperaturmaximum wurde 55 °C und als Temperaturminimum 5 °C eingestellt. Die sich in den Einschüben einstellenden Temperaturen wurden einzeln ausgemessen.

Ausgehend von der Stammkultur wurden die Bakterien mit einer Impföse zweimal nacheinander in 10 ml MRS-Bouillon angesetzt und während 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschliessend wurden 500 ml sterile MRS-Bouillon mit 100 ml der zweiten Vorkultur beimpft. Je 20 ml dieser beimpften Bouillon wurden in TGI-Röhrchen gefüllt und diese in den seit mindestens einer Woche vortemperierten TGI gesteckt. Dabei wurden die Röhrchen zweier Stämme abwechselnd hineingesteckt, so dass pro Stamm 15 Temperaturmesspunkte resultierten.

Die Vermehrung wurde direkt in den Röhrchen durch Messung der Lichtabsorption (0 = Lichtabsorption durch unbeimpftes Medium, 1 = Das Licht wird durch das Medium total absorbiert) bei 610 nm in einem Photometer (Colemann 44, Perkin Elmer, Norwalk, USA) bestimmt.

Kulturmedien und Koloniezahlbestimmungen

Zur Vermehrung der Bakterien wurden folgende Flüssigmedien verwendet:

MRS-Bouillon (Oxoid CM 359)

Weizenruchmehlmedium: 100 g l⁻¹ amylolytisch und proteolytisch aufgeschlossenes Weizenruchmehl (Type 1050 (3)). Der Aufschluss von diesem und den folgenden Medien erfolgte nach der an anderer Stelle (4) beschriebenen Methode.

Weizenruchmehl-Malat-Medium: Weizenruchmehlmedium mit Zusatz von 16,5 g sterilfiltriertem Malat pro Liter Medium. Einstellung mit 4N NaOH auf einen pH-Wert von 6,0.

Weizenmehlmedium: 100 g l⁻¹ Vollkornweizenmehl wurden amylolytisch und proteolytisch aufgeschlossen. Der Weizen wurde auf einer Steinmühle in einem Durchgang zu einem Vollkornmehl gemahlen.

Weizenmehl-Salz-Medium: Weizenmehlmedium mit Zusatz von 7,5 g l⁻¹ Hefeextrakt (BBL 11929), 0,05 g l⁻¹ MnSO₄, 0,2 g l⁻¹ MgSO₄ und 1 ml l⁻¹ Tween 80 (ICI America Inc., Wilmington, USA)

Weizenmehl-Weizenkeim-Medium: Weizenmehlmedium mit Zusatz von 50 g l⁻¹ enzymatisch aufgeschlossenen Weizenkeimen.

Die Koloniezahlbestimmungen erfolgten auf MRS-Agar (MRS-Bouillon Oxoid CM 359, verfestigt mit Agar technical Oxoid L13, welcher der Bouillon vor dem Sterilisieren zugegeben wurde). Zur Koloniezählung von *L. sanfrancisco* wurde dem sterilen verflüssigten Agar 2 g l⁻¹ sterilfiltrierter Hefeextrakt (BBL 11929) zugegeben. Zur Verdünnung wurde eine Lösung von 0,85% NaCl und 0,1% Sojapepton (Oxoid L44) verwendet. Der Ausstrich von jeweils 0,02 ml Verdünnungslösung erfolgte aus vier aufeinanderfolgenden dezimalen Verdünnungsstufen auf einen Viertel einer Agarplatte. Nach der aeroben Inkubation bei 30 °C während dreier Tagen wurde das gewogene arithmetische Mittel der Koloniezahlen bestimmt.

Erlenmeyer-Kultur

Die Bakterien wurden nach dem Überimpfen von der Stammkultur auf eine MRS-Platte während 48 Stunden inkubiert. Eine Kolonie wurde mit einer Öse in 200 ml des Weizenruchmehlmediums übergeimpft und bei 30 °C während 24 Stunden kultiviert. 50 ml dieser zweiten Vorkultur dienten als Inokulum für die Erlenmeyer-Kultur, welche mit 500 ml Weizenruchmehlmedium in 1-l-Erlenmeyerkolben im Klimaschüttelschrank (Clim-O-Shake, System Kühner, Basel, Schweiz) bei 80 U min⁻¹ und 30 ± 2 °C durchgeführt wurde.

Fermentationsanlage

Die Vorkulturbedingungen für die Fermenterkulturen waren gleich wie für die Erlenmeyer-Kulturen, ausser dass Weizenmehl- statt Weizenruchmehlmedium verwendet und mit 150 statt 50 ml inokuliert wurde. Zur Vermehrung der Bakterien

wurde ein 2-l-Laborfermenter (Model KLF 2000, Bioengineering AG, Wald, Schweiz) eingesetzt. Die Durchmischung besorgte ein Blattrührer, dessen Drehzahl bei allen Versuchen auf 1000 Umdrehungen pro Minute eingestellt wurde. Die Temperatur wurde elektronisch geregelt und mit einem Kühl- und Heizstab auf 30 ± 1 °C eingestellt. Der Fermenter wurde während der Vermehrungsversuche nicht belüftet. Die Sauerstoffmessungen erfolgten mit einer amperometrischen Elektrode (Nr. 32 275 6701, Ingold AG, Urdorf, Schweiz). Sie wurde im sterilen Weizenmehlmedium bei einer Drehzahl des Rührwerks von 1000 U min^{-1} und einer Luftzufuhr von 100 l h^{-1} auf 95% des Sättigungsdruckes geeicht. Der pH-Wert wurde, nachdem er bis zum Einstellpunkt gefallen war, durch elektronisch gesteuerte Zugabe von $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/l}$ oder 25%iger Ammoniak-Lösung reguliert.

Teigbereitung

2,0 g NaCl wurden in 77,5 g entionisiertem und sterilisiertem Wasser gelöst und 25 g Probe aus dem Fermenter zugegeben. Die Flüssigkeit wurde mit 167 g Halbweissmehl (Typ 630 (3)) gemischt und mit einer Küchenmaschine mit Knethaken (Rotel, Schweiz) während mindestens fünf Minuten zu einem homogenen Teig verarbeitet. Für die Teiganalysen ohne Bakterienkultur wurden vier Teige mit 102,5 g entionisiertem und sterilisiertem Wasser, 2,0 g NaCl und 167 g Halbweissmehl (Typ 630 (3)) hergestellt. Die Teiggare fand in einem mit einem feuchten Tuch abgedeckten Becherglas bei Zimmertemperatur statt.

Enzymatische Bestimmungen

Jeweils 9 ml jeder Probe wurde in ein Hydrolyseröhrchen eingeschlossen und zum Eliminieren von Enzymaktivitäten 15 Minuten bei 80 °C erhitzt. Anschliessend wurde die Probe während 10 Minuten bei 7500 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde während höchstens zwei Wochen bei -18 °C gelagert. Für die enzymatischen Bestimmungen wurden Testkits verwendet (Glucose, Nr. 716 251; Ethanol, Nr. 176 290; Apfelsäure, Nr. 139 068; Essigsäure, Nr. 148 261; L-Milchsäure, Nr. 139 084; D-Milchsäure, Nr. 106 941; Böhringer GmbH, Mannheim, Deutschland).

Teiganalysen

Für die Analysen wurden 10,0 g Teig in einen sterilen Plastiksack eingewogen und 90 ml entionisiertes und sterilisiertes Wasser dazugegeben. Das Gemisch wurde während zwei Minuten mit einem Stomacher homogenisiert. Von den 100 ml Homogenisat wurde 1 ml für die Koloniezahlbestimmung und 9 ml für die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration eingesetzt. Anschliessend wurde der pH-Wert im Homogenisat gemessen. Das Resultat entspricht nach den Angaben von Spicher und Stephan (1) dem pH-Wert im Teig.

Ergebnisse

Bestimmung der Vermehrungstemperaturen

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Vermehrungstemperaturen der untersuchten Bakterienstämme. Als Vermehrungsbereich wurde die tiefste und höchste Temperatur angegeben, bei welcher nach 80 Stunden eine Lichtabsorption von über 0,2 erreicht wurde. Als optimale Temperatur wurde diejenige bezeichnet, bei welcher eine Absorption von 0,8 am raschesten erreicht wurde.

P. pentosaceus vermehrte sich bei einer Temperatur von 35 °C am raschesten. Bei dieser Temperatur wurde bereits nach fünf Stunden eine Absorption von mehr als 0,8 erreicht. Mit *L. brevis* und *L. mesenteroides* wurde diese Absorption nach etwa zehn Stunden bei Temperaturen zwischen 30 und 35 °C erreicht. Bei *L. sanfrancisco* und *L. plantarum* wurde erst nach 24 Stunden eine Absorption über 0,8 gemessen. Nach 52 bis 77 Stunden wurde keine Vermehrung bei höheren oder tieferen Temperaturstufen beobachtet.

Tabelle 1. Vermehrungstemperaturbereich und optimale Wachstumstemperatur von fünf Milchsäurebakterienstämmen

Stamm	Vermehrungstemperaturbereich	Optimale Wachstumstemperatur
<i>L. plantarum</i> p3	13–42 °C	35 °C
<i>L. brevis</i> b1	15–42 °C	35 °C
<i>L. sanfrancisco</i> s2	15–42 °C	35 °C
<i>L. mesenteroides</i> m2	13–42 °C	27 °C
<i>P. pentosaceus</i> t1	10–46 °C	37 °C

Vergleich der Weizenmehlmedien

Die Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen wurden mit *L. plantarum* als Teststamm bei 30 °C in einer ersten Serie folgende Kulturmedien verglichen:

1. Weizenruchmehlmedium im Erlenmeyer
2. Weizenruchmehl-Malat-Medium im Erlenmeyer
3. Weizenruchmehlmedium mit Zugabe von c(NaOH) = 4 mol/l im Fermenter

Die drei Versuche können sehr gut am pH-Verlauf während der 24stündigen Kultur unterschieden werden (Abb. 1). Die Anfangs-pH-Werte lagen nach der Inokulation zwischen 5,0 und 5,5 Einheiten. Bei Verwendung des Weizenruchmehlmediums sank der pH-Wert in den ersten acht Stunden auf unter 4,0 ab und lag am Ende des Versuchs bei 3,3. Im Weizenruchmehl-Malat-Medium fiel der pH-Wert in 24 Stunden um eine halbe Einheit, so dass am Ende ein Wert von 4,9 resultierte. Bei pH-Wert-Einstellung durch Lauge fiel der pH-Wert in den ersten

vier Stunden auf den Einstellpunkt der Regelung und blieb dann bis zum Ende des Versuchs in einem Bereich von 4,1 bis 4,2.

Die Zunahme der Koloniezahlen war während den ersten sechs Stunden in allen Medien weitgehend gleich (Abb. 2). Danach vermehrten sich die Bakterien im Weizenruchmehlmedium nur noch um einen Faktor 5, bei Zugabe von Lauge zur pH-Einstellung oder Verwendung des Weizenruchmehl-Malat-Mediums um einen Faktor 10, so dass nach 24 Stunden eine maximale Koloniezahl von $5,0 \cdot 10^9$ erreicht wurde.

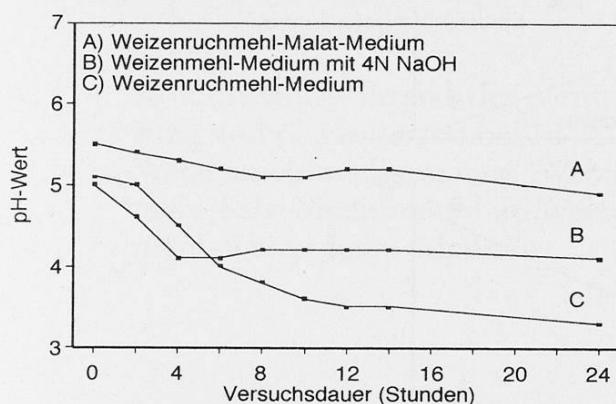


Abb. 1. pH-Werte während der Vermehrung von *L. plantarum* bei 30 °C im Weizenruchmehlmedium und im Weizenruchmehl-Malat-Medium im Erlenmeyerkolben, sowie im Weizenmehlmedium mit pH-Regulierung durch 4 N NaOH auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

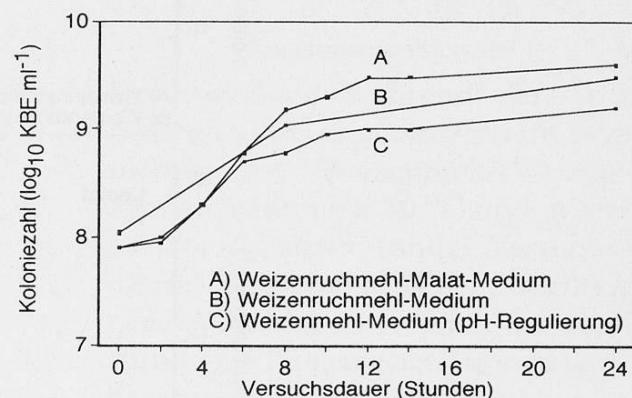


Abb. 2. Koloniezahlen während der Vermehrung von *L. plantarum* bei 30 °C im Weizenruchmehlmedium und im Weizenruchmehl-Malat-Medium im Erlenmeyerkolben, sowie im Weizenmehlmedium mit pH-Regulierung durch 4 N NaOH auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

Abbildung 3 zeigt, dass im Weizenruchmehlmedium 7 g Glucose pro Liter von *L. plantarum* verbraucht wurde. Bei Verwendung des Weizenruchmehl-Malat-Mediums sank dagegen der Glucosegehalt während der gesamten Versuchsdauer um 12 g l⁻¹. Das Malat wurde fast vollständig verbraucht. Die Lactatkonzentration stieg in den beiden Versuchen gegen Ende schneller als am Anfang. Bei Zugabe von 17 g Malat wurde pro Liter mehr als die dreifache Lactatmenge gebildet. Die zusätzliche Bestimmung des L-Lactatanteils an der gesamten Lactatmenge ergab nach 24 Stunden 83% gegenüber 36% L-Lactat in den Versuchen ohne Malatzugabe.

In einer zweiten Versuchs-Serie zur Ermittlung optimaler Kulturbedingungen ebenfalls mit *L. plantarum* als Teststamm wurden bei 30 °C drei weitere Mehlmedien im Fermenter geprüft: Weizenmehlmedium, Weizenmehl-Salz-Medium und Weizenmehl-Weizenkeim-Medium. Der pH-Wert wurde in allen Kulturen mit c (NaOH) = 4 mol/l reguliert.

Abbildung 4 zeigt, dass in allen drei untersuchten Medien in den ersten sechs Stunden eine vergleichbare Vermehrung um einen Faktor 10 stattfand. In den Medien mit Zusätzen von Hefeextrakt und Nährsalzen oder Weizenkeimen wur-

den um die 24. Versuchsstunde 10^{10} KBE ml⁻¹ erreicht, im Weizenmehlmedium nur $5 \cdot 10^9$ KBE ml⁻¹.

Anschliessend reduzierten sich die Koloniezahlen in allen drei Medien.

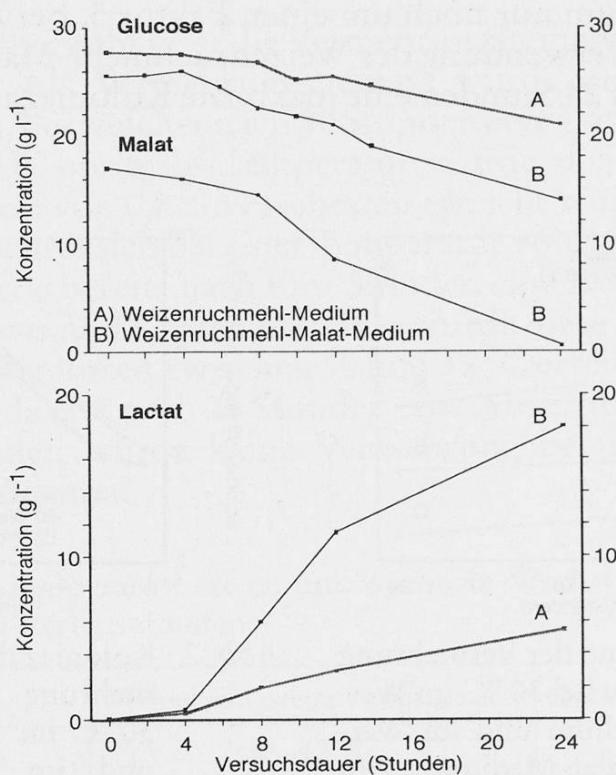


Abb. 3. Glucose-, Malat- und Lactatkonzentration während der Vermehrung von *L. plantarum* bei 30 °C im Weizenruchmehlmedium und im Weizenruchmehl-Malat-Medium

Vermehrung und Stoffwechsel von *L. plantarum* im Weizenmehlteig

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Herstellung von *L. plantarum*-Kulturen wurde für die folgenden Versuche das Weizenmehl-Weizenkeim-Medium und pH-Einstellung mit c (NaOH) gewählt. Nach 6, 12 und 48 Stunden der Kultur von *L. plantarum* bei 30 °C im Fermenter wurden Proben entnommen und Milchsäurebakterienteige hergestellt. Von diesen dem Fermenter entnommenen Proben und den daraus hergestellten Teigen wurden Koloniezahl, Glucosekonzentration, Lactatkonzentration und pH-Wert bestimmt.

Als Vergleich zu den mit *L. plantarum* hergestellten Teigen wurden solche ohne Milchsäurebakterienzusatz hergestellt. Bei diesen waren Milchsäurebakterien-Koloniezahlen von maximal $4,0 \cdot 10^4$ ml⁻¹ nachweisbar. Der Glucosegehalt dieser Teige nahm in der dreistündigen Gare um durchschnittlich 0,7 g kg⁻¹ zu. Der pH-Wert sank um 0,1 Einheiten auf einen Wert von 5,8 ab.

In Abbildung 5 sind sowohl die im Fermenter als auch die in den Teigproben bestimmten Koloniezahlen dargestellt. Die Werte der Teigproben waren um einen Faktor zehn tiefer als im Fermenter, was etwa der Verdünnung durch die Teigher-

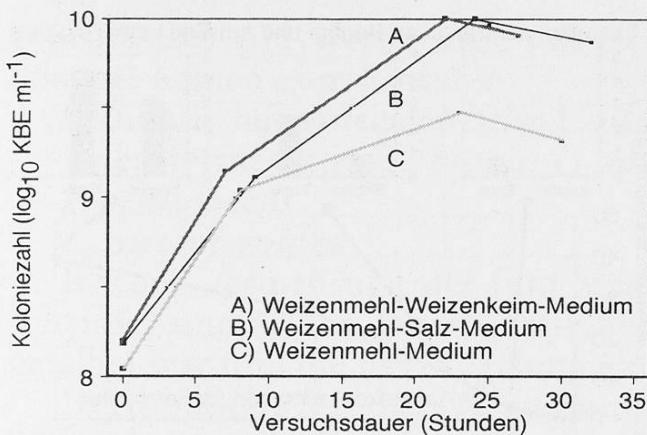


Abb. 4. Koloniezahl während der Vermehrung von *L. plantarum* bei 30 °C im Weizenmehlmedium, im Weizenmehl-Salz-Medium und im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium

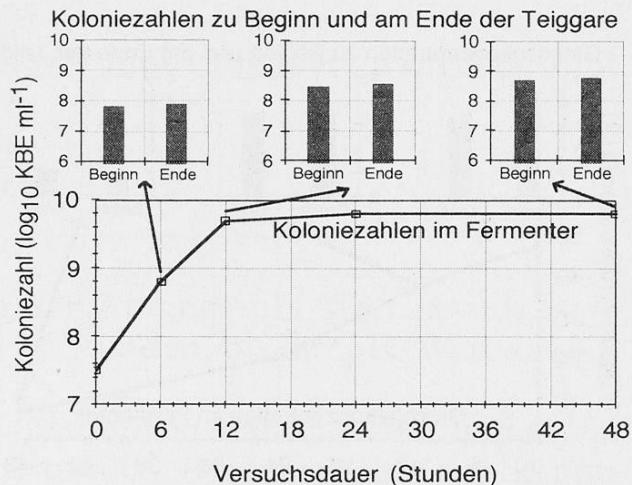


Abb. 5. Koloniezahlen während der Vermehrung von *L. plantarum* im Fermenter im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium bei 30 °C und in den nach 6, 12 und 48 Stunden Versuchsdauer angesetzten Weizenmehlteigen am Anfang sowie Ende der dreistündigen Teiggare bei Zimmertemperatur

stellung entspricht. Während der Teiggare blieben die Koloniezahlen konstant. Somit wurden die höchsten Werte im Fermenter und in den Teigen nach 48 Stunden gleichzeitig erreicht. Im Teig wurden zwischen $6 \cdot 10^7$ KBE ml⁻¹ nach 6stündiger Fermenterkultur und fast 10^9 KBE ml⁻¹ nach 48stündiger Kultur erreicht. Das ist ein um drei bis fünf Zehnerpotenzen höherer Wert als in einem Teig ohne Zusatz von Milchsäurebakterien.

Die Glucosekonzentration in den Teigen war ebenfalls rund zehnmal geringer als die entsprechende Konzentration im Fermenter. Abbildung 6 zeigt, dass der Glucosegehalt in einigen Teigen während der Gare ab, in anderen dagegen zunahm. Die Veränderungen waren aber immer geringer als 1,0 g l⁻¹. Während der dreistündigen Gare wurde der vorhandene Zucker von den Bakterien nie ganz aufgebraucht. Im Fermenter sank die Glucosekonzentration in 48 Stunden um 80% des Anfangsgehalts unter 10 g l⁻¹.

Die Lactatkonzentration stieg im Fermenter während der 48stündigen Versuchsdauer bis auf 40 g l⁻¹ (Abb. 7). In den Teigen betrugen die entsprechenden Anfangslactatgehalte 10% der Gehalte im Fermenter. In allen Versuchen stieg die Lactatkonzentration während der Teiggare an. Im mit zwölfstündiger Bakterienkultur hergestellten Teig stieg der Lactatgehalt um über 1,5 g l⁻¹ und hatte sich damit am Ende mehr als verdoppelt. In den mit 48stündiger Kultur hergestellten Teigen wurden am Ende der Teiggare zwar höhere Lactatkonzentrationen gemessen, die Zunahme des Lactatgehaltes war aber geringer als bei Verwendung von 12stündiger Kultur.

Tabelle 2 zeigt die im Fermenter und im zum Messzeitpunkt angesetzten Teigen gemessenen pH-Werte. Die pH-Werte wurden im Fermenter mit einer Genauigkeit

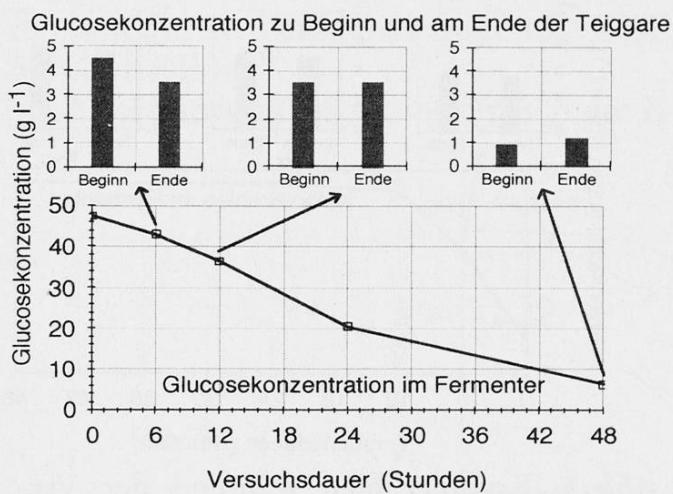


Abb. 6. Glucosekonzentration während der Vermehrung von *L. plantarum* im Fermenter im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium bei 30 °C und in den nach 6, 12 und 48 Stunden Versuchsdauer angesetzten Weizenmehlteigen am Anfang sowie Ende der dreistündigen Teiggare bei Zimmertemperatur

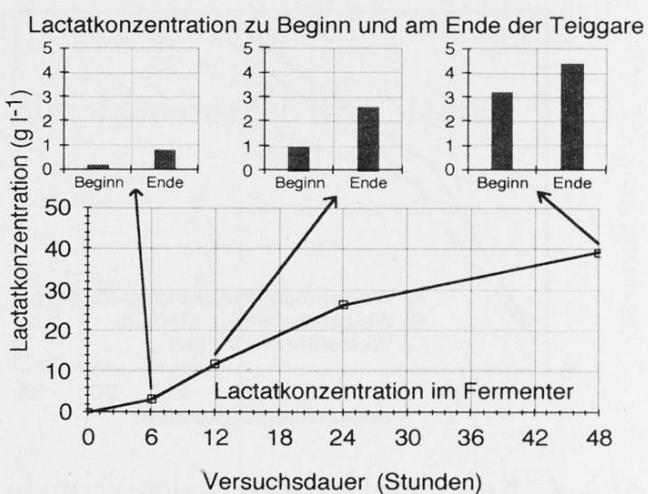


Abb. 7. Lactatkonzentration während der Vermehrung von *L. plantarum* im Fermenter im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium bei 30 °C und in den nach 6, 12 und 48 Stunden angesetzten Weizenmehlteig am Anfang sowie Ende der dreistündigen Teiggare bei Zimmertemperatur

von $\pm 0,2$ Einheiten auf einen Wert von 4,5 reguliert. Am Anfang der Teiggare lagen die pH-Werte zwischen 5,5 und 5,9. Am Ende lagen die Werte zwischen 5,2 und 5,3. Nur bei Verwendung von 6stündiger Kultur wurde ein End-pH-Wert von 5,7 gemessen.

Tabelle 2. Entwicklung der pH-Werte bei Vermehrung von *L. plantarum* in flüssigem Weizenmehl und in Teigen nach einer Vermehrungszeit von 6, 12, 24 und 48 Stunden

	Stunden nach Versuchsbeginn			
	6	12	24	48
pH-Wert im Fermenter (30 °C)	4,4	4,5	4,7	4,5
pH-Wert zu Beginn der Teiggare (Zimmertemperatur)	5,9	5,7	5,7	5,5
pH-Wert am Ende der Teiggare (Zimmertemperatur)	5,7	5,2	5,3	5,2

Vermehrung und Stoffwechsel von fünf Milchsäurebakterien

Die Vermehrung und der Stoffwechsel von fünf Milchsäurebakterienstämmen bei 30 °C mit Weizenmehl-Weizenkeim-Medium wurde vergleichend im Fermenter

geprüft. Der pH-Wert wurde mit $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/l}$ reguliert. Folgende fünf Stämme kamen zum Einsatz:

- fakultativ heterofermentativ: *L. plantarum*
- heterofermentativ: *L. brevis*, *L. sanfrancisco*
- *P. pentosaceus*
- *L. mesenteroides*.

Bei der Vermehrung der fünf Stämme lag der Anfangs-pH-Wert jeweils zwischen 5,3 und 5,7. Es dauerte zwischen 5 und 14 Stunden, bis der pH-Wert auf 4,8 gefallen war und die pH-Regelung einsetzte.

In Abbildung 8 ist die Vermehrung von *L. plantarum* während 24 Stunden bei 30°C dargestellt. In den ersten acht Versuchsstunden vermehrte sich der Stamm auf eine Koloniezahl von über $1,0 \cdot 10^9 \text{ KBE ml}^{-1}$. Nach der zwölften Stunde blieb die Zahl konstant bei etwa $3,5 \cdot 10^9 \text{ KBE ml}^{-1}$. Die Abbildung zeigt zusätzlich die Konzentration von Glucose im Medium, die von anfänglich 60 g l^{-1} auf unter 30 g l^{-1} sank. Bei Vermehrung von *L. plantarum* wurde nur Lactat gebildet.

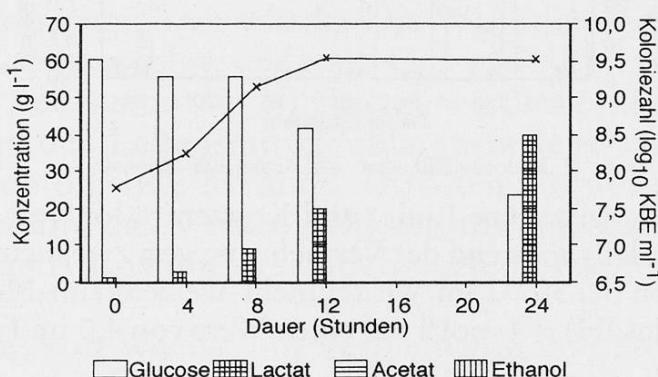
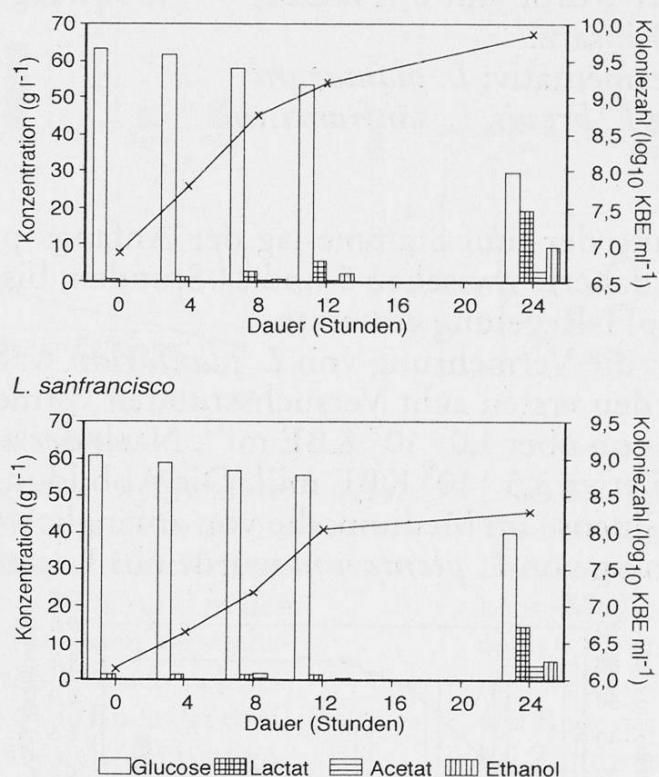


Abb. 8. Koloniezahl (durchgezogene Linie) und Konzentration von Glucose, Lactat, Acetat und Ethanol (Säulen) während der Vermehrung von *L. plantarum* bei 30°C im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium mit pH-Regulierung durch $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/l}$ auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

Die Vermehrung von *L. brevis* und *L. sanfrancisco* zeigt Abbildung 9. Die beiden Stämme unterschieden sich deutlich in der erreichten Endkoloniezahl. Sie lag bei Vermehrung von *L. sanfrancisco* um einen Faktor 30 tiefer. Der Glucoseverbrauch war bei *L. brevis* mit über 30 g l^{-1} in 24 Stunden um 10 g l^{-1} höher als derjenige von *L. sanfrancisco*. Beide Stämme produzierten neben Lactat auch Ethanol und Acetat. Im Vergleich zu der gesamten Vermehrung um einen Faktor grösser als 500 fand in der zweiten Versuchshälfte nur noch eine geringe Vermehrung um einen Faktor 3 statt, und der Glucoseverbrauch war bei beiden Stämmen rund dreimal höher als in der ersten Versuchshälfte.

Die Vermehrung von *L. mesenteroides* ist in Abbildung 10, diejenige von *P. pentosaceus* in Abbildung 11 dargestellt. Mit beiden Stämmen wurde eine Koloniezahl von über $5,0 \cdot 10^9 \text{ KBE ml}^{-1}$ erreicht. Während bei *P. pentosaceus* die Glucose fast völlig verbraucht und ausschliesslich in Lactat umgesetzt wurde, verblieb bei Vermehrung von *L. mesenteroides* nach 24 Stunden noch 24 g l^{-1} Glucose im Fermenter. Neben Lactat wurden noch je 9 g l^{-1} Acetat und Ethanol gebildet.

L. brevis



L. sanfrancisco

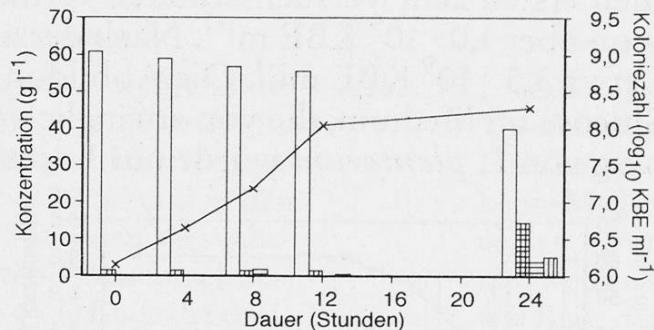


Abb. 9. Koloniezahl (durchgezogene Linie) und Konzentration von Glucose, Lactat, Acetat und Ethanol (Säulen) während der Vermehrung von zwei heterofermentativen *Lactobacillus*-Stämmen bei 30 °C im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium mit pH-Regulierung durch c (NaOH) = 4 mol/l auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

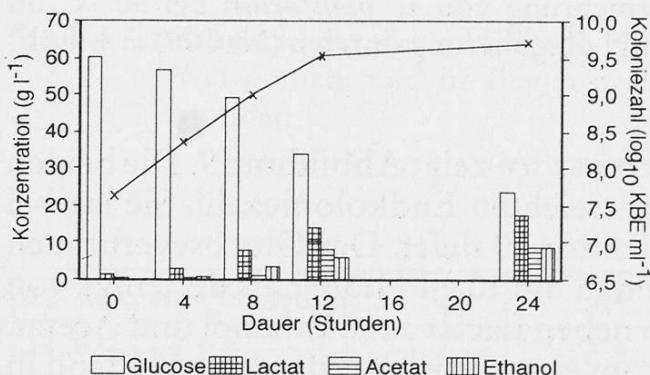


Abb. 10. Koloniezahl (durchgezogene Linie) und Konzentration von Glucose, Lactat, Acetat und Ethanol (Säulen) während der Vermehrung von *L. mesenteroides* bei 30 °C im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium mit pH-Regulierung durch c (NaOH) = 4 mol/l auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

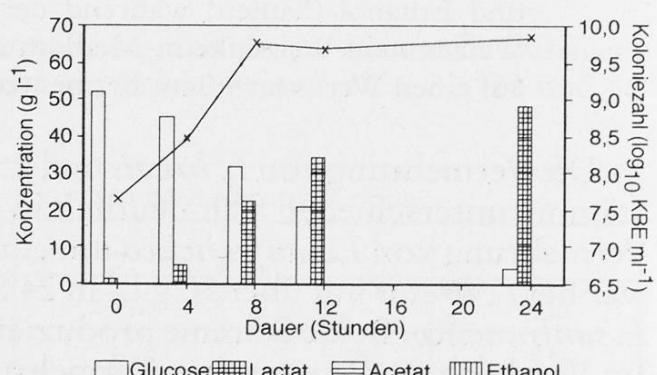


Abb. 11. Koloniezahl (durchgezogene Linie) und Konzentration von Glucose, Lactat, Acetat und Ethanol (Säulen) während der Vermehrung von *P. pentosaceus* bei 30 °C im Weizenmehl-Weizenkeim-Medium mit pH-Regulierung durch c (NaOH) = 4 mol/l auf einen Wert von 4,0 im Fermenter

Diskussion

Methoden

Die Wahl des MRS-Agars und der Verzicht auf anaerobe Kultivierung bei den Koloniezahlbestimmungen erfolgte nach den Empfehlungen von *Spicher* (5). Er schrieb, dass sich die Koloniezahl von *L. sanfrancisco* als besonders anspruchsvollem Stamm mit MRS-Medium aerob bestimmen liess. In den eigenen Versuchen kam es bei der Koloniezahlbestimmung von *L. sanfrancisco* jedoch vor, dass keine Koloniebildung erfolgte. *Berg* et al. (6) isolierten aus frisch zubereitetem Hefeextrakt ein Peptid, das zur Vermehrung dieses Stammes notwendig war. Deshalb wurde sterilfiltrierter Hefeextrakt dem verflüssigten sterilen MRS-Agar zugegeben. Damit konnte konstante Koloniebildung erreicht werden.

Die Milchsäurebakterien können Stärke nicht als Kohlenhydratquelle nutzen. Deshalb wurde sie enzymatisch zu Glucose abgebaut, wie das auch von *Shamala* und *Sreekantiah* (7) durchgeführt wurde. Die Wahl der enzymatisch aufgeschlossenen Weizenmehlmedien erfolgte aus zwei Gründen. Einerseits sollten die produzierten Bakterien in Lebensmitteln eingesetzt werden und deshalb möglichst zusatstofffrei im Sinne der Lebensmitteldeklaration sein. Andererseits sollten die Bakterien an das nachfolgende Medium «Brotteig» optimal angepasst sein. Das Weizenruchmehlmedium, das Weizenmehlmedium und das Weizenmehl-Weizenkeim-Medium sind mit Ausnahme des Glucosegehaltes dem Brotteig im Nährstoffgehalt sehr ähnlich.

Zur Untersuchung von Wachstum, Vermehrung und Stoffwechsel von Milchsäurebakterien wurden häufig synthetische Medien verwendet. So kamen oft MRS-ähnliche Medien zum Einsatz, wie sie von zum Beispiel von *Blickstad* und *Molin* (8) zur Untersuchung von *P. pentosaceus* angewandt wurden. Diese Medien enthielten Glucose als Kohlenhydratquelle sowie Hefeextrakt, Peptone und Nährsalze. Die dabei erhaltenen Resultate können nur sehr bedingt auf die Fermentation von Lebensmitteln übertragen werden, da dabei die Nährstoff- und Vermehrungsbedingungen erheblich anders sind.

Andere Untersuchungen über Vermehrung und Stoffwechsel von Milchsäurebakterien wurden direkt in Lebensmitteln durchgeführt. Bei den Versuchen in Milch lagen die erreichten Zellzahlen um eine Zehnerpotenz und die Lactatgehalte um einen Faktor 2 bis 4 tiefer als in den hier mit Weizenmehlmedien durchgeföhrten Versuchen (9). Die meisten Arbeiten über Brotteig behandelten im Unterschied zu den eigenen Untersuchungen die länger dauernden und mehrstufigen Roggenmehl-Sauerteig-Techniken (1). Die dort erreichten pH-Werte waren durchschnittlich um eine Einheit tiefer als in den Weizenmehlteigen (10).

Bestimmung der Vermehrungstemperaturen

Die Werte stimmten gut mit denjenigen von *Sneath* et al. (11) überein, nach welchen die *Lactobacillus*-Stämme sich bei 15 °C vermehrten, aber bei 45 °C keine

Vermehrung mehr stattfand. Für *Pediococcus* wurde eine Optimaltemperatur von 30 °C und Vermehrung bei 45 °C, für *Leuconostoc* einen Vermehrungsbereich von 10–37 °C angegeben. Alle fünf untersuchten Stämme waren mesophil und liessen sich bei der gewählten Temperatur von 30 °C gut vermehren. Einzelne Stämme konnten sich bei Temperaturen bis 37 °C noch schneller vermehren.

Vergleich der Weizenmehlmedien

Daeschel (12) stellte fest, dass bei Kultur von *L. plantarum* und *L. mesenteroides* in MRS-Bouillon der pH-Abfall durch Zugabe von Malat im Nährmedium vermindert werden konnte. In Abhängigkeit des Verhältnisses von Malat zu Glucose konnte sogar eine pH-Erhöhung während der Fermentation erreicht werden.

Nach *Schütz* und *Radler* (13) decarboxyliert ein Malo-Lactat-Enzym das Malat zu L-Lactat. Die Bakterien gewinnen dadurch keine Energie, der pH-Wert wird erhöht. Diese Reaktion sollte mit dem Weizenruchmehlmedium ausgenutzt werden, um ohne Zusatz von Natronlauge höhere Koloniezahlen zu erreichen. Das Malat wurde den Erwartungen entsprechend verbraucht. Das Verhältnis von L- zu D-Lactat verschob sich deutlich zugunsten der L-Form, was auf Aktivität des Malo-Lactat-Enzyms zurückzuführen ist. Dadurch konnte der pH-Wert stabilisiert und höhere Koloniezahlen erreicht werden.

Das Malo-Lactat-Enzym wurde nicht nur bei *L. plantarum*, sondern auch bei vielen anderen Milchsäurebakterien nachgewiesen (13, 14). Das Enzym wurde von *Caspritz* und *Radler* (15) isoliert und charakterisiert. Seine besondere Bedeutung hat es für die Weinbereitung, wo es in *Leuconostoc oenos* für den «biologischen Säureabbau» verantwortlich ist (16). Das Enzym spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Sauerteigbereitung. *Klemp* et al. (17) untersuchten, ob durch Bestimmung der Malatkonzentration eine biologische von einer chemischen durch Zugabe von Milchsäure durchgeführten Sauerteigführung unterschieden werden könnte. Obwohl dies nicht gelang, konnte gezeigt werden, dass die Malatkonzentration in allen Teigführungen sank. Beim Einsatz von Malat zur pH-Wert-Neutralisation müsste aber für jeden Stamm mit der Methode von *Daeschel* et al. (18) das Malo-Lactat-Enzym nachgewiesen werden. Am Anfang der eigenen Versuche musste mit 17 g l⁻¹ unverhältnismässig viel Apfelsäure zugegeben werden. Deren Wirkung musste auf den pH-Wert des Mediums mit einer vergleichbar hohen Laugenmenge, wie sie zur Einstellung des pH-Wertes während der Vermehrung der Bakterien nötig war, korrigiert werden. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen der pH-Wert während der Vermehrung immer mit Lauge reguliert.

In den drei Versuchen mit Einstellung des pH-Wertes durch Laugenzugabe zeigte sich, dass die maximale Koloniezahl bereits nach 24 Stunden erreicht wurde. Deshalb wurden die Versuche zum Vergleich der fünf Bakterienstämme nach dieser Dauer abgebrochen. Der Zusatz von Hefeextrakt und Nährsalzen oder Weizenkeimen zum Weizenmehlmedium bewirkte, dass sich höhere Koloniezahlen als mit dem reinen Weizenmehlmedium erreichen liessen. Da die Milchsäurebakterien zur Herstellung von Brot verwendet werden sollten, wurde als weitgehend zusatzstoff-

freies Medium das Weizenmehl-Weizenkeim-Medium zur Vermehrung der Bakterien eingesetzt.

*Vermehrung und Stoffwechsel von *L. plantarum* im Weizenmehlteig*

Die Vermehrung von *L. plantarum* verlief im Fermenter in den drei klassischen Phasen, wie sie zum Beispiel von Pelczar et al. (19) beschrieben wurden. In den 48 Stunden dauernden Versuchen konnte die vierte Phase (Absterbephase) nicht mehr beobachtet werden. Nach kurzer lag-Phase folgte bis zur 12. Stunde die log-Phase. In dieser Zeit vermehrten sich die Bakterien exponentiell. Es wurden Generationszeiten von 75 Minuten erreicht. Von der 12. bis zur 48. Stunde fand nur noch eine geringe Erhöhung der Koloniezahl um 50% statt. Wären im Brotteig ähnlich gute Vermehrungsbedingungen wie im Fermenter gegeben, so sollten deutliche Unterschiede zwischen den nach 6 und 48 Stunden produzierten Brotteigen zu beobachten sein. In den nach 6 Stunden produzierten Teigen könnte bei einer Generationszeit von 75 Minuten mehr als eine Vervierfachung der Koloniezahl erreicht werden. Es erfolgte aber in der dreistündigen Teiggare nur eine Vermehrung um 10%, wie sie auch bei den nach 48 Stunden angesetzten Brotteigen zu beobachten war. Diese Veränderungen lagen aber in der experimentell bedingten Schwankungsbreite der Ergebnisse für kulturelle Keimzahlbestimmungen (20). Es ist deshalb anzunehmen, dass in den untersuchten Teigen keine Veränderungen der Koloniezahl erfolgte. Dabei wäre nach den vorgegebenen Kultivierungsbedingungen durchaus eine Koloniezahlerhöhung zu erwarten gewesen. Die Glucosekonzentration lag nie unterhalb 1 g kg^{-1} . Die Lactatgehalte waren immer geringer als im Fermenter und die pH-Werte immer höher als 5,0.

Der Verlauf der Glucose und Lactatgehalte im Fermenter war charakteristisch für homofermentative Lactobazillen (21). Die Glucose wurde praktisch quantitativ in Milchsäure umgesetzt. Im Teig waren die Anfangskonzentrationen entsprechend der Verdünnung durch das Einarbeiten der Bakteriensuspension in den Teig um etwa einen Faktor 10 tiefer als im Fermenter. Der während der Teiggare uneinheitliche Verlauf der Glucosegehalte war auf zwei gegensätzliche Faktoren zurückzuführen. Auf der einen Seite fand ein Abbau der Glucose durch die Milchsäurebakterien statt. Auf der anderen Seite wurde durch mehleigene Enzyme etwa gleich viel Glucose freigesetzt. Die Zunahme an Lactat in den Teigen zeigte die Glucosevergärung durch die Milchsäurebakterien an. Die Lactatveränderungen waren deshalb zur Beurteilung der Aktivität der Bakterien besser geeignet als die Veränderungen der Glucosegehalte. Die grösste Aktivität von *L. plantarum* wurde in den nach 6 Stunden produzierten Teigen gemessen. Die höchsten Lactatgehalte wurden im nach 48 Stunden hergestellten Teig nachgewiesen. Dies zeigt, dass durch Einbringen einer möglichst hohen Zahl von Bakterien mit den im Fermenter produzierten Metaboliten ein gröserer Effekt erzielt wurde als durch Verwendung von möglichst aktiven Bakterien. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Messung der pH-Werte gestützt. Die grössten Veränderungen wurden zwar bei den nach

sechs Stunden produzierten Teigen gemessen. Aber bei den nach 48 Stunden gefertigten Teigen war der pH-Wert nach der Gare am tiefsten.

Die in den Teigen gemessenen pH-Werte waren um rund eine Einheit höher als die von *Lönnér* und *Preve-Åkesson* (10) im Roggenmehlsauerteig gemessenen Werte. Trotzdem waren die Lactatkonzentrationen in den eigenen Weizenmehlbrotteigen gleich hoch wie in den Roggenmehlbrotteigen. Dies dürfte dadurch bedingt sein, dass die Milchsäure aus dem Fermenter nach Zugabe von Natronlauge als Natriumsalz eingearbeitet wurde und so nur geringen Einfluss auf den pH-Wert hatte.

Vergleich von fünf Milchsäurebakterienstämmen

Der Verlauf der Koloniezahlen war bei vier der untersuchten Stämme gleich. In den ersten zwölf Stunden vermehrten sich alle Stämme bis zu einer Koloniezahl über 10^9 KBE ml⁻¹. Anschliessend fand entweder keine oder höchstens eine Vermehrung um einen Faktor drei statt. Die Endkoloniezahl lag bei diesen Stämmen mit $3 \cdot 10^9$ bis $8 \cdot 10^9$ KBE ml⁻¹ im Bereich einer halben Zehnerpotenz. Im Gegensatz dazu war bei den Versuchen mit *L. sanfrancisco* zwar der Verlauf der Koloniezahl gleich wie bei den übrigen vier Stämmen, doch waren die absoluten Werte der Koloniezahlen um einen Faktor 30 geringer.

Ein umgekehrter Aktivitätsverlauf zeigte sich beim Glucoseverbrauch. Bis zu einer Koloniezahl von 10^9 KBE ml⁻¹ sank die Glucosekonzentration um rund 10 g l⁻¹. Obwohl sich die Bakterien anschliessend nur noch um weniger als einen Faktor von zehn vermehrten, verbrauchten sie mehr Glucose als in der ersten Phase. Man könnte von einer ersten Vermehrungsphase und einer anschliessenden Stoffwechselphase sprechen. Diese zwei Phasen konnten auch bei *L. sanfrancisco* beobachtet werden, wobei sich alles bei einer um eine Zehnerpotenz tieferen Koloniezahl abspielte.

Bezüglich der gebildeten Endprodukte können die fünf untersuchten Stämme in zwei Gruppen unterteilt werden. Bei Vermehrung von *L. plantarum* und *P. pentosaceus* wurde aus der Glucose ausschliesslich Lactat gebildet, bei den übrigen Stämmen zusätzlich noch jeweils über 5 g l⁻¹ Acetat und Ethanol. Bei allen Stämmen war Lactat das mengenmässig wichtigste Endprodukt. Die Glucosekonzentration sank während der 24stündigen Kultur von *L. plantarum* mit 33% weniger als bei den übrigen Bakterienstämmen, bei welchen sie um 50 bis 80% abnahm. Die Menge der zur gleichen Zeit gemessenen Glucose sowie die Summe der Konzentration der Metaboliten (Lactat-, Acetat- und Ethanolkonzentrationen) zusammen sollten im Verlauf der Vermehrung bei allen Stämmen leicht sinken, da aus Glucose zusätzlich Biomasse produziert wurde. Bei den heterofermentativen Lactobazillen müsste zusätzlich ein Gewichtsdefizit durch entweichendes CO₂ zu beobachten sein. In Tabelle 3 ist die Glucosekonzentration und die Summe der Metaboliten-Konzentration aufgeführt. Sie zeigen, dass die Analysenfehler im allgemeinen grösser als die erwarteten Effekte waren. Einzig bei *L. brevis* sank die Summen aus Glucose- und Metabolitenkonzentration während der 24 Stunden um rund 4 g l⁻¹.

Tabelle 3. Glucosekonzentration und Summe der Lactat-, Acetat- und Ethanolkonzentration (= Metabolite in g l⁻¹ Nährmedium) während der Vermehrung von fünf Milchsäurebakterienstämmen

Untersuchter Stamm	Analyse	Stunden nach Versuchsbeginn			
		0	4	8	12
<i>L. plantarum</i> p3	Glucose	60,4	55,9	55,7	41,7
	Metabolite	1,3	2,6	9,1	20,0
<i>L. brevis</i> b1	Glucose	63,2	61,8	61,1	19,0
	Metabolite	0,6	2,3	3,6	41,7
<i>L. sanfrancisco</i> s2	Glucose	60,7	58,9	56,7	14,4
	Metabolite	1,2	1,2	2,4	49,3
<i>L. mesenteroides</i> m2	Glucose	60,2	56,6	49,3	34,0
	Metabolite	1,7	3,5	11,7	28,2
<i>P. pentosaceus</i> t1	Glucose	52,0	45,1	31,8	20,8
	Metabolite	1,3	4,8	23,2	34,3

Zusammenfassung

Die Vermehrung von *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Pediococcus pentosaceus* wurde in einem amylolytisch und proteolytisch aufgeschlossenen Weizenmehl-Weizenkeim-Medium optimiert. Die optimale Vermehrungstemperatur dieser Stämme lag zwischen 30 und 37 °C. Während der 24stündigen Vermehrung bildeten *L. plantarum* und *P. pentosaceus* ausschliesslich Milchsäure aus Glucose, die übrigen Stämme zusätzlich zwei bis zehn g l⁻¹ Essigsäure und Ethanol.

Résumé

La multiplication de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Pediococcus pentosaceus* a été optimisé dans un milieu de farine de blé hydrolysée par des amylases et des protéases. La température optimale pour la multiplication des souches était de 30 à 37 °C. Après 24 heures de multiplication, *L. plantarum* et *P. pentosaceus* ont produit seulement de l'acide lactique à partir du glucose, les autres souches ont données en plus de l'acide acétique et de l'éthanol.

Summary

The growth of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus* was optimized using a amylolytic and proteolytic hydrolysed wheat-meal-wheat-germ-medium. The optimum temperature of multiplication of these strains was between 30 and 37 °C. During a multiplication of 24 hour,

L. plantarum and *P. pentosaceus* produced only lactic acid from glucose, the other strains in addition two to ten g l⁻¹ acetic acid and ethanol.

Literatur

1. *Spicher, G. und Stephan, H.*: Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie, 3. Auflage. Behr's Verlag, Hamburg 1987.
2. *Schulz, A. und Stephan, H.*: Untersuchungen über die Möglichkeiten zur Verbesserung der Qualität und des Geschmackes von Weizen- und Weizenmischbrot. Brot und Gebäck **16**, 203–209 (1962).
3. *Hochstrasser, R.E., Ehret, A., Geiges, O. und Schmidt-Lorenz, W.*: Mikrobiologie der Brotteigherstellung. III. Die Mikroflora von Weizenmehlteigen aus acht Bäckereien nach direkter, Hebel- und Sauerteigführung. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **84**, 581–621 (1993).
4. *Merseburger, T., Ehret, A., Geiges, O. und Schmidt-Lorenz, W.*: Mikrobiologie der Brotteigherstellung. V. Vermehrung von Backhefe in Weizenmehl. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85**, 608–629 (1994).
5. *Spicher, G.*: Beiträge zur Vereinheitlichung der Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten. Getreide, Mehl, Brot **38**, 261–264 (1984).
6. *Berg, R. W., Sandine, W. E. and Anderson, A. W.*: Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. Appl. Environm. Microbiol. **42**, 786–788 (1981).
7. *Shamala, T. R. and Sreelantiah, K. R.*: Fermentation of starch hydrolysates by *Lactobacillus plantarum*. J. Indust. Microbiol. **3**, 175–178 (1988).
8. *Blickstad, E. and Molin, G.*: Growth and lactic acid production of *Pediococcus pentosaceus* at different gas environments, temperatures, pH values and nitrite concentrations. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **13**, 170–174 (1981).
9. *Litoupoulou-Tzanetaki, E., Vafopoulou-Mastrojiann, A. and Tzanetakis, N.*: Biotechnologically important metabolic activities of *Pediococcus* isolates from milk and cheese. Microbiol. Alim. Nutr. **7**, 113–122 (1989).
10. *Lönnér, C. and Preve-Åkesson, K.*: Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sour doughs. Food Microbiol. **5**, 43–58 (1988).
11. *Sneath, P. H. D., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.*: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. Williams und Wilkins, Baltimore 1986.
12. *Daeschel, M. A.*: A pH control system based on malate decarboxylation for the cultivation of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **6**, 1627–1629 (1988).
13. *Schütz, M. und Radler, F.*: Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat-Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien. Arch. Mikrobiol. **96**, 329–339 (1974).
14. *Kandler, O., Winter, J. und Stetter, K. O.*: Zur Frage der Beeinflussung der Glucosevergärung durch L-Malat bei *Leuconostoc mesenteroides*. Arch. Mikrobiol. **90**, 65–75 (1973).
15. *Caspritz, G. und Radler, F.*: Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*; Purification properties and distribution among bacteria – isolation and characterization of enzyme involved in wine malolactic fermentation. J. Biol. Chem. **258**, 4907–4910 (1983).
16. *Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. und Ribereau-Gayon, P.*: Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol. **46**, 874–880 (1983).
17. *Klemp, J., Regula, E. und Wassermann, L.*: Veränderung der Malat- und Citratgehalte bei der Herstellung von Sauerteigbrot. Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. **175**, 403–405 (1982).

18. *Daeschel, M. A., McFeeters, R. F., Fleming, H. P., Klaenhammer, T. R. and Sanozky, R. B.:* Mutation and selection of *Lactobacillus plantarum* strains that do not produce carbon dioxide from malate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**, 419–420 (1984).
19. *Pelczar, J. M., Reid, D. R. and Chan, E. C. S.:* *Microbiology*, 4. Edition. McGraw-Hill, New York 1977.
20. *Müller, A. und Hildebrandt, G.:* Die Genauigkeit der kulturellen Keimzahlbestimmungen. II. Eigene Untersuchungen. *Fleischwirtschaft* **69**, 925–930 (1989).
21. *Kandler, O.:* Gärungsmechanismen bei Milchsäurebakterien. *Forum Mikrobiol.* **5**, 16–22 (1982).

Dr. T. Merseburger
Givaudan-Roure Aromen AG
CH-8600 Dübendorf