

Der Einfluss alternativer Hefen auf die Aromabildung in Weizenteigen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

vorgelegt von
Melanie Wieschebrock

Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis..... I

1 Einleitung..... 1

1.1 Mikrobielle Ökologie der Teigfermentation 1

1.2 Produktion von Aromen durch die Lebensmittelindustrie 4

1.3 Potenzial der Hefen zur Aromabildung 5

1.4 Stoffwechselwege der Aromaproduktion durch Hefen 12

1.5 Nebenströme der Lebensmittelindustrie 16

1.6 Ziele dieser Arbeit 19

2 Material und Methoden..... 20

2.1 Material..... 20

2.1.1 Geräte.....20

2.1.2 Software21

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien22

2.1.4 Kits.....22

2.1.5 Standards22

2.1.6 Oligonukleotide22

2.1.7 Enzyme23

2.1.8 Antikörper.....24

2.1.9 Medien24

2.1.10 Fermentationssubstrat28

2.1.11 Stämme30

2.1.12 Inkubation der Stämme.....32

2.1.13 Lagerung der Stämme35

2.1.14 Vektoren und Plasmide35

2.2 Methoden 36

2.2.1 Nährstoffanalyse36

2.2.2 Keimzahlbestimmung37

2.2.3 Analyse von stammspezifischen Parametern.....37

2.2.4 pH-Messung38

2.2.5 Modellfermentation38

2.2.6 Propagation39

2.2.7 Wachstumskurve.....39

2.2.8 Wachstum unter definierter Sauerstoffkonzentration40

2.2.9 Herstellung von Modellbrot41

2.2.10 Sensorische Analysen41

2.2.11 Aromaextrakt-Verdünnungsanalysen42

2.2.12 Physikalische Methoden43

2.2.13 Transformation von DNA.....45

2.2.14 Analyse von DNA46

2.2.15 Analyse von Proteinen53

2.2.16 Statistische Auswertung.....54

3 Ergebnisse..... 55

3.1 Charakterisierung der Fermentationssubstrate..... 55

3.2 Effekt der Hefepopulation auf die Aromabildung und das Wachstum der Mikroflora..... 57

3.3 Charakterisierung alternativer Hefen 61

3.4 Optimierung der Prozessparameter 62

3.4.1 Anteil des Nebenstroms62

3.4.2 Teigausbeute65

3.4.3 Einfluss der Temperatur66

3.4.4	Einfluss der Höhe des Inokulats	68
3.4.5	Effekt der Fermentationszeit.....	69
3.4.6	Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit.....	71
3.4.7	Reproduzierbarkeit der Fermentationsergebnisse	71
3.5	Analyse der Mikroflora in fermentierten Teigen	73
3.5.1	Entwicklung eines PCR-DGGE-Systems zur Charakterisierung der Hefe- und Milchsäurebakterienflora	73
3.5.2	Identifizierung der Hefen und Milchsäurebakterien in der Kontaminationsflora	75
3.5.3	Mikroflora in spontan fermentierten Teigen	76
3.5.4	Charakterisierung der Flora bei Co-Fermentation und Propagation in Teigen mit Apfeltrester.....	79
3.5.5	Co-Fermentation von <i>K. marxianus</i> DIL 82 mit Milchsäurebakterien	82
3.5.6	Charakterisierung der Flora bei Co-Fermentation und Propagation in Teigen mit Karottentrester	84
3.6	Identifizierung der während der Fermentation gebildeten Aromakomponenten	87
3.7	Rheologische Charakterisierung der Teige.....	91
3.8	Modellbackwaren	92
3.9	Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene in <i>K. lactis</i> und <i>K. marxianus</i>	95
4	Diskussion	101
4.1	Fermentation der mit Nebenströmen supplementierten Weizenteige durch alternative Hefen ...	101
4.2	Mikroflora der fermentierten Teige.....	106
4.3	Zusammensetzung der Aromakomponenten der fermentierten Teige.....	110
4.4	Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene in <i>K. lactis</i> und <i>K. marxianus</i>	112
5	Zusammenfassung	114
6	Summary.....	115
7	Literatur	116
A.	Anhang.....	III
A 1.	Abkürzungsverzeichnis.....	III
A 2.	Eidesstattliche Erklärung.....	VI
A 3.	Effekt alternativer Hefen auf die Aromabildung und das Wachstum der Mikroflora.....	VII
A 4.	Optimierung der Prozessparameter	XIX
A 5.	Analyse der Mikroflora in fermentierten Teigen	XXIV
A 6.	Aromaextraktverdünnungsanalysen mittels GC/O	XXV
A 7.	Modellbackwaren	XXXI
A 8.	Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene	XXXI
A 9.	Sequenzen.....	XXXIV

1 Einleitung

1.1 Mikrobielle Ökologie der Teigfermentation

Gemahlene Getreidekörner werden schon seit mindestens 1500 v. Chr. mit Wasser zu einem Teig verarbeitet. Wird dieser Teig vor dem Verbacken zu Brot einige Zeit stehen gelassen, so vergrößert sich das Teigvolumen durch Gasbildung, und Aroma sowie ein säuerlicher Geschmack entstehen (Hammes und Gänzle, 1998). Diese Effekte sind auf ein Zusammenspiel zwischen der mikrobiellen Aktivität von Hefen und Milchsäurebakterien und der im Fermentationssubstrat enthaltenen endogenen Enzymaktivitäten zurückzuführen (Abbildung 1.1). Die an der Fermentation beteiligten Mikroorganismen werden entweder dem Teig gezielt in Form von Starterkulturen oder Anstellgut zugegeben oder sind im Fermentationssubstrat als autochthone Mikroflora enthaltenen. Die Aktivität der Mikroflora wird dann durch die Eigenschaften des Substrats (endogene Faktoren) und die Prozessparameter (exogene Faktoren, Führungsbedingungen) bestimmt. Die im Substrat enthaltenen Enzymaktivitäten sowie der Metabolismus der Mikroorganismen setzen während der Fermentation nicht nur die Kohlenstoff- und Stickstoffquellen um, sondern verändern auch die Zusammensetzung der Lipide und freien Fettsäuren. Dieser Prozess kann durch die Temperatur, Fermentationszeit, Teigausbeute (als ein Maß für das verfügbare Wasser) sowie durch den Sauerstoffeintrag und pH-Wert beeinflusst werden. Sie wirken sich sowohl auf die Wechselwirkungen der Hefen und Milchsäurebakterien, als auch auf die Kontaminationsflora aus. Die jeweils dominierenden Mikroorganismen bestimmen neben der Lockerung oder Säuerung maßgeblich das Aroma, die Haltbarkeit, Textur und den Nährwert des fertigen Teiges. Da die Qualität des Endproduktes also durch das komplexe Wechselspiel zwischen endogenen Faktoren mit den Prozessparametern bestimmt wird, ist der Fermentationsprozess trotz der langen Tradition noch immer nicht vollständig verstanden (Arendt *et al.*, 2007).

Die in Abhängigkeit von den Prozessparametern erhaltenen Teige wurden von Böcker *et al.* (1995) in vier verschiedene Typen unterteilt. Hierbei wurden neben den technologischen Aspekten auch die mikrobiologischen Eigenschaften berücksichtigt. Da bei den Sauerteigen (Typ I - III) die Säuerung durch Milchsäurebakterien im Vordergrund steht, spielt die Lockerung durch das von Hefen produzierte Kohlendioxid eine untergeordnete Rolle. Hingegen sind die Hefen ein dominanter Bestandteil von Weizenvorteigen (Teige des Typs 0). Diese Teige werden durch eine Mischung von Getreidemahlerzeugnissen, Wasser und der Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt und für bis zu 24 h fermentiert (Brümmer *et al.*, 1984). In dieser Fermentation wird keine gezielte Säuerung angestrebt,

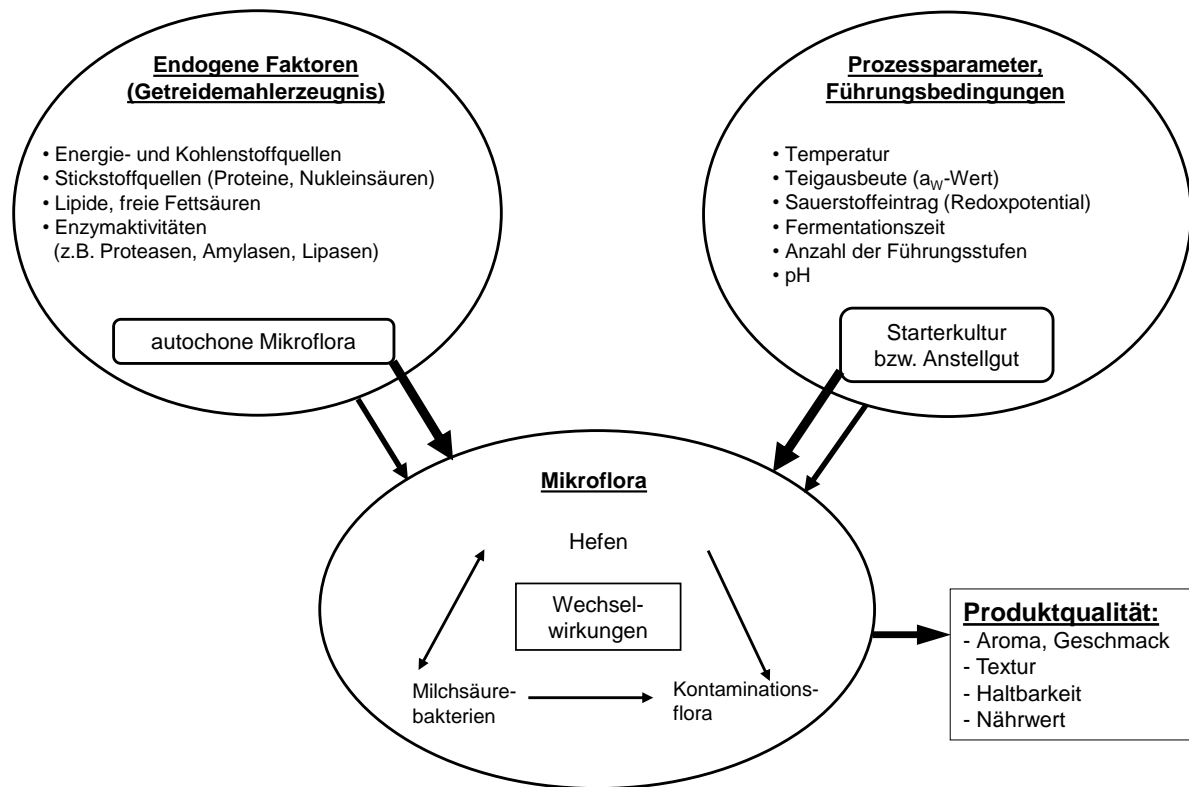


Abbildung 1.1: Einfluss der endogenen und exogenen Faktoren auf den Metabolismus und das Wachstum der Mikroflora sowie die Qualität des fermentierten Teiges (modifiziert nach Arendt *et al.*, 2007).

sondern vielmehr eine gute Triebleistung, wobei auch die Frischhaltung und Aromabildung berücksichtigt werden müssen (Gassenmeier und Schieberle, 1995; Zehentbauer und Grosch, 1998).

Auch die ausschließliche Fermentation von Weizenmehl führt abhängig von den Prozessparametern zu einer diversen Flora der Milchsäurebakterien und Hefen. Die große Diversität der Mikroflora wurde bereits eingehend untersucht und in zahlreichen Artikeln beschrieben (De Vuyst und Neysens, 2005; Ehrmann und Vogel, 2005; Arendt *et al.*, 2007; De Vuyst und Vancanneyt, 2007; De Vuyst *et al.*, 2009; De Vuyst *et al.*, 2014). So wurde in den Weizenteigen zwar am häufigsten *S. cerevisiae*-Hefen gefunden, aber auch *Candida humilis* konnte oft in diesen Teigen nachgewiesen werden. Allerdings kam keine dieser Hefen in allen untersuchten Teigen vor. Stattdessen wurden die Fermentationen der Weizenteige gelegentlich von *Wickerhamomyces anomalus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kazachstania exigua* und *Pichia kudriavzevii* begleitet. Darüber hinaus fand man in einzelnen Fällen noch eine Vielzahl an weiteren Hefen, unter anderem *Candida glabrata*, *Candida stellata*, *Candida milleri*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Kazachstania barnettii*, *Kazachstania unispora*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*

und *Saccharomyces pastorianus*. Alleine die unterschiedliche Häufigkeit mit der die Hefen in den Weizenteigen gefunden wurden zeigt, dass die verschiedenen Arten sehr unterschiedlich am Fermentationsgeschehen beteiligt sein können. Dabei muss aber zwischen den an den Teig adaptierten Hefen und den kontaminierenden Hefearten unterschieden werden. Es wird davon ausgegangen, dass verschiedene Hefespezies umso eher an das Ökosystem Teig adaptiert sind, je häufiger sie tatsächlich gefunden werden. So gelten z. B. *C. glabrata*, *C. humilis*, *K. exigua*, *S. cerevisiae* und *T. delbrueckii* als an das Ökosystem Teig adaptiert (Hammes *et al.*, 2005). Hingegen wurden die Hefen *P. kudriavzevii* und *W. anomalus* zwar auch häufig isoliert, gelten aber nicht als adaptiert. Weiterhin werden Hefespezies, die nur vereinzelt in fermentierten Teigen nachgewiesen wurden, als Kontaminationen angesehen. Diese Kontaminanten sind nur bei entsprechend hoher Keimzahl im Teig auch an der Aromabildung beteiligt.

Obwohl sich die Bäckerhefe *S. cerevisiae* aufgrund ihrer starken Triebleistung bei der Fermentation von Weizenteigen durchgesetzt hat, müsste sie nicht unbedingt immer eingesetzt werden. In den mit *S. cerevisiae* fermentierten Teigen dominieren die durch den Hefemetabolismus gebildeten Aromen (in Abhängigkeit der oben beschriebenen Prozessparameter) mehr oder weniger stark. Einige der für *S. cerevisiae* typischen Aromen und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Allerdings ist zu vermerken, dass die Selektion auf starke Triebbildung wohl zu einer zunehmenden Verarmung an von *S. cerevisiae* in den Teig eingebrachten Aromastoffen geführt hat. Diesem Problem versucht man heute durch den gezielten Einsatz von kommerziell erhältlichen „Aromahefen“, wie z. B. „Vital-Arom“ (Deutsche Hefewerke, Nürnberg) entgegenzuwirken. Außerdem liegt hier wahrscheinlich ein großes Potenzial für den Einsatz anderer Hefen zur Fermentation von Weizenteigen, vor allem solcher Spezies, die sich an das Ökosystem Teig adaptieren können. Mit ihrer Hilfe könnte sich gezielt das Aroma der Teige verbessern lassen.

Tabelle 1.1: Typische Aromen und ihre Aromaeigenschaften.

Verbindung	Geruch	Quelle
2-Phenylethanol	honigartig	(Czerny <i>et al.</i> , 2003)
(E/E)-2,4-Decadienal	fettig	(Hansen und Schieberle, 2005)
Methylpropanol	malzig	(Czerny <i>et al.</i> , 2003)
2-/3-Methylbutanol	malzig, alkoholisch, Balsamico	(Czerny <i>et al.</i> , 2003)
3-Methylbutanal	malzig	(Birch <i>et al.</i> , 2013b)
(E)-2-Nonenal	nach Gurke bzw. Bohne	(Hansen und Schieberle, 2005)
2,3-Butandion	nach Butter und Karamell	(Birch <i>et al.</i> , 2013b)

1.2 Produktion von Aromen durch die Lebensmittelindustrie

Aromen und Düfte werden weltweit in Nahrungsmitteln, Futter, Kosmetik, Chemie und Pharmazie eingesetzt (Vandamme und Soetaert, 2002) und erzielten 2012 einen weltweiten Umsatz von 16,8 Mrd € (Leffingwell & Associates 2013). Vor allem bei der Verwendung von Aromen in Lebensmitteln erwarten die Konsumenten, dass es sich um „natürliche Aromastoffe“ handelt. Darunter versteht man nur solche Aromastoffe, die „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen“ wurden und chemisch identisch mit in der Natur vorkommenden Aromastoffen sind (Europäisches Parlament und Rat, 2008). Entsprechend wird zwischen chemisch hergestellten „naturidentischen“ und „künstlichen“ Aromastoffen nicht mehr unterschieden. Traditionell wurden die natürlichen Aromakomponenten aus Pflanzen oder Tieren isoliert, was sehr aufwändig und letztlich nicht kontrolliert möglich ist, weil z. B. das Wetter einen Einfluss auf die Qualität der Naturmaterialien hat. Außerdem konnten die Aromen oft nur in kleinen Mengen gewonnen werden, was die Entwicklung alternativer Produktionsmethoden beflügelte. Als erster Aromastoff wurde so 1852 erstmals Zimtaldehyd synthetisiert (Rowe, 2009) gefolgt von der kostengünstigen chemischen Synthese vieler Aromastoffe, deren Marktanteil im Jahr 2000 84 % der weltweiten Produktion betrug (Soares *et al.*, 2000). Oft sind die chemischen Produktionsverfahren umweltschädlich und stoßen auf erhebliche Skepsis bei den Konsumenten. Ein weiterer Nachteil der chemischen Synthese ist auch das Auftreten von Gemischen enantiomerer Formen, von denen häufig nur eines aromaaktiv ist, und das in weiteren Prozessschritten noch abgetrennt werden muss. Daraus hat sich ein Trend zur Produktion von natürlichen Aromastoffen durch biotechnologische Prozesse entwickelt, die eher akzeptiert sind, weil sie bei der Herstellung von Lebensmitteln in Form von Gärungen schon seit tausenden von Jahren verwendet werden. Tatsächlich wurde die Vergärung von Lebensmitteln ursprünglich häufig dazu eingesetzt, ihre Haltbarkeit zu verbessern. Typische Beispiele hierfür sind Bier, Joghurt, Käse, Kefir, Sojasoße, Sauerteig, Sauerkraut und Wein. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde der Zusammenhang zwischen der Bildung produktspezifischer Aromastoffe und den zur Fermentation eingesetzten bzw. natürlicherweise vorhandenen Mikroorganismen erkannt (Molina *et al.*, 2013). Oft erzeugt dabei eine komplex zusammengesetzte Mikroflora ein bestimmtes Aromaprofil. Umgekehrt können natürlich auch unerwünschte Aromen durch Mikroorganismen eingebracht werden, welche im Zusammenhang mit dem Verderb von Lebensmitteln stehen (Ruttloff, 1982; Feron und Waché, 2005). Die entsprechenden Aromakomponenten können entweder *de novo* als Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels gebildet werden, oder durch

den biologischen Umsatz vorhandener Komponenten, d. h. durch Biokonversion, entstehen (Feron *et al.*, 1996). Als Beispiele für solche aromaaktiven Substanzen wären kurzkettige Alkohole, Ester, Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Terpene, phenolische Verbindungen, schwefelhaltige Verbindungen oder Pyrazine und Lactone zu nennen (Krings und Berger, 1998; Labuda, 2009). Auch gereinigte Enzyme, bevorzugt solche die keine Co-Faktoren wie NAD(P)⁺ oder ATP benötigen, können für die Herstellung verschiedener Aromastoffe herangezogen werden. Probleme können dabei die aufwändige Isolierung der Enzyme aus Mikroorganismen und ihre begrenzte Stabilität darstellen. Die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen für die Herstellung rekombinanter Enzyme und deren Immobilisierung tragen vielfach zur Lösung dieser Probleme bei (Schreier, 1997). Trotzdem können einige Aromakomponenten bisher nur in sehr geringen Mengen (meist weniger als 100 mg/l) gewonnen werden und sind entsprechend teuer in der Herstellung. Eine gezielte Optimierung der Produktionsorganismen erfordert aber ein detailliertes Verständnis der zugrunde liegenden Stoffwechselwege, sowie die Entwicklung neuartiger Fermentationstechnologien und Verfahren zur Aromastabilisierung (Vandamme, 2003; Schrader, 2007). Letztlich könnte die biotechnologische Aromaproduktion durch den gezielten Einsatz von Starterkulturen während der Lebensmittelfermentation die komplexen Herstellungs- und Reinigungsverfahren ersetzen.

1.3 Potenzial der Hefen zur Aromabildung

Auf das hohe Potenzial von verschiedenen Bakterien und Pilzen, insbesondere von Hefen, zur *de novo*-Synthese bzw. Biokonversion von Aromastoffen wurde bereits in vielen Übersichtsartikeln hingewiesen (Belin *et al.*, 1992; Janssens *et al.*, 1992; Fleet, 2003; Feron und Waché, 2005; Longo und Sanromán, 2006; Schrader, 2007; Xu *et al.*, 2007; Labuda, 2009). In Tabelle 1.2 sind einige Beispiele für Hefen angegeben, die neben der klassischen Bäcker-, Bier- und Weinhefe *S. cerevisiae* zur Verbesserung des Aromas von fermentierten Lebensmitteln geeignet sind. Insgesamt geht man davon aus, dass mehr als 1500 Hefearten aus 149 unterschiedlichen Gattungen existieren (Kurtzman *et al.*, 2011). Im Folgenden wird kurz auf das Potenzial einiger dieser Hefen in Bezug auf die Aromabildung eingegangen. Es handelt sich hier ausschließlich um Hefen aus der Abteilung der Ascomycota, die zur Klasse der Hemiascomycetales gehören, und den Saccharomycetales (echte Hefen) zugeordnet sind.

Die der Familie Wickerhamomycetaceae zugeordnete Hefe *Cyberlindnera jadinii* (anamorph *Candida utilis*) (Kurtzman, 2011a) wurde erstmals 1931 isoliert (Sartory *et al.*, 1932). Der Typstamm CBS 5609^T stammt aus klinischem Material (menschlicher Abszess), während weitere Stämme aus diversen Quellen (Euter einer infizierten Kuh, Sputum, Kontamination in

Hefefabriken bzw. Brennereien, und aus Blumen) isoliert wurden. Auch wenn das ursprüngliche Habitat von *C. jadinii* nicht bekannt ist, wird aufgrund der Fähigkeit zur Pentoseverwertung und dem guten Wachstum auf Lignin-Nebenprodukten angenommen, dass es sich um zersetztes, pflanzliches Material handelt (Kurtzman, 2011a). In Bezug auf den Einsatz von *C. jadinii* in Lebensmitteln ist diese Hefe von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) dem Status einer qualifizierten Sicherheitsannahme (*Qualified Presumption of Safety*, QPS) für die Enzymproduktion (EFSA, 2013) zugeordnet. *C. jadinii* ist eine Crabtree-negative Hefe (d. h. im Gegensatz zu *S. cerevisiae* werden Zucker unter aeroben Bedingungen im Wesentlichen der Atmungskette und nicht der alkoholischen Gärung zugeführt) und wird schon sehr lange biotechnologisch in der Abwasserbehandlung (Elmaleh *et al.*, 1999) und bei der Herstellung von Lebens- und Futtermitteln verwendet (van Dijken *et al.*, 1993). Sie wird beispielsweise in der Käseproduktion (Wyder *et al.*, 1999) oder für die Herstellung von Einzellerprotein („*single cell protein*“, SCP) eingesetzt (Lee und Kyun Kim, 2001). Sie wurde auch bereits in Form von Hefeextrakt zur Verbesserung des Aromas in Lebensmitteln *C. jadinii* verwendet (Schanus und McPherson, 1994). Zudem nutzten Yanai *et al.* (2001) eine von *C. jadinii* produzierte β -D-Xylosidase um Terpene durch Hydrolyse aus ihren Vorstufen freizusetzen und so die Aromaqualität von Wein zu verbessern.

Die Hefe *Hanseniaspora uvarum* (anamorph *Kloeckera apiculata*) gehört ebenfalls zur Familie der Saccharomycetales. Der Typstamm von *H. uvarum* CBS 314^T wurde von einer ungarischen Muskat-Traube isoliert und von Niehaus im Jahr 1932 beschrieben (Cadez und Smith, 2011). Generell ist *H. uvarum* weltweit verbreitet und kommt häufig im Boden, auf Insekten und verschiedenen Früchten, sowie in vergorenem Most oder im Sauerteig vor. Des Weiteren konnte *H. uvarum* sowohl aus Frisch- und Meerwasser, als auch aus klinischem Material isoliert werden (Cadez und Smith, 2011). *H. uvarum* ist Crabtree-negativ, vergärt Zucker nur unter anaeroben Bedingungen (Gonzalez *et al.*, 2013) und besitzt den QPS-Status (EFSA, 2013). Die von *H. uvarum* gebildete β -D-Glucosidase (Barbagallo *et al.*, 2004) und eine β -D-Xylosidase (Manzanares *et al.*, 1999) setzten aromatische Verbindungen wie z. B. Monoterpene im Wein frei. Obwohl *H. uvarum* aufgrund der hohen Essigsäurebildung lange als unerwünschte Kontamination in der Weinbereitung galt (Romano *et al.*, 2003), wird sie heute zunehmend zur Verbesserung des Aromas verwendet, weil sie auch höhere Alkohole und Ester produziert (Moreira *et al.*, 2005). *H. uvarum* stellt aber nur vergleichsweise wenig Alkohol her und wird deshalb in der Weinfermentation nur in Verbindung mit *S. cerevisiae* eingesetzt (Mateo *et al.*, 1991).

Tabelle 1.2: Einfluss von verschiedenen Mikroorganismen auf die Aromamerkmale in Lebensmitteln.

Mikroorganismen	Aromamerkmale	Quelle
Bier		
<i>S. cerevisiae</i>	Aliphatische und aromatische Alkohole, Ester, Carbonylverbindungen	(Priesolová <i>et al.</i> , 2013)
<i>S. cerevisiae</i> K-14, NCYC1333, K-14-L5, NCYC1333-RD7, F32	Ethylacetat, Propylalkohol, Isobutylalkohol, Isobutylacetat, Isoamylalkohol, Ethylcaproat	(Mukai <i>et al.</i> , 2001)
Brot		
<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. guilliermonii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>	Acetaldehyd, Aceton, Ethylacetat, Ethanol, Hexanal, Isobutylalkohol, Propanol)	(Torner <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. cerevisiae</i> Weinstamm (IFI256), Bäckerstämme (V1, V2), AS-überexprimierende Mutanten aus IFI256 und V2 (Lys ^S , Met ^S , Thr ^S)	Organoleptische Eigenschaften (Geruch und Geschmack)	(Rincón und Benitez, 2001)
<i>L. brevis</i> , <i>L. brevis</i> var. <i>lindneri</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus farciminis</i> , sowie aus Teigen isolierte Hefen (<i>P. kudriavzvi</i> , <i>S. saitoi</i> , <i>T. holmii</i> , <i>S. cerevisiae</i>)	Verbesserung der organoleptischen Eigenschaften	(Spicher <i>et al.</i> , 1982) (Spicher <i>et al.</i> , 1981)
<i>S. cerevisiae</i> SW-39 und KY-5649 sowie hieraus hergestellte Mutanten S208, S228, K324, K242	Isobutylalkohol, Isoamylalkohol	(Watanabe <i>et al.</i> , 1990)
<i>K. marxianus</i> NRRL-Y-1109, NRRL-Y-2415, <i>S. cerevisiae</i> (Backhefe)	Organoleptisch kein Unterschied zwischen <i>K. marxianus</i> und <i>S. cerevisiae</i>	(Caballero <i>et al.</i> , 1995)
<i>S. cerevisiae</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i>	2-Methylbuttersäureethylester (fruchtig), Methylpropansäureethylester (fruchtig), (E,E)-2,4-Decadienal (fettig, frittiert), 4-Ethyl-2-methoxyphenol (rauchig), 3-Methylbutanol, 2-Phenylethanol (honigartig), 2-Methoxyphenol (rauchig), Methylpropanol (malzig)	(Czerny <i>et al.</i> , 2003)
<i>K. marxianus</i> IFO 288	Ester, organische Säuren, Alkohole, Carbonylverbindungen	(Dimitrellou <i>et al.</i> , 2009)

Tabelle 1.2: Fortsetzung.

Mikroorganismen	Aromamerkmale	Quelle
Aus Orangensaft isolierte Hefen: <i>D. bruxellensis</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora burtoni</i>	Aroma, Geschmack	(Boboye und Dayo-Owoyemi, 2009)
Bäckerhefen (Malteserkors, Skærtøftmølle, Rapunzel, l'Hirondelle, Sema, Bruggeman, Zymarom)	Ester, höhere Alkohole, Carbonylverbindungen	(Birch <i>et al.</i> , 2013a; 2013b)
<i>S. cerevisiae</i> ; <i>P. kudriavzevii</i> ; <i>Candida norvegensis</i> ; <i>K. exigua</i> , <i>W. anomalous</i>	Carbonylverbindungen, höhere Alkohole	(Damiani <i>et al.</i> , 1996)
<i>K. marxianus</i> (IFO 0288) <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , (ATCC 11842), <i>L. helveticus</i> (ATCC 15009)	Alkohole, Ester, Carbonylverbindungen, organische Säuren	(Plessas <i>et al.</i> , 2008a; 2008b)
Käse		
<i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>C. jadinii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i>	Fettsäuren, organoleptisch	(Wyder <i>et al.</i> , 1999)
<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>Pichia fermentans</i>	Ester, Fettsäuren, höhere Alkohole, Carbonylverbindungen	(De Freitas <i>et al.</i> , 2009)
Wein		
<i>S. cerevisiae</i> AWRI 123–AWRI 130	4-Mercapto-4-methyl-pentan-2-on (Buchsbaum/schwarze Johannisbeere)	(Howell <i>et al.</i> , 2004)
<i>S. cerevisiae</i> CC12, CC17 (CGMCC No.3284), CC18, CS9, SC5, SC8, SS2, WC5, WM1, WX10, YS8, YX6	Ester, höhere Alkohole, flüchtige Säuren, Monoterpene, Norisoprenoide, flüchtige Phenole	(Liang <i>et al.</i> , 2013)
<i>D. bruxellensis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Kregervanrija fluxuum</i> , <i>C. stellata</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>W. anomalous</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>M. guilliermondii</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>Millerozyma farinosa</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodospiridium babjevae</i> , <i>Saccharomyces ludwigii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Ferulasäure, 4-Vinylguaiacol, 4-Ethylguaiacol	(Shinohara <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. cerevisiae</i> M522, KU1	Ester, Monoterpene, γ -Butyrolacton	(Carrau <i>et al.</i> , 2010)

Tabelle 1.2: Fortsetzung.

Mikroorganismen	Aromamerkmale	Quelle
<i>S. cerevisiae</i> VIN13, EC1118	Höhere Alkohole, Säuren, Ester; EC1118: Lösungsmittel, fettig, Ananas VIN13: Banane, fruchtig, hefig, grün	(Molina <i>et al.</i> , 2009)
<i>S. cerevisiae</i> A2-40, A3-2, A4-9, EC1118, BA11, ICV-K1, ICV-D254, RC212, L404, <i>H. uvarum</i> 1-03	Ester, Säuren, Alkohole, Terpene; (Z)-Ethyl-4-decenoat, (E)-Ethyl-3-decenoat, (Z)-Ethyl-3-decenoat	(Scacco <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. cerevisiae</i> PB2023, <i>Candida zemplinina</i> MCR-9, <i>T. delbrueckii</i> BB-MV:3FA5, <i>M. pulcherrima</i> MCR-24	Alkohol, Aldehyde, Lactone, Acetat, Ester, Fettsäuren	(Sadoudi <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. cerevisiae</i> (ISE 1; ISE 4; ISE 196; CBS 1171); <i>Saccharomyces bayanus</i> (ISE 250; ISE 949; CBS 4309); natürlicher Hybrid aus <i>S. cerevisiae</i> and <i>S. bayanus</i> , (S6U), <i>D. bruxellensis</i> (ISE 371; ISE 372; ISE 373; ISE 374); <i>H. uvarum</i> , ISE 1342; ISE 1336; ISE 308; ISE 345; ISE 346; CBS 479; <i>T. delbrueckii</i> (CBS 1146), <i>Debaryomyces carsonii</i> (ISE 302)	Fettsäuren, Benzeneide, flüchtige Phenole, Vaniline, Nor-Isoprenoide, Terpene	(Hernández-Orte <i>et al.</i> , 2008)
<i>D. bruxellensis</i> MUCL 11989, I E B SA, <i>H. uvarum</i> MUCL 21110, <i>K. fluxuum</i> MUCL 21120, <i>M. pulcherrima</i> MUCL 211816, <i>P. membranifaciens</i> MUCL 21134, <i>W. anomalus</i> MUCL 21153, 11 Stämme <i>S. cerevisiae</i> , <i>Kluuyveromyces thermotolerans</i> MUCL 28822, <i>T. delbrueckii</i> MUCL 21816, <i>Wickerhamomyces canadensis</i> MUCL 21122, <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> MUCL 1 1443, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> IEB	4- Vinylphenol, 4-Ethylphenol	(Chatonnet <i>et al.</i> , 1992)
34 Stämme der Gattungen <i>Candida</i> , <i>Torulasporea</i> , <i>Lachancea</i> , <i>Metschnikowia</i>	Ester, höhere Alkohole, organische Säuren, Carbonylverbindungen	(Comitini <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. membranifaciens</i> , <i>D. bruxellensis</i> , <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> var. <i>capensis/chevalieri/bayanus/cerevisiae</i>	Ester, höhere Alkohole, organische Säuren	(Mateo <i>et al.</i> , 1991)
25 Stämme <i>C. stellata</i> , 84 Stämme <i>H. uvarum</i> , 125 Stämme <i>Lachancea fermentati</i> , 27 Stämme <i>S. cerevisiae</i> , 25 Stämme <i>S. ludwigii</i>	Propanol; Isobutanol; Isoamylalkohol; Acetaldehyd; Acetoin; Essigsäure	(Romano <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>H. uvarum</i>	Höhere Alkohole, höhere Alkoholacetate, Ethylerster von Fettsäuren, Fettsäuren	(Andorrà <i>et al.</i> , 2012)

Die zu der Familie der Saccharomycetaceae gehörende *Kluyveromyces marxianus* (anamorph *Candida kefyr*) wird der Gruppe *Saccharomyces sensu lato* zugeordnet (Lachance, 2011). *K. marxianus* wurde im Jahr 1888 von E. C. Hansen beschrieben und nach Herrn Marx benannt, der die Hefe von Trauben isolierte. Dieser Stamm ist jedoch in keiner Stammsammlung mehr verfügbar. Daher wurde der von H. Schnegg im Jahr 1922 hinterlegte Stamm CBS 712^{NT} zum Neotypstamm erklärt (Fonseca *et al.*, 2008). Lachance (2011) zählt 72 verschiedene Synonyme für die Spezies *K. marxianus* auf (z. B. *Kluyveromyces fragilis*). *K. marxianus* wurde aus den unterschiedlichsten Substraten isoliert. Neben fermentierten Produkten wie Joghurt, Käse, Koumiss (fermentierte Eselsmilch), Teigen, Wein, Sorghum- oder Bantubier, wurde *K. marxianus* auch in Zuckerfabriken, Maismehl oder auf faulenden Blättern nachgewiesen. Auch auf klinischen Materialien wie Rachen, Lunge, Fäkalien oder der Euter einer Kuh mit Mastitis wurde *K. marxianus* nachgewiesen (Plata *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2008; Lachance, 2011). Trotzdem erhielt *K. marxianus* von der EFSA (2013) den QPS-Status und wird aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften wie Thermotoleranz (Nonklang *et al.*, 2008) und hohen Wachstumsraten biotechnologisch genutzt (Groeneveld *et al.*, 2009). Ein Beispiel für die Nutzung von *K. marxianus* ist die Fermentation von Molke zur Ethanolgewinnung (Zoppellari und Bardi, 2012). Ebenso eignet sich *K. marxianus* zur Herstellung von Biomasse oder SCP (Belem und Lee, 1998). Des Weiteren sind verschiedene endogene Enzyme wie β -Xylosidase (Rajoka, 2007), β -Galactosidase (Brady *et al.*, 1995), β -Glucosidase (Szczo drak, 2000), Inulinase (Singh *et al.*, 2007), Pektinase (Schwan *et al.*, 1997) oder Lactase (Schwan *et al.*, 1997) von großem Interesse. Zugleich wird das Potenzial von *K. marxianus* genutzt, um heterologe Proteine zu exprimieren (Hong *et al.*, 2007; Matsuzaki *et al.*, 2012). Zudem gilt *K. marxianus* als Crabtree-negativ, obwohl einige Studien die Produktion von Ethanol bei Anwesenheit von Sauerstoff zeigten (Lane *et al.*, 2011). Die Hefe kann auch eine Reihe von fruchtigen Aromen bilden (Fabre *et al.*, 1998; Medeiros *et al.*, 2001; Dujon *et al.*, 2004). *K. marxianus* wurde in verschiedenen Teigen nachgewiesen, gilt als an das Ökosystem Teig adaptiert (Hammes *et al.*, 2005) und wurde neben der Herstellung von Sauerteigen (Plessas *et al.*, 2008a; Plessas *et al.*, 2008b) auch direkt als Bäckerhefe verwendet (Caballero *et al.*, 1995; Dimitrellou *et al.*, 2009).

Wie *K. marxianus* gehört *Torulaspora delbrueckii* (anamorph *Candida colliculosa*) ebenfalls zu der Familie der Saccharomycetaceae. Das erste Mal wurde diese Spezies 1895 von Lindner beschrieben. Der Stamm CBS 1146^{NT} wurde von L. J. Wickerham identifiziert und von J. P. van der Walt zum Neotypstamm erklärt (Kurtzman, 2011b). Die Herkunft dieses Stammes ist allerdings unklar. In der Natur ist *T. delbrueckii* weit verbreitet. So konnten Stämme von

T. delbrueckii aus Wein, verschiedenen fermentierten Säften, aus Milch, Sorghumbrandy, Boden, Baumrinde, eingelegten Gurken, sowie von Gummimaterial einer Zuckerraffinerie isoliert werden (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman, 2011b). In der Klinik wurde *T. delbrueckii* nur vereinzelt nachgewiesen, wozu beispielsweise ihr Auftreten nach einer Hautverletzung oder die Infektion einer transplantierten Herzklappe zählen (Kurtzman, 2011b). Deshalb wurde *T. delbrueckii* der QPS-Status verwehrt (EFSA, 2013), während von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) getrocknete Torulahefen als „*Generally Recognized as Safe*“ (GRAS) anerkannt sind (FDA, 21 CFR §172.896). Dieser Widerspruch in der Sicherheitsbewertung liegt darin begründet, dass GRAS stammspezifisch und QPS speziesspezifisch vergeben werden. *T. delbrueckii* zeigt einen leichten Crabtree-Effekt (Merico *et al.*, 2007) und wird in der Biotechnologie im Bereich von Wein und Backwaren angewendet. Die Hefe zeichnet sich durch eine hohe Toleranz gegenüber osmotischem Stress aus und ihre Wachstumsrate sowie der Biomassertrag sind vergleichbar zu denen von *S. cerevisiae*. Die Eigenschaften von über 40 unterschiedlichen *T. delbrueckii*-Stämmen wurden in Abhängigkeit der Prozessparameter während der Weinfermentation untersucht und ihr Einfluss auf die Aromabildung wurde bestimmt (Hernández-Orte *et al.*, 2008; van Breda *et al.*, 2013). Bei Backwaren wurde *T. delbrueckii* in süßen und tiefgefrorenen Teigen untersucht (Ohshima *et al.*, 1987; Hernández-López *et al.*, 2007) und es konnte gezeigt werden, dass *T. delbrueckii* solche Prozeduren besser übersteht als *S. cerevisiae* (Alves-Araújo *et al.*, 2004). Bezüglich der Bildung von Aromastoffen konnten King *et al.* (2000) die Biotransformation von Monoterpenoiden durch *T. delbrueckii* zu aromaintensiven Komponenten zeigen.

Die Hefe *Wickerhamomyces anomalus* (anamorph *Candida pelliculosa*) gehört zu der Familie der Wickerhamomycetaceae. Erstmals wurde diese Spezies von E. C. Hansen im Jahr 1891 beschrieben, während der Neotypstamm CBS 5759^{NT} von F. W. Fabian aus unbekanntem Substrat isoliert wurde (Kurtzman, 2011c). *W. anomalus* ist in der Natur vor allem im Boden und in pflanzlichem Material weit verbreitet, wobei letzteres als ursprüngliches Habitat angesehen wird und beispielsweise die Mikroflora auf Blättern von zehn unterschiedlichen Bäumen dominierte (Slavikova *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde *W. anomalus* auf Johannisbeeren, Trauben, Äpfeln, Rohrzucker, Mirabellensirup, Getreide, Weizenmehl, Silage, Wein, Bier, Sauerteig, Sauerkraut, Melasse, geräucherter und fermentierter Wurst, gesüßter Milch, und als Kontamination in Gärungen und in Abwasser nachgewiesen. Zudem gilt *W. anomalus* als opportunistisches Pathogen für Mensch und Tier. Beispiele hierfür waren eine infizierte menschliche Lunge, menschliches Blut, der Kropf einer Taube und der Nachweis in Rindersperma (Barnett *et al.*, 2000; Pérez-Mendoza *et al.*, 2005;

Renouf *et al.*, 2007; Kurtzman, 2011c). Die als QPS für die Enzymproduktion eingestufte Hefe (EFSA, 2013) ist Crabtree-negativ (Fredlund *et al.*, 2004), zeigt eine hohe Osmotoleranz, vergärt Saccharose, assimiliert Raffinose, toleriert sowohl eine niedrige Wasseraktivität als auch extreme pH-Werte oder anaerobe Bedingungen (Kurtzman, 2011c). Dennoch hat *W. anomalous* biotechnologisch nur eine geringe Bedeutung. Bei der Vergärung von Kaffee- und Kakaobohnen ist sie am Abbau von Pektin aus pflanzlichem Gewebe beteiligt (Martelli und Dittmar, 1961; Masoud und Jespersen, 2006). Des Weiteren wurden verschiedene Enzyme beschrieben, die auch einen Einfluss auf die Aromabildung haben (z. B. Invertase, verschiedene Lipasen und eine β -D-Xylosidase (Rodriguez *et al.*, 1995; Ionita *et al.*, 1997; Manzanares *et al.*, 1999). In Bezug auf die Aromabildung konnte die Bildung von verschiedenen Acetatestern gezeigt werden, welche teilweise auch das Weinaroma verbessern können (Rojas *et al.*, 2001; Kurita, 2008). Aus belgischem Sauerteig wurde *W. anomalous* häufig isoliert und gilt daher als wettbewerbsfähig bei der Teigherstellung (Daniel *et al.*, 2011). Allerdings beschreiben andere Studien den Verderb von Backwaren (Lanciotti *et al.*, 1998) oder Bier (Timke *et al.*, 2008) durch *W. anomalous*, während diese Hefe umgekehrt durch die Bildung eines Killertoxins den Verderb von Lebensmitteln durch Hefen und Schimmelpilze hemmen kann. So vermuten Comitini *et al.* (2004), dass durch die Präsenz von *W. anomalous* der durch *Dekkera* sp. verursachte Weinefehler verhindert werden kann. Ebenso wurde der Schutz von grünen Oliven gegen Schimmelpilze und unerwünschte Hefen (Hernandez *et al.*, 2008) oder während der Lagerung von Äpfeln (Haissam, 2011) und Getreide (Björnberg und Schnürer, 1993) sowie gegen *Candida albicans* (Mathews *et al.*, 1998) untersucht. Aufgrund ihrer Bedeutung in der Biokontrolle von Lebensmitteln und ihrem Einsatz in verschiedenen Fermentationsprozessen wurde das Genom von *W. anomalous* als Grundlage für weitere Forschungen sequenziert (Schneider *et al.*, 2012).

Diese Diversität der Hefen aus den unterschiedlichsten Habitaten beinhaltet ein großes Potenzial zur Aromabildung. Eine gründliche Untersuchung dieser Hefen und ihrer an der Aromabildung beteiligten Stoffwechselwege sollte ihre gezielte Nutzung ermöglichen.

1.4 Stoffwechselwege der Aromaproduktion durch Hefen

Trotz der in Kapitel 1.3 dargestellten Diversität der Hefen nutzen sie ähnliche primäre Stoffwechselwege zur Aromaproduktion. So werden Zucker, Lipide und Proteine zu zentralen Stoffwechselmetaboliten wie Pyruvat, Acetyl-CoA, kurzkettigen Fettsäuren, Ketonen, Aldehyden, höheren Alkoholen, Schwefelverbindungen oder phenolischen Verbindungen

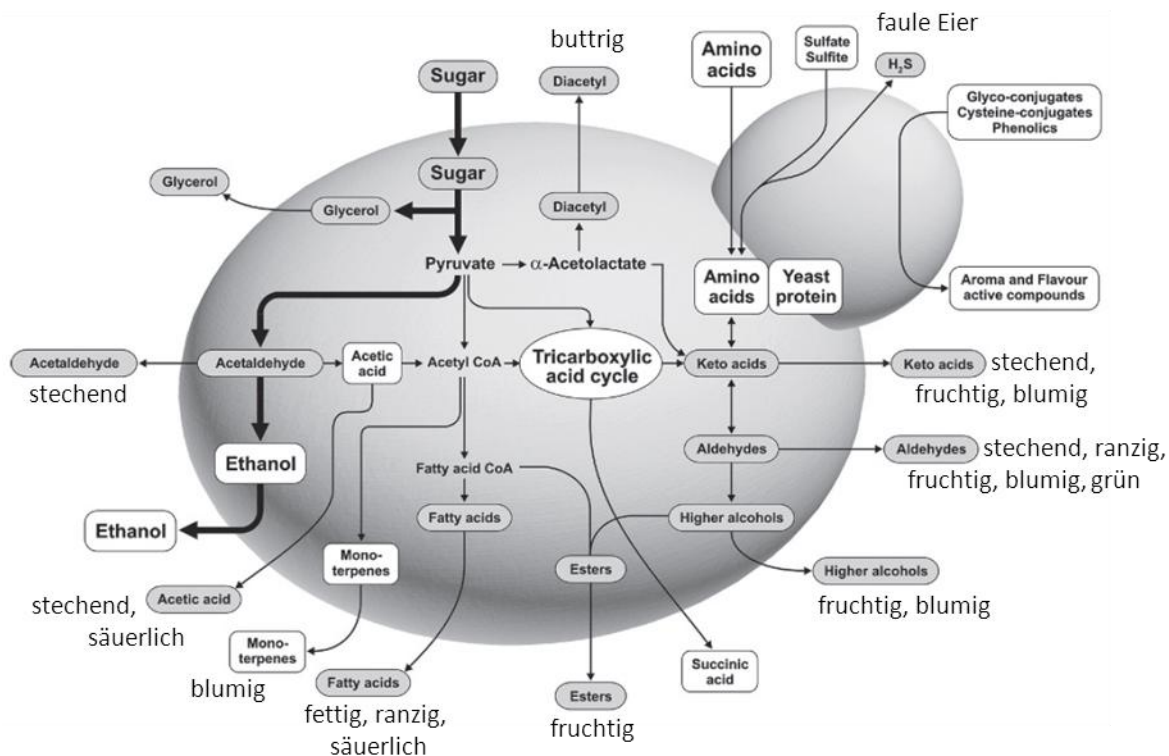


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht der aromaaktiven Metabolite beim Abbau von Zuckern, Aminosäuren und Schwefelverbindungen in *S. cerevisiae* (modifiziert nach Bartowsky *et al.*, 2009).

abgebaut. Eine Übersicht des Metabolismus von *S. cerevisiae* ist beispielhaft in Abbildung 1.2 dargestellt. Teilweise sind die primären Metabolite bereits selbst aromaaktiv. So werden Aldehyde für Gerüche nach Nuss, Apfel oder Citrus verantwortlich gemacht (Swiegers *et al.*, 2005). Ebenso sind Carbonsäuren in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge aromaaktiv. Solche Verbindungen werden als stechend, nach Essig riechend, und als ranzig oder sauer beschrieben (Feron und Waché, 2005; Borneman *et al.*, 2009).

Unterschiede in der *de novo*-Synthese von Aromastoffen durch verschiedene Hefen treten vor allem bei Produkten des Sekundärstoffwechsels auf. Als Beispiel sei hier die Synthese von Terpenen und Estern genannt. Terpene haben einen fruchtig-blumigen Geruch und können nur von wenigen Hefen *de novo* hergestellt werden. Neben *S. cerevisiae* zählen hierzu *Ambrosiozyma monospora*, *Kluyveromyces lactis*, *C. stellata*, *M. pulcherrima* und *T. delbrueckii* (King und Dickinson, 2000; Carrau *et al.*, 2005). Die aus der Kondensationsreaktion von Acetyl-CoA gebildeten Isopreneinheiten sind die Grundlage für die *de novo*-Synthese von (Mono-)Terpenen. Jedoch konnten die an diesem Stoffwechsel beteiligten homologen Schlüsselenzyme in der Arbeit von Carrau *et al.* (2005) in *S. cerevisiae* nicht gefunden werden.

Die Biosynthese von höheren Alkoholen und Estern ist in Hefen dagegen sehr gut untersucht. So beschrieb Ehrlich (1904) bereits den nach ihm benannten Stoffwechselweg, der auch als Aminosäuregärung bekannt ist. Er beschreibt den Abbau von Aminosäuren durch eine Transaminierung zur α -Ketosäure, die anschließende Decarboxylierung zum Aldehyd, sowie die darauffolgende Reduktion zum Alkohol. Wird das Aldehyd stattdessen oxidiert entsteht eine Carbonsäure (siehe Abbildung 1.3). In *S. cerevisiae* sind an diesem Stoffwechselweg drei Aminotransferasen, fünf Decarboxylasen und sechs Dehydrogenasen beteiligt. Die Enzymaktivitäten werden dabei genau kontrolliert und hängen beispielsweise von der abzubauenen Aminosäure, der Wachstumsphase der Hefe und der zum Wachstum verwendeten C-Quelle ab (Swiegers *et al.*, 2005). Einige der während der Aminosäuregärung entstandenen Produkte können in einem weiteren Schritt zur Synthese von Estern verwendet werden. Ester sind sehr aromastarke Verbindungen, welche aus der gleichzeitigen Bildung von Alkohol und aktivierten Fettsäuren entstehen (siehe Abbildung 1.4). Das Aroma von aus kurz- bis mittelkettigen Fettsäuren gebildeten Estern wird als fruchtig beschrieben (Saerens *et al.*, 2006). Die an ihrer Bildung beteiligten Alkoholacyltransferasen sind spezifisch jeweils für die verwendeten Fettsäuren und Alkohole. So wurden in *S. cerevisiae* zwei unterschiedliche Alkoholacetyltransferasen identifiziert, Atf1 und Atf2, die die Bildung von Acetatestern katalysieren (Lilly *et al.*, 2000). Ein Homolog zu Atf1 wurde in *S. pastoriensis* gefunden und entsprechend als Lg-Atf bezeichnet (Yoshimoto *et al.*, 1998). Weitere orthologe Enzyme zu Atf1 und Atf2 wurden in verschiedenen Spezies von *Saccharomyces*, in *C. glabrata*, *K. lactis*

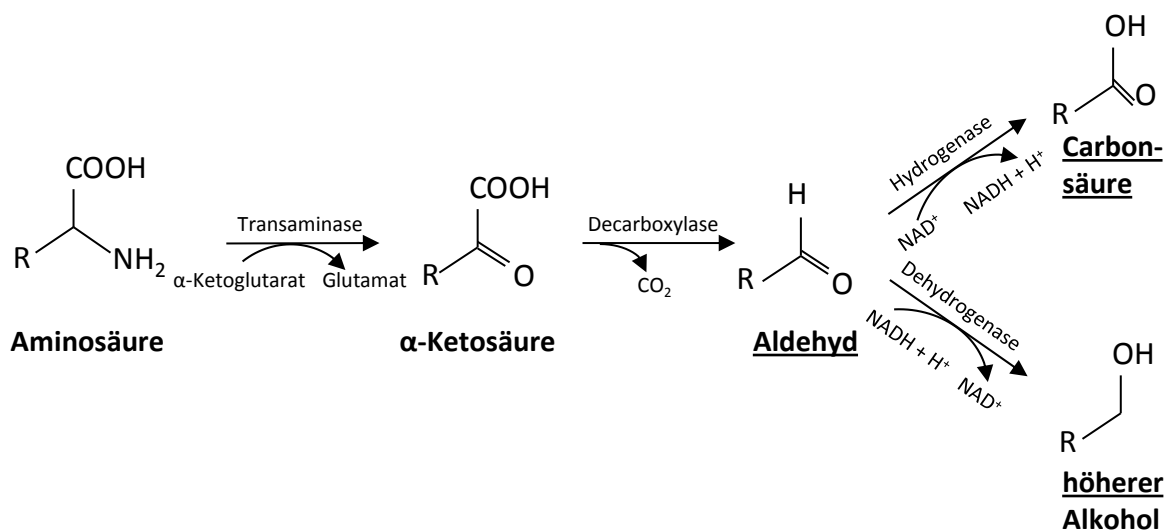


Abbildung 1.3: Allgemeines Schema des Ehrlich-Weges zum Abbau von Aminosäuren. Die Aminosäuregärung über den Ehrlich-Weg führt zur Bildung von höheren Alkoholen oder deren Carbonsäuren. Aromaaktiv sind sowohl die Aldehyde, Ketosäuren und Alkohole der verzweigten Aminosäuren (Leucin, Valin, Isoleucin), aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) oder der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin, als auch die Abbauprodukte von Aspartat (modifiziert nach Ardö, 2006).

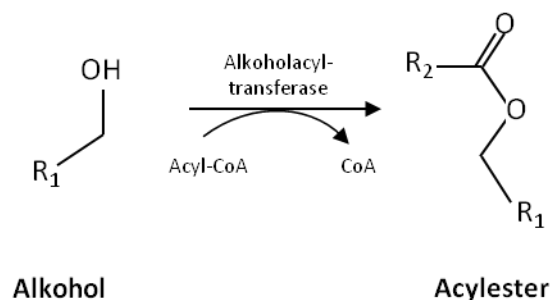


Abbildung 1.4: Allgemeines Schema der Bildung von Estern aus Alkohol und aktivierten Fettsäuren.

und *Kluyveromyces waltii* identifiziert (Van Laere *et al.*, 2008). Neben den Acetat-Estern stellen die Ethylester eine weitere Gruppe fruchtiger Aromastoffe dar. Das für die Synthese von Ethylestern mit mittelkettigen Fettsäuren benötigte Schlüsselenzym wird in *S. cerevisiae* durch das Gen *EEB1* kodiert (Saerens *et al.*, 2006). Welche Ester genau von welchem Enzym gebildet werden ist meist noch unklar. Neben den entsprechenden Enzymen spielen auch das Substrat und die Reaktionsumgebung eine entscheidende Rolle (Liu *et al.*, 2004). So stellten Malcorps *et al.* (1992) fest, dass Isoamylacetat nur während des exponentiellen Wachstums gebildet wird und beobachteten eine verstärkte Estersynthese unter anaeroben Bedingungen. Verschiedene Hypothesen versuchen zu erklären, warum Hefen überhaupt Ester synthetisieren. Zum einen entsteht beim Abbau von Fettsäuren ein Überschuss an freien mittelkettigen Fettsäuren, welcher sich toxisch auf den Hefemetabolismus auswirkt (Bardi *et al.*, 1998). Durch die Veresterung kann die Konzentration der freien mittelkettigen Fettsäuren gesenkt werden (Nordström, 1962). In einer anderen Studie wurde ein Zusammenhang zum anaeroben Zuckermetabolismus auf den Hefemetabolismus gezeigt, bei dem kein toxischer Effekt beobachtet wurde (Peddie, 1990). In der Arbeit von Thurston *et al.* (1982) wird die Estersynthese als eine Möglichkeit gesehen, um das Verhältnis zwischen Acyl-CoA und freiem CoA zu regulieren. Verschiedene Acyl-CoA-Verbindungen sind an der Biosynthese von Fettsäuren, Fetten und Aminosäuren sowie an Reaktionen des Citratzyklus beteiligt (Nordström, 1964). Da die Hefen zu Beginn der Gärung die Acyl-Verbindungen und die Energie für das Zellwachstum benötigen, werden nach dieser Hypothese die Ester im Wein vorwiegend in der mittleren Gärungsphase nach etwa 20 - 30 Stunden gebildet. Im späteren Fermentationsverlauf fehlt der Hefe die Energie für die weitere Esterproduktion (Swiegers *et al.*, 2005). Die energiereichen Esterverbindungen können aber auch von Esterasen im Laufe der Gärung wieder gespalten werden (Plata *et al.*, 1998). Die tatsächliche Esterkonzentration wird also sowohl durch die Synthese durch Alkoholacyltransferasen als auch durch den Abbau mithilfe von Esterasen bestimmt. Es wird vermutet, dass die synthetischen Enzyme

hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Dies zeigen die Deletions- und Überexpressionsstudien am Beispiel von *S. cerevisiae* *ATF1* und *ATF2* (Fujii *et al.*, 1994; Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003; Lilly *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde auch das homologe *KlATF*-Gen aus *K. lactis* zur heterologen Expression in *S. cerevisiae* verwendet, um mögliche Änderungen im Aromaspektrum zu erzeugen (Van Laere *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen ergaben, dass die Überexpression von *S. cerevisiae* *ATF1* einen stärkeren Einfluss als *S. cerevisiae* *ATF2* und *K. lactis* *ATF* auf eine Erhöhung der Konzentration von Acetateestern hat.

1.5 Nebenströme der Lebensmittelindustrie

Das Aroma von Weizenteigen kann durch den Einsatz von alternativen Hefen und die Variation der Prozessparameter verbessert werden. Jedoch wird die Vielfalt der gebildeten Aromen durch die in den Rohstoffen enthaltenen Vorstufen begrenzt (Vandamme und Soetaert, 2002). Zur Aromaverbesserung können entsprechende Vor- und Zwischenstufen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zugesetzt werden. Darunter versteht man hauptsächlich die festen Rückstände, die nach der Saftgewinnung aus Obst oder Gemüse übrig bleiben. Beispiele hierfür sind z. B. Apfel-, Karotten- oder Traubentrester. Bei der Obst- und Gemüseverarbeitung fallen diese Nebenströme in Europa mit 30 Mio t/Jahr an (Bioazul, 2008). Aber auch bei der Bierherstellung entstehen große Mengen an Nebenströmen, die zu 75 - 80 % aus Biertreber gewonnen werden, mit einer Gesamtproduktion von 2,8 Mio t pro Jahr (Dehoust *et al.*, 2007). Derzeit werden diese Nebenströme in unterschiedlichen Mengen unterschiedlich verwertet, unter anderem als Tierfutter, Dünger oder in Biogas-Anlagen (Bioazul, 2008). Als weitere wirtschaftliche Möglichkeit bietet sich der Einsatz der Nebenströme für die Herstellung von neuartigen Produkten (z. B. als multifunktionale Zutaten in Fruchtsäften oder Backwaren) oder zur Biokonversion während der Festbett-Fermentation an, um fruchtige Lebensmittelaromen zu gewinnen (Laufenberg *et al.*, 2003). So zeichnet sich **Apfeltrester** durch seinen hohen Gehalt an Polyphenolen und Ballaststoffen wie Pektin aus (Schieber *et al.*, 2003; Sudha *et al.*, 2007). Die Polyphenole wirken nicht nur antimikrobiell (Tajkarimi *et al.*, 2010), sondern es wird ihnen auch eine positive Wirkung auf den menschlichen Organismus zugeschrieben (Lu und Foo, 2000; Daglia, 2012). Zur Wertsteigerung des Apfeltresters werden die enthaltenen Pektine extrahiert (Wang *et al.*, 2007; Kumar und Chauhan, 2010; Min *et al.*, 2010) und zum Teil bereits in Backwaren eingesetzt (Weiss, 1981). Beispielsweise wurde auch getrockneter Apfeltrester unfermentiert auf seine rheologischen und sensorischen Auswirkungen auf Weizenbrot (Masoodi und

Chauhan, 1998) oder Kuchen (Masoodi *et al.*, 2002; Sudha *et al.*, 2007) untersucht. Andererseits könnte Apfeltrester aufgrund seines hohen Anteils an fermentierbaren Zuckern auch als Substrat zur Herstellung von Backhefe verwendet werden (Joshi und Bhushan, 2003). Auch die Gewinnung von Aromastoffen aus Apfeltrester mithilfe von Enzymen oder Pilzen aus der Gruppe der Basidiomyceten wurde untersucht (Almosnino *et al.*, 1996; Bosse *et al.*, 2013).

Bei den Ballaststoffen des **Karottentresters** handelt es sich vor allem um Lignin und Cellulose, mit einem kleineren Anteil von Pektin (Nawirska und Kwasniewska, 2005). Zusätzlich findet man verschiedene Mineralstoffe (Tańska *et al.*, 2007), einen hohen Gehalt an Carotinoiden (bis zu 2 g/kg Trockenmasse) sowie Vitamin A und B (Singh *et al.*, 2006). Diese Eigenschaften machen den Einsatz von Karottentrestern in hochwertigen Lebensmitteln interessant (Singh *et al.*, 2006). So schlugen Stoll *et al.* (2003) den Einsatz von hydrolysierten Karottentrestern als funktionalen Getränkezusatz vor. Aber auch die Verwendung von Karottentrester in Brot (Tańska *et al.*, 2007), Kuchen und Salatsößen wurde untersucht (Schieber *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2012). Die Ballaststoffe wurden auch in getrockneter fermentierter Wurst verarbeitet (Eim *et al.*, 2008).

Traubentrester zeichnet sich ebenfalls durch einen hohen Ballaststoffanteil aus. Etwa 7 % des Frischgewichts bestehen aus Fetten, wobei die enthaltenen Fettsäuren zu über 60 % vielfach ungesättigte Fettsäuren sind (Yi *et al.*, 2009). Es konnten 38 unterschiedliche Aromakomponenten identifiziert werden, wobei die Gruppe der Ester den stärksten Beitrag zum Gesamtaroma hatte (Ruberto *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurden 17 unterschiedliche phenolische Verbindungen gefunden, mit einem hohen Anteil an Polyphenolen (Lu und Foo, 1999). Hierzu gehören (Bio-) Flavonoide (Wulf und Nagel, 1980; Foo *et al.*, 1998), Anthocyane (Ayed *et al.*, 1999), Proanthocyanidine (Khanal *et al.*, 2010), Tannine (Ping *et al.*, 2011), Catechin (Lu und Foo, 1999) sowie Phenolsäuren (Singleton *et al.*, 1978). Diesen Verbindungen werden die antioxidativen Eigenschaften des Traubentresters zugeschrieben (Ruberto *et al.*, 2007; Rockenbach *et al.*, 2011). Antimikrobielle Effekte des Tresters auf *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurden von Sagdic *et al.* (2012) beobachtet. In Italien wird Grappa durch die Vergärung von Traubentrester hergestellt. Bei dieser Gärung wurde die Zusammensetzung der Mikroflora untersucht (Bovo *et al.*, 2012) und die Dominanz von sogenannten Nicht-*Saccharomyces*-Hefen nachgewiesen. Milchsäurebakterien wurden erst in einer späteren Phase der Grappaherstellung in größeren Mengen gefunden (Maragkoudakis *et al.*, 2013). Weitere Beispiele für die Nutzung von Traubentrester ist der

Einsatz in Keksen (Romero *et al.*, 2004), Joghurt und Salatsoßen (Tseng und Zhao, 2013), oder auch in Burgern aus Schweinefleisch (Garrido *et al.*, 2011), sowie in Frikadellen aus Hühnerfleisch (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2009).

Schließlich hat der **Biertreber** im Vergleich zu den beschriebenen Treestern den höchsten Proteingehalt mit 20 - 25 % der Trockenmasse (Abasiakong 1991; Celus, Brijs *et al.* 2007). Ähnlich wie die Trester enthält der Treber einen hohen Anteil an Ballaststoffen, die vor allem aus Lignin und Cellulose bestehen (53,5 % der Trockenmasse, Chaudhary und Weber, 1990; Mussatto *et al.*, 2008; Pierre *et al.*, 2011). Die im Trester noch enthaltenen Zucker sind vor allem Pentosen wie Xylulose und Arabinose (15 % bzw. 8 % der Trockenmasse; Bartolomé *et al.*, 2002). Zudem ist der Treber noch reich an Mineralstoffen und enthält verschiedene Hydroxyzimtsäuren wie z. B. Ferulasäure (Rasco *et al.*, 1990; Bartolomé und Gómez-Cordovés, 1999; Mussatto *et al.*, 2007; Xiros *et al.*, 2009). Die Mikroflora zeigt eine starke Abhängigkeit des frischen Trebers von der Bezugsquelle und kann eine starke Belastung aufweisen (Robertson *et al.*, 2010). Die Verwendung von Biertreber wird für die verschiedensten Anwendungen diskutiert, u. a. für die Ethanolherstellung mit Hilfe des Pilzes *Neurospira crassa* (Xiros *et al.*, 2008) oder für die Immobilisierung von Mikroorganismen und anschließende Verwertung zum Brotbacken (Plessas *et al.*, 2007).

Eine Voraussetzung für den Einsatz der Nebenströme in Lebensmitteln ist, dass sie die Kette der Lebensmittelverarbeitung nicht verlassen dürfen. Dies ist zur Zeit beispielsweise bei der großtechnischen Saftgewinnung noch nicht der Fall. Auch die Herkunft der verarbeiteten Früchte ist ein Faktor, der bei der Verwendung von Nebenströmen bekannt sein sollte. So werden häufig Pestizide bei deren Produktion eingesetzt, die in der Regel auf der Schale der Früchte verbleiben und sich bei der Saftherstellung im Trester anreichern. Obwohl also der nachhaltige Einsatz der Nebenströme in der Lebensmittelproduktion eine Wertsteigerung darstellen würde, ist hier noch viel Entwicklungsarbeit zu leisten. Vor allem beim Einsatz von Hefen in der Fermentation von Lebensmitteln könnten die Nebenströme sowohl als Substrat als auch zur Bereitstellung von Aromavorstufen dienen.

1.6 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte das metabolische Potenzial von alternativen Hefen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Aromabildung untersucht werden. Als Modellsystem diente hierbei die Fermentation von Weizenteigen. Um das Angebot an Aromavorstufen zu erhöhen, wurden den Teigen unterschiedliche Nebenströme der Lebensmittelindustrie (Apfel-, Karotten- und Traubentrester, Biertreber) zugesetzt. Auch der Einfluss der Nebenströme auf die Mikroflora im Verlauf der Fermentation von Brotteigen sollte untersucht werden, mit dem Ziel, die Wettbewerbsfähigkeit bisher untypischer Mikroorganismen zu steigern. Unter Gewährleistung der mikrobiellen Stabilität sollten die Prozessparameter der Fermentation hinsichtlich einer verbesserten Aromabildung optimiert werden. Nach Auswahl der für die Fermentation geeigneten Hefe-Substrat-Kombination sollten die rheologischen Eigenschaften der Teige charakterisiert und die Übertragbarkeit der während der Fermentation entstandenen Aromen ins Brot überprüft werden. Um die molekularen Grundlagen der Aromabildung gezielt zu beeinflussen, sollten darüber hinaus zwei für Aromaenzyme kodierende Gene aus der Weinhefe *H. uvarum* mithilfe gentechnischer Methoden in *K. marxianus* und *K. lactis* überexprimiert und der Effekt auf das Aroma beobachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

In dieser Arbeit verwendete Geräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelkammer Multisub choice trio und Zubehör	Biostep GmbH (Jahnsdorf)
Analysewaage ABS 220-4	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Autoklav VX-95	Systec GmbH (Wettenberg)
Bäckerofen Euromat B4	Wiesheu (Wolfen)
Brotbackautomat Backmeister Skala	Unold (Hockenheim)
DCode™ Universal Mutation Detection System zur Durchführung von DGGE, mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Fermentationsbecher Büchse mit Deckel	Bochem Instrumente GmbH (Weilburg)
Fermenter Minifors	Infors GmbH (Einsbach)
Gärschrank GS2	Wiesheu GmbH (Affalterbach)
Geldokumentationssystem AlphaImager EP	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Heizmagnetrührer RCT basic IKAMAG safety control	IKA-Werke GmbH und Co. KG (Staufen)
iCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Konvektomat Joker B – GN	Eloma (Maisach)
Küchenmaschine Artisan®, KitchenAid	Whirlpool Corporation, Benton Harbor, USA)
Kühlinkubator	Binder GmbH (Tuttlingen)
Laborhomogenisator BagMixer 400 P	Interscience (Paris, Frankreich)
Labor-pH-Meter HI 221	Hanna Instruments Deutschland GmbH (Kehl am Rhein)
Labor-pH-Meter LAB850SET INK Blueline	SI Analytics GmbH (Mainz)
Phasenkontrastmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Magnetheizrührer	IKA-Werke GmbH und Co. KG (Staufen)
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
Messermühle GM 200	Retsch GmbH (Haan)
Messknetter	Brabender GmbH & Co. KG (Duisburg)
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Mixer 3Mix 8000	Krupps GmbH (Offenbach/Main)
Objektiv „A-Plan“; 10 ×-, 20 ×-, 40 ×- bzw. 100 ×- Vergrößerung	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Odyssey Scanner	Li-Cor Biotechnology (Bad Homburg)
Photometer GeneQuant 1300 classic	GE Healthcare GmbH (Solingen)
pH-Redox-Messgerät pH1140	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Pipettierhilfe accu jet	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim)
Präzisionswaage EG 4200-2 NM	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Rheometer AR 2000	TA Instruments (New Castle, USA)
Schüttelinkubator Ecotron	Infors GmbH (Einsbach)
Schüttelinkubator RC-TK, Typ 87317	Infors GmbH (Einsbach)
Schüttelinkubator Typ 3033	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Spannungsquelle PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

Tabelle 2.1: Fortsetzung.

Gerät	Hersteller
Spiralplater WASPZ	Meintrup DWA Laborgeräte GmbH (Löhden - Holte)
Temperaturmessgerät 922	Testo AG (Lenzkirch)
Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Tiefsttemperatureinheit (-80 °C-Schrank)	Panasonic Marketing Europe GmbH (Wiesbaden)
Heraeus Umluftwärmeschrank UT 5060 E	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bremen)
Vakuumschweißgerät C 200	Multivac Sepp Haggenmüller GmbH & Co. KG (Wolfertschwenden)
Vakuumtrockenschrank	Binder GmbH (Tuttlingen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasseraktivitäts-Präzisionsmeßgerät aw Lab	SE Schulz Electronic (Höhenkirchen)
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach)
Zählkammer nach Thoma, doppelt	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim)
Zelldichtemessgerät Ultraspec 10	GE Healthcare GmbH (Solingen)
Zentrifugalmühle ZM1	Retsch GmbH (Haan)
Zentrifuge Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen)
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bremen)

2.1.2 Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme zur Datenauswertung und -Analyse, Textverarbeitung sowie Literaturrecherche sind mit Angaben des Herstellers und ihres Verwendungszwecks in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2: Verwendete Programme zur Datenauswertung und -Analyse, Textbearbeitung sowie Literaturrecherche.

Programm	Hersteller	Anwendung
CloneManager	Scientific & Educational Software	Planung von Klonierungen
Bioedit	Hall (1999)	Analyse der Sequenzierungsergebnisse
Chromas lite	Technelysium Pty Ltd	Analyse der Sequenzierungsergebnisse
CorelDraw	Corel Corporation	Bildbearbeitung
Iris	Infors	Dokumentation der mit dem Minifors (Infors) Tischfermenter durchgeführten Fermentationen.
Office 2010	Microsoft Inc., USA	Text- und Datenverarbeitung
PVC	GE Healthcare GmbH	Dokumentation und Auswertung der gemessenen Absorption
AlphaImager EP	Cell Biosciences, Inc.	Dokumentation der mit dem Geldokumentationssystem erhaltenen Gelbilder
Endnote X4	Thomson ISI ResearchSoft, Stamford, USA	Literaturverwaltung
AxioVision 4	Carl Zeiss Vision	Analyse mikroskopischer Bilder
SigmaPlot	SPSS Inc.	Auswertung von Daten, Erstellung von Abbildungen
Origin 7	OriginLab Corporation	Auswertung von Daten, Erstellung von Abbildungen
Rheostar	Franke <i>et al.</i> (1995)	Rheologische Auswertung

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), BD (Franklin Lakes, USA), Bio-Rad (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Brand (Gießen), Difco (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Steinheim), GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Neolab (Heidelberg), Omnilab (Bremen), Riedel-de Haën (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Schott (Mainz), Serva (Heidelberg) Sigma (Steinheim) und Technolab (Herne) bezogen.

2.1.4 Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Nutzung der Kits nach den Angaben des Herstellers.

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Kit	Hersteller
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
Gene-Jet PCR Purification Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
E.Z.N.A Bacterial DNA Kit	Omega Bio-Tek (Norcross, USA)
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)

2.1.5 Standards

Zur Größenabschätzung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Der für die PCR-DGGE verwendete Marker wurde selbst entwickelt und ist im Ergebnisteil beschrieben.

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) bezogen und sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') ^a	Quelle
GC-clamp ^b	cgcccggggcgcgccccggggcgccccggggcaccggggg	(Walter <i>et al.</i> , 2001)
GM3f	AGAGTTTGATCMTGGC	(Muyzer <i>et al.</i> , 1995)
GM4r	TACCTTGTTACGACTT	(Muyzer <i>et al.</i> , 1995)
HuATFforBamHI	cgcaggatccATGCTTACGCTTTCGGATGTTC	diese Arbeit
HuATFrwSalI	cgcgtcgacCTAAATGTTATCGATGTCTTG	diese Arbeit
Hu EEB1seq	GGATGTGCCAGAACCAAGATTATG	diese Arbeit
L1	CAGCAGTAGGGAATCTTCC	(Meroth <i>et al.</i> , 2003b)
Lab-0677	CACCGCTACACATGGAG	(Heilig <i>et al.</i> , 2002)
LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACTC	(Cocolin <i>et al.</i> , 2002)
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	(Kurtzman und Robnett, 1998)
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	(Kurtzman und Robnett, 1998)
Universal M13 reverse	AGCGGATAACAATTCACACAGG	Gibco-BRL, Life Technologies
Universal M13 forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	Gibco-BRL, Life Technologies
806r	GGACTACCAGGGTATCTAAT	(McBain <i>et al.</i> , 2003)

^a Großbuchstaben stellen die komplementären Bereiche der Zielsequenz dar, mit Kleinbuchstaben markierte Bereiche binden nicht an die Zielsequenz, die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen.

^b Für die PCR-DGGE wurde die GC-clamp an das 5'-Ende von NL1 und L1 gesetzt.

2.1.7 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme zur Restriktion von Nukleinsäuren wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen. Klonierungen erfolgten mithilfe der „T4 DNA Ligase“ der Firma New England Biolabs. Zur Amplifikation von PCR-Produkten wurden die „Dream Taq DNA Polymerase“ sowie der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ der Firma Fermentas GmbH verwendet. Zur Optimierung der Fermentation wurden die in Tabelle 2.5 angegebenen Enzyme von der Firma Novozymes (Dittingen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.5: Eigenschaften der Enzympräparate der Fa. Novozymes, die für die Fermentationen verwendet wurden

Produkt	Enzymaktivität	Produktionsorganismus	Nebenaktivität	Dosierung (ppm)	pH Optimum
NS27246	Glucoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i>	-	10-50	3,5-7
NS27277	Exo-1,3-β-glucanase	<i>Trichoderma harzianum</i>	-	100-500	2-5
NS27264	Pectinlyase	<i>Aspergillus niger</i> / <i>Aspergillus aculeatus</i>	Polygalacturonase, Xylanase	50-150	3-5,5
NS27162	Pectinmethylesterase	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	1000-2000	2-5,5
NS27141	Laccase	<i>Myceliophthera thermophila</i>	-	1000-2000	5-6
NS27006	Exo-peptidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Protease, Amylase	100-300	4,5-8
NS27229	Cellulase (Cellobiohydrolase/Endoglucanase)	<i>Trichoderma reesei</i>	Endo-Xylanase, L-Arabinofuranosidase, β-Xylosidase	100-300	4-6
NS27253	Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>		300-500	3-5

2.1.8 Antikörper

In Tabelle 2.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt. Neben der Bezeichnung der Antikörper sind der Organismus, aus dem die Antikörper gewonnen wurden, sowie die verwendeten Verdünnung angegeben.

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Organismus	Verdünnung	Hersteller
anti-HA	Maus	1 : 10000	A. Lorberg, pers. Mitteilung
anti-Kaninchen	Esel	1 : 5000	Rockland, 611-730-127
anti-Maus	Ziege	1 : 5000	Li-Cor, 926-32210
anti-Pfk1	Kaninchen	1 : 20000	J. J. Heinisch, pers. Mitteilung

2.1.9 Medien

Die Einstellung des pH-Wertes der Kulturmedien erfolgte mit 1 M HCl- bzw. 1 M NaOH-Lösungen. Die Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Zur Filtersterilisation von Lösungen wurden Sterilfilter mit der Porengröße 0,2 µm genutzt. Die Herstellung fester Medien erfolgte durch die Zugabe von 15 g Agar-Agar pro Liter Medium. Zur Identifizierung von verschiedenen Kolonietypen wurde den Nährböden 0,025 g/l Bromkresolgrün hinzugefügt.

Fermentationsgrundmedium

Hefeextrakt	4,5 g
Pepton	7,5 g
Bromkresolgrün	0,025 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l

Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar)

VRBD-Agar	38,5 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l

Nach dem Suspendieren wurde das Medium unter Rühren bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Das Medium wurde nicht autoklaviert.

Luria–Bertani (LB; Sambrook *et al.*, 2001).

Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 7,0	

Zur selektiven Anzucht von plasmidhaltigen Zellen wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben.

mMRS (modifiziert nach De Man *et al.*, 1960)

Pepton	10 g
Fleischextrakt	8 g
Hefeextrakt	4 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,62 g
Triammoniumcitrat	2 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,2 g
Mangansulfat	0,04 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 6,2	

mMRS5 (De Man *et al.*, 1960; Stolz *et al.*, 1995, modifiziert)

Trypton	10 g
Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	5 g
Maltose	10 g
Fructose	5 g
Glucose	5 g
$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	2,6 g
KH_2PO_4	4 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,1 g
$MnSO_4$	0,05 g
Cystein-HCl	0,5 g
Tween 80 [®]	1 g
Vitaminstammlösung	1 ml
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 5,8	

Für die selektive Bestimmung von Milchsäurebakterien aus Teigen wurden dem Medium 0,5 g/l Delvocid (DSM – Food Specialties, NL; enthält Natamycin) und 5 g/l Natriumacetat zugesetzt.

Vitaminstammlösung

Thiamin	10 mg
Niacinamid	10 mg
Folsäure	10 mg
Pyridoxal	10 mg
Pantothensäure	10 mg
Cobalamin	10 mg
Aqua _{deion.}	ad 50 ml
pH 5,8	

Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm)

Standard I

Pepton	15 g
Hefeextrakt	3 g
NaCl	6 g
Glucose	1 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 7,5	

Synthetisches Minimalmedium (SM)

Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB)	6,7 g
Glucose	20 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 6,2	

Synthetisches Komplettmedium (SC)

Dem Medium SM wurden Aminosäuren und Basen nach Zimmermann (1975) zugesetzt.

Tryptone - Yeast extract - Magnesium (TYM)

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0.5 %
NaCl	0.1 M
MgCl ₂	0.01 M
Aqua _{deion.}	ad 1 l

Yeast extract - Glucose - Chloramphenicol (YGC; Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 1980)

Glucose	20 g
Hefeextrakt	5 g
Chloramphenicol	0,1 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 6,6 ± 0,2	

Für Medien der Stammhaltung bzw. zur selektiven Bestimmung von Hefen aus Teigen wurden 0,1 g/l Chloramphenicol zugesetzt.

Yeast extract – Glucose (YG)

Glucose	20 g
Hefeextrakt	5 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l
pH 6,6 ± 0,2	

Yeast extract - Peptone - Dextrose (YEPD)

Glucose	20 g
Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Aqua _{deion.}	ad 1 l

2.1.10 Fermentationssubstrat

Für die Fermentationen wurden die in Tabelle 2.7 dargestellten Fermentationssubstrate verwendet. Der Apfeltrester der Charge 1 war bereits fein vermahlen, während der Biertreber, der Karottentrester (Wesergold und Ernteband) sowie die weiteren Chargen des Apfeltresters

in der Zentrifugalmühle mit Ringsieb (1 mm) vermahlen wurden. Die frischen Traubentrester (Riesling, weißer Burgunder, Portugieser) wurden mit Hilfe der Messermühle zerkleinert und für die Fermentation eingesetzt. Der restliche Traubentrester wurde im Umluftwärmeschrank für 24 h bei 50 °C getrocknet und anschließend in der Zentrifugalmühle mit Ringsieb (1 mm) vermahlen. Die Nebenströme wurden zu je 200 g in Polypropylen-Beuteln vakuumverpackt und bei - 20 °C gelagert.

Der frische Karottentrester der Charge 2 enthielt folgende Inhaltsstoffe: 82,8 % Wasser, 1,0 % Rohasche, 0,9 % Rohprotein, 0,3 % Rohfett A, 0,9 % Rohstärke, 4,3 % Gesamtzucker, 11,9 % NFE, 89,6 mg/kg Gesamtcarotin (berechnet als β -Carotin). Im Biertreber waren bezogen auf die Trockenmasse 26 % Rohprotein, 8,5 % Rohfett, 17,0 % Rohfaser, 4,7 % Rohasche und 0,45 % Stärke vorhanden.

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Fermentationssubstrate und deren Bezugsquelle.

Fermentationssubstrat	Bemerkungen	Bezugsquelle
Weizenmehl Typ 550	Charge 1	Bremer Rolandmühle Erling GmbH & Co. KG, Bremen
getrockneter Biertreber	Charge 1	Leiber GmbH, Bramsche
getrockneter Karottentrester	Charge 0/1	Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG, Rinteln
frischer Karottentrester	Charge 2	Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG, Rinteln
getrockneter Karottentrester	Charge 3	Karottentrester der Charge 2 im Umluftwärmeschrank getrocknet
getrockneter Karottentrester	Charge 4	Ernteband Fruchtsaft GmbH, Winnenden
frischer Rieslingtrester	Charge 1	Eckes-Granini Deutschland GmbH, Nieder-Olm
frischer weißer Burgundertrester	Charge 1	Eckes-Granini Deutschland GmbH, Nieder-Olm
frischer Portugiesertrester	Charge 1	Eckes-Granini Deutschland GmbH, Nieder-Olm
getrockneter Rieslingtrester	Charge 2	Rieslingtrester der Charge 1 im Umluftwärmeschrank getrocknet
getrockneter weißer Burgundertrester	Charge 2	weißer Burgundertrester der Charge 1 im Umluftwärmeschrank getrocknet
getrockneter Portugiesertrester	Charge 2	Portugiesertrester der Charge 1 im Umluftwärmeschrank getrocknet
getrockneter Apfeltrester	Polen, Charge 1	Unternelbe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen
getrockneter Apfeltrester	indirekt getrocknet, Charge 2	Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG, Rinteln
getrockneter Apfeltrester	Türkei, Charge 3	Unternelbe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen
getrockneter Apfeltrester	Italien, Charge 4	Unternelbe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen

Tabelle 2.7: Fortsetzung.

Fermentationssubstrat	Bemerkungen	Bezugsquelle
getrockneter Apfeltrester	Italien, Charge 5	Untereibe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen
getrockneter Apfeltrester	Italien, Charge 6	Untereibe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen
getrockneter Apfeltrester	Italien, Charge 7	Untereibe-Frucht Handelsges. mbH & Co., Drochtersen

2.1.11 Stämme

2.1.11.1 *E. coli*

In dieser Arbeit wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (F-*glnV44 thiA-1* Δ (*argF-lac*) U169 *deoR endA1 gyrA96 hsdR17 recA1 relA1 supE44* (\emptyset 80lacZ Δ M15) *Nal^R*) verwendet (Hanahan, 1983).

2.1.11.2 Milchsäurebakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten und isolierten Stämme der Milchsäurebakterien sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Milchsäurebakterienstämme

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>Lactobacillus curvatus</i>	DIL 799	DSM 20019 ^T
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DIL 3232	Amaranth-Sauerteig
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DIL 3230	Quinoa-Sauerteig
<i>Lactococcus sakei</i>	DIL 625	DSM 20017 ^T
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DIL 5117	Weizenteig mit 25 % Karottentrester, diese Arbeit
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	DIL 5114	Weizenteig mit 25 % Karottentrester, diese Arbeit
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DIL 5111	Weizenteig mit 25 % Apfeltrester und Aspartat, diese Arbeit
<i>Weissella confusa</i>	DIL 5115	Weizenteig mit 25 % Karottentrester, diese Arbeit

2.1.11.3 Hefen

Die in dieser Arbeit verwendeten und isolierten Hefestämme sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.9: In dieser Arbeit verwendete Hefestämme.

Spezies	Stamm	Herkunft / Genotyp	Quelle / Stammbezeichnung
<i>Candida humilis</i>	DIL 4539		CBS 6897
<i>Candida silvae</i>	DIL 5174	spontan fermentierter Karottenteig	diese Arbeit
<i>Candida tropicalis</i>	DIL 3128	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Candida tropicalis</i>	DIL 3129	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Clavispora lusitaniae</i>	DIL 5172	spontan fermentierter Karottenteig	diese Arbeit
<i>Cryptococcus thermophilus</i>	DIL 150		DSM 19443 ^T

Tabelle 2.9: Fortsetzung.

Spezies	Stamm	Herkunft / Genotyp	Quelle / Stammbezeichnung
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	DIL 1047		TMW 3.033
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 68		n. b.
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 74		n. b.
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 75		n. b.
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1048		LTH 318
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1199	Chile, isoliert im Weinlabor	LTH 370
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1200	Chile	LTH 371
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1201	Portugal	LTH 365
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1202	Italien	LTH 366
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 1203	Italien	LTH 368
<i>Dekkera bruxellensis</i>	DIL 166		CBS 74
<i>Dekkera intermedia</i>	DIL 69		n. b.
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 42		n. b.
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 168		CBS 312
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DIL 192		DSM 2768
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DIL 5167	Derivat von DSM 2728 mit Einzelzellen	OS148, DSM 2768
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 595	isoliert aus kalifornischem Wein, Italien	n. b.
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 596		DSM 70788
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 597		DSM 2768
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DIL 3136	isoliert aus spontan fermentiertem frischen Rieslingtrester	diese Arbeit
<i>Hanseniasproa uvarum</i>	DIL 3158	spontan fermentierter Weizenteig mit 25 % Apfeltrester	diese Arbeit
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	DIL 5173	spontan fermentierter Karottenteig	diese Arbeit
<i>Hanseniasproa osmophila</i>	DIL 3873	Isolat Milchindustrie	n. b.
<i>Kazachstania exigua</i>	DIL 181		CBS 379
<i>Kazachstania exigua</i>	DIL 3875	Isolat Lebensmittelindustrie	n. b.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DIL 170		DSM 70807
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DIL 194		DSM 70799
<i>Kluyveromyces lactis</i>	DIL 4537		CBS 683
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Os 156	KHO46-6C, (<i>MATa ura3 leu2</i>)	(Heinisch <i>et al.</i> , 2010)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Os 157	KHO46-8B (<i>MATalpha ura3 leu2</i>)	(Heinisch <i>et al.</i> , 2010)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 43		DSM 70343
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 82		DSM 70343
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 171		CBS 712 ^T
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 193		OS 5420
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 610		DSM 5419
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 1049		DSM 70343
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 3127	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 3131	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 3132	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 3864		CBS 712 ^T
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DIL 5171	spontan fermentierter Karottenteig	diese Arbeit
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	DSM 70343		
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 6556	Pozol, fermentierter Mais Teig, Mexiko	(Rocha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SLC33	<i>ura3</i> -Mutante von CBS 6556	(Rocha <i>et al.</i> , 2010)

Tabelle 2.9: Fortsetzung.

Spezies	Stamm	Herkunft / Genotyp	Quelle / Stammbezeichnung
<i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3143	isoliert aus spontan fermentierten frischen Burgundertrester	diese Arbeit
<i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3155	spontan fermentierter Weizenteig mit 25 % Apfeltrester	diese Arbeit
<i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3157	spontan fermentierter Weizenteig mit 25 % Apfeltrester	diese Arbeit
<i>Pichia fermentans</i>	DIL 175		CBS 187 ^T
<i>Pichia fermentans</i>	DIL 590	Italien	n. b.
<i>Pichia fermentans</i>	DIL 1051		DSM 70090
<i>Pichia haplophila</i>	DIL 145		DSM 70365
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DIL 3130	isoliert aus spontan fermentierten frischen Karottentrester	diese Arbeit
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DIL 3154	spontan fermentierter Weizenteig mit 25 % Apfeltrester	diese Arbeit
<i>Pichia kudriavzevii</i>	DIL 5170	spontan fermentierter Karottenteig	diese Arbeit
<i>Pichia membranifaciens</i>	DIL 45		n. b.
<i>Pichia membranifaciens</i>	DIL 83		LTH 720
<i>Pichia membranifaciens</i>	DIL 176		CBS 107 ^T
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	DIL 3138	isoliert aus spontan fermentierten frischen Rieslingtrester	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DIL 3148	isoliert aus spontan fermentierten frischen Portugiesertrester	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DIL 3153	spontan fermentierter Weizenteig mit 25 % Apfeltrester	diese Arbeit
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DIL 3863		CBS 1171 ^T
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449		
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	DIL 3888	Isolat Milchindustrie	n. b.
<i>Saturnispora saitoi</i>	DIL 77		ATCC 24034
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 58		n. b.
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 86		LTH 736
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 97		n. b.
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 111	Müsli Riegel	LTH 235
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 113	Mais-Sauerteig, Ägypten	LTH 242
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 186		DSM 70497
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 1054		DSM 70504
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	DIL 3140	isoliert aus spontan fermentierten frischen Rieslingtrester	diese Arbeit
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	DIL 123	Portugal	LTH 369
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	DIL 187		DSM 70525 ^T
<i>Torulasporea pretoriensis</i>	DIL 1055		LTH 295
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DIL 114	Weizen-Sauerteig, Ägypten	LTH 243
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DIL 151	Rohrzucker, Spanien	n. b.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DIL 174		DSM 70130
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	DIL 1050		DSM 70263

n. b. = nicht bekannt

2.1.12 Inkubation der Stämme

Der Nachweis und die Quantifizierung der Mikroflora erfolgten aerob unter den in Tabelle 2.9 dargestellten Bedingungen.

Tabelle 2.10: Bedingungen für den Nachweis und die Quantifizierung der Mikroflora.

Parameter	Medium	Temperatur (°C)	Zeit (d)
Enterobakterien	VRBD	37	1
Gesamtkeimzahl	Standard I	30	2
Hefen	YGC	25	2-5
Milchsäurebakterien	mMRS5	30	2-3

Die Anzucht der Hefen für die Fermentation erfolgte im Schüttler RC-TK, Typ 87317 (Infors) unter den in Tabelle 2.11 beschriebenen Bedingungen. Für die Anzucht der Milchsäurebakterien wurde die Vorkultur für 24 h bei 30 °C mikroaerob inkubiert. Durch die Inokulation von 100 ml mMRS mit 1 ml der Vorkultur und Inkubation für 24 h bei 30 °C wurde die Hauptkultur hergestellt.

Tabelle 2.11: Anzucht der Hefen für die Fermentation.

Methode	Medium		Temperatur		Anzucht VK (10 ml)	Überimpfen HK	Vol. HK (ml)	Alter (h)		Rota- tion (rpm)
	VK	HK	VK	HK				VK	HK	
1 ^a	YG	YG	25	25	RG	30 ml	500	40	48	100
2	YG	YG	25	25	RG	30 ml	500	40	48	100
3	YG	YG	25	25	RG	30 ml	500	40	36	100
4	YG	YG	25	25	RG	30 ml	500	40	24	100
5	YG	YG	25	25	RG	30 ml	500	40	12	100
6	YG	YG	25	25	RG	12 ml	200	40	48	100
7	YG	YG	25	25	RG	18 ml	300	40	48	100
8	YG	YG	25	25	RG	24 ml	400	40	48	100
9	YG	YG	25	25	RG	6 ml	100	40	48	100
10	YG	YG	25	25	RG	1 ml	100	40	48	100
11	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,05	100	40	48	100
12	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,1	100	40	48	100
13	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,7	100	40	48	100
14	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,4	100	40	48	135
15	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,3	100	14	48	135
16	YG	YG	25	25	RG	6 ml	100	9,85	14	135
17	YG	YG	25	25	RG	10 ⁶ KbE/ml	100	40	48	135
18	YG	YG	25	25	RG	6 ml	100	12	48	135
19	YG	YG	25	25	RG	6 ml	100	40	48	135
20	YG	YG	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
21	YG	YG	25	25	K	6 ml	100	40	48	135
22	YG	YG + Af	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
23	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
24	YG	YG	30	30	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
25	YG (0,5% G)	YG (0,5% G)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
26	YPD	YPD	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135
27	YPD (0,5% G)	YPD (0,5% G)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	135

Tabelle 2.11: Fortsetzung.

Methode	Medium		Temperatur		Anzucht VK (10 ml)	Überimpfen HK	Vol. HK (ml)	Alter (h)		Rota- tion (rpm)
	VK	HK	VK	HK				VK	HK	
28	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	46	135
29	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	50	135
30	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	50	40	48	135
31	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
32	SM	SM	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
33	SM	SM	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
34	YG	YG	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
35	Y+2% G	Y+2% G	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
36	SM (0,5% G)	SM (0,5% G)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	50	40	48	130
37	SM (0,1% G)	SM (0,1% G)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,25	50	40	48	130
38	SM (0,5% E)	SM (0,5% E)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,05	100	40	48	130
39	SM (0,1% E)	SM (0,1% E)	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,05	100	40	48	130
40	YG	YG + 1% A	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
41	YG	YG + 1% A	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
42	YG+ 1% A	YG + 1% A	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
43	YG + 1 % A	YG	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
44	SM	SM	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	75	40	48	130
45	SM + 1% A	SM + 1% A	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	75	40	48	130
46	SM (0,5% E) + 1 % A	SM (0,5% E) + 1 % A	25	25	K	OD ₆₀₀ =1	75	40	48	130
47	--	SM (0,5% E)	25	25	RG	--	10	--	184	130
48	--	SM (3% E)	25	25	RG	--	10	--	184	130
49	SM (3% E)	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =0,1	100	40	48	130
50	YG	YG	25	37	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
51	YG	YG	37	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
52	YG	YG	37	37	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	130
53 ^a	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	140
54 ^b	YG	YG	25	25	RG	OD ₆₀₀ =1	100	40	48	150
55	--	YG	25	25	RG	--	--	--	48	135
56	--	YG	25	25	RG	--	--	--	11	135

^a, Schüttler Typ 3033 (GFL); ^b, Schüttler Ecotron (Infors), VK, Vorkultur; HK, Hauptkultur; (x %), anstatt Glucose verwendete C-Quelle; G, Glucose; E, Ethanol; A, Apfeltrester Charge 4; Af, Antifoam; Y, Hefeextrakt; Vol, Volumen; K, Kolben; RG, Reagenzglas.

Für die Anzucht der Hefestämme zur heterologen Expression von Genen und einer anschließenden Analyse des Aromas wurden zunächst 5 ml einer Übernachtskultur bei 25 °C und 150 rpm (Ecotron, Infors) hergestellt. Hiervon wurde 1 ml der Kultur verwendet um 50 ml Medium (SC-Medium ohne Uracil mit 8 % Glucose) im 250 ml-Kolben anzuimpfen. Nach 48 h befanden sich die die Hefezellen in der stationären Phase und wurden mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde das auf 25 °C vorgewärmte Medium mit den gewaschenen Hefezellen auf eine OD₆₀₀ von 0,4 inokuliert und für 144 h inkubiert.

2.1.13 Lagerung der Stämme

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur bei 1,000 × g (Hefen) bzw. 2,000 × g (Bakterien) für 10 min zentrifugiert und in 1/10 des Volumens mit frischem Medium resuspendiert. Es wurden je 1 ml dieser Suspension mit 1 ml 60 %iger (v/v) steriler Glycerinlösung vermennt und nach einer Inkubation von 1 h bei Umgebungstemperatur bei - 80 °C gelagert.

2.1.14 Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tabelle 2.12: In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCXs18	Expression von Genen in <i>Kluyveromyces lactis</i> ; Shuttlevektor <i>K. lactis</i> - <i>S. cerevisiae</i> - <i>E. coli</i>	(Heinisch <i>et al.</i> , 2010)
pCXs22	Klonierung von Genen zur Expression in <i>K. lactis</i> oder <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit SphI in der “multiple cloning site”	(Heinisch <i>et al.</i> , 2010)
pJJH1512	pCXs22 mit <i>ScPFK2</i> Promotor	J. J. Heinisch, pers. Mitteilung
pJJH1823	pMW3 mit <i>HuATF1-3HA</i>	erzeugt über <i>in vivo</i> - Rekombination J. J. Heinisch, pers. Mitteilung
pJJH1828	pMW2 mit <i>HuEEB1-3HA</i>	J. J. Heinisch, pers. Mitteilung
pSPGOX	episomaler Vektor mit <i>ScPGK</i> Promotor; Shuttlevektor <i>K. marxianus</i> - <i>E. coli</i>	(Rocha <i>et al.</i> , 2010)
pSPINGOX	episomaler Vektor mit <i>KmINU1</i> Promotor; Shuttlevektor <i>K. marxianus</i> - <i>E. coli</i>	(Rocha <i>et al.</i> , 2010)
pUC-BM20- ATF1	Vektor mit <i>HuATF1</i> -Gen	Christian von Wallbrun (Geisenheim) über Jürgen Heinisch, pers. Mitteilung
pYEX-BX- EEB1	Vektor mit <i>HuEEB1</i> -Gen	Christian von Wallbrun (Geisenheim) über Jürgen Heinisch, pers. Mitteilung

Die während dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2.13 angegeben. Klonierungen und Umklonierungen wurden mit Hilfe der angegebenen Restriktionsenzyme und einer T4-DNA-Ligase durchgeführt, bzw. über *in vivo*-Rekombination in *S. cerevisiae*. Zur Überprüfung der richtigen Konstruktion der Plasmide wurde eine Kontrollrestriktion durchgeführt und anschließend die Sequenz überprüft.

Tabelle 2.13: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Name	Insertion	Hintergrund	Konstruktion
pMW2	<i>HuEEB1</i>	pJJH1512	Mit <i>SalI</i> und <i>BamHI</i> aus pYEX-BX-EEB1 in pJJH1512 kloniert
pMW3	<i>HuATF1</i>	pJJH1512	PCR-Amplifikation genomischer DNA des Stamms <i>H. uvarum</i> OS148 mit den Oligonukleotiden HuATFforBamHI und HuATFrwSalI, Klonierung mit <i>SalI</i> und <i>BamHI</i>

2.2 Methoden

2.2.1 Nährstoffanalyse

Die Bestimmung der Nährstoffe in den Fermentationssubstraten erfolgte entsprechend den in Tabelle 2.14 angegebenen, akkreditierten Methoden.

Tabelle 2.14: Untersuchte Parameter der Nährstoffanalyse.

Parameter	Methode
Wasser	DIL256-1
Asche	DIL259-2
Rohprotein	N x 6.25 DIL260-1
Fett	DGF C-III 19 (00)
Kohlenhydrate	Berechnung
Ballaststoffe	L00.00-18 / e
Saccharose	DIL789-9
Glucose	DIL789-9
Fructose	DIL789-9
Maltose	DIL789-9
Lactose	DIL789-9
Zucker (Summe Mono-, Disaccharide)	Berechnung
Fettsäuren (gesättigt) ^a	DIL770-11
Fettsäuren (einfach ungesättigt) ^a	DIL770-11
Fettsäuren (mehrfach ungesättigt) ^a	DIL770-11
Trans-Fettsäuren ^a	L 13.03/04-2
Brennwert	Berechnung
Brennwert	Berechnung

^a berechnet als Triglycerid

2.2.2 Keimzahlbestimmung

2.2.2.1 Gesamtkeimzahl

Die Gesamtkeimzahl von Bakterien- oder Hefesuspensionen wurde mikroskopisch mit Hilfe der Thomakammer oder durch die Bestimmung der optischen Dichte mit Hilfe des Zelldichtemessgeräts „Ultrospec 10“ (GE Healthcare GmbH, Solingen) ermittelt. Für *K. marxianus* DIL 43, DIL 82, *C. jadinii* DIL 1047, *W. anomalus* DIL 1050 und *T. delbrueckii* DIL 1054 entspricht eine optische Dichte von $OD_{600} = 1$ einer Lebendkeimzahl von etwa 1×10^7 KbE/ml. Für Milchsäurebakterien entspricht eine $OD_{600} = 1$ einer Lebendkeimzahl von 1×10^8 KbE/ml.

2.2.2.2 Lebendkeimzahl

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden die dekadisch in 0,85 % NaCl-Lösung verdünnten Proben mittels dem Oberflächenspatelverfahren oder mit Hilfe des „Spiralplaters“ in Doppelansätzen auf die entsprechenden Agarplatten ausplattiert. Feste Proben wurden zuerst mit 0,85 % NaCl-Lösung 1:10 verdünnt und im Laborhomogenisator für 60 s homogenisiert, bevor diese weiter dekadisch verdünnt wurden. Für die Bestimmung der Lebendkeimzahlen wurden nur solche verwendet, die in den Doppelbestimmungen Abweichungen von $< 0,2$ log-Stufen zeigten.

2.2.3 Analyse von stammspezifischen Parametern

2.2.3.1 Vergärung verschiedener Kohlenstoffquellen

Der Nachweis von spezies- und stammspezifischen Unterschieden in der anaeroben Verwertung verschiedener C-Quellen erfolgte nach Kurtzmann *et al.* (2011). Hierzu wurden 2 ml Fermentationsgrundmedium in Reagenzgläser mit invertierten Durhamröhrchen gefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde 1 ml 6 %ige Zuckerlösung (Glucose, Maltose, Fructose, Saccharose bzw. Lactose; sterilfiltriert) hinzugefügt. Die Teströhrchen wurden mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 25 °C ohne Schütteln inkubiert. Durch die Fermentation von Zucker bzw. Aminosäuren werden Gase gebildet, welche im Durhamröhrchen aufgefangen werden. Daher wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen täglich nach kurzem Schütteln der Teströhrchen die Ansammlung von Gas im Durhamröhrchen und die Farbe des Mediums beobachtet. Durch die Zuckerverwertung entstehen Säuren, sodass sich aufgrund der pH-Verschiebung die Farbe des Mediums von blau in Richtung grün-gelb ändert. Findet dieser Farbumschlag bei gleichzeitiger Gasbildung nicht

statt, so wurden die im Medium vorhandenen Aminosäuren fermentativ als C-Quelle genutzt. Zur Bewertung der Fermentationseigenschaften wurde die in Tabelle 2.15 angegebene Skala verwendet:

Tabelle 2.15: Skala zur Bewertung der Fermentationseigenschaften.

Skala	Durhamröhrchen	Fermentationseigenschaft
++	vollständig mit Gas gefüllt	stark positiv
+	mit viel Gas gefüllt und schwimmt an der Oberfläche	latent positiv
~	mit etwas Gas gefüllt und schwimmt nicht an der Oberfläche	schwach positiv
-	nicht mit Luft gefüllt	negativ

2.2.3.2 Optimale Wachstumstemperatur

Die Überprüfung der für die Hefen optimalen Wachstumstemperatur wurde auf Agarplatten durchgeführt (Kurtzman *et al.*, 2011). Hierzu wurde eine frische Kultur des zu untersuchenden Hefestamms auf YGC-Agar ausgestrichen und bei der gewünschten Temperatur für 4 Tage inkubiert. In Abhängigkeit der Koloniegröße bei unterschiedlichen Temperaturen wurden die optimale sowie die maximale Wachstumstemperatur bestimmt.

2.2.4 pH-Messung

Die pH-Werte wurden elektrometrisch mittels des pH-Meters ermittelt. Für die Messung des pH-Wertes von festen Proben wurden diese mit 0,85 % NaCl-Lösung 1:10 verdünnt und im Laborhomogenisator für 60 s homogenisiert.

2.2.5 Modellfermentation

Die Anzucht der für die Fermentation benötigten Mikroorganismen erfolgte wie in Kapitel 2.1.11 beschrieben. Die Hefen wurden bei $1.000 \times g$ und die Milchsäurebakterien bei $2.000 \times g$ für 10 min zentrifugiert und in 1/10 des Volumens in 0,85 % NaCl-Lösung resuspendiert. Von dieser Suspension wurde die Gesamtkeimzahl mikroskopisch oder optisch (siehe Kapitel 2.2.2.1) bestimmt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Weizenmehl Typ 550 mit 25 % Nebenstrom für die Fermentation in Fermentationsbehälter (Volumen 1 l) eingewogen. Durch die Zugabe der entsprechenden Menge an vortemperiertem Leitungswasser wurde die Teigausbeute ($TA = \text{Teigmasse pro Masse des Fermentationssubstrat} \times 100$) auf 200 eingestellt. Hierbei wurde das für die Inokulation auf 10^6 KbE/g benötigte Volumen der Hefe- bzw. Milchsäurebakteriensuspension von der Gesamtwassermenge subtrahiert. Weizenmehl, Nebenstrom, Wasser und Inokulat wurden mit

Hilfe der Spiralknethaken eines handelsüblichen Küchenmixers homogen zu einem Teig vermischt. Vor dem Fermentationsstart wurde hiervon eine Probe zur Bestimmung des pH-Werts und der Lebendkeimzahl der Milchsäurebakterien, Hefen und ggf. Enterobakterien entnommen. Der Fermentationsbehälter wurde mit dem Teig in ein auf 25 °C vorgeheiztes Wasserbad gestellt und dort für 24 h inkubiert. Nach Fermentationsende wurden die Teige sensorisch beurteilt, die Lebendkeimzahl der Milchsäurebakterien und Hefen sowie der pH-Wert bestimmt. Bei den Kontrollteigen wurde auf den Zusatz der Nebenströme oder der Hefen verzichtet. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von Milchsäure oder Calciumcarbonat zu Beginn der Fermentation eingestellt. Die Antibiotika Chloramphenicol bzw. Cycloheximid wurden dem Teig mit 0,02 g pro 100 g Teig zugesetzt.

2.2.6 Propagation

Die Teige wurden, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, hergestellt. Nach der sensorischen Prüfung und der Probenahme für die weiteren Analysen diente der fermentierte Teig als Anstellgut für den nächsten Teig. Hierzu wurden 2 g des fermentierten Teigs mit 75 g Mehl und 25 g Nebenstrom sowie Wasser (entsprechend der gewünschten Teigausbeute (TA)) mit den Spiralknethaken eines Küchenmixers zu einem neuen Teig verarbeitet. Dieser Teig wurde wie der am Tag zuvor hergestellte Teig behandelt.

2.2.7 Wachstumskurve

Um das Wachstumsverhalten verschiedener Hefestämme unter unterschiedlichen Bedingungen (z. B. im Medium, bei limitierter Sauerstoffverfügbarkeit im Medium oder bei Teigen mit Apfel- bzw. Karottentrester) miteinander vergleichen zu können, wurde der zeitliche Verlauf der Keimzahl gemessen und eine Wachstumskurve erstellt. Für die Wachstumskurven im Medium wurden die entsprechenden Hefestämme über Nacht angezogen, mit dem Medium auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und in regelmäßigen Zeitabständen die OD gemessen. Für die Bestimmung der Wachstumskurve in Teigen wurden die Teige entsprechend Kapitel 2.2.5 hergestellt und die Lebendkeimzahl nach Fermentationsbeginn in regelmäßigen Zeitabständen anhand der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Keimzahlen wurde mit dem von Zwietering *et al.* (1990) vorgeschlagenen modifizierten Gompertz-Modell (Formel 2.1) mit Hilfe der Solver-Funktion in Excel angepasst und somit die Dauer der lag-Phase, die maximale Wachstumsrate und die maximale Zunahme der Hefepopulation bestimmt.

Formel 2.1: modifiziertes Gompertz-Modell (nach Zwietering *et al.*, 1990).

$$\ln \frac{N}{N_0} = A \cdot e^{-e \frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} \lambda - t + 1}$$

N: Keimzahl zum Zeitpunkt t

N₀: Keimzahl zum Zeitpunkt 0

A: Zunahme der Keimzahl

μ_{max}: maximale Wachstumsrate

λ: Dauer der lag-Phase

t: Zeitpunkt der Keimzahlberechnung

Des Weiteren kann aus μ_{max} die Generationszeit t_D berechnet werden. Hierfür gilt die Formel 2.2:

Formel 2.2: Berechnung der Generationszeit anhand der maximalen Wachstumsrate.

$$t_D = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}}$$

2.2.8 Wachstum unter definierter Sauerstoffkonzentration

Das Wachstum von *K. marxianus* DIL 82 wurde unter definierter Sauerstoffkonzentration im Tischfermenter (Minifors, Infors) beobachtet. Für die Fermentation wurde als Medium 1,5 l YG mit 200 µl Antifoam A verwendet, wobei die 20 %ige Glucoselösung nach dem Autoklavieren zugegeben wurde. Der Fermenter wurde an die Steuereinheit angeschlossen und über Nacht mit 650 rpm und 1,5 vvm Druckluft bei einer Temperatur von 25 °C betrieben. Die unter diesen Bedingungen gemessene Sauerstoffkonzentration wurde als 100 % (entspricht 20,95 % Sauerstoff im Medium) definiert. Durch die Begasung des Fermenters mit Stickstoff oder Sauerstoff und Anpassung des Volumenstroms wurde die gewünschte Sauerstoffkonzentration für die Fermentation eingestellt. Gestartet wurde die Fermentation durch die Zugabe einer über Nacht inkubierten Kultur von *K. marxianus* DIL 82, sodass das Medium im Fermenter eine OD₆₀₀ von 0,1 erreichte. Die im Fermenter angebrachten Sensoren ermittelten den Sauerstoffgehalt im Medium, den pH-Wert, die Temperatur und die Rührgeschwindigkeit. Diese Daten wurden durch das PC-Programm „Iris“ (Infors) dokumentiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD₆₀₀ des Mediums bestimmt (vgl.

Kapitel 2.2.2.1) und mit Hilfe des Gompertz-Modells (vgl. Kapitel 2.2.7) die maximale Wachstumsrate μ_{\max} ermittelt.

2.2.9 Herstellung von Modellbrot

Als Grundrezeptur für die Herstellung der Modellborte wurden 1,8 % Hefe, 1,6 % Salz, TA 160 sowie 9 % bzw. 20 % vorfermentierter Teig (bezogen auf Mehlmenge des fermentierten Teiges/Gesamtmehlmenge) mit einem Stückgewicht von 540 g gewählt. Die Zutaten wurden mittels eines Handrührgeräts zu einem Teig geknetet. Es folgten eine Bulkfermentation für 15 min bei Umgebungstemperatur, Rundwirken und eine Teigruhe für 3 min bei Umgebungstemperatur. Für die Endgare wurden die zur Kapsel geformten Teige in Kastenbrotbackformen mit Wasser bestrichen, mit einer Kunststoffolie abgedeckt und im Wärmeschrank bei 30 °C oder im Gärschrank bei 32 °C und 80 % Feuchte für 45 min inkubiert. Die Modellbrote wurden entweder im vorgeheizten und beschwadeten Haushaltsbackofen für 45 min bei 220 °C, im Konvektomaten für 10 min bei 250 °C (mit Schwaden) und anschließenden 10 min bei 220 °C (ohne Schwaden) oder im auf 250 °C vorgeheizten und beschwadeten Bäckerofen für 15 min gebacken. Zur besseren Standardisierung der Modellbackwaren wurden die Brote zur Dreiecks- und Duoprüfung im Brotbackautomaten mit den in Tabelle 2.16 angegebenen Programmen hergestellt.

Tabelle 2.16: Programm zur Herstellung der Weizenbrote im Brotbackautomat Backmeister Skala.

Programmschritt	Zeit	
	Programm 1	Programm 2
Kneten 1	9 min	9 min
Teigreife 1	20 min	20 min
Kneten 2	5 min	5 min
Teigreife 2	5 min	5 h 30 min
Stückgare	35 min	35 min
Backen	45 min	45 min

2.2.10 Sensorische Analysen

Die Analysen zur sensorischen Einstufung der vorfermentierten Teige wurden als „Einfach beschreibende Prüfung“ durchgeführt. Zur Überprüfung, ob die im vorfermentierten Teig gebildeten Aromen nach dem Backvorgang noch im Brot vorhanden waren, wurden Diskriminierungsprüfungen (Vergleichsprüfungen) durchgeführt. Hierbei sollten sensorische Unterschiede zwischen den mit und ohne vorfermentierten Teig hergestellten Broten

analysiert werden und eine statistisch gesicherte Feststellung getroffen werden. Die Diskriminierungsprüfung wurde als paarweise Unterschiedsprüfung (Duo-Test), Dreiecksprüfung (Triangel-Test) sowie als Rangfolgeprüfung (Rangordnungsprüfung) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben dem geschulten Prüfer verschlüsselt dargereicht, sodass der Prüfer aus der Art der Darreichung keine Rückschlüsse auf das Prüfgut ziehen konnte (identische Aufstellung und identische Gefäße).

Einfach beschreibende Prüfung

Um eine sehr große Anzahl von unterschiedlich hergestellten, vorfermentierten Teigen sensorisch beurteilen zu können, wurde die einfach beschreibende Prüfung als eine Vorauswahlmethode gewählt. Die einfach beschreibende Prüfung wurde wie in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB, Juni 2013) beschrieben durchgeführt.

Duoprüfung

Mit der Duoprüfung sollten geringe Unterschiede zwischen zwei Produkten festgestellt werden. Diese Prüfung wurde wie in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB) - Untersuchung von Lebensmitteln, sensorische Prüfverfahren, Paarweise Unterschiedsprüfung L 00.90.8 (Norm DIN EN ISO 5495, Ausgabe Okt. 2007) beschrieben, durchgeführt. Das Gruppenergebnis wurde mit Hilfe der Binomialverteilung ausgewertet.

Dreiecksprüfung

Bei der Dreiecksprüfung werden drei Proben gleichzeitig dargereicht, von denen zwei Proben identisch und eine Probe abweichend war. Durchgeführt wurde diese Prüfung nach der in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB) - Untersuchung von Lebensmitteln, sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung L 00.90.7 (Norm DIN EN ISO 4120, Ausgabe Okt. 2007) beschriebenen Methode. Das Gruppenergebnis wurde mit Hilfe der Binomialverteilung ausgewertet.

2.2.11 Aromaextrakt-Verdünnungsanalysen

Zur Identifizierung der an der Aromabildung beteiligten Komponenten wurden die Proben durch die Firma aromaLAB AG (Freisingen) durch Gaschromatographie in Kombination mit

der Olfaktometrie (GC/O) oder durch Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie (GC/MS) durchgeführt. In der GC/O werden alle in der Probe enthaltenen aromaaktiven Substanzen identifiziert und durch 1:2-Verdünnungen der „Flavour of Dilution“ (FD) ermittelt. Der FD-Wert gibt die größtmögliche Verdünnung an, in der eine Aromakomponente noch aromaaktiv ist. Der Δ FD gibt die Differenz zwischen dem FD des fermentierten und dem FD des unfermentierten Teigs an. Im Gegensatz hierzu werden bei der GC/MS nur die Aromakomponenten identifiziert, nach denen gezielt gesucht wurde. Die Konzentration dieser Aromakomponenten wird anhand der Fläche unter dem bei der GC/MS entstehenden „Peaks“ berechnet.

2.2.12 Physikalische Methoden

2.2.12.1 Bestimmung des a_w -Werts

Die Bestimmung der a_w -Werte erfolgte mit dem Wasseraktivitäts-Präzisionsmeßgerät SE a_w Lab nach den Angaben des Herstellers.

2.2.12.2 Konsistenzmessung

Um die Konsistenz der Teige zu bewerten, wurden die Fließeigenschaften der Teige mit Hilfe eines Rheometers im Kegel-Platte-Messsystem gemessen. Der verwendete Kegel hatte einen Durchmesser von 4 cm und einen Winkel von 4 °. Die Teige wurden in einem Schergefällebereich von 0,1 s⁻¹ bis 200 s⁻¹ mit einer kontinuierlichen aufsteigenden Rampe vermessen. Die erhaltenen Fließkurven wurden mit dem Modell „Ostwald-de-Waele“, auch als „Power-Law-Model“ bezeichnet, und dem Programm „Rheostar“ ausgewertet (Franke und Tscheuschner, 1995). Für den Vergleich der Teigkonsistenzen untereinander wurde der Konsistenzwert K herangezogen (Formel 2.3)

Formel 2.3: Ermittlung des Konsistenzwerts nach Ostwald-de Waele.

$$\tau = K \times \gamma^n$$

τ : Schubspannung (Pa)

K : Konsistenz (Paⁿ)

n : Fließindex

γ : Schergeschwindigkeit (s⁻¹)

2.2.12.3 Wasseraufnahme

Zur Bestimmung der Wasseraufnahme wurde im ersten Schritt der Wassergehalt der fermentierten Teige bestimmt. Hierzu wurden 3×5 g Probe in ein vorgetrocknetes Seesandschälchen eingewogen und verrührt. Anschließend wurden die Proben für 3 h bei $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und im Exsikkator für 1 h abgekühlt. Nach dem Auswiegen der Proben wurden diese erneut bei $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert (1 h) und im Exsikkator abgekühlt. Dieser Schritt wurde wiederholt bis eine konstante Masse der Proben erreicht wurde. Im zweiten Schritt wurden die Substanzen (Mehl, Trester bzw. vorfermentierter Teig) mit einer Trockenmasse von 258 g (entspricht 300 g Mehl mit einer Feuchte von 14 %) eingewogen. Anschließend wurde die für die Herstellung im Messkneteter eines Teiges mit einem Drehmoment von 5 Nm (entspricht 500 FE) nötige Menge an Wasser zugegeben. Diese Versuche wurden bei einer Untersuchungstemperatur von $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ und mit einer Drehzahl von 90 rpm als Doppelbestimmung durchgeführt. Die notwendige Wassermenge berechnet sich aus der Differenz zwischen der Masse des Teiges mit einem Drehmoment von 5 Nm und der Masse des eingesetzten Mehls mit einer Feuchte von 14 % (300 g).

2.2.12.4 Oszillationstest

Der Oszillationstest erfolgte mit einem Rheometer wie für die Konsistenzmessung beschrieben. Die Messung wurde im viskoelastischen Deformationsbereich durchgeführt, d. h. die Strukturelemente wurden reversibel gedehnt und nicht zerstört. Zur Bewertung der Eigenschaften der Teige ist das Speichermodul G' geeignet. Das Speichermodul stellt dabei die Spannung dar, die notwendig ist, um die innere Struktur reversibel zu dehnen und ist somit ein Maß für die Festigkeit der unzerstörten Struktur. Je größer das Speichermodul, desto größer ist die innere Festigkeit. Die Speichermodul-Frequenz-Funktion, die im Frequenzbereich von 0,1 bis 10 Hz gemessen wurde, erlaubt Aussagen hinsichtlich des viskoelastischen Verhaltens im viskoelastischen Bereich der untersuchten Stoffsysteme.

Im Fall der untersuchten Teige war eine Anpassung an eine empirische Gleichung (Formel 2.4) möglich.

Formel 2.4: Empirische Gleichung zur Ermittlung von Festigkeit und Viskosität im unzerstörten Strukturzustand.

$$G' = G'_0 + \eta_{VE,int} \times \ln f$$

G' : Festigkeit der unzerstörten Struktur (Pa)

G'_0 : Festigkeit der inneren Strukturen (Pa)

$\eta_{VE,int}$: Viskosität im unzerstörten Strukturzustand (Pa s)

f : Frequenz (s^{-1})

2.2.13 Transformation von DNA

Die Transformation wurde zum Einbringen von freier DNA in *E. coli*, *K. marxianus* und *K. lactis* verwendet.

2.2.13.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* basierte auf der von Hanahan (1983) beschriebenen Methode. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde *E. coli* über Nacht in TYM angezogen. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Kultur zu 250 ml TYM gegeben und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C unter schütteln inkubiert, bevor die Kultur auf Eis gekühlt wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 2000 × g) sedimentiert und mit dem 0,4-fachen des Ausgangsvolumens in kaltem Tfb1 (30 mM KAc, 50 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 15 % w/v Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, steril filtriert) resuspendiert. Nach weiteren 1,5 h auf Eis wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation geerntet und in 0,075 fachen des Ausgangsvolumens in Tfb2 (10 mM Na-MOPS pH 7,0, 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % w/v Glycerin, steril filtriert) resuspendiert, auf Eis zu 100 µl Aliquots portioniert und bis zur Transformation bei – 80 °C gelagert. Zur Transformation der kompetenten Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und 2 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsgemisches zugegeben. Durch die Inkubation auf Eis für 30 min lagerte sich die DNA an die Zelle an und wurde durch den anschließenden Hitzeschock für 90 s bei 42 °C in die Zelle aufgenommen. Nach 5 min auf Eis wurde 1 ml LB zugegeben und für 1 h bei 37 °C aerob inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 2 min bei 2000 × g zentrifugiert und auf LB-Amp ausplattiert.

2.2.13.2 Transformation von *Kluyveromyces*-Arten (Lithiumacetat-Methode)

Die Transformation von *K. marxianus* und *K. lactis* erfolgte nach der von Gietz *et al.* (1995) beschriebenen Lithiumacetat-Methode. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml YG mit einer frischen Hefe-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und bei 25 °C unter schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Zentrifuge „Mikro 220R“ bei 1000 × g für eine Minute zentrifugiert, mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und zur Destabilisierung der Zellwand in 400 µl 100 mM Lithiumacetat (pH 7,5) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 50 µl der kompetenten Zellen bei 1000 × g zentrifugiert und das Zellsediment mit 240 µl 50 % (w/v) PEG 4000, 36 µl 1 M LiAc, 5 µl denaturierter DNA aus Heringssperma (10 mg/ml) und 2 µl Plasmid-DNA überschichtet. Dieser Transformationsansatz wurde gut suspendiert und anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Ein Hitzeschock der Zellen für 20 min bei 42 °C sollte die Aufnahme der DNA erleichtern, bevor die Zellen zentrifugiert, in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf SC-Medium ohne Uracil ausplattiert wurden.

2.2.14 Analyse von DNA

2.2.14.1 Präparation von genomischer DNA aus Hefen

Die Präparation von genomischer DNA aus Hefe-Reinkulturen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden). Hierzu wurden die Hefen zunächst in YG über Nacht angezogen und 1 ml der Kultur nach dem Herstellerprotokoll „Purification of total DNA from yeast using the DNeasy Blood & Tissue Kit“ behandelt. Zusätzlich zum Puffer ATL und zur Proteinase K wurden 10 µL RNase A (10 mg/mL in TE-Puffer; Sigma, St. Louis, USA) zugegeben. Die in 100 µl eluierte DNA wurde bei – 20 °C aufbewahrt.

2.2.14.2 Präparation von genomischer DNA aus Milchsäurebakterien

Die Präparation von genomischer DNA aus Milchsäurebakterien-Reinkulturen erfolgte mit dem E.Z.N.A™ Bacterial DNA-Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, USA) oder DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden). Hierzu wurden die Milchsäurebakterien zunächst in mMRS über Nacht angezogen und 1 ml der Kultur nach dem Herstellerprotokoll für Gram positive Bakterien behandelt. Nach dem Lyseschritt wurden 10 µL RNase A (10 mg/mL in TE-Puffer; Sigma, St. Louis, USA) zugegeben. Die in 100 µl eluierte DNA wurde bei – 20 °C aufbewahrt.

2.2.14.3 Präparation von genomischer DNA aus Nebenströmen und Teigen

Zur Isolierung der DNA aus Teigen oder Nebenströmen wurde die Probe 1:10 mit 0,85 % NaCl-Lösung verdünnt und im „Stomacher“ homogenisiert. 50 ml dieser Suspension wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt und zur Abtrennung der groben Bestandteile von Mehl und Trester für 5 min bei 4 °C und $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Pelletieren der Zellen 15 min bei $4.800 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem PBS-Puffer aufgenommen und zu zwei gleich großen Teilen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei $6.000 \times g$ und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml sterilem Leitungswasser und erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Die Zellsedimente wurden zur weiteren Behandlung eingefroren oder direkt zur DNA-Isolierung verwendet. Die DNA wurde aus Hefen bzw. Milchsäurebakterien nach den in den Abschnitten 2.2.14.1 und 2.2.14.2 beschriebenen Protokollen isoliert. Das Lysat wurde vor der Säulenreinigung für 2 min bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und nur der Überstand wurde auf die Säule gegeben. Zur Reinigung von Hefe-DNA mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit wurde das Eluat (100 µl) mit 100 µl Puffer AL und 100 µl Ethanol gemischt und erneut auf die bereits verwendete Säule gegeben. Die erneute Elution der an die Silica-Membran der Säule gebundenen DNA erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben.

2.2.14.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur spezifischen Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte eingesetzt und im iCycler (BioRad) oder Mastercycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt. Für Überprüfungs-PCRs oder PCR-DGGE wurden dem PCR-Ansatz neben je 2 mM dNTPs (dNTP-Mix von Fermentas, St. Leon-Rot) und je 0,5 µM der beiden Oligonukleotide 1,25 Units DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und die einfache Konzentration des Puffers zugesetzt. Das Volumen des PCR-Mixes wurde mit bidestilliertem und autoklaviertem Wasser auf 24 µl eingestellt. Diesem Mastermix wurden je 1 µl der zuvor isolierten DNA (siehe Kapitel 2.2.14.1 - 2.2.14.3) als Template zugegeben. War die PCR die Grundlage für die spätere Klonierung, so wurde der „Q5 High-Fidelity 2x Master Mix“ (New England Biolabs, Ipswich, UK) verwendet.

Die PCR wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation des 28S rRNA-Gens von Hefen, des 16S rRNA-Gens von Milchsäurebakterien, für die Erstellung eines PCR-DGGE-Fingerprints von Hefen oder Milchsäurebakterien sowie zur Klonierung des *ATF1*-Gens aus *H. uvarum*

verwendet. Die für diese Ansätze verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 2.17 - Tabelle 2.20 dargestellt.

Tabelle 2.17: PCR-Programm zur Amplifikation des 28S rRNA-Gens von Hefen mit den Oligonukleotiden NL1/NL4.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	94	2	1
Denaturierung	94	0,5	36
Annealing	52	1	
Elongation	72	1	
finale Elongation	72	7	1

Tabelle 2.18: PCR-Programm zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens von Milchsäurebakterien mit den Oligonukleotiden GM3f/GM4r.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	95	4	1
Denaturierung	95	0,5	9
Annealing	49	0,5	
Elongation	72	0,5	
Denaturierung	95	0,5	25
Annealing	44	0,5	
Elongation	72	1,5	
finale Elongation	72	10	1

Tabelle 2.19: PCR-Programm zur Amplifikation der D1/D2-Region des 28S rRNA-Gens von Hefen bzw. der V2/V3-Region des 16S rRNA-Gens der Milchsäurebakterien mit den Oligonukleotiden NL1(-GC)/LS2 bzw. L1(-GC)/Lab0677.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,5	40
Annealing	58 ^a bzw. 61 ^b	0,5	
Elongation	72	0,5	
finale Elongation	72	7	1

^aNL1(-GC)/LS2, ^bL1(-GC)/Lab0677

Tabelle 2.20: PCR-Programm zur Klonierung des ATF-Gens aus *H. uvarum* mit den Oligonukleotiden HuATFforBamHI/HuATFrwSalI

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl Zyklen
initiale Denaturierung	94	2	1
Denaturierung	94	0,5	35
Annealing	55	1	
Elongation	72	2,5	
finale Elongation	72	7	1

2.2.14.5 Reinigung von PCR-Produkten

War die Entfernung von störenden Substanzen für die weitere Bearbeitung der PCR-Produkte notwendig, so wurde die Reinigung mit dem „Gene-Jet PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.14.6 Trennung von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe in der Agarose-Gelelektrophorese oder sequenzspezifisch in der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE):

Agarose-Gelelektrophorese

Je nach erwarteter Fragmentlänge wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 1 – 2 % (w/v, in 1 × TAE [40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 8,0 mit Essigsäure einstellen]) getrennt. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 5 µl PCR-Produkt bzw. 10 µl eines Restriktionsansatzes mit 2 × Ladepuffer (70 % w/v Glycerin, 0,05 % w/v Xylencyanolblau, 0,05 % Bromphenolblau; in 1 × TAE) vermengt und in die Probenaschen des Gels aufgetragen. Zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente wurde der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ (Fermentas) verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde an die Spannungsquelle „PowerPac Basic Power Supply“ angeschlossen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1 × TAE-Laufpuffer bei 130 V für 30 – 50 min. Um die DNA-Fragmente im Agarosegel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 10 min im Ethidumbromidbad (1 mg/l, in TAE) inkubiert. Die DNA konnte dann nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) und mit Hilfe des Geldokumentationssystems AlphaImager EP sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Das Prinzip der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) wurde erstmals von Fischer *et al.* (1983) beschrieben. Die DGGE ermöglicht die sequenzspezifische Trennung von DNA-Fragmenten gleicher Länge. Die doppelsträngige DNA wird in einem Polyacrylamidgel mit zunehmenden Gradienten aus Harnstoff und Formamid elektrophoretisch aufgetrennt. In Abhängigkeit der denaturierenden Umgebung erfolgt ein Schmelzen der doppelsträngigen DNA. Zunächst schmelzen die Bereiche der DNA, deren Sequenz die gleichen Schmelzeigenschaften aufweisen („Schmelzdomäne“). Dieses partielle Aufschmelzen der DNA reduziert die elektrophoretische Mobilität im Polyacrylamidgel und

ermöglicht eine sequenzspezifische Trennung der DNA-Fragmente. Im Rahmen der PCR-DGGE wurden die zur Identifizierung von Hefen bzw. Milchsäurebakterien geeigneten Bereiche des 28S rRNA-Gens bzw. des 16S rRNA-Gens wie in Kapitel 2.2.14.4 (siehe Tabelle 2.17 und Tabelle 2.18) amplifiziert. Jeweils eines der verwendeten Oligonukleotide war mit einer GC-Klammer versehen (Muyzer *et al.*, 1993). Dieser Bereich würde aufgrund der hohen Bindungsenergie erst bei einer sehr hohen denaturierenden Umgebung schmelzen. Aufgrund der verringerten Mobilität der aufgeschmolzenen DNA wurde dieser Punkt jedoch nicht erreicht und das vollständige Aufschmelzen der DNA somit verhindert (Muyzer und Smalla, 1998). Die PCR-DGGE wurde, wie von Walter *et al.* (2000) beschrieben, mit dem „DCode™ Universal Mutation Detection System“ durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 8 %igen Polyacrylamidgelen (Acrylamid/Bis [37,5:1]) mit einem denaturierenden Gradienten zwischen 32,5 – 50 % (Hefen) bzw. 32,5 – 40 % (Milchsäurebakterien) in TAE-Puffer. Hierbei entspricht 100 % Denaturierung einer Mischung aus 7 M Harnstoff und 40 % (v/v) Formamid. Auf die Entgasung der Lösung durch vorherige Ultraschallbehandlung wurde bei der Gelherstellung verzichtet. Gestartet wurde die radikalische Polymerisation durch die Zugabe von 120 µl 10 % (w/v) APS und 12 µl TEMED pro 16 ml Lösung und anschließendem Schwenken der Lösung. Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers mit einer Fläche von 16 × 16 cm und einer Dicke von 1 mm hergestellt. Bei PCR-Produkten von Reinkulturen wurde in der Regel ein Volumen von 5 µl Probe mit 5 µl 2 × Ladepuffer aufgetragen. Bei Teigproben, bei denen es sich in der Regel um ein Gemisch aus mehreren unterschiedlichen PCR-Produkten handelte, wurden dagegen 15 µl Probe versetzt mit 5 µl 2 × Ladepuffer aufgetragen. Zur schnellen Identifizierung der in der Probe vorhandenen Hefen oder Milchsäurebakterien wurde ein Marker etabliert (siehe Kapitel 3.5.1, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). Hierzu wurde die DNA der im Marker vorhandenen Mikroorganismen mittels PCR amplifiziert und die so erhaltenen PCR-Produkte miteinander vermengt. Von diesem DNA-Gemisch wurden stets 15 µl als Marker eingesetzt. Die Trennung in der DGGE wurde bei 60 °C mit 130 V für 4,5 h durchgeführt. Um die DNA-Fragmente im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 10 min im Ethidumbromidbad (1 mg/l in TAE) inkubiert. Nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) konnte die DNA mit Hilfe des Geldokumentationssystems „AlphaImager EP“ sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.2.14.7 Isolierung von DNA-Fragmenten

In einigen Fällen war eine Isolierung bestimmter DNA-Fragmente nach der elektrophoretischen Auftrennung notwendig.

Agarose-Gele

Um nach der Restriktion mit DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe weiter arbeiten zu können, wurden nach der Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.14.6) und dem dem Färben im Ethidiumbromidbad die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die Isolierung dieser DNA-Fragmente erfolgte mit dem Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ nach Herstellerangaben.

Denaturierende-Gradienten-Gele

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wurden die einzelnen Banden, die durch die PCR-DGGE (siehe Kapitel 2.2.14.6) erhalten wurden, nach dem Sichtbarmachen mit UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die Isolierung dieser DNA-Fragmente erfolgte nach ben Omar *et al.* (2000). Hierzu wurde das Gelfragment mit 100 µl Wasser gewaschen und über Nacht in 20 µl Wasser bei 4 °C eluiert. In einer nachfolgenden PCR (siehe Kapitel 2.2.14.4, Tabelle 2.19) wurde 1 µl des Eluats mit dem entsprechenden Oligonukleotidpaar ohne GC-Klammer amplifiziert.

2.2.14.8 Restriktion von Nukleinsäuren

Die Restriktion von doppelsträngiger DNA wurde zur Klonierung sowie zur Überprüfung der nach der Klonierung erhaltenen Plasmide mit den in Kapitel 2.1.6 beschriebenen Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers in einem Reaktionsansatz von 20 µl durchgeführt.

2.2.14.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit „Quick T4 DNA Ligase“ (NEB) nach Angaben des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt.

2.2.14.10 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus 5 ml einer frischen Übernachtskultur durchgeführt.

2.2.14.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration der aus Teigen bzw. Nebenströmen isolierten DNA oder nach der Plasmidisolierung (Kapitel 2.2.14.3 und 2.2.14.10) erfolgte photometrisch bei

einer Wellenlänge von 260 nm (Sambrook *et al.*, 2001) mit Hilfe des GeneQuant 1300 classic (GE Health Care). Für dsDNA entsprach eine Absorption von $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml. Zudem wurde die Reinheit der DNA-Lösung durch Messungen bei einer Wellenlänge von 280 und 320 nm überprüft.

2.2.14.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung definierter DNA-Abschnitte wurde durch die Firma Seqlab (Göttingen) mittels Extended HotShot durchgeführt. Neben 5-10 mM Tris enthielt der Sequenzierungsansatz (7 µl) 20 pmol des gewünschten Oligonukleotids („Primer“) und die zu sequenzierende DNA.

Reinkulturen

Für die Sequenzierung von Reinkulturen wurde die DNA der Hefen bzw. der Milchsäurebakterien wie in Kapitel 2.2.14.1 bzw. 2.2.14.2 beschrieben isoliert. Anschließend wurde die DNA wie in Kapitel 2.2.14.4 (Tabelle 2.17 bzw. Tabelle 2.18) beschrieben amplifiziert und gereinigt (Kapitel 2.2.14.5). Die für die Sequenzierung benötigte Menge an DNA wurde berechnet. Hierbei ergab die PCR-Produkt-Länge geteilt durch 4 die Menge an benötigter DNA in Nanogramm. Als „Primer“ wurde NL4 (Hefen) bzw. 806r (Milchsäurebakterien) verwendet.

DGGE-Banden

Die aus den denaturierenden Gradientengelen isolierte und amplifizierte DNA (siehe Kapitel 2.2.14.7) wurde mit den Oligonukleotiden NL1 (Hefen) bzw. L1 (Milchsäurebakterien) sequenziert. Die benötigte Menge an DNA wurde wie für die Sequenzierung der Reinkulturen berechnet.

Plasmide

Die aus *E. coli* isolierten Plasmide (siehe Kapitel 2.2.14.10) wurden mit jeweils einem der Oligonukleotide „Universal M13 reverse“, „Universal M13 forward“ oder „HuEEB1seq“ sequenziert. Der Sequenzieransatz enthielt jeweils 600 - 700 ng Plasmid.

2.2.14.13 BLAST („Basic Alignment Search Tool“)

Die erhaltenen DNA-Sequenzen aus den oben beschriebenen Ansätzen wurden mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST, Altschul *et al.*, 1990) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) ausgewertet. Der Sequenzvergleich erfolgte mittels

„blastn“ und der Datenbank „nr/nt“. Die erhaltenen Resultate wurden durch einen direkten Sequenzvergleich mit der Typstamm-Sequenz bestätigt.

2.2.15 Analyse von Proteinen

2.2.15.1 Rohextrakt-Präparationen aus *K. lactis* und *K. marxianus*

Zur Überprüfung der Expression von HuEeb1 und HuAtf1 in *K. lactis* und *K. marxianus* wurden nach der Transformation von pJJH1512, pJJH1823 und pJJH1828 aus den entsprechenden *K. lactis*- bzw. *K. marxianus*-Stämmen nach selektiver Anzucht Rohextrakte hergestellt. Hierzu wurden 15 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur durch Zentrifugation (2 min, 3000 rpm) geerntet und einmal mit 3 ml Wasser und einmal mit 3 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Kaliumphosphatpuffer resuspendiert, mit 0,5g Glaskugeln (Durchmesser 0,5 mm) versetzt und durch Schütteln mit dem „Vibrax-VXR basic“ (IKA, Staufen) bei 4 °C für 7 min aufgeschlossen. Debris aus dem Überstand wurde durch Zentrifugation in einer Mikrofuge (10 min, 4 °C, 13000 rpm) entfernt. Der so erhaltene klare Rohextrakt wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Micro-Biuret-Methode bestimmt (Zamenhoff, 1957) und jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden für die Westernblot-Analyse eingesetzt.

2.2.15.2 Trennung der Proteine des Rohextrakts mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Zunächst wurden die Proben im 3 %igen Sammelgel (0,5 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe), 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer [0,4 % (w/v) SDS, 0,5 m Tris, pH 6,8], 3,25 ml H₂O, 30 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 30 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)) fokussiert und anschließend im 10 %igen Trenngel (5 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe), 3,75 ml 4 x Trenngelgelpuffer [0,4 % (w/v) SDS, 1,5 m Tris, pH 8,8], 6,25 ml H₂O, 50 µl 10 % (w/v) APS und 50 µl TEMED) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Elektrophorese wurde im „Mini-PROTEAN 3 Cell“-System (BioRad, München) durchgeführt. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein mit den mit Probenpuffer (60 mM Tris/HCl, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,005% Bromphenolblau) versetzten und gekochten Rohextrakten und 2 µl des Standards „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden für

30 min mit 70 Volt ins Sammelgel einlaufen lassen und dann für etwa 2 h bei 100 Volt in 1 x SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 35 mM SDS, 250 mM Tris, pH 8) getrennt. Anschließend wurden die Gele in der "Semi-Dry-Blotting-Apparatur" von BioRad auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und zum immunologischen Nachweis eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.15.3).

2.2.15.3 Western Blot

Proteine können im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung und dem Transfer auf eine Trägermembran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Hierzu wurden im ersten Schritt die „Gel-Blotting-Papiere 3 mM“ (Whatman, Roth), das SDS-Gel und eine „PROTRAN Nitrocellulose Transfer membrane“ (Whatman, A. Hartenstein) in 1 x Blotpuffer (192 mM Glycin, 20 % (v/v) MeOH, 29 mM Tris) für 30 min äquiliert. Anschließend wurden im „Semidry“-Verfahren unter Zuhilfenahme des Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München) bei 500 mA für 30 min die Proteine auf die Membran übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren, wurde die Membran mit 1 x TBST (150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 50 mM Tris, pH 8,0) mit 3 % (w/v) BSA für 1 h bei Umgebungstemperatur inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Maus-anti-HA [1:5000] bzw. Kaninchen-anti-ScPFK [1:10.000] jeweils in 1 x TBST mit 3 % (w/v) BSA) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die überschüssigen Antikörper wurden durch Waschen der Membran (4 x für 10 min) mit 1 x TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG [1:5000] bzw. anti-Kaninchen-IgG [1:5000], jeweils in 1 x TBST mit 3 % (w/v) BSA) bei Umgebungstemperatur inkubiert und erneut 4 x für 10 min mit 1 x TBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mithilfe des Odyssey-Scanners bei 700 nm bzw. 800 nm detektiert und anhand der mitgelieferten Software visualisiert.

2.2.16 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde entweder die Regressionsanalyse mittels der RGP-Funktion oder eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) in Excel 2010 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Fermentationssubstrate

Zunächst sollten die Auswirkungen verschiedener Hefearten und der Zusatz von Nebenströmen auf die Teigqualität untersucht werden. Für die Fermentation von Teigen auf Basis von Weizenmehl Typ 550 mit Zusatz von Nebenströmen durch alternative Hefen wurden deshalb verschiedene Chargen von Apfel-, Karotten- und Traubentrestern sowie Biertreber verwendet. Hierzu wurden vor Beginn der Fermentation diese Nebenströme der Lebensmittelindustrie und das Weizenmehl auf ihren Gehalt an Hefen und Milchsäurebakterien überprüft und der Ausgangs-pH-Wert bestimmt (Tabelle 3.1). Diese Analysen zeigten eine sehr geringe mikrobiologische Belastung der Fermentationssubstrate Weizenmehl Typ 550, Apfeltrester, Karottentrester der Charge 1 und Biertreber, mit Gesamtkeimzahlen von maximal $3,5 \times 10^3$ KbE/g. Der frische Karottentrester (Charge 2) und seine im Umluftschrank getrocknete Variante (Charge 3) zeigten dagegen, ebenso wie der getrocknete Trester der Charge 4, mit bis zu $1,6 \times 10^6$ KbE/g deutlich höhere Keimzahlen sowohl für Milchsäurebakterien als auch in der Gesamtkeimzahl. Die frischen Traubentrester Riesling, weißer Burgunder und Portugieser wiesen im Vergleich zu den anderen Fermentationssubstraten die höchste Lebendkeimzahl der Hefen (zwischen etwa 10^5 und 10^7 KbE/g)

Tabelle 3.1: Lebendkeimzahlen und pH-Werte der in die Fermentation eingesetzten Substrate.

Nebenstrom	Charge	Lebendkeimzahl (KbE/g)			pH-Wert
		Hefen	Milchsäurebakterien	Gesamtkeimzahl	
Weizenmehl	1	$< 10^2$	$< 10^2$	$3,5 \times 10^3$	6,2
Apfeltrester	1	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^3$	3,5
	2	$3,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	n. b.	3,6
	3	$6,8 \times 10^2$	$< 10^1$	$< 10^2$	3,5
	4	$1,2 \times 10^2$	$< 10^1$	$< 10^2$	3,7
	5	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^2$	3,5
	6	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^2$	3,6
	7	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^1$	3,6
	8	$< 10^1$	$< 10^2$	$< 10^1$	3,1
Karottentrester	1	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^3$	5,1
	2	$< 10^2$	$4,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	4,8
	3	$< 10^2$	$1,5 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$	4,6
	4	$1,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	5,7
Biertreber	1	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	4,7
Rieslingtrester	1	$1,2 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$	n. b.	3,5
	2	$2,6 \times 10^3$	$< 10^2$	$2,5 \times 10^3$	3,8
weißer Burgundertrester	1	$8,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	n. b.	3,8
	2	$1,4 \times 10^2$	$< 10^2$	$< 10^3$	3,7
Portugiesertrester	1	$1,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^2$	n. b.	3,5
	2	$6,7 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$< 10^3$	4,0

n. b., nicht bestimmt

auf, die allerdings durch die Trocknung auf maximal $2,6 \times 10^3$ KbE/g reduziert werden konnte. Milchsäurebakterien konnten nur im Trester aus frischem weißem Burgunder mit $1,1 \times 10^4$ KbE/g nachgewiesen werden. Neben den mikrobiellen Analysen wurden außerdem die Wasseraktivität (a_w) und die Feuchte der saisonal anfallenden Nebenströme bestimmt. Für die Wasseraktivität wurden a_w -Werte zwischen 0,17 und 0,28 ermittelt. Die Feuchte der Substrate lag bei 11 - 15 %. Es ist daher anzunehmen, dass sich eine Lagerung bei -20 °C nicht negativ auf die Qualität der Nebenströme als Fermentationssubstrat auswirkte.

Da die Fermentationssubstrate mit den in ihnen enthaltenen Nährstoffen die Grundlage für eine erfolgreiche Fermentation durch die Mikroflora und die Aromakomposition bilden, wurde als Nächstes eine Nährstoffanalyse besonders häufig verwendeter Nebenströme (Apfeltrester Charge 1, 5 und 6 sowie Karottentrester Charge 1 und 4) durchgeführt. Beim Weizenmehl des Typs 550 handelt es sich um ein recht gut standardisiertes Naturprodukt, dessen Nährstoffzusammensetzung in der Literatur bereits beschrieben wurde (GMF 2009), sodass hier auf eine erneute Charakterisierung verzichtet wurde. Wie Tabelle 3.2 zeigt, sind Ballaststoffe und Kohlenhydrate die Hauptbestandteile beider Trestersorten. Der Anteil an Wasser, Asche, Rohprotein und Fett spielt in beiden Trestersorten eine eher untergeordnete

Tabelle 3.2: Nährstoffanalyse der häufig für die Fermentation verwendeten getrockneten Trester.

Parameter	Apfeltrester			Karottentrester	
	Charge 1	Charge 5	Charge 6	Charge 1	Charge 4
Wasser	6,6	5,1	4,7	6,0	5,3
Asche	1,9	1,9	2,8	5,7	4,8
Rohprotein	4,7	6,0	4,0	6,5	8,4
Fett	3,1	4,6	3,6	1,5	2,9
Ballaststoffe gesamt	51,4	49,7	38,7	50,2	65,3
Kohlenhydrate	32,3	32,7	46,3	30,2	13,3
Saccharose	2,2	6,1	7,1	23,2	8,8
Glucose	4,9	7,0	10,7	2,7	1,1
Fructose	11,3	15,5	23,0	2,6	1,2
Maltose	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Lactose	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,5	< 0,3
Zucker (Summe Mono-, Disaccharide)	18,4	28,6	40,8	28,5	11,1
Fettsäuren (gesättigt)	1,0	1,1	0,9	0,4	0,6
Fettsäuren (einfach ungesättigt)	0,7	1,6	1,1	< 0,1	0,1
Fettsäuren (mehrfach ungesättigt)	1,4	2,0	1,6	1,0	2,1
Trans-Fettsäuren	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Brennwert	1154	1226	1295	1079	999

Alle Angaben sind in g/100g, mit Ausnahme des Brennwertes, der in kJ/100g angegeben ist.

Rolle. Allerdings unterscheiden sich die beiden Trestersorten bezüglich der enthaltenen Zucker. Während die Konzentration des Disaccharids Saccharose im Karottentrester (8,8 - 23,2 %) deutlich höher sein kann als im Apfeltrester (2,2 – 7,1 %), sind im Apfeltrester die Monosaccharide Fructose und Glucose stärker vertreten. So liegt der Anteil dieser Monosaccharide im Karottentrester bei 1,1 – 2,7 %, während im Apfeltrester Werte zwischen 4,9 - 23,0 % erreicht werden. Des Weiteren fällt auf, dass im Apfeltrester etwa doppelt so viel Fructose wie Glucose vorhanden ist, was eine Vermehrung fructophiler Hefearten begünstigen könnte.

3.2 Effekt der Hefepopulation auf die Aromabildung und das Wachstum der Mikroflora

Zur Identifizierung alternativer Hefen mit einem besonderen Potenzial zur Aromabildung im Teig erfolgte zunächst eine Auswahl von verschiedenen Stämmen der Gattungen *Cyberlindnera*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saturnispora*, *Torulaspora* und *Wickerhamomyces*, die im Vergleich zum *S. cerevisiae*-Typstamm DSM 70449^T zur Fermentation verschiedener Teige eingesetzt wurden. Hierzu wurden die Teige (TA 200) mit der zu untersuchenden Hefe inokuliert (10^6 KBE/g) und für 24 h bei 25 °C fermentiert. Eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse ist in Tabelle 3.3 dargestellt, während die detaillierten Messwerte im Anhang (Tabelle A.1 - Tabelle A.14) zu finden sind.

Im ersten Schritt wurde das Wachstum und die Aromabildung der Nicht-*Saccharomyces*-Hefen in Weizenteigen ohne die Zugabe von Nebenströmen im Vergleich zu *S. cerevisiae* DSM 70449^T untersucht (Tabelle A.1 im Anhang). Ein sehr gutes Wachstum in diesen Weizenteigen zeigten *S. cerevisiae* DSM 70449, *T. delbrueckii* DIL 97, *W. anomalus* DIL 1050 sowie alle untersuchten Stämme von *H. uvarum*. Bei anderen untersuchten Hefen wurde hingegen kein Wachstum und im Fall von *C. jadinii* sogar eine Reduktion der Lebendkeimzahl um mehr als den Faktor 10 beobachtet. Der Geruch einiger fermentierter Teige wurde arttypisch als teigig und hefig beschrieben. In anderen Fällen wurden entweder zusätzliche oder ausschließlich an Käse oder Banane erinnernde Gerüche wahrgenommen. Besonders negativ fiel der Geruch des mit *S. cerevisiae* DSM 70449 fermentierten Weizenteigs auf, welcher als „Schweißfuß“ oder „Erbrochenes“ beschrieben wurde. Der käsige Geruch der fermentierten Teige deutete auf die Anwesenheit von Enterobakterien hin (Hochstrasser *et al.*, 1993). Daher wurden in einigen der fermentierten Weizenteige auch die

Lebendkeimzahlen der Enterobakterien bestimmt (Tabelle A.2), die mit bis zu $7,5 \times 10^6$ KbE/g nachgewiesen werden konnten. Durch Veränderung der Prozessparameter (Zugabe von Antibiotika, Absenken des pH-Werts durch die Zugabe von Milchsäure) konnte das Wachstum der Enterobakterien verhindert und ein käsiges Aroma vermieden werden. Trotz des zum Teil sehr guten Hefewachstums in den Weizenteigen, konnten die alternativen Hefen aus den im Weizenmehl vorhandenen Vorstufen keine besonderen fruchtigen Aromen generieren. Daher wurden die Weizenteige auch mit verschiedenen Nebenströmen versetzt, um die Auswirkungen des Hefestoffwechsels auf die Bildung von solchen Aromen zu untersuchen. Zunächst wurde überprüft, ob das Aroma der Teige auf die Aktivität der Hefen und nicht ausschließlich auf die Präsenz des Nebenstroms zurückzuführen ist (Tabelle A.3). Hierzu wurden 25 % des entsprechenden Nebenstroms, wie Apfel-, Karotten- und Traubentrester oder Bierteber, in die fermentierten Weizenteige gemischt und der entstehende Geruch untersucht. Es zeigte sich, dass die begleitenden Gerüche wie z. B. käsig durch die Nebenströme überdeckt wurden. Allerdings entstanden keine fruchtigen oder süßlichen Aromen. Nur in Kombination mit dem Karottentrester wurde der Geruch der Teige als nach Karotte riechend, erdig und süßlich beschrieben. Eine Fermentation der Weizenteige mit 25 % Nebenstrom durch die im Fermentationssubstrat enthaltenen Enzymaktivitäten sowie der metabolischen Aktivität der Mikroflora führte in Abhängigkeit des verwendeten Nebenstroms zu unterschiedlichen Gerüchen. Für den Apfeltrester dominierten die Gerüche nach Marzipan und kernig, während für den Karottentrester der bereits im nicht fermentierten Teig festgestellte, süßliche, nach Karotte und Erde riechende Geruch auftrat. Die entsprechend mit Traubentrester hergestellten Teige hatten einen muffigen Geruch, während nur der Geruch des mit Portugiesertrester hergestellten Teigs an Wein erinnerte. Mit Ausnahme des Rieslingtresters konnte in der Spontanflora stets das Wachstum von Hefen nachgewiesen werden, während die Milchsäurebakterien eher in Kombination mit dem Karottentrester bzw. dem Burgundertrester wachsen konnten.

Im weiteren Verlauf sollten nun die verschiedenen Hefen in Kombination mit den Nebenströmen dem Teig zugesetzt und das mikrobielle Wachstum sowie die Aromabildung beobachtet werden. In insgesamt 282 Fermentationen wurden mit zehn Gattungen, 18 Spezies und 56 Stämmen der Nicht-*Saccharomyces*-Hefen gearbeitet, zusammen mit sechs unterschiedlichen Sorten von getrockneten Nebenströmen sowie unterschiedlicher Chargen der Nebenströme. Hierbei wurden sowohl das Wachstum der Hefen als auch das der in der Begleitflora enthaltenen Milchsäurebakterien, die Änderung des pH-Werts und das Aroma der fermentierten Teige überprüft. Die Auswahl der für die Fermentation geeigneten Hefe-

Substrat-Kombinationen erfolgte anhand des Hefewachstums und des Aromas der fermentierten Teige. In Tabelle 3.3 ist eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse dargestellt, die im Anhang (Tabelle A.1, Tabelle A.4, Tabelle A.6, Tabelle A.8, Tabelle A.12, Tabelle A.13, Tabelle A.14) detailliert aufgeführt sind. Insgesamt fiel auf, dass die Zugabe der Nebenströme wie Apfel- oder Karottentrester das Wachstum von nicht an den Teig adaptierten Hefen wie z. B. *C. jadinii* DIL 1047 ermöglichte, obwohl deren Lebendkeimzahl sich in reinen Weizenteigen in 24 h um den Faktor 10 reduzierte. Allerdings verbesserte die Zugabe der Nebenströme nicht das Wachstum aller getesteten Hefen. So erreichten viele der untersuchten Stämme nach 24 h Fermentation in den Teigen mit und ohne Zusatz von Nebenströmen ähnliche Lebendkeimzahlen. Beispielsweise wuchsen die Stämme von *D. bruxellensis* praktisch nicht, während ein mäßig gutes Wachstum für einige Stämme von *K. marxianus*, *T. delbrueckii* oder *W. anomalus* beobachtet wurde. Allerdings gab es bei den Spezies mit einem mäßig guten Wachstum in der Regel stets einen Stamm, der auf allen Substratkombinationen gut wuchs. Genannt sei hier z. B. *K. marxianus* DIL 82. Weiterhin konnten alle von *H. uvarum* untersuchten Stämme in den hergestellten Teigen stets sehr gut wachsen. In Bezug auf die Aromabildung wurde festgestellt, dass die Fähigkeit der Hefen zu wachsen keinen entscheidenden Einfluss auf das Aroma der Teige hatte. Es gab Teige mit einer bestimmten Hefestamm-Substrat-Kombination, wie z. B. *H. uvarum* und Biertreber, deren Geruch nach Fermentationsende fruchtig und nach Banane riechend beschrieben wurde. Allerdings war dieses Aroma sehr flüchtig und somit bereits nach sehr kurzer Zeit nicht mehr detektierbar. Andere Kombinationen von *H. uvarum* mit den unterschiedlichen Fermentationssubstraten resultierten in keinem besonderen Aroma. Hingegen gab es Hefe-Substrat-Kombinationen sowohl für Hefestämme mit einem schlechten als auch einem mäßig guten Wachstum, deren Teige nach Fermentationsende ein besonderes Aroma aufwiesen. Als Beispiel sei hier der mit *D. bruxellensis* DIL 1203 und Karottentrester hergestellte Teig 234 genannt (Tabelle A.8), dessen Aroma eine blumige Note aufwies. Neben der Auswahl der geeigneten Hefestämme in Kombination mit dem Fermentationssubstrat hatte auch die Charge des Nebenstroms einen großen Einfluss auf das Fermentationsergebnis. Außer den getrockneten Trestern wurden daher auch frische Karotten- oder Traubentrester der Fermentation zugesetzt, allerdings konnten damit aufgrund der begrenzten Haltbarkeit nur wenige Fermentationen durchgeführt werden. Um gleiche Anteile an Trockenmasse des getrockneten bzw. des frischen Tresters zu verwenden, hier wurde auch das Volumen der zugesetzten frischen Trester erhöht.

Tabelle 3.3: Übersicht der Fermentatationsergebnisse für unterschiedliche Hefe-Nebenstrom-Kombinationen.

Nebenstrom	Anzahl der untersuchten Fermentationen/Gattungen/Spezies/Stämme	Beispiele für Hefen mit		Wachstum schlechtem Wachstum, keine Aromabildung	Wachstum Begleitflora	pH-Wert	
		gutem Wachstum und Aromabildung	gutem Wachstum oder Aromabildung			t ₀	t ₂₄
Ohne ¹⁾	33 / 10 / 12 / 24	<i>H. uvarum</i> , <i>T. delbrueckii</i> S. cerevisiae, <i>K. marxianus</i> DIL 186, DIL 97	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. marxianus</i> DIL 43, <i>T. pretoriensis</i> DIL 1055	<i>P. fermentans</i> , <i>C. jadinii</i> , <i>D. bruxellensis</i>	häufig	5,9 – 5,0 – 6,4	Hefig, teigig 5,8
Apfeltrester ²⁾	74 / 10 / 13 / 42	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>C. jadinii</i> DIL 1047, <i>T. delbrueckii</i> DIL 97	<i>H. uvarum</i> , <i>K. marxianus</i> DIL 174, <i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>T. pretoriensis</i> DIL 97	<i>K. marxianus</i> DIL 193, <i>D. bruxellensis</i>	nicht nachweisbar	4,3 – 4,1 – 4,6	Apfel, fruchtig 4,6 (z. B. tropisch oder Banane), blumig
Biertreber ³⁾	53 / 8 / 12 / 41	<i>H. uvarum</i> DIL 595, 596	<i>K. marxianus</i> DIL 43, <i>T. delbrueckii</i> DIL 186	<i>K. marxianus</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>D. bruxellensis</i>	teilweise	5,4 – 5,0 – 5,8	Bier, fruchtig 5,7. (Banane) ^{a)}
Karottentrester ⁴⁾	67 / 9 / 12 / 33	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>T. delbrueckii</i> DIL 1054, <i>T. pretoriensis</i> DIL 1055, <i>W. anomalus</i> DIL 1050	<i>D. bruxellensis</i> dil 1203, <i>K. lactis</i> DIL 194, <i>K. marxianus</i> DIL 193, <i>S. saitoi</i> DIL 1050, <i>H. uvarum</i>	<i>D. bruxellensis</i> , <i>S. saitoi</i>	häufig	5,8 – 4,4 – 5,4	Fruchtig, Karotte, 5,7 süßlich, blumig
Burgundertrester ⁵⁾	10 / 3 / 4 / 8		<i>K. marxianus</i> DIL 43, DIL 82, <i>C. tropicalis</i> , <i>Metschnikowia</i> sp.	<i>K. marxianus</i> DIL 82	teilweise	4,0 – 3,9 – 4,4	Kein besonderes Aroma
Portugiesertrester ⁶⁾	26 / 8 / 9 / 15		<i>K. marxianus</i> , <i>Metschnikowia</i> sp., <i>T. delbrueckii</i> , <i>H. uvarum</i>	<i>R. nothofagi</i>	nicht nachweisbar	3,5 – 3,5 – 4,1	Fruchtig, Rotwein, 4,1 Schokolade
Rieslingtrester ⁷⁾	19 / 8 / 9 / 12		<i>C. jadinii</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Metschnikowia</i> sp.	<i>R. nothofagi</i>	teilweise	3,7 – 3,7 – 4,3	Fruchtig, süßlich, 4,2 Traube, Getreide, Kartoffel

t₀ bzw. t₂₄: 0 bzw. 24 h nach Fermentationsbeginn¹⁾ Tabelle A.1, ²⁾ Tabelle A.4, ³⁾ Tabelle A.6, ⁴⁾ Tabelle A.8, ⁵⁾ Tabelle A.12, ⁶⁾ Tabelle A.13, ⁷⁾ Tabelle A.14^{a)} Geruch schnell verfliegen

Letztlich konnten bei der Fermentation der frischen Trester deutliche Unterschiede vor allem in der Aromabildung im Vergleich zu den getrockneten Trestern beobachtet werden, während das Wachstum der Mikroflora hiervon nicht beeinflusst wurde (Tabelle A.10, Tabelle A.11). Weiterhin wurde überprüft, ob sich das z. T. starke Wachstum der Begleitflora auf die Aromabildung auswirkt. Hierzu wurde das Wachstum der bakteriellen Begleitflora in den Teigen durch die Zugabe von Antibiotika gehemmt. Da der Geruch der mit den Hefen inokulierten Teige weitgehend dem Geruch der ohne Chloramphenicol fermentierten Teige entsprach, hatten die Milchsäurebakterien offenbar keinen wesentlichen Einfluss auf die Aromabildung (vgl. Tabelle A.5, Tabelle A.7, Tabelle A.9).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Kombination von verschiedenen Hefen mit unterschiedlichen Nebenströmen in Weizenteigen das Wachstum der Hefen fördern kann und zur Bildung von positiven Aromen beiträgt.

3.3 Charakterisierung alternativer Hefen

Die oben beschriebenen Vorversuche führten zur Auswahl einer überschaubaren Zahl von Hefestämmen für die weiteren in dieser Dissertation durchgeführten Experimente, deren Eigenschaften in Tabelle 3.4 zusammengefasst sind. Da während der Teigfermentation die Verfügbarkeit von Sauerstoff für die Hefen begrenzt ist, müssen die im Teig vorhandenen Kohlenhydrate Maltose, Saccharose, Glucose und Fructose fermentativ durch den Hefestoffwechsel genutzt werden. Daher wurden die für die Fermentation der mit Nebenströmen supplementierten Weizenteige geeigneten Hefen auf ihre Fähigkeit zur anaeroben Verwertung

Tabelle 3.4: Stammspezifische Eigenschaften verschiedener Hefestämmen.

Spezies	Stamm	Fermentation				Temperatur (°C)	
		Glucose	Fructose	Maltose	Saccharose	Maximale Koloniegröße	Maximum Wachstum
<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	++	+	-	+	37	42
<i>K. lactis</i>	DIL 194	++	++	-	++	30	37
<i>K. marxianus</i>	DIL 43	++	++	-	++	42	42
<i>K. marxianus</i>	DIL 82	++	++	○	++	42	42
<i>K. marxianus</i>	DIL 610	++	++	-	++	42	42
<i>P. fermentans</i>	DIL 175	++	++	-	++	30	37
<i>S. cerevisiae</i>	DIL 1225	+++	+	-	+++	37	37
<i>T. delbrueckii</i>	DIL 1054	+++	+	+++	++	30	30
<i>W. anomalus</i>	DIL 1050	+	○	-	++	30	30

Angegeben ist die Eigenschaft bestimmte C-Quellen zu fermentieren sowie die Temperatur, bei der die maximale Koloniegröße erreicht wurde bzw. noch Wachstum stattfindet. Die Fermentation wurde mit Hilfe von Durham-Röhrchen überprüft und anhand der Gasbildung bewertet.

+++ starke, + verzögert, + langsame, ○ schwache, - keine Gasbildung.

der entsprechenden Kohlenstoffquellen untersucht. Anhand der Gasbildung in Durham-Röhrchen konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Hefestämme Glucose und Saccharose gut bis sehr gut verwerten konnten. Während auch Fructose mit Ausnahme von *W. anomalus* DIL 1050 gut fermentiert wurde, konnte Maltose nur von *T. delbrueckii* DIL 1054 sehr gut verwertet werden.

3.4 Optimierung der Prozessparameter

Die in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse des Screenings zeigten, dass sich vor allem die Nebenströme Apfel-, Karotten- und Traubentrester in Kombination mit dem Zusatz alternativer Hefen für die Fermentation von Teigen eigneten. Im Folgenden sollten die Prozessparameter (Höhe des Inokulats, Teigausbeute, Anteil des Nebenstroms, Temperatur und Fermentationszeit) für die Teigfermentation optimiert und die Variationsbreite bei Zusatz verschiedener Chargen der Apfel- und Karottentrester untersucht werden. Das Einstellen des pH-Wertes und die Zugabe von Enzymen zur Fermentation zeigten in Vorversuchen keinen nennenswerten Einfluss auf die Teig- und Aromaqualität und blieben daher hier unberücksichtigt.

3.4.1 Anteil des Nebenstroms

Für das oben beschriebene Screening zur Auswahl der geeigneten Nebenströme wurden die Teige mit jeweils 25 % Nebenstrom hergestellt. Dieser Anteil sollte im Folgenden variiert werden, wobei die zur Herstellung der Teige benötigte Wassermenge so angepasst wurde, dass alle Teige die gleiche Konsistenz aufwiesen. Für die Teige mit Apfeltrester wurde ein Konsistenzwert von $756 \pm 134 \text{ Pa s}^n$ für diejenigen mit Karottentrester ein Wert von $830 \pm 68 \text{ Pa s}^n$ ermittelt. Der a_w -Wert für Teige mit Apfeltrester lag bei 0,97, unabhängig davon, ob sie mit 5 % Trester oder mit 50 % Trester versetzt wurden. Somit wirkte die Trestermenge sich nicht auf diesen Parameter aus.

In Abbildung 3.1 sind zwei Beispiele für die nach 24 h Fermentation erreichten Lebendkeimzahlen von zwei *K. marxianus*-Stämmen in Teigen mit unterschiedlichem Anteil an Apfeltrester der Charge 1 und Charge 5 dargestellt. Die als repräsentativ ausgewählten Daten für die Fermentation der Weizenteige mit einem unterschiedlichen Anteil an Apfeltrester durch *K. marxianus* in Abbildung 3.1 zeigen, dass sowohl beim Apfeltrester der Charge 1 als auch bei der Charge 5 die Hefen innerhalb von 24 h mit einem zunehmenden Anteil an Trester auch eine höhere Lebendkeimzahl erreichten. In Kombination mit dem Trester der Charge 5

erreichte *K. marxianus* bereits bei einer Tresterkonzentration von 25 % eine Lebendkeimzahl von $8,9 \times 10^7$ KbE/g. Entsprechend wurden mit der Charge 5 des Apfeltresters nochmals mit fünf verschiedenen Stämmen von *K. marxianus* weitere Teige mit 25 % Trester hergestellt. Dabei wurde nach 24 h Fermentation jedoch nur eine Lebendkeimzahl zwischen $6,0 \times 10^6$ und $1,2 \times 10^7$ KbE/g erreicht. Obwohl es bei einer festgelegten Tresterkonzentration also zu erheblichen Schwankungen im Hefewachstum kommen kann, zeigen die durchgeführten Regressionsanalysen, dass die Tresterkonzentration einen signifikanten positiven Einfluss auf das Wachstum der Hefen hat. Weiterhin ist zu beobachten, dass durch die Charge 5 das Wachstum stärker verbessert wurde als durch Charge 1. Der pH-Wert der Teige nach Fermentationsende lag zwischen 3,5 und 5,1, wobei die niedrigeren Werte für die Teige mit dem höheren Tresteranteil und dem besseren Hefewachstum erzielt wurden. Ähnlich wie bereits für die Teige mit Apfeltrester gezeigt wurde, waren auch die Schwankungen der Hefelebendkeimzahl in den Teigen mit unterschiedlichen Anteilen an Karottentrester sehr groß. In Abbildung 3.2 sind am Beispiel des Karottentresters der Charge 4 die Mittelwerte aus zwei Lebendkeimzahlen sowie deren Abweichung angegeben. Trotz der starken Schwankung der Messwerte kann mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit eine leichte Steigerung des Hefewachstums mit zunehmender Tresterkonzentration beobachtet werden. Ein fruchtiges und nach Karotte riechendes Aroma konnte bei den Teigen mit einem Tresteranteil von bis zu

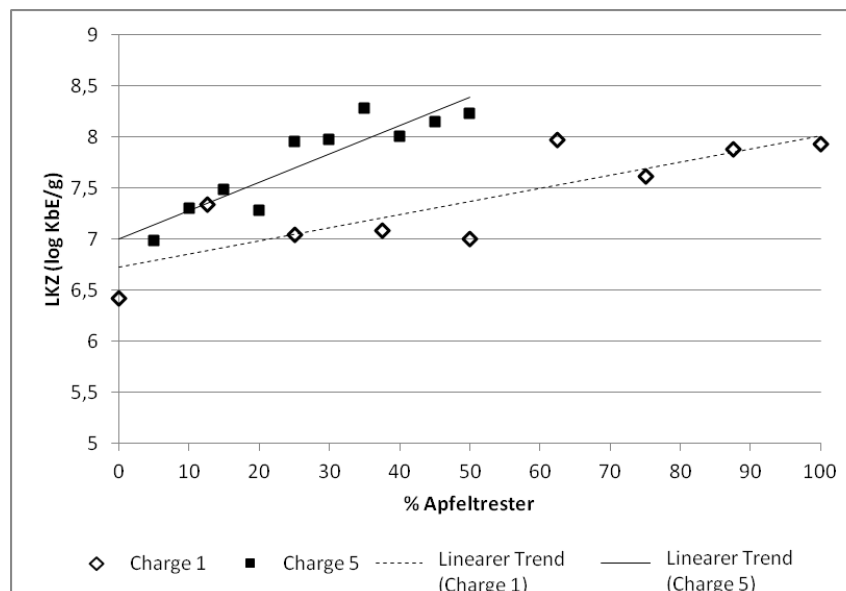


Abbildung 3.1: Einfluss der Tresterkonzentration auf die Lebendkeimzahl der Hefen in fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester (Charge 1 bzw. Charge 5). Die Teige wurden mit *K. marxianus* DIL 43 oder DIL 82 auf 10^6 KbE/g inokuliert und für 24 h bei 25 °C fermentiert. Die für die Herstellung der Teige notwendige Wassermenge wurde der Teigkonsistenz angepasst, sodass die Konsistenz der Teige 756 ± 134 Pa sⁿ betrug. 1: *K. marxianus* DIL 43, Hefeanzucht nach Methode 2, Charge 1; 4: *K. marxianus* DIL 82, Hefeanzucht nach Methode 28, Charge 5. Die Regressionsanalysen (Charge 1: $y = 0,0129 x + 6,7194$; $R^2 = 0,7032$; Charge 5: $y = 0,0276 x + 7,0021$; $R^2 = 0,8258$) wurde mittels RGP-Funktion durchgeführt und hatten ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. LKZ: Lebendkeimzahl der Hefen.

30 % festgestellt werden. Am intensivsten war dieses Aroma in den Teigen mit 20 - 25 % Trester. Unabhängig von der Karottentresterkonzentration lag der pH-Wert der Teige zu Fermentationsbeginn zwischen 5,7 - 5,9. Durch die Fermentation kam es zu einer Ansäuerung der Teige mit einem Tresteranteil von bis zu 30 %, sodass hier die pH-Werte bei 5,0 – 5,2 (Charge 1) bzw. 4,2 - 4,7 (Charge 4) lagen. Wurden die Teige mit einem Tresteranteil von 35 - 50 % hergestellt, so unterschieden sich die pH-Werte der mit den beiden Chargen hergestellten Teige nach Fermentationsende nicht und lagen im Bereich von 4,2 - 4,8. Für die Teige mit einem Tresteranteil von bis zu 100 % der Charge 1 lag der pH-Wert nach Fermentationsende bei 4,4 – 4,5. Fermentationen von 10 – 30 % Traubentrester wurde am Beispiel von Portugieser der Charge 2 untersucht. Die Hefen erreichten während der Fermentation eine Lebendkeimzahl von $1,7 \times 10^7$ - $5,9 \times 10^7$ KbE/g, wobei die niedrigeren Keimzahlen in den Teigen mit einer geringeren Tresterkonzentration ermittelt wurden. Dies bestätigt die oben beschriebene Tendenz der Apfel- und Karottentrester zur Förderung des Hefewachstums bei steigender Tresterkonzentration. Der Geruch der Teige mit einem niedrigen Tresteranteil war süßlich, säuerlich und nach Traube riechend und änderte sich mit Erhöhung des Tresteranteils zu einem Geruch nach Rotwein und Schokolade. Der pH-Wert der Teige nach Fermentationsende lag zwischen 3,6 und 4,4, wobei die niedrigeren Werte für die Teige mit dem höheren Tresteranteil erzielt wurden.

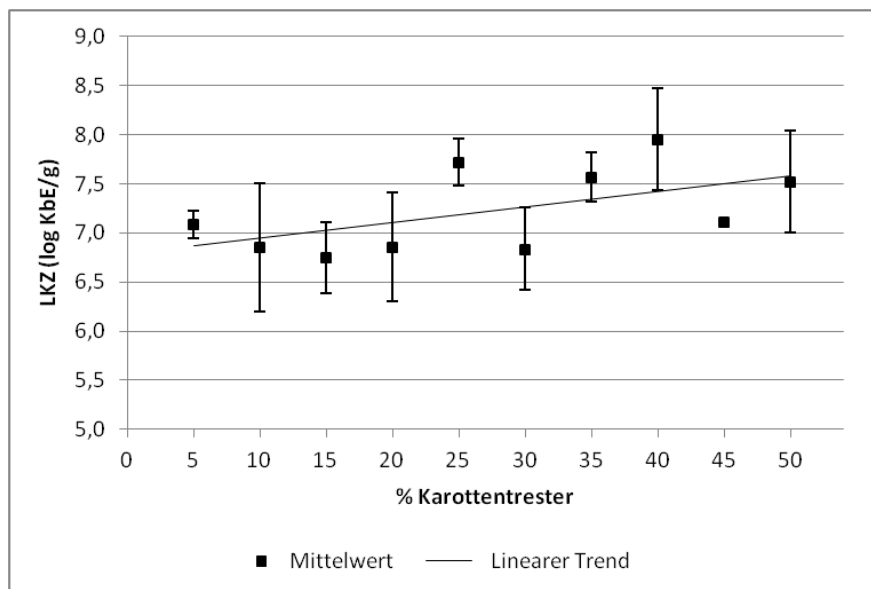


Abbildung 3.2: Einfluss der Tresterkonzentration auf die Lebendkeimzahl der Hefen in fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Karottentrester (Charge 4). Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Lebendkeimzahlen sowie der Abstand. Die Teige wurden mit *K. marxianus* DIL 82 (10^6 KbE/g) inokuliert und bei 25 °C für 24 h fermentiert. Die für die Herstellung der Teige notwendige Wassermenge wurde der Teigkonsistenz angepasst, sodass die Konsistenz der Teige $830 \pm 68 \text{ Pa s}^n$ betrug. Die Regressionsanalyse ($y = 0,0157 x + 6,7936$; $R^2 = 0,3064$) wurde mittels RGP-Funktion durchgeführt und hat ein Signifikanzniveau von $p = 0,07$. LKZ: Lebendkeimzahl der Hefen.

Insgesamt ist zu vermerken, dass die optimal einzusetzende Tresterkonzentration von der Art des Tresters und der jeweiligen Charge abhängt und dass die Wachstumsfähigkeit der Hefen nicht mit der Intensität des fruchtigen Geruchs korreliert.

3.4.2 Teigausbeute

Ein wichtiger Parameter für die Fermentation von Teigen ist die Teigausbeute (TA). Sie beschreibt das Verhältnis vom Fermentationssubstrat und Wasser, das sich unter anderem auf die Konzentration der Nährstoffe im Teig auswirkt. Die bisher beschriebenen Modellfermentationen wurden mit TA 200 durchgeführt. Am Beispiel von mit Apfel- oder Karottentrester versetzten Weizenteigen sollten im Folgenden Fermentationen bei verschiedenen TA-Werten mit *K. marxianus* DIL 43, DIL 82, DIL 610, *K. lactis* DIL 194, *C. jadinii* DIL 1047 und *W. anomalus* DIL 1050 untersucht werden. Der bei TA 200 mit 0,97 bestimmte a_w -Wert der Teige blieb bei einer Erhöhung der Teigausbeute unverändert. Zudem zeigte sich, dass das Wachstum der verschiedenen Hefestämme in den mit Apfel- und Karottentrester hergestellten Teigen durch die TA nicht beeinflusst wurde. In Abbildung 3.3 sind die Lebendkeimzahlen am Beispiel der Hefe *K. marxianus* dargestellt. Wie bereits im Screening beobachtet wurde, schwankten die Lebendkeimzahlen der Hefen unter gleichen Fermentationsbedingungen z. B. für *K. marxianus* DIL 82 in Teigen mit Apfeltrester um 1,5 log-Stufen (siehe Tabelle A.4) und in Teigen mit Karottentrester um bis zu 1,9 log-Stufen (siehe Tabelle A.8). Ebenso

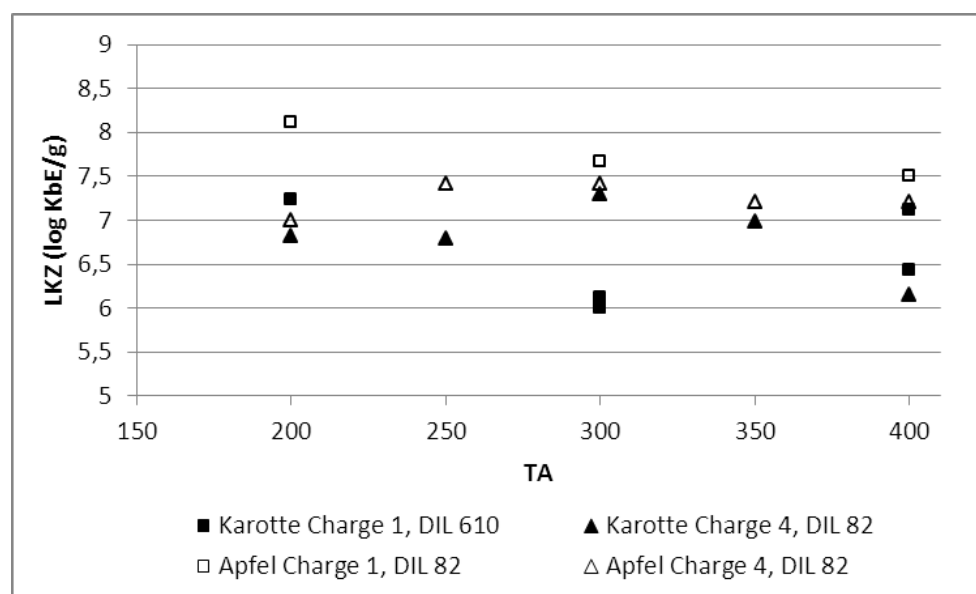


Abbildung 3.3: Effekt der Teigausbeute (TA) von Weizenteigen mit Zusatz von Apfel- und Karottentrester auf die Lebendkeimzahl der Hefen in mit *K. marxianus* DIL 82 und DIL 610 fermentierten (10^6 Kbe/g, 25 °C, 24 h) Teigen. Die Hefen wurden in den hier gezeigten Fermentationen nach folgenden Methoden angezogen: Trester Charge 1, Hefeanzucht nach Methode 2; Trester Charge 4, Hefeanzucht nach Methode 23. LKZ: Lebendkeimzahl der Hefen.

konnte kein Effekt der Teigausbeute auf die Lebendkeimzahlen der Begleitflora festgestellt werden. Vielmehr waren diese von der Art und der Charge der eingesetzten Nebenströme abhängig. So zeigten die Milchsäurebakterien in den mit Apfeltrester hergestellten Teigen kein Wachstum, während in den Teigen mit Karottentrester der Charge 1 ein leichtes Wachstum ($< 10^7$ KbE/g) und in denen der Charge 4 ein starkes Wachstum ($> 10^9$ KbE/g) auftrat. Der pH-Wert der mit Karottentrester der Charge 1 fermentierten Teige lag im Mittel bei 5,4 während der derjenige der Charge 4 bei 4,4 lag. Der Geruch der fermentierten Teige mit Zusatz von Apfeltrester wurde bis TA 250 als fruchtig beschrieben. Dieser fruchtige Geruch ließ jedoch mit zunehmender TA nach. Bei Teigen mit einer TA > 300 wurde der Geruch dann muffig, teigig und mehlig. Für die mit Karottentrester hergestellten Teige wurde der intensivste fruchtige, blumige und nach Karotte riechende Geruch für Teige mit TA 250 festgestellt. Allerdings wurde dieser Geruch von chemischen, nach Lösungsmittel riechenden Noten begleitet. Erst bei TA 400 war nur noch ein leichter Geruch nach Karotte vorhanden. In diesen Teigen dominierte jedoch eine mehlig und nach Teig riechende Note. Somit wurden die weiteren Versuche mit Apfeltrester in Teigen mit einer TA von 200 durchgeführt. Für die Teige mit Karottentrester wurde eine TA von 250 gewählt.

3.4.3 Einfluss der Temperatur

Um den Effekt der Fermentationstemperatur auf das Fermentationsergebnis zu untersuchen, wurden für die Teige mit Apfel-, Karotten-, Riesling- und weißer Burgundertrester weitere Fermentationen bei 30 °C durchgeführt (Tabelle A.15). Zusätzlich wurde am Beispiel von *K. marxianus* DIL 82 in Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester der Einfluss anderer Temperaturen untersucht (Abbildung 3.4). In einem Temperaturbereich zwischen 25 und 41 °C konnte *K. marxianus* innerhalb von 24 h von 10^6 KbE/g auf $10^7 - 10^8$ KbE/g wachsen. Der pH-Wert sank während der Fermentation um 0,1 – 0,4 Einheiten, ohne eine erkennbare Korrelation zur Fermentationstemperatur. Dagegen hing der Geruch eindeutig von der Fermentationstemperatur ab. Bei niedrigen Temperaturen (bis 20 °C) dominierte ein kerniger und holziger Geruch, während bei höheren Temperaturen (ab 30 °C) der typische fruchtige und an Apfel erinnernde Geruch von einer alkoholischen und einer nach warmem Apfelkuchen riechenden Note begleitet wurde.

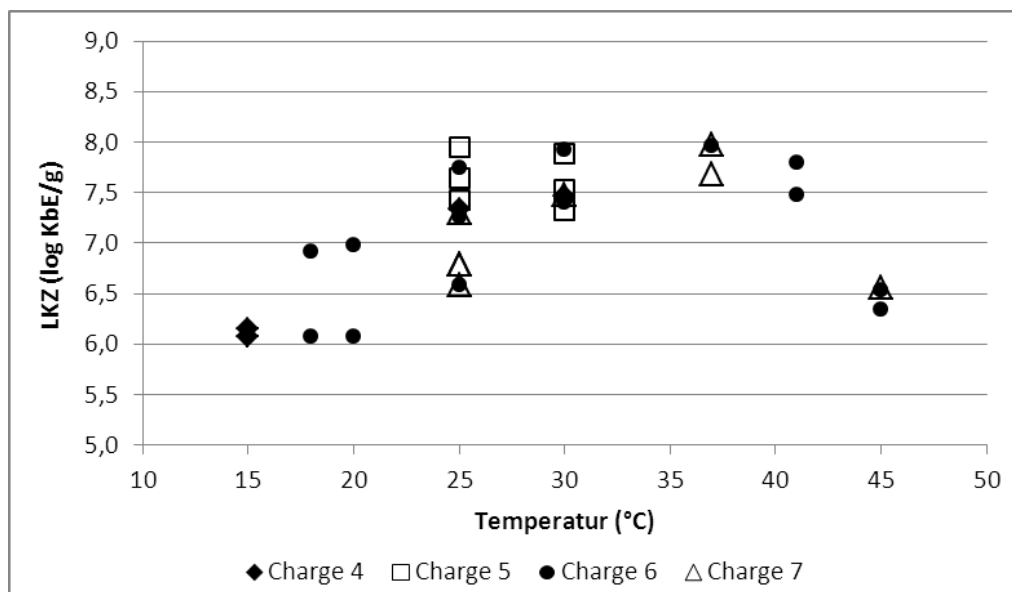


Abbildung 3.4: Effekt der Fermentationstemperatur auf die Lebendkeimzahl der Hefen in Weizenteigen (TA 200) mit unterschiedlichen Chargen des Apfeltresters der Charge 4, 5, 6 oder 7, die mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h fermentiert wurden. Die Teige wurden mit 10^6 KbE/g inokuliert. LKZ: Lebendkeimzahl der Hefen.

Um einen Aufschluss über die Temperaturoptima des Wachstums von *K. marxianus* DIL 82 zu erhalten, wurden die Wachstumsraten in YG-Medium bestimmt (Abbildung 3.5). Wie für diese Hefe erwartet, wurde die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) erst bei 41 °C erreicht und betrug dort $0,98 \text{ h}^{-1}$. Obwohl bei 25 °C die Wachstumsrate mit $0,40 \text{ h}^{-1}$ mehr als halbiert war, wurden nach 24 h Fermentation mit etwa 9×10^7 KbE/g letztlich ähnlich hohe Lebendkeimzahlen in einigen mit Apfeltrester hergestellten Teigen erreicht wie in den bei höherer Temperatur verarbeiteten Teigen.

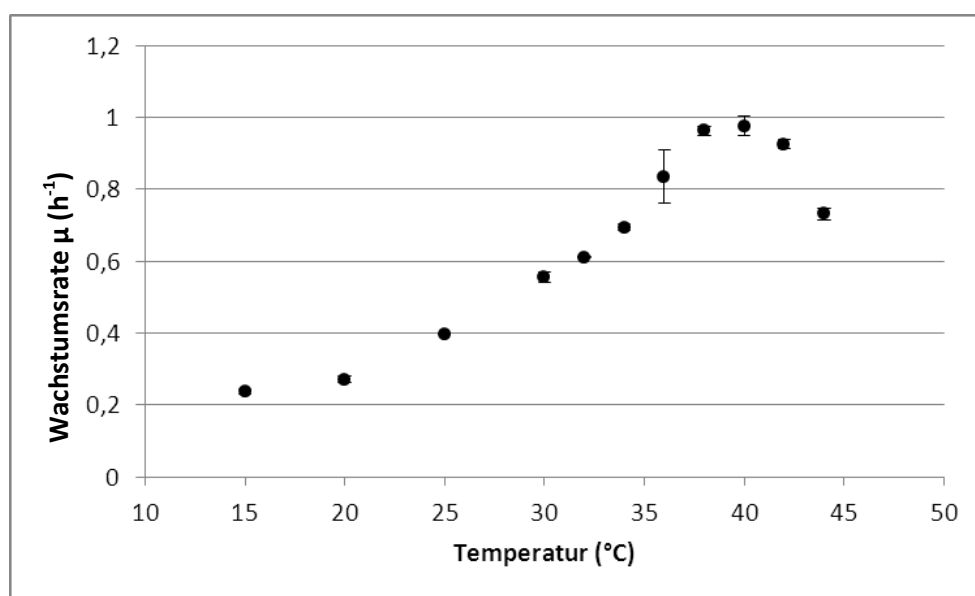


Abbildung 3.5: Wachstumsrate μ von *K. marxianus* DIL 82 in Abhängigkeit der Temperatur in YG-Medium.

3.4.4 Einfluss der Höhe des Inokulats

Die Höhe des Inokulats hat einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Hefen im Ökosystem, auf ihre Wettbewerbsfähigkeit und somit auf die Zusammensetzung der Mikroflora während der Fermentation. Werden den Teigen zu Beginn der Fermentation die alternativen Hefen in einer zu geringen Keimzahl zugegeben, so nimmt der Einfluss der im Fermentationssubstrat vorhandenen Spontanflora auf die Fermentation zu. Daher wurde für verschiedene Hefestämme (wie z. B. *C. jadinii* DIL 1047, *K. lactis* DIL 4537, *K. marxianus* DIL 82, DIL 610, *T. delbrueckii* DIL 1054, *W. anomalus* DIL 1050) in Kombination mit Apfel- und Karottentrester, sowie mit Biertreber, die Höhe des Inokulates von 10^5 - 10^7 KbE/g variiert. Hierbei wurden das Wachstum der Hefen und Milchsäurebakterien sowie die Änderung des pH-Wertes und die Aromabildung verfolgt. In Abbildung 3.6 ist das Wachstum der Hefen am Beispiel der Kombination von *K. marxianus* DIL 82 mit Apfeltrester der Chargen 1, 4 und 5 dargestellt. Mit 2,9 log-Stufen wuchsen die Hefen in dem mit 10^5 KbE/g inokulierten Teig mit Apfeltrester der Charge 1 am besten. Für die mit dem Trester der Charge 4 durchgeführte Fermentation wurde nur eine log-Stufe überbrückt, während das Wachstum für die Hefen in den Teigen mit dem Trester der Charge 5 zwischen diesen Werten lag. Wurden die Teige dagegen mit der zehnfachen Hefemenge (10^6 KbE/g) inokuliert, so wurde unabhängig von der Trestercharge ein Wachstum von 0,7-1,9 log-Stufen ermittelt. Zwar lagen in einigen Fällen die absoluten Werte der durch die Hefen erreichten Zellzahlen für die mit 10^5 KbE/g inokulierten Teige deutlich über denen der mit 10^6 KbE/g inokulierten

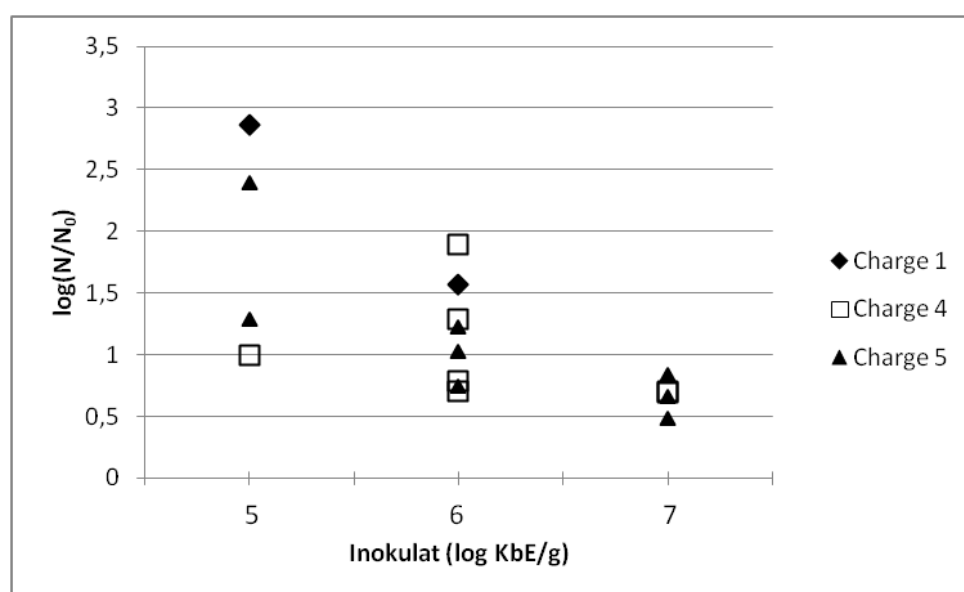


Abbildung 3.6: Einfluss der Inokulatshöhe von *K. marxianus* DIL 82 und unterschiedlichen Chargen des Apfeltresters (25 %) auf das Wachstum ($\log(N/N_0)$) der Hefen nach 24 h Fermentation der Weizenteige (TA 200, 25 °C).

Teige, aber aufgrund der großen Streuung konnte bezüglich des Hefewachstums kein signifikanter Unterschied mittels ANOVA festgestellt werden ($p = 0,075$). Im Gegensatz hierzu unterschied sich das Hefewachstum der mit 10^5 und 10^6 KbE/g inokulierten Teige signifikant von dem schlechteren Wachstum der Hefen in den mit 10^7 KbE/g inokulierten Teigen ($p < 0,034$), das unabhängig von den eingesetzten Tresterchargen bei 0,49 - 0,84 log-Stufen lag. Ein Wachstum von Milchsäurebakterien wurde in keinem dieser Teige beobachtet. Das typische Aroma der mit 10^6 KbE/g inokulierten Teige wurde auch von den mit $< 10^6$ KbE/g inokulierten Teigen erzielt. In diesem Fall mussten die Hefen während der Fermentation letztlich eine Lebendkeimzahl von $> 3 \times 10^7$ KbE/g erreichen. Bei geringeren Lebendkeimzahlen der Hefen ($< 5 \times 10^6$ KbE/g) entsprach der kernige und nach Getreide riechende Geruch dagegen dem der in Kapitel 3.2 beschriebenen unfermentierten bzw. spontan fermentierten Teige. Hingegen wurden für alle mit 10^7 KbE/g inokulierten Teige ein käsiger, mostiger Geruch sowie ein Geruch nach saurem Apfel wahrgenommen, welcher der Produktqualität eher abträglich war. Sowohl eine Beimpfung mit zu hohen als auch eine mit zu niedrigen Hefekonzentrationen kann also die Teigqualität negativ beeinflussen.

3.4.5 Effekt der Fermentationszeit

Unter den in den vorausgehenden Kapiteln als optimal ermittelten Prozessparametern (TA 200, 25 % Trester, 25 °C, 10^6 KbE/g) sollte nun noch der Einfluss der Fermentationszeit untersucht werden. Im ersten Schritt wurden Teige mit den Hefen *H. uvarum* DIL 192, DIL 596, DIL 597, *K. marxianus* DIL 82, DIL 610, DIL 1049, *C. jadinii* DIL 1047, und *S. cerevisiae* DSM 70449, sowie den bereits vorher verwendeten Nebenströmen (Apfeltrester, Karottentrester, Biertreber; ausnahmslos jeweils aus der Charge 1) hergestellt und die Aromabildung im Zeitraum von 13 - 28 h untersucht. In einigen Teigen wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum keine großen Änderungen im Geruch wahrgenommen, während die Geruchsentwicklung bei der Mehrzahl der Teige deutlich mit der Fermentationszeit korrelierte (siehe Tabelle A.16 und Tabelle A.17). Im Folgenden wurde das Wachstum und die Aromabildung in Abhängigkeit der Zeit am Beispiel von *K. marxianus* DIL 82 und *S. cerevisiae* DSM 70449 in Teigen mit Apfel- und Karottentrester sowie mit *C. tropicalis* DIL 3128 mit Karottentrester verfolgt. Das beste Wachstum zeigte *K. marxianus* DIL 82 im Teig mit Karottentrester. Hier wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,41 \text{ h}^{-1}$ ermittelt (Abbildung 3.7). In den Teigen mit Apfeltrester lag die maximale Wachstumsrate μ_{\max} zwischen 0,21 - 0,32 h^{-1} , während die maximale Wachstumsrate von *S. cerevisiae* und *C. tropicalis* noch deutlich darunter bei 0,15 - 0,19 h^{-1} lag.

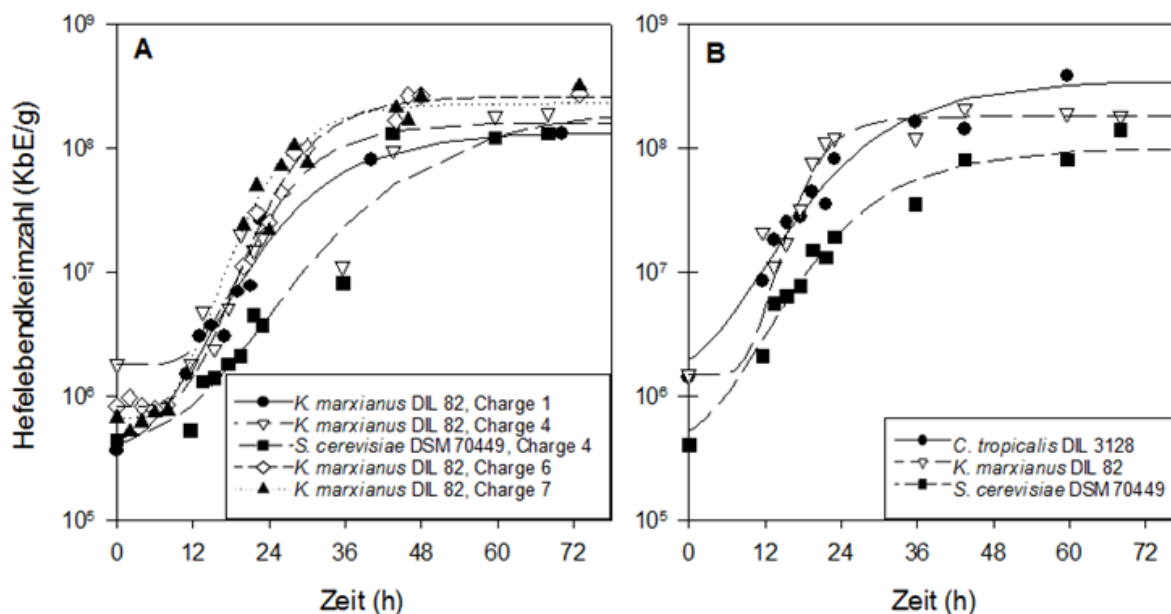


Abbildung 3.7: Effekt der Fermentationszeit auf das Hefewachstum in Weizenteigen mit Apfeltrester (A) oder mit Karottentrester der Charge 4 (B). Die Wachstumskurven wurden mit dem Gompertz-Modell und den in Tabelle 3.5 angegebenen Parametern angepasst.

Der Geruch der mit Apfeltrester hergestellten Teige hing vor allem von der verwendeten Hefespezies ab. So wurde der Geruch des mit *S. cerevisiae* DSM 70449 fermentierten Teiges als "getreidig" über "mostig" bis hin zu "vergammelt" beschrieben. Bei den mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teigen entwickelte sich dagegen nach verschiedenen Inkubationszeiten ein fruchtiger Geruch (bei Charge 1 nach 40 h, bei Charge 6 nach 22 h, bei Charge 7 nach 48 h), der als nach Apfel, süßlich oder säuerlich riechend beschrieben wurde (Tabelle A.18). Im Verlauf dieser Wachstumskurven konnte in den mit Karottentrester und hier getesteten Hefespezies hergestellten Teigen kein fruchtiger Geruch beobachtet werden.

Tabelle 3.5: Parameter für die Modellierung des in Abbildung 3.7 gezeigten zeitabhängigen Wachstums der Hefen in den Teigen mit Zusatz von Apfel- bzw. Karottentrester.

Teig	Hefe	Trester	Charge	λ (h)	μ_{\max} (h^{-1})	A
433	<i>K. marxianus</i> DIL 82	Apfel	1	4,35	0,21	5,92
434	<i>K. marxianus</i> DIL 82	Apfel	4	12,03	0,23	4,48
435	<i>S. cerevisiae</i> DSM 70449	Apfel	4	8,91	0,15	6,16
436	<i>K. marxianus</i> DIL 82	Apfel	6	11,08	0,30	5,75
437	<i>K. marxianus</i> DIL 82	Apfel	7	8,50	0,32	5,84
438	<i>C. tropicalis</i> DIL 3128	Karotte	4	0,99	0,18	5,69
439	<i>K. marxianus</i> DIL 82	Karotte	4	9,08	0,41	4,78
440	<i>S. cerevisiae</i> DSM 70449	Karotte	4	1,29	0,19	5,51

λ , lag-Phase; μ_{\max} , maximale Wachstumsrate; A, Zunahme der Population

3.4.6 Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit

Eine mögliche Ursache für das in der Fermentation der Teige beobachtete vergleichsweise langsame Wachstum der Hefen könnte die Verfügbarkeit von Sauerstoff sein. Daher wurde das Wachstum von *K. marxianus* DIL 82 unter definierten Medium- und Sauerstoffbedingungen im Fermenter untersucht. In Bezug auf μ_{\max} konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 20 % und 30 % Sauerstoff im Medium festgestellt werden. Hier lagen die bestimmten Wachstumsraten bei $0,36 \text{ h}^{-1}$. Wurde die Sauerstoffkonzentration aber auf ein Minimum ($< 1 \%$) reduziert, sank die Wachstumsrate auf $0,23 \text{ h}^{-1}$ und es zeigten sich signifikante Unterschiede zu den sauerstoffreichen Bedingungen ($p < 0,003$). Dennoch hatte *K. marxianus* DIL 82 bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ eine signifikant höhere Wachstumsrate ($p < 0,010$) in Erlenmeyer-Schüttelkulturen ($\mu_{\max} = 0,41$, vergleiche Kapitel 3.4.3) als die hier gefundene $\mu_{\max} = 0,36$ im Fermenter.

3.4.7 Reproduzierbarkeit der Fermentationsergebnisse

Neben dem Effekt der oben untersuchten Prozessparameter auf die Aromabildung und das Wachstum der Hefeflora wurde auch die Stabilität und Reproduzierbarkeit der Fermentation unter denselben Bedingungen untersucht. In Tabelle 3.6 ist die Aromaqualität der mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teige mit Zusatz von Apfel- bzw. Karottentrester (10^6 KbE/g , 24 h, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, alle Chargen mit TA 200, nur Karotte Charge 4 mit TA 250) dargestellt. Diese Daten zeigen, dass das Aroma der Teige nicht nur durch den Einsatz von unterschiedlichen Trestersorten sondern auch durch die Verwendung unterschiedlicher Chargen beeinflusst wurde. Selbst innerhalb einer Trestercharge traten die Aromen in unterschiedlichen Intensitäten auf, bis hin zum Fehlen bestimmter Aromenoten in einigen scheinbar identischen Fermentationen. Daher wurden die fermentierten Teige in die Klassen „mit fruchtigem Aroma“ und „ohne fruchtiges Aroma“ eingeteilt. Fehlte das fruchtige, nach Apfel oder Karotte riechende Aroma oder wurde es durch unangenehme Begleitgerüche überdeckt, so wurden diese Teige der Klasse „ohne fruchtiges Aroma“ zugeordnet. Getrennt nach diesen beiden Klassen sind in Abbildung 3.8 die Mittelwerte der Lebendkeimzahlen der fermentierten Teige dargestellt. Sowohl bei den Fermentationen mit Apfel- als auch bei denen mit Karottentrester lagen die Lebendkeimzahlen der Hefen in der Regel im Bereich von $3,3 \times 10^6 - 1,9 \times 10^8 \text{ KbE/g}$ bzw. $4,4 \times 10^6 - 5 \times 10^8 \text{ KbE/g}$ und wichen nicht mehr 3 – 9 % voneinander ab. Es konnten aber auch signifikante Unterschiede zwischen ähnlichen Lebendkeimzahlen in einigen Fermentationen mit diesen Treestern festgestellt werden.

Tabelle 3.6: Abhängigkeit der Aromaqualität von der verwendeten Apfeltrestercharge in der Fermentation von Weizenteigen mit 25 % Apfel- bzw. Karottentrester mit *K. marxianus* DIL 82 (TA 200, 25 °C, 24 h, 10⁶ KbE/g).

Charge	Aromaqualität der fermentierten Teige mit Zusatz von	
	Apfeltrester	Karottentrester
0	n. b.	Karotte, erdig, blumig, süßlich, fruchtig, chemisch
1	Apfel, fruchtig (tropisch), chemisch	Karotte, blumig, süßlich, fruchtig, chemisch
2	süßlich, säuerlich, fruchtiges Lösungsmittel	angenehmer Fruchtgeruch, Steinobst (Quitte?)
3	Apfel, fruchtig, süßlich, unangenehm	Karotte, blumig, süßlich, chemisch
4	Apfel, fruchtig, süßlich, säuerlich, chemisch	Karotte, erdig, blumig, süßlich, fruchtig, chemisch, (rauchig, buttermilchähnlich)
5	Apfel, fruchtig, süßlich, säuerlich, chemisch	
6	Apfel, fruchtig, säuerlich, chemisch	
7	Apfel, kernig, säuerlich, chemisch	

In der Regel unterschieden sich die Lebendkeimzahlen zwischen einem Teig „mit fruchtigem Aroma“ und einem Teig „ohne fruchtiges Aroma“ signifikant voneinander. Jedoch wurde auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Fermentation "mit fruchtigem Aroma“ der Apfeltrester Charge 1 und der Charge 6 beobachtet. Zudem konnte ein signifikanter Unterschied auch innerhalb derselben Trestercharge (z. B. Apfeltrester Charge 5) festgestellt werden, wie aus den Tabellen A.19 und A.20 im Anhang zu entnehmen ist. Insgesamt ist also eine für Lebensmittel typische Variationsbreite in den Ergebnissen zu verzeichnen, die eher Rückschlüsse auf Tendenzen als eine sichere Reproduzierbarkeit erlauben.

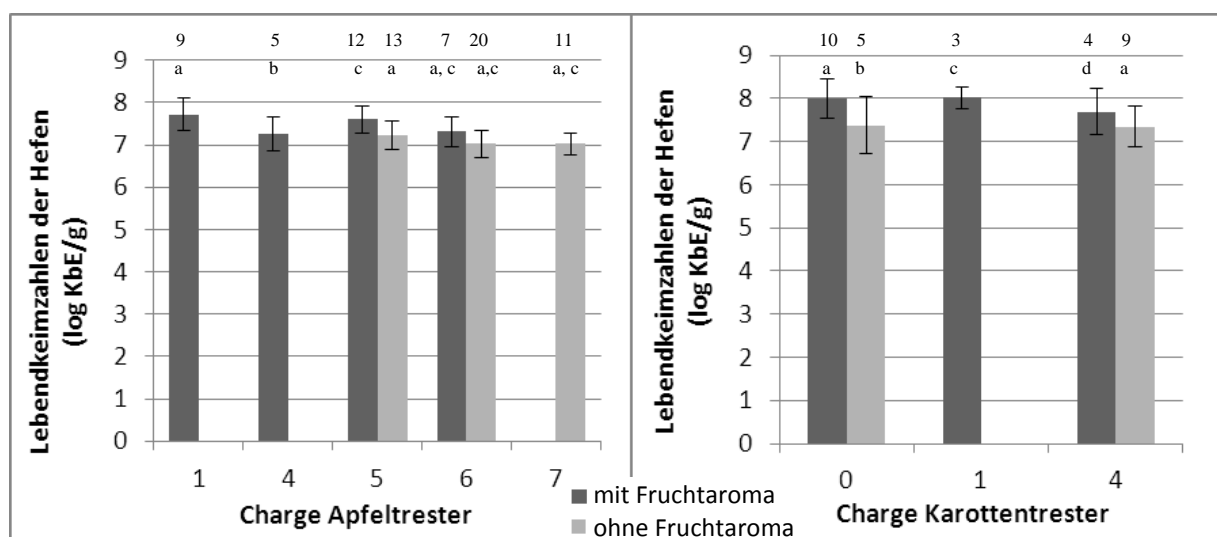


Abbildung 3.8: Effekt der Trestercharge auf die Reproduzierbarkeit der Aromabildung und das Wachstum der Hefeflora am Beispiel der für 24 h mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Weizenteige mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (linke Abbildung) und Karottentrester (rechte Abbildung). Die Fermentation der Teige (TA 200, nur Karotte Charge 4 mit TA 250) wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Zahlen über den Balken geben die Anzahl der unabhängigen Fermentationen an. Die Buchstaben a-d geben die signifikant unterschiedlichen Datenreihen an (vgl. Tabellen A.19 und A.20).

3.5 Analyse der Mikroflora in fermentierten Teigen

In den bisher dargestellten Arbeiten wurde für die Fermentation der Teige jeweils ein bestimmter Hefestamm verwendet und die Mikroflora anschließend über die Lebendkeimzahl charakterisiert. Durch die Auswahl der geeigneten Hefe-Substrat-Kombination konnte sowohl ein gutes Wachstum der Hefen als auch die Bildung von gewünschten Aromen beobachtet werden. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob diese Eigenschaften auch in kontinuierlich propagierten Teigen erhalten bleiben. Das Verfahren der kontinuierlichen Propagation wird in der Industrie zur Herstellung von fermentierten Teigen angewandt, in dessen Verlauf es aber zu einer Veränderung der Mikroflora kommen kann. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mittels PCR-DGGE die Kontaminationsflora der kontinuierlich propagierten Teige charakterisiert, um so einen Aufschluss über die Wettbewerbsfähigkeit der alternativen Hefen mit der sich entwickelnden Begleitflora zu erhalten.

3.5.1 Entwicklung eines PCR-DGGE-Systems zur Charakterisierung der Hefe- und Milchsäurebakterienflora

Zur schnellen Differenzierung der in den fermentierten Teigen vorhandenen Hefeflora und deren Begleitflora mittels der von den Kulturbedingungen unabhängigen PCR-DGGE musste zunächst ein Marker entwickelt werden, anhand dessen sich die verschiedenen Arten identifizieren lassen. Dazu sollte die Amplifikation der universellen 28S-rDNA dienen. Hierzu wurde das Oligonukleotid NL1 (Kurtzman und Robnett, 1998) mit einer GC-Klammer versehen (Walter *et al.*, 2001) und der D1/D2-Abschnitt des 28S rRNA-Gens der für die Fermentation mit Nebenströmen geeigneten alternativen Hefen, sowie derjenige von *S. cerevisiae* zusammen mit dem Oligonukleotid LS2 (Cocolin *et al.*, 2002) amplifiziert und im denaturierenden Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3.9). Auf diese Weise konnten für jede Hefeart zwei Banden detektiert werden, von denen stets eine für die verwendete Spezies charakteristisch war. Der zweiten Bande konnte kein für die Hefeart spezifisches Laufverhalten zugeordnet werden. Diese Bande lief in allen PCR-DGGEs auf der gleichen Höhe und wurde wahrscheinlich durch die einzelsträngige DNA hervorgerufen (Heuer *et al.*, 1997). Ein Gemisch der speziesspezifischen PCR-Produkte und die anschließende DGGE zeigten alle für die verwendeten Hefespezies charakteristischen Banden. Der so erhaltene "Hefe-Marker" erlaubte in den folgenden Experimenten eine schnelle Identifizierung der meisten in den Teigen vorkommenden Hefen. Es konnte jedoch nicht immer derselbe Marker genutzt werden. In einigen Fällen kam es zu einer Co-Migration von *T. delbrueckii* und *T. pretoriensis*, sodass die dabei auftretende Bande im Marker

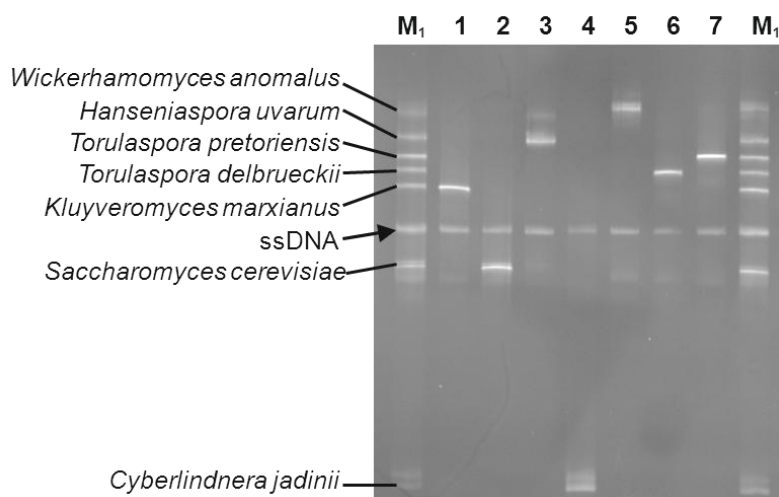


Abbildung 3.9: Migrationsdistanzen der mittels DGGE (denaturierender Gradient von 37,5 - 50 %) getrennten PCR-Produkte, die mit dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 und der DNA aus Hefereinzuchtkulturen erhalten wurden. Die Spuren des Gels enthalten PCR-Produkte aus den folgenden Hefen: 1 = *K. marxianus* DIL 82, 2 = *S. cerevisiae* DSM 70449, 3 = *H. uvarum* DIL 192, 4 = *C. jadinii* DIL 1047, 5 = *W. anomalus* DIL 1050, 6 = *T. delbrueckii* DIL 1054, 7 = *T. pretoriensis* DIL 1055. M₁ kennzeichnet das Gemisch aus den PCR-Produkten der zuvor beschriebenen Hefen und diente im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Hefemarker für die schnelle Identifizierung der Hefen durch Vergleichen der Migrationsdistanzen.

allgemein als *Torulaspora* sp. bezeichnet wurde. In einigen Fällen wurde das Markergemisch auch noch zusätzlich mit den PCR-Produkten von *D. bruxellensis* hergestellt, um das Spektrum zu erweitern. Auch die in den fermentierten Teigen vorhandene bakterielle Begleitflora wurde bisher nur über die Lebendkeimzahl charakterisiert. Um die Zusammensetzung der Begleitflora mittels DGGE beschreiben zu können, wurde auch hier ein geeigneter Standard benötigt. Daher wurden aus den fermentierten Teigen Milchsäurebakterien mit unterschiedlicher Koloniemorphologie isoliert und über die Sequenzanalyse der V2-V3-Region des 16S-rRNA-Gens identifiziert (siehe Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Identifizierung der aus Teigen mit Zusatz von Trester der Charge 4 auf mMRS5-Agar isolierten Milchsäurebakterien mittels Sequenzierung eines Ausschnittes des 16S-rRNA-Gens.

Teig mit	Kolonie-morphologie	DIL	Spezies	Übereinstimmung mit Typstamm ^a	Accession Nr. Typstamm
Apfeltrester, Aspartat*	groß, weiß	5111	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99 %	NR042058.1
Karottentrester	groß, dunkelgrün	5114	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99 %	AB023237.1
Karottentrester	klein, dunkelgrün	5115	<i>Weissella confusa</i>	99 %	M23036.1
Karottentrester	groß, grünlich durchscheinend	5117	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99 %	M23035.1
Karottentrester	klein, grün	5118	<i>Leuconostoc lactis</i>	99 %	AB023968.1

* Dieser Teig stammt aus Vorversuchen, in denen Teige mit Aminosäuren supplementiert wurden. Auf diese Versuche soll im Laufe dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden. ^a 99 % (bzw. 98 %) Identität bedeutet, dass sich bis zu zwei (bzw. vier) Basen zwischen der Referenzsequenz und der untersuchten Sequenz unterscheiden. Diese Basenaustausche können auch auf PCR- und/oder Sequenzierfehler zurückzuführen sein.

Diese aus den Teigen isolierten Milchsäurebakterien, sowie die in fermentierten Weizenteigen ohne Zusatz von Nebenströmen mittels PCR-DGGE identifizierte *L. sakei* bzw. *L. curvatus*, wurden verwendet, um mit dem Oligonukleotidpaar L1-GC/Lab0677 (Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002; Meroth *et al.*, 2003b) einen für die Milchsäurebakterien spezifischen Marker für die PCR-DGGE zu erstellen. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, war die Migrationsdistanz der PCR-Produkte spezifisch für die isolierten Milchsäurebakterien. Nur *L. sakei* und *L. curvatus* konnten mit diesem Ansatz nicht unterschieden werden.

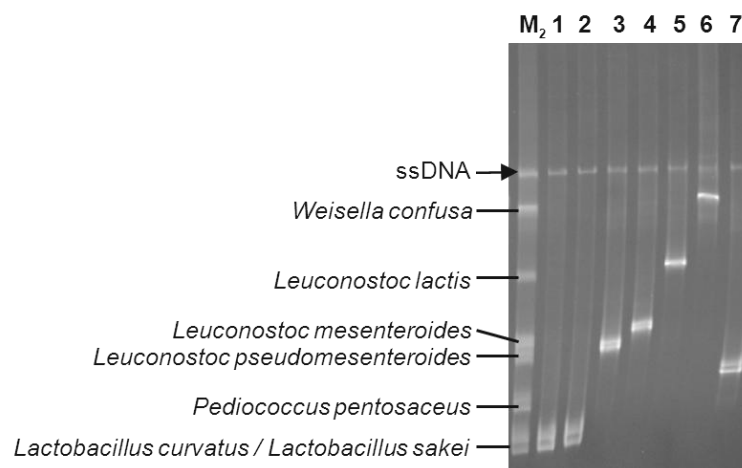


Abbildung 3.10: Auftrennung von PCR-Produkten mittels DGGE (denaturierender Gradient von 37,5 - 40 %), die mit den Oligonukleotidpaar L1-GC/Lab0677 und der DNA der Milchsäurebakterienreinkultur erhalten wurden. Die Spuren des Gels enthalten PCR-Produkte aus den folgenden Milchsäurebakterien: 1 = *L. curvatus* DIL 799, 2 = *L. sakei* DIL 625, 3 = *Le. pseudomesenteroides* DIL 5114, 4 = *Le. mesenteroides* DIL 5117, 5 = *Le. lactis* DIL 5118, 6 = *W. confusa* DIL 5115, 7 = *P. pentosaceus* DIL 5111 isoliert. M₂ kennzeichnet das Gemisch aus allen PCR-Produkten und diente im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Standard zur Bestimmung der Milchsäurebakterien.

3.5.2 Identifizierung der Hefen und Milchsäurebakterien in der Kontaminationsflora

Das Screening der alternativen Hefen und der Nebenströme der Lebensmittelindustrie zeigte, dass vor allem in den mit Apfel- und Karottentrester versetzten Weizenteigen ein gutes Hefewachstum sowie die Bildung von fruchtigen Aromen möglich war. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente auf diese Substrate beschränkt. Zur weiteren Charakterisierung der damit assoziierten Hefespezies wurden PCR-DGGE-Analysen mit der aus Hefe-DNA amplifizierte DNA aus nicht fermentiertem Weizenmehl mit zugesetztem Apfeltrester (Charge 5) oder Karottentrester (Charge 4) durchgeführt (Abbildung 3.11). Die so erhaltenen DGGE-Profile zeigten für jedes der drei Substrate zwei dominante Banden, die sich allerdings von denen des Markers unterschieden und somit nicht direkt zugeordnet werden konnten. Nach einer gezielten DNA-Sequenzierung dieser Banden konnte im Weizenmehl neben einer zu den Ascomycota gehörigen, aber nicht näher zu identifizierenden Hefe auch ein Schimmelpilz der Gattung *Cladosporium* spp. nachgewiesen werden. Die aus

dem Apfeltrester erhaltenen Banden wurden der Hefe *Magnusiomyces magnusii* sowie der Zierpflanze *Photinia fraseri* (Fraser's Glanzmispel) zugeordnet, die wahrscheinlich auf eine Kontamination bei der Herstellung des Apfeltresters zurückzuführen ist. Im Karottentrester wurden die beiden dominanten Banden durch die DNA des Tresters selbst (*Daucus carota* subsp. *sativus*) gebildet. Milchsäurebakterien konnten aufgrund eines fehlenden spezifischen Profils in diesen Ansätzen nicht mithilfe der PCR-DGGE zugeordnet werden.

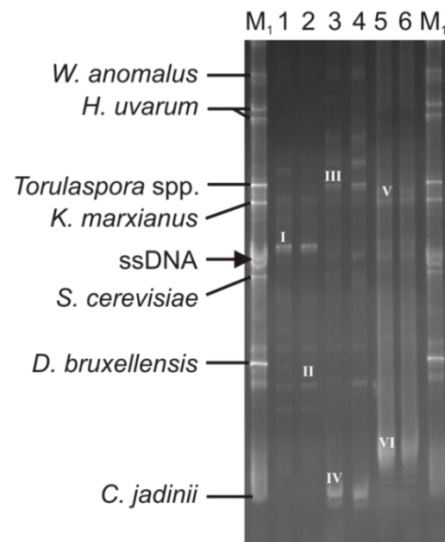


Abbildung 3.11: DGGE-Profil der PCR-Produkte, die mit dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 und der aus dem Fermentationssubstrat isolierten DNA erhalten wurden. Reihe 1 und 2: Weizenmehl; Reihe 3 und 4: Apfeltrester (Charge 4); Reihe 5 und 6: Karottentrester (Charge 4); M₁ Hefemarker zur Identifizierung der Banden durch Vergleich der Migrationsdistanz. Banden, die nicht durch Vergleich der Migrationsdistanz zugeordnet werden konnten, wurden isoliert und die DNA wurde mit folgenden Ergebnissen sequenziert: I, *Cladosporium* spp.; II, Ascomycota-Hefe; III, *Magnusiomyces magnusii*; IV, *Photinia fraseri*; V und VI, *Daucus carota* subsp. *sativus*.

3.5.3 Mikroflora in spontan fermentierten Teigen

Nach der Bestimmung der natürlich vorhandenen Hefestämme, die keine der Arten aus dem verwendeten Marker enthielten, wurden die Teige spontan fermentiert. In den Teigen mit Zusatz von Apfeltrester der Charge 1, 4, 5 und 6 entwickelte sich innerhalb von 24 h keine dominante Mikroflora. Die Lebendkeimzahl der Hefen und der Milchsäurebakterien blieb stets bei Werten unter 10^3 KBE/g. Abhängig von der verwendeten Trestercharge wurde das Aroma der Teige als schwach nach Apfel (Charge 1) bzw. intensiv nach Marzipan und Getreide (Chargen 4, 5 und 6) riechend beschrieben. Aufgrund der geringen Keimzahlen war ein Nachweis der Mikroflora mit Hilfe der PCR-DGGE nicht möglich. Die Plattierung und Isolierung von Einzelkolonien, gefolgt von einer Sequenzanalyse der D1/D2-Region des 28S rRNA-Gens zeigte, dass die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora uvarum* und *Metschnikowia* sp. zu der Mikroflora der spontan fermentierten Teige mit Apfeltrester gehörten (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Koloniemorphologie und die mittels Sequenzierung bestimmte Identität der aus den spontan fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester (Charge 3) isolierten Hefen.

Stamm	Koloniemorphologie	nächster Verwandter	% Identität ^a	Referenzsequenz
DIL 3153	klein, weiß, erhaben	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	AY048154
DIL 3154	flauschig	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	EF550222
DIL 3155	rot glänzend, leicht schleimig	<i>Metschnikowia</i> sp.	97	AF360542
DIL 3157	weiß, runzelig	<i>Metschnikowia</i> sp.	97	AF360542
DIL 3158	grün, flach	<i>Hanseniapora uvarum</i>	99	U84229

Die Morphologie der Kolonien wurde auf YGC-Agar mit Bromkresolgrün nach zwei Tagen Inkubation bei 25 °C bestimmt.

^a 99 % (bzw. 98 %) Identität bedeutet, dass sich bis zu zwei (bzw. vier) Basen zwischen der Referenzsequenz und der untersuchten Sequenz unterschieden. Diese Basenaustausche können auch auf PCR- und/oder Sequenzierfehler zurückzuführen sein.

Der pH-Wert der Teige änderte sich kaum und lag zu Fermentationsbeginn bei 4,2 - 4,4 und nach Fermentationsende bei 4,0 - 4,3. Anders als in den spontan fermentierten Teigen mit Apfeltrester entwickelte sich in den Teigen mit Karottentrester (Charge 4) sowohl eine ausgeprägte Hefe- als auch eine Milchsäurebakterienflora. So erreichten die Hefen nach 24 h eine Lebendkeimzahl von $1,3 \times 10^6$ KbE/g und die Milchsäurebakterien eine Lebendkeimzahl von $2,3 \times 10^9$ KbE/g. In den folgenden Propagationsschritten nahm die Lebendkeimzahl der Hefen stets weiter zu, sodass am vierten Tag die Hefen bis auf $8,2 \times 10^7$ KbE/g gewachsen waren. Die Milchsäurebakterien erreichten dagegen bereits am ersten Tag ihre maximale Lebendkeimzahl von $2,3 \times 10^9$ KbE/g, die sich in den folgenden Propagationsschritten nicht mehr veränderte. Der pH-Wert der Teige fiel während des ersten Tages von 5,6 auf 3,9 und veränderte sich mit den folgenden Propagationsschritten nicht weiter. Das Aroma wurde für die ersten zwei Tage als muffig, säuerlich, buttermilchähnlich und erdig, aber nicht nach Karotte riechend beschrieben. Am dritten Tag traten fruchtige, erdige und nach Karotte riechende Aromen in den Vordergrund, und die unangenehmen Aromen der ersten beiden Tage wurden nicht mehr wahrgenommen. Allerdings war das gewünschte fruchtige Aroma am vierten Tag nicht mehr vorhanden. Die Analyse der Mikroflora mittels PCR-DGGE (Abbildung 3.12) zeigte, dass die Hefen *K. marxianus* bereits zu Fermentationsbeginn in der Mikroflora präsent waren. Ab dem dritten Tag der Fermentation konnte überraschend auch *H. uvarum* nachgewiesen werden. Am vierten Tag waren die beiden zu *H. uvarum* gehörigen Banden bereits sehr ausgeprägt.

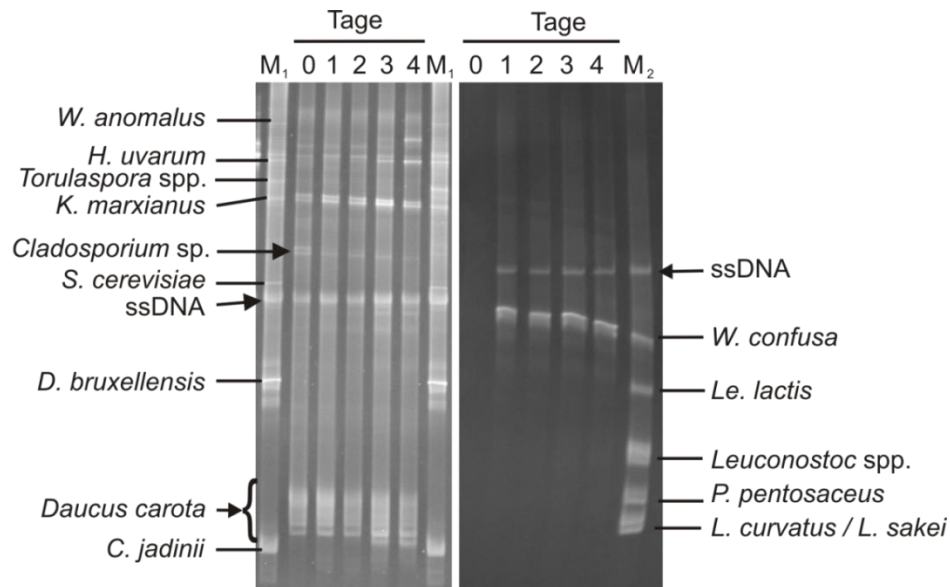


Abbildung 3.12: PCR-DGGE-Profile der PCR-Produkte, die von der aus den spontan fermentierten und propagierten Weizenteigen mit 25 % Karottentrester isolierten Hefe-DNA mit dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 (linke Abbildung), bzw. Milchsäurebakterien-DNA und dem Oligonukleotidpaar L1-GC/LAB-0677 (rechte Abbildung) erhalten wurden. Die Weizenteige (TA 250) wurden mit Zusatz von 25 % Karottentrester (Charge 4) hergestellt (Tag 0) spontan für 24 h bei 25 °C fermentiert (Tag 1). Anschließend erfolgte die Propagation mit jeweils 1 % spontan fermentiertem Teig sowie die Isolierung der Hefe- bzw. Milchsäurebakterien-DNA jeweils nach weiteren 24 h (Tage 2-4).

In der durch die Milchsäurebakterien gebildeten Mikroflora konnte mittels PCR-DGGE hingegen nur *W. confusa* identifiziert werden. Dies änderte sich auch nicht mit den folgenden Propagationsschritten. Auf den YGC-Agarplatten zur Bestimmung der Lebendkeimzahl konnten allerdings unterschiedliche Koloniemorphologien beobachtet werden. Die Sequenzierung der D1/D2-Regionen des 28S rRNA-Gens der so erhaltenen Reinkulturen zeigte, dass weitere nicht dominante Hefen (*Pichia kudrivazevii*, *Clavispora lusitaniae* und *Candida silvae*) zu der Mikroflora der propagierten Karottenteige gehörten (Tabelle 3.9). Die Hefen *K. marxianus* und *P. kudrivazevii* wurden mit dieser Methode neben den spontan fermentierten und propagierten Teigen auch im frischen Karottentrester der Charge 2 gefunden. Daraus konnte auch *C. tropicalis* isoliert werden, die in den anderen Fermentationen nicht auftauchte. Darüber hinaus konnten weitere Hefen aus den mit Traubentrester hergestellten Teigen isoliert und identifiziert werden (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.9: Koloniemorphologie und die mittels Sequenzierung bestimmte Identität der aus frischem Karottentrester (Charge 2) bzw. den spontan fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Karottentrester (Charge 4) isolierten Hefen.

Trester-charge	Stamm	Koloniemorphologie	nächster Verwandter	% Identität ^a	Referenzsequenz
2	DIL 3127	groß, flach, weiß	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	U94924
2	DIL 3128	klein, cremefarben	<i>Candida tropicalis</i>	99	U45749
2	DIL 3129	klein, rund, ohne Hyphen, weiß	<i>Candida tropicalis</i>	99	U45749
2	DIL 3130	klein, rund, mit Hyphen, weiß	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	EF550222
2	DIL 3131	weiß, groß	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	U94924
2	DIL 3132	weiß, klein	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	U94924
4	DIL 5170	groß, dunkelgrün	<i>Pichia kudriavzevii</i>	99	EF550222
4	DIL 5171	mittelgroß, hellgrün	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	99	U94924
4	DIL 5172	groß, weiß	<i>Clavispora lusitaniae</i>	98	U44817, AY190538
4	DIL 5173	mittelgroß, hellblau	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99	U84229
4	DIL 5174	klein, dunkelgrün	<i>Candida silvae</i>	99	U71065

Die Morphologie der Kolonien wurde auf YGC-Agar mit Bromkresolgrün nach zwei Tagen Inkubation bei 25 °C bestimmt.

^a 99 % (bzw. 98 %) Identität bedeutet, dass sich bis zu zwei (bzw. vier) Basen zwischen der Referenzsequenz und der untersuchten Sequenz unterschieden. Diese Basenaustausche können auch auf PCR- und/oder Sequenzierfehler zurückzuführen sein.

Tabelle 3.10: Koloniemorphologie und die mittels Sequenzierung bestimmte Identität der aus frischem Traubentrester (Charge 1) isolierten Hefen.

Trestersorte	Stamm	Koloniemorphologie	nächster Verwandter	% Identität ^a	Referenzsequenz
Riesling	DIL 3136	hellgrün, groß, flach	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99	U84229
Riesling	DIL 3138	rot, nicht schleimig	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	99	AF189950
Riesling	DIL 3140	weiß, matt	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	99	U72156
weißer Burgunder	DIL 3143	rot-braun bis weiß	<i>Metschnikowia</i> sp.	97	AF360542
Portugieser	DIL 3148	klein, weiß/creme	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	AY048154

Die Morphologie der Kolonien wurde auf YGC-Agar mit Bromkresolgrün nach zwei Tagen Inkubation bei 25 °C bestimmt.

^a 99 % (bzw. 98 %) Identität bedeutet, dass sich bis zu zwei (bzw. vier) Basen zwischen der Referenzsequenz und der untersuchten Sequenz unterschieden. Diese Basenaustausche können auch auf PCR- und/oder Sequenzierfehler zurückzuführen sein.

3.5.4 Charakterisierung der Flora bei Co-Fermentation und Propagation in Teigen mit Apfeltrester

Wie bereits bemerkt, ist die kontinuierliche Propagation ein wichtiges Instrument für die Herstellung von Teigen in der Industrie. Während der Propagation dient ein Anteil eines fermentierten Teigs als Anstellgut für die Fermentation des nächsten Teiges. Hierdurch kann auf die Zugabe von mikrobiellen Starterkulturen verzichtet werden. Daher ist es wichtig, dass sich in den fermentierten Teigen eine stabile und dominante Mikroflora entwickelt, welche auch im Laufe der Propagation erhalten bleibt. Die bisher durchgeführten Experimente

zeigten, dass die Hefen *K. marxianus* DIL 82, *W. anomalous* DIL 1050 und *C. jadinii* DIL 1047 in Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester ein besonderes fruchtiges Aroma erzeugten. Zudem wuchsen diese Hefen mehr oder weniger gut in diesen Teigen. Daher wurden Reinkulturen dieser Stämme ausgewählt, um Teige mit Apfeltrester (Charge 5) zu inokulieren, die Propagation mit jeweils 1 % des bereits fermentierten Teigs durchzuführen und die Entwicklung der Mikroflora sowie der Aromabildung dieser Teige zu analysieren. Wie bereits in den zuvor mit Zusatz von Apfeltrester fermentierten Teigen war in diesen Teigen kein Wachstum von Milchsäurebakterien oder Enterobakterien zu beobachten. In den mit 10^6 KbE/g angeimpften Teigen konnte *K. marxianus* DIL 82 in den ersten 24 h um eine log-Stufe wachsen. In den folgenden Propagationsschritten wurde dann stets wieder eine Lebendkeimzahl von 10^7 KbE/g erreicht (Abbildung 3.13 A). Das Aroma der Teige änderte sich während der Propagation nur unwesentlich und wurde in unterschiedlichen Intensitäten als fruchtig, süßlich und nach Apfel riechend beschrieben (siehe Tabelle A.21). In den mit *W. anomalous* DIL 1050 bzw. mit *C. jadinii* DIL 1047 hergestellten Teigen konnte in den ersten 24 h kein gutes Hefewachstum beobachtet werden. Die Lebendkeimzahl nahm nur um 0,4 bzw. 0,1 log-Stufen zu. Unterschiede zeigten sich in der Entwicklung der Lebendkeimzahl erst in den folgenden Propagationsschritten. Während *W. anomalous* DIL 1050 nach dem ersten Propagationsschritt wieder eine Lebendkeimzahl von 10^6 KbE/g erreichte, sank dieser Wert in den folgenden Propagationsschritten auf bis zu 6×10^4 KbE/g (Abbildung 3.13 B).

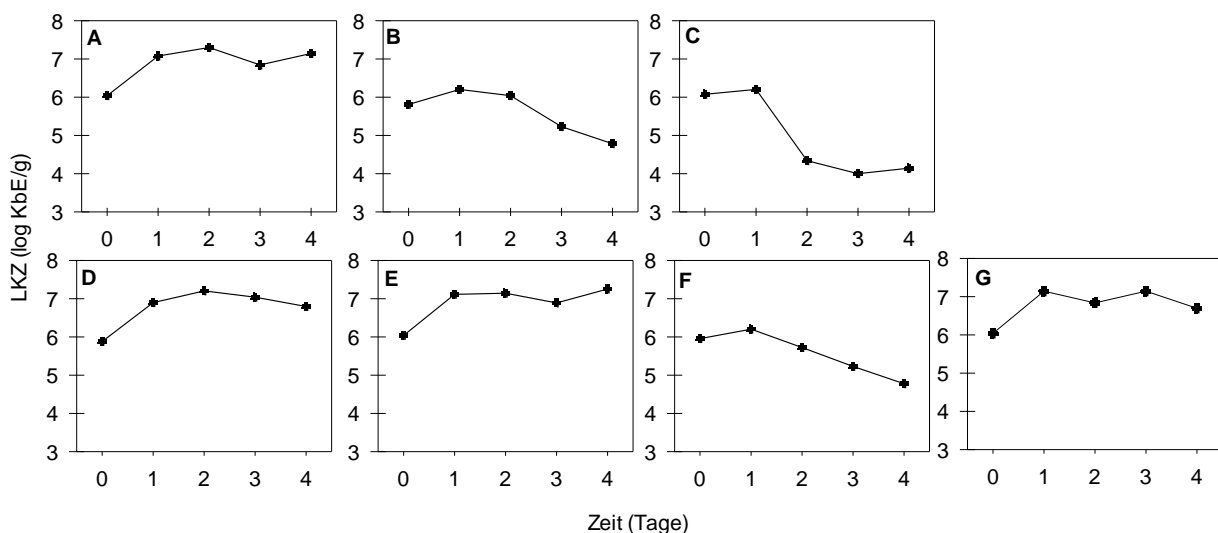


Abbildung 3.13: Einfluss der Propagation auf die Lebendkeimzahl der Hefen in Weizenteigen (TA 200) mit 25 % Apfeltrester (Charge 5). Die Teige wurden mit den Hefen A, *K. marxianus* DIL 82 (Teig 441); B, *W. anomalous* DIL 1050 (Teig 442); C, *C. jadinii* DIL 1047 (Teig 443); D, *K. marxianus* DIL 82 / *W. anomalous* DIL 1050 (Teig 444); E, *K. marxianus* DIL 82 / *C. jadinii* DIL 1047 (Teig 445); F, *W. anomalous* DIL 1050 / *C. jadinii* DIL 1047 (Teig 446); G, *K. marxianus* DIL 82 / *W. anomalous* DIL 1050 / *C. jadinii* DIL 1047 (Teig 447) bei 25 °C für 24 h fermentiert und anschließend mit 1 % fermentierten Teig propagiert. LKZ = Lebendkeimzahl der Hefen.

In den mit *C. jadinii* DIL 1047 hergestellten Teigen reduzierte sich die Lebendkeimzahl bereits mit dem ersten Propagationsschritt auf 10^4 KbE/g und wurde auch in den folgenden Propagationsschritten nicht erhöht (Abbildung 3.13 C). Eine bakterielle Begleitflora konnte während des gesamten Propagationszeitraums nicht nachgewiesen werden. Das Aroma der mit *W. anomalus* DIL 1050 bzw. mit *C. jadinii* DIL 1047 fermentierten Teige unterschied sich nicht signifikant, erzeugte aber nie die gewünschte fruchtige und nach Apfel riechende Note (siehe Tabelle A.21). Hingegen dominierten Aromen wie Marzipan, Getreide oder kernig, wie sie auch für spontan fermentierte Teige (vgl. Kapitel 3.2) wahrgenommen wurden. Wurden die Weizenteige mit Zusatz von Apfeltrester mit *K. marxianus* DIL 82 in Kombination mit *W. anomalus* DIL 1050 und/oder mit *C. jadinii* DIL 1047 fermentiert, so waren die Lebendkeimzahlen der propagierten Teige mit den Lebendkeimzahlen des nur mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teigs vergleichbar (Abbildung 3.13 A und D-E, G). Für den mit *W. anomalus* DIL 1050 und *C. jadinii* DIL 1047 co-fermentierten Teig entsprach die Lebendkeimzahl der propagierten Teige der Lebendkeimzahl des nur mit *W. anomalus* DIL 1050 fermentierten Teigs (siehe Abbildung 3.13 B und F). Wie erwartet spiegelte also das Hefewachstum in den co-fermentierten Teigen das Wachstum derjenigen Hefe wider, die in Einzelfermentation die höchste Lebendkeimzahl erreichten. Dies galt allerdings nicht immer für die Aromabildung, obwohl auch hier viele Übereinstimmungen erzielt wurden (vgl. Tabelle A.21). Beispielsweise war in Teig 447 das fruchtige, süßliche und nach Apfel riechende Aroma wieder in fast allen Propagationsstufen vorhanden und entsprach somit weitgehend dem Aroma des Teigs 441, welcher nur mit *K. marxianus* DIL 82 fermentiert wurde. Der pH-Wert der Teige war unabhängig von den in die Fermentation eingesetzten Hefen. In den ersten 24 h fiel er von 4,3 – 4,4 auf 3,7 – 4,0 und veränderte sich in den nächsten Propagationsschritten nicht weiter. Die Zusammensetzung der Hefemikroflora wurde für alle Propagationsstufen mittels PCR-DGGE beobachtet. Hier zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie bei der Entwicklung der Lebendkeimzahlen der Hefen (Abbildung 3.14). So konnten in allen mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teigen die Hefen gut wachsen. Das entsprechende DGGE-Profil zeigte auch stets die für *K. marxianus* charakteristische Bande, während in den co-fermentierten Teigen die für *C. jadinii* und *W. anomalus* charakteristischen Banden in der Regel nur für Tag 0 und Tag 1 auftraten. Exemplarisch ist in Abbildung 3.14 das DGGE-Profil für den Teig 447 gezeigt, der mit allen drei Hefen co-fermentiert wurde. Zusätzlich sind stets die zu *Cladosporium* spp. und die zu *H. uvarum* gehörigen Banden im DGGE-Profil zu erkennen.

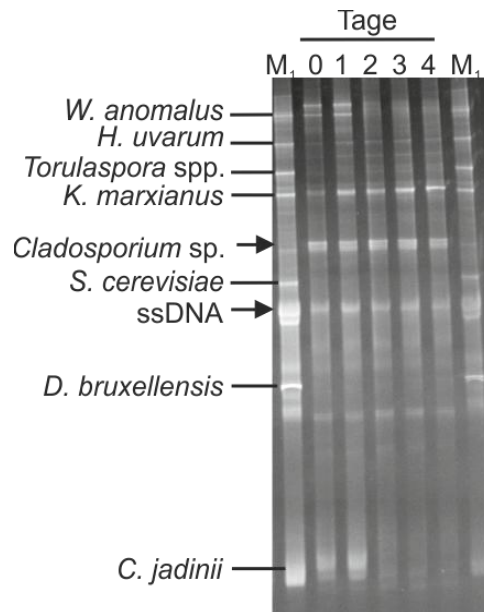


Abbildung 3.14: DGGE-Profil der PCR-Produkte von Hefe-DNA, die mit dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 aus dem mit Apfeltrester propagierten Teig 447 erhalten wurden. Die Fermentation der Weizenteige (TA 200) mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5) wurde am Tag 0 mit den Hefen *K. marxianus* DIL 82, *C. jadinii* DIL 1047 und *W. anomalus* DIL 1050 gestartet und für 24 h bei 25 °C durchgeführt (Tag 1). Anschließend erfolgte die Propagation mit 1 % des fermentierten Teigs sowie die Isolierung der Hefe-DNA nach jeweils weiteren 24 h (Tage 2-4).

3.5.5 Co-Fermentation von *K. marxianus* DIL 82 mit Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien bildeten in der Regel in den Teigen mit Apfeltrester keine dominante Begleitflora aus. Im Zuge der oben beschriebenen Vorversuche (Kapitel 3.1) fiel allerdings auf, dass in einem Teig mit Apfeltrester der Charge 4 unter Zugabe von 0,05 % Aspartat ein schwaches Wachstum von Milchsäurebakterien (7×10^5 KbE/g) nach 24 h Fermentation auftrat. Die Isolierung und Sequenzanalyse dieser Milchsäurebakterien zeigte, dass es sich hierbei um die Spezies *Pediococcus pentosaceus* handelte. Plessas *et al.* (2008a, b) beobachteten eine Verbesserung der Aromaqualität der Backwaren, wenn während der Fermentation von Teigen mit *K. marxianus* auch Milchsäurebakterien zugegeben wurden. Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Fermentation der Teige mit *K. marxianus* DIL 82 durch den Zusatz von *P. pentosaceus* DIL 5111 positiv beeinflusst werden kann. Wurden die mit Apfeltrester der Charge 5 hergestellten Teige ausschließlich mit *P. pentosaceus* DIL 5111 inokuliert, so erreichten die Milchsäurebakterien nach 24 h Fermentation eine Lebendkeimzahl von 2×10^9 KbE/g (Tabelle 3.11). Auch in den folgenden Propagationsschritten erreichten die Milchsäurebakterien immer wieder diese Lebendkeimzahl. Das Wachstum von *K. marxianus* DIL 82 in den Teigen mit Zusatz von Apfeltrester wurde durch die Anwesenheit von *P. pentosaceus* nicht beeinflusst. Eine Charakterisierung der Fermentationsflora mittels PCR-DGGE (Abbildung 3.15) erbrachte neben *Cladosporium* sp. und *K. marxianus* auch den Nachweis von *P. pentosaceus*.

Tabelle 3.11: Effekt der Co-Fermentation von *K. marxianus* DIL 82 und *P. pentosaceus* DIL 5111 auf das Wachstum der Mikroflora, pH-Wert und die Aromabildung in mit Apfeltrester der Charge 5 hergestellten und propagierten Teigen.

Teig	Propa- gations- stufe	Inokulat	Lebendkeimzahl				Geruch nach 24 h
			Hefen		Milchsäurebakterien		
			t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄	
450	0	DIL 5111	<10 ¹	<10 ¹	4,4 × 10 ⁶	2,0 × 10 ⁹	Marzipan 2, Getreide 2
	1	DIL 5111	<10 ¹	<10 ¹	1,5 × 10 ⁷	2,6 × 10 ⁹	Getreide, kein Marzipan
	2	DIL 5111	<10 ¹	<10 ²	1,9 × 10 ⁷	1,6 × 10 ⁹	Marzipan, Getreide, Müsli
	3	DIL 5111	<10 ¹	<10 ²	1,4 × 10 ⁷	1,3 × 10 ⁹	Marzipan, Getreide, flach
451	0	DIL 82	7,8 × 10 ⁵	6,5 × 10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	Apfel 2-3, fruchtig 2
	1	DIL 82	8,3 × 10 ⁵	4,6 × 10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	Apfel 2, fruchtig 1
	2	DIL 82	8,3 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	fruchtig 2, Apfel 1-2, chemisch 1
	3	DIL 82	5,1 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	fruchtig 2, Apfel 2, chemisch 0-1
452	0	DIL 82, DIL 5111	9,7 × 10 ⁵	1,9 × 10 ⁷	4,1 × 10 ⁶	1,2 × 10 ⁹	fruchtig 1, Apfel 1, chemisch 1-2
	1	DIL 82, DIL 5111	1,1 × 10 ⁵	2,7 × 10 ⁷	1,7 × 10 ⁷	3,0 × 10 ⁹	Apfel 1, anfangs säuerlich, flach
	2	DIL 82, DIL 5111	1,9 × 10 ⁵	2,3 × 10 ⁷	2,0 × 10 ⁷	3,4 × 10 ⁹	Apfel 1-2, chemisch 1, flach
	3	DIL 82, DIL 5111	4,2 × 10 ⁵	1,7 × 10 ⁷	1,5 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁹	Apfel 1-2, chemisch 1

t₀, Fermentationsbeginn; t₂₄, Fermentationsende nach 24 h. Die Intensität des Geruchs ist auf einer Skala von 0 (nicht vorhanden) bis 3 (sehr stark) angegeben.

Eine weitere Begleitflora konnte in dieser PCR-DGGE nicht nachgewiesen werden. In Hinblick auf die Aromabildung unterschieden sich die mit *P. pentosaceus* DIL 5111 fermentierten und propagierten Teige nicht von den zuvor in Kapitel 3.2 beschriebenen Kontrollteigen.

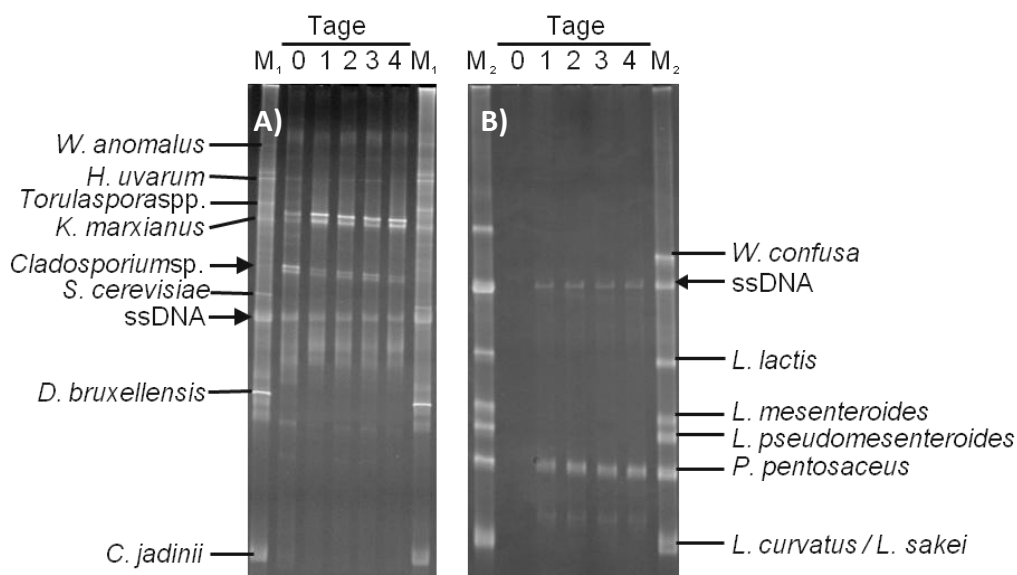


Abbildung 3.15: PCR-DGGE-Profile des mit Apfeltrester der Charge 5 hergestellten und propagierten Teigs 452. A) Das PCR-DGGE-Profil der Hefen wurde dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 und B) das PCR-DGGE-Profil der Milchsäurebakterien wurde mit dem Oligonukleotidpaar L1-GC/LAB-0677 erhalten. Die Fermentation der Weizenteige (TA 200) mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5) wurde an Tag 0 mit *K. marxianus* DIL 82 und *P. pentosaceus* DIL 5111 gestartet und für 24 h bei 25 °C fermentiert (Tag 1). Anschließend erfolgte die Propagation mit jeweils 1 % fermentiertem Teig sowie nach weiteren 24 h (Tage 2-4) die Isolierung und Amplifikation der Hefe- bzw. Milchsäurebakterien-DNA.

Jedoch war die Aromaqualität der mit *K. marxianus* DIL 82 und *P. pentosaceus* DIL 5111 co-fermentierten Teige schlechter, als die nur mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten und propagierten Teige. Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 4,1 und 4,3 und sank nach 24 h auf einen Wert zwischen 3,5 und 3,9.

3.5.6 Charakterisierung der Flora bei Co-Fermentation und Propagation in Teigen mit Karottentrester

Um den Effekt der Propagation von fermentierten Teigen mit Zusatz von Karottentrester auf die Mikroflora, den pH-Wert und die Aromabildung zu untersuchen, wurden Trester der Charge 4 in Kombination mit *K. marxianus* DIL 82, *T. delbrueckii* DIL 1054 oder/und *W. anomalus* DIL 1050 verwendet. In dem mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teig wuchsen die Hefen während der ersten 24 h um 1,3 log-Stufen, sodass sie eine Lebendkeimzahl von $1,4 \times 10^7$ KbE/g erreichten. In den folgenden Propagationsschritten betrug das Wachstum 1,4 – 1,8 log-Stufen, sodass trotz des durch die Propagation verursachten Verdünnungseffekts die Hefen Lebendkeimzahlen von $1,2 \times 10^7$ KbE/g bis $4,4 \times 10^6$ KbE/g erreichten (Abbildung 3.16 A). Für die mit *W. anomalus* DIL 1050 durchgeführte Fermentation konnte im ersten Propagationsschritt noch kein Wachstum festgestellt werden. Dennoch stieg ab der zweiten Propagationsstufe das Wachstum, sodass die Hefen auf letztlich eine Lebendkeimzahl von $1,2 \times 10^7$ KbE/g erreichten (Abbildung 3.16 B). Ein sehr gutes Wachstum von 1,9 log-Stufen konnte für die Hefen in der mit *T. delbrueckii* DIL 1054 durchgeführte Fermentation an Tag 1 beobachtet werden. In den weiteren Propagationsstufen sank die Lebendkeimzahl jedoch und erreichte zum Schluss nur noch $1,1 \times 10^6$ KbE/g (Abbildung 3.16 C). Der Verlauf der Lebendkeimzahlen der mit *K. marxianus* DIL 82 und *W. anomalus* DIL 1050 bzw. mit *T. delbrueckii* DIL 1504 co-fermentierten Teige entsprach den Fermentationen von *K. marxianus* DIL 82 (Abbildung 3.16 D, E, G). Anders verhielt sich das Wachstum für die Fermentation mit *T. delbrueckii* DIL 1054 und *W. anomalus* DIL 1050. In den ersten 24 h der Fermentation wurde ein Wachstum von 1,7 log-Stufen und eine Lebendkeimzahl von $5,3 \times 10^7$ KbE/g beobachtet. Zwar nahm während der Propagationsstufen 1 und 2 die Lebendkeimzahl auf $2,0 \times 10^6$ KbE/g ab, stieg aber in der letzten Propagation wieder auf $1,0 \times 10^7$ KbE/g an (Abbildung 3.16 F). In Bezug auf die Zusammensetzung der Hefeflora während der Propagation konnten während der ersten 24 h der Fermentation stets alle eingesetzten Hefespezies mittels PCR-DGGE nachgewiesen werden (Abbildung 3.17).

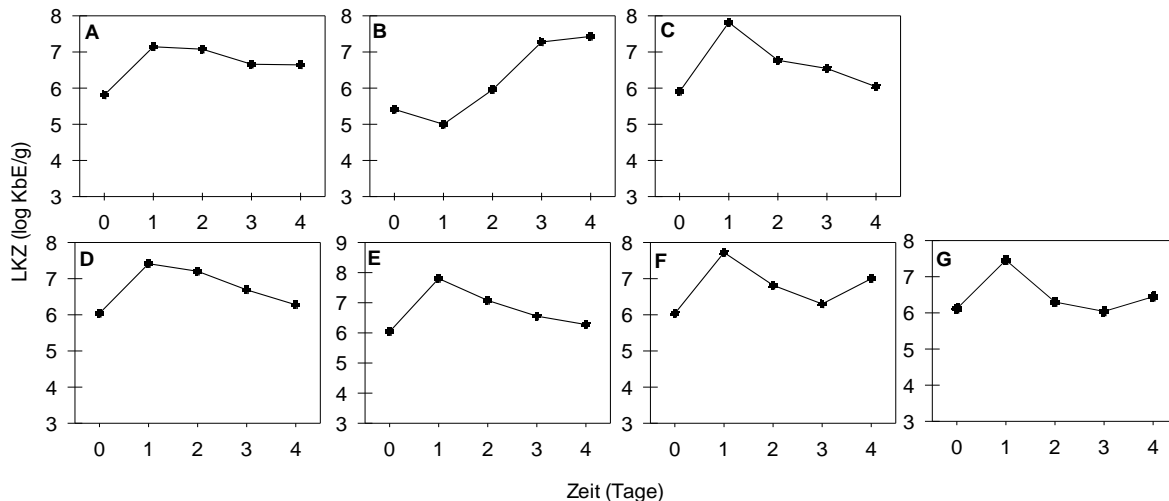


Abbildung 3.16: Effekt der Propagation auf die Lebendkeimzahl der Hefen in Weizenteigen (TA 250) mit 25 % Karottentrester (Charge 4). Die Teige wurden mit den Hefen A, *K. marxianus* DIL 82 (Teig 453); B, *W. anomalus* DIL 1050 (Teig 454); C, *T. delbrueckii* DIL 1054 (Teig 455); D, *K. marxianus* DIL 82 / *W. anomalus* DIL 1050 (Teig 456); E, *K. marxianus* DIL 82 / *T. delbrueckii* DIL 1054 (Teig 457); F, *W. anomalus* DIL 1050 / *T. delbrueckii* DIL 1054 (Teig 458); G, *K. marxianus* DIL 82 / *W. anomalus* DIL 1050 / *T. delbrueckii* DIL 1054 (Teig 459) bei 25 °C für 24 h fermentiert und anschließend mit 1 % fermentierten Teig propagiert; LKZ = Lebendkeimzahl der Hefen.

Während in den mit nur einem Stamm gestarteten Fermentationen die Stämme von *K. marxianus* und *T. delbrueckii* über den gesamten Fermentationsverlauf nachweisbar blieben, fehlte die für *W. anomalus* charakteristische Bande am vierten Tag. Darüber hinaus wurde für die mit *W. anomalus* DIL 1050 bzw. *T. delbrueckii* DIL 1054 hergestellten Teige am dritten bzw. vierten Tag der Fermentation zusätzlich die nicht zugesetzte Hefe *H. uvarum* detektiert. Für die Co-Fermentation von *K. marxianus* DIL 82 mit *T. delbrueckii* DIL 1054 bzw. *W. anomalus* DIL 1050 (Abbildung 3.17 A, B) konnten *K. marxianus* und *T. delbrueckii* während der gesamten Fermentation nachgewiesen werden, während die für *W. anomalus* charakteristische Bande nur für die ersten 24 h der Fermentation vorhanden war. Hingegen konnte in den mit *W. anomalus* DIL 1050 und *T. delbrueckii* DIL 1054 gestarteten Co-Fermentationen beide Hefen durchgehend mittels PCR-DGGE nachgewiesen werden (Abbildung 3.17 C). Auch hier wurde am vierten Fermentationstag wieder die Bande für *H. uvarum* sichtbar. Erfolgte die Co-Fermentation der Teige mit allen drei ursprünglich ausgewählten Hefen, so konnten *W. anomalus* und *K. marxianus* über den gesamten Fermentationszeitraum nachgewiesen werden, während *T. delbrueckii* nur die ersten 24 h zur Fermentationsflora gehörte (Abbildung 3.17 D). In allen Teigen konnten darüber hinaus die im Mehl vorhandenen *Cladosporium* sp. sowie die zu dem Karottentrester gehörende DNA (*Daucus carota*) unabhängig von den eingesetzten Hefen nachgewiesen werden.

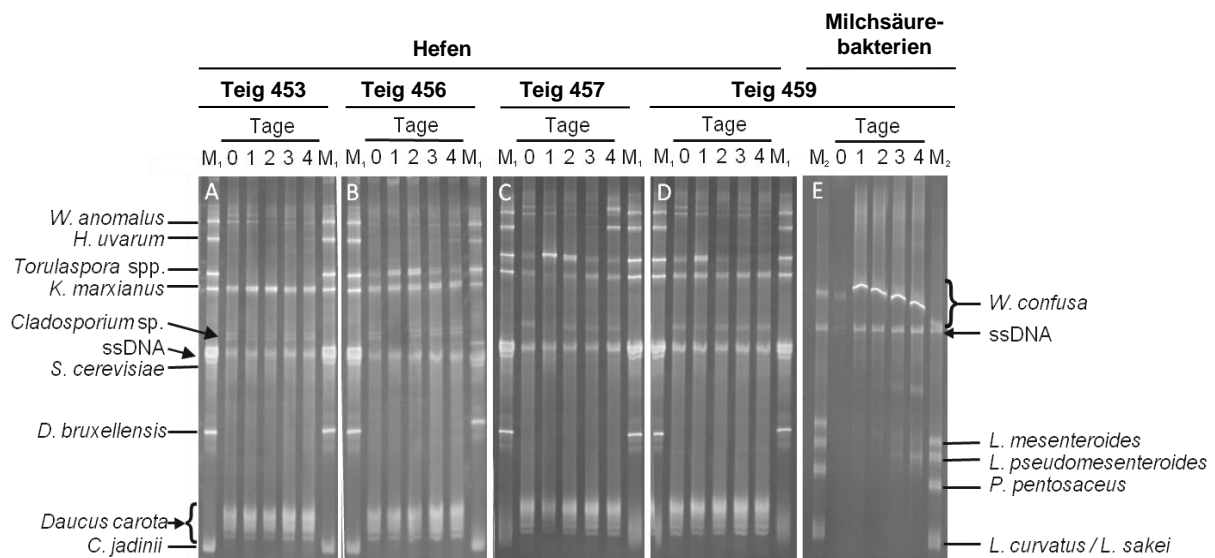


Abbildung 3.17: PCR-DGGE-Analyse der mit Karottentrester der Charge 4 und mit verschiedenen Hefeinokulanten hergestellten und propagierten Teige 453, 456, 457 und 459. A-D) Die PCR-DGGE-Profil der Hefen wurde dem Oligonukleotidpaar NL1-GC/LS2 und E) das PCR-DGGE-Profil der Milchsäurebakterien wurde mit dem Oligonukleotidpaar L1-GC/LAB-0677 erhalten. Die Fermentation der Weizenteige (TA 250) mit Zusatz von 25 % Karottentrester (Charge 4) wurde an Tag 0 mit den Hefen *K. marxianus* DIL 82 (A, B, D), *T. delbrueckii* DIL 1054 (B, C, D) und *W. anomalus* DIL 1050 (A, C, D) gestartet und für 24 h bei 25 °C fermentiert (Tag 1). Anschließend erfolgte die Propagation mit 1 % fermentierten Teig sowie die Isolierung der Hefe-DNA nach weiteren 24 h (Tage 2 - 4). Die Bande I konnte nicht anhand des Markers identifiziert werden. Die DNA wurde aus dieser Bande isoliert. Mit Hilfe der Analyse der DNA-Sequenz konnte *Leuconostoc citreum* als nächster Verwandter identifiziert werden.

Alle mit Karottentrester propagierten Teige wiesen eine starke Begleitflora auf. Während zu Fermentationsbeginn die Milchsäurebakterien nur $< 10^4$ KbE/g erreichten, wuchsen sie innerhalb von 24 h bereits auf eine Lebendkeimzahl von $1 - 3 \times 10^9$ KbE/g an. Auch in den folgenden Propagationsschritten lag die Lebendkeimzahl der Milchsäurebakterien in dieser Größenordnung. In der mittels PCR-DGGE analysierten Zusammensetzung dieser Fermentationsflora wurde zu Beginn der Propagation nur *W. confusa* nachgewiesen. Erst ab der zweiten und dritten Propagationsstufe zeigten sich die für *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* und *Leuconostoc citreum* charakteristischen Banden (Abbildung 3.17 E). Wie das Wachstum der Milchsäurebakterien war die Änderung der pH-Werte während der Fermentation unabhängig von den verwendeten Hefen und der Propagationsstufe. Zu Beginn der Fermentation lag der pH-Wert bei 5,7-5,9 und sank während der Fermentation auf 3,9 - 4,2 ab. Die während der Fermentation der propagierten Teige gebildeten Aromen sind in Tabelle A.22 beschrieben. Generell war das Aroma der mit Karottentrester hergestellten Teige sehr ähnlich und unabhängig von der im Teig vorhandenen Mikroflora. Es dominierte der Geruch nach Karotte, welcher teilweise von einem säuerlichen, rauchigen, chemischen bzw. lösungsmittelartigen Geruch begleitet wurde. Nur in Ausnahmefällen wurde ein fruchtiger oder blumiger Geruch wahrgenommen.

3.6 Identifizierung der während der Fermentation gebildeten Aromakomponenten

In den oben beschriebenen Ansätzen zeigte sich das besondere Potenzial von *K. marxianus* DIL 82 zur Aromabildung in Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester. Vier aufgrund ihrer besonderen fruchtigen Qualität ausgewählte Teige wurden daher genauer auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten untersucht (Tabelle 3.12). Die Teige zeigten ein mäßiges bis sehr gutes Hefewachstum und die Begleitflora konnte auch hier für die Qualität vernachlässigt werden.

Im Rahmen der ersten Analyse (Nummer 460 in Tabelle 3.12; fermentierter Teig mit 25 % Apfeltrester der Charge 5, siehe auch Tabelle A.23) konnten insgesamt 60 unterschiedliche Verbindungen nachgewiesen werden, wobei die Aromaqualität von 23 Verbindungen als fruchtig, blumig oder nach Apfel riechend beschrieben wurde. Am stärksten trugen das fruchtige und nach Apfel riechende β -Damascenon und die nach Honig riechende Phenyl-essigsäure zum Aroma des Teiges bei. Für diese Verbindungen wurde ein *Flavour of Dilution* (FD)-Wert von 1024 ermittelt, wobei der FD-Wert die Verdünnung beschreibt, bei der die entsprechende Verbindung in der GC-Analyse noch nachweisbar ist. Einen ebenso hohen FD-Wert von 1024 zeigten aber auch negative Aromen, wie das metallisch riechende tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal und die nach Schweiß riechende 2-/3-Methylbuttersäure. Allerdings wurden diese unangenehmen Aromaqualitäten trotz des hohen FD-Wertes in der einfach beschreibenden sensorischen Prüfung des Teiges nicht wahrgenommen (Tabelle 3.12). In einer zweiten Analyse wurden vergleichend die Aromaverbindungen des fermentierten und unfermentierten Teigs untersucht, um den Einfluss der Fermentation auf die Bildung der Aromen zu ermitteln. Für den fermentierten Teig (25 % Apfeltrester Charge 6, siehe Tabelle A.24) konnten insgesamt 56 unterschiedliche Verbindungen nachgewiesen werden, wobei von 14 Verbindungen die Aromaqualität als fruchtig, blumig oder nach Apfel riechend

Tabelle 3.12: Übersicht der für die Aromaextraktverdünnungsanalysen mittels GC/O verwendeten Weizenteige mit Zusatz von Apfeltrester, die mit *K. marxianus* DIL 82 (10^6 KbE/g) für 24 h bei 25 °C fermentiert wurden.

Analyse	%	Apfel- trester Charge	TA	Lebendkeimzahl (KbE/g)		pH-Wert		Geruch
				Hefen	MSB	t_0	t_{24}	
460	25	5	200	$1,2 \times 10^7$	$<10^3$	n. b.	3,9	fruchtig 2-3, frisch, Apfel 2, säuerlich?
461	25	6	200	$7,3 \times 10^6$	$8,5 \times 10^3$	4,4	4,2	schöner und konstanter Apfel 2, chemisch 0-1
462	25	6	200	$5,4 \times 10^7$	$<10^1$	4,4	4,2	schöner und konstanter Apfel 2, chemisch 1
463	50	6	238	$1,2 \times 10^8$	$<10^1$	3,9	3,8	fruchtig (tropisch)?, Apfel 1, süßlich/säuerlich

MSB: Milchsäurebakterien; t_0 , Fermentationsbeginn; t_{24} , Fermentationsende nach 24 h, n. b. = nicht bestimmt. Die Intensität des beschriebenen Geruchs wird auf einer Skala von 1 (schwacher Geruch) bis 3 (starker Geruch) angegeben.

beschrieben wurde. Während der Fermentation entstanden 17 neue Verbindungen, während sich die Konzentrationen für weitere sieben Verbindungen erhöhten ($\Delta \text{FD} \geq 2$). Bei neun Verbindungen wurde keine nennenswerte Änderung des FD-Wertes ($-1 \geq \Delta \text{FD} \geq 1$) festgestellt, während er sich bei 23 Verbindungen deutlich verringerte ($\Delta \text{FD} \leq -2$). Obwohl bei der dritten Analyse die gleichen Bedingungen gewählt wurden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, konnten hier zusätzlich 12 weitere Verbindungen identifiziert werden (siehe Tabelle A.23). Von den insgesamt 68 Verbindungen hatten 17 Verbindungen eine fruchtig, blumig oder nach Apfel riechende Aromaqualität. Durch die Fermentation wurden hier 12 Verbindungen neu gebildet, von neun Verbindungen erhöhte sich die Konzentration ($\Delta \text{FD} \geq 2$), und für 22 Verbindungen wurde keine deutliche Änderung des FD-Wertes ($-1 \geq \Delta \text{FD} \geq 1$) festgestellt. Wie in der zweiten Analyse reduzierte sich bei 23 Verbindungen die Konzentration ($\Delta \text{FD} \leq -2$), wobei hier im Vergleich zur Analyse 2 nur zehn der Verbindungen identisch waren. Im Gegensatz zu den zuvor analysierten Teigen wurde in der vierten Analyse die Tresterkonzentration im Teig auf 50 % erhöht (Apfeltrester Charge 6, siehe Tabelle A.26). Hier konnte die größte Anzahl an Aromaverbindungen (71 Stoffe) nachgewiesen werden. Eine fruchtige, blumige oder nach Apfel riechende Aromaqualität zeigten aber nur wieder 17 dieser Verbindungen. Im Laufe der Fermentation entstanden hier 18 neue Verbindungen und von 15 weiteren Verbindungen erhöhte sich die Konzentration ($\Delta \text{FD} \geq 2$). Bei den übrigen nachgewiesenen Inhaltsstoffen konnte keine Änderung (22 Verbindungen) oder eine Verringerung (16 Verbindungen mit $\Delta \text{FD} \leq -2$) beobachtet werden. Aus allen vier Ansätzen wurden in den Aromaextraktverdünnungsanalysen der mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Weizenteige mit Zusatz von Apfeltrester insgesamt sieben unterschiedliche Verbindungen mit FD-Werten von 1024 identifiziert (Tabelle 3.13). Die Geruchsqualität dieser Verbindungen wurde hauptsächlich als fruchtig, oder nach Apfel, Honig, Vanille oder Karamell riechend beschrieben. Jedoch wurden zwei Aromastoffe 2/3-Methylbuttersäure und tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal mit einem schweißig und metallischen Geruch identifiziert, welcher allerdings bei der einfach beschreibenden Prüfung in Analyse 1 nicht wahrgenommen wurde. Jede dieser sieben Verbindungen wurde in allen vier Analysen nachgewiesen, allerdings unterschieden sich die FD-Werte für die entsprechenden Verbindungen deutlich zwischen den einzelnen Analysen. So wurde Phenyllessigsäure (nach Honig riechend) in den Analysen 1, 3 und 4 mit FD 1024 nachgewiesen, während in Analyse 2 der FD nur mit 16 ermittelt wurde. Interessanterweise unterschieden sich die in den Analysen 1, 3 und 4 untersuchten Teige durch die Charge sowie durch die Konzentration des verwendeten Apfeltresters, während diese Parameter für die

Teige in den Analysen 2 und 3 identisch waren. Daher konnte anhand dieser Analysen keine Abhängigkeit zwischen dem analysierten Aromastoff, seinem FD und der Trestercharge und Tresterkonzentration beobachtet werden. In Tabelle 3.14 sind die 27 Verbindungen mit einer fruchtigen oder blumigen Geruchsqualität aufgeführt, die in den Analysen 1 - 4 ermittelt wurden. Von diesen Verbindungen konnten zehn Verbindungen den Estern, fünf Verbindungen den Lactonen, jeweils drei Verbindungen den C13-Norisoprenoiden und Monoterpenen, je zwei Verbindungen den höheren Alkoholen und den Ketonen, sowie jeweils eine Verbindung der Klasse der Aldehyde und der phenolischen Verbindungen zugeordnet werden. Bei den Analysen 2 - 4 entstanden 13 der Verbindungen im Laufe der Fermentation ($\Delta \text{FD} \geq 2$), während sich bei zehn Verbindungen der FD nicht änderte ($-1 \geq \Delta \text{FD} \geq 1$) und bei vier Verbindungen vor Fermentationsbeginn höher als nach Fermentationsende war ($\Delta \text{FD} \leq -2$). Bei den neu gebildeten fruchtigen und blumigen Aromen handelte es sich hauptsächlich um Esterverbindungen.

Tabelle 3.13: Mittels GC/O-Analyse (Analysen 1 - 4) identifizierte, aromastarke Verbindungen in den fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester.

Verbindung	Geruchsqualität (Analyse)	FD			
		Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Analyse 4
		25 % Charge 5	25 % Charge 6	25 % Charge 6	50 % Charge 6
β -Damascenon	Apfel (1-4), fruchtig (1)	1024	128	64	256
2-Phenylethanol	Honig (1-4)	64	1024	64	64
Phenyllessigsäure	Honig (1-4)	1024	16	1024	1024
Vanillin	Vanille (1-4)	32	1024	16	64
Furaneol	Karamell (1-4)	256	16	1024	512
2/3-Methylbuttersäure	schweißig (1-4)	1024	32	1024	1024
tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch (1-4)	1024	64	512	1024

Die Fermentation der Teige erfolgte mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C.

Tabelle 3.14: Übersicht aller mit fruchtiger oder blumiger Geruchsqualität identifizierten Verbindungen, die in den fermentierten Weizenteigen mit Zusatz von Apfeltrester nachgewiesen wurden. Die Fermentation der Teige erfolgte mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C. Analyse 1: 25 % Apfeltrester Charge 5; Analyse 2 & Analyse 3: 25 % Apfeltrester Charge 6; Analyse 4: 50 % Apfeltrester Charge 6. Es werden jeweils die FD der fermentierten Teige sowie ggf. die Änderung des FD (Δ FD) im Vergleich zu den unfermentierten Teigen angegeben. Die Aromaverbindungen wurden nach der Summe ihres Δ FD sortiert.

Verbindung	Geruchsqualität (Analyse)	Stoffklasse	Analyse										
			1		2		3		4				
			FD	Δ FD	FD	Δ FD	FD	Δ FD	FD	Δ FD			
1-Hexanol	Apfel (1), grasig (1-3), Mandel (4)	höhere Alkohole	4	32	6	16	3	16	3	16	5	68	14
2-Phenylethanol	blumig (1), Honig (1-4)	höhere Alkohole	64	1024	3	64	2	64	2	64	7	1216	12
Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig (1, 4)	Ester	32	512	10	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	544	10
γ -Nonalacton	Pfirsich (1), Kokos (2-4)	Lactone	128	4	3	64	1	256	1	256	6	452	10
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig (2, 3)	Ester	n.d.	n.d.	0	16	5	16	5	16	5	32	10
Phenylethylacetat	blumig (2, 3)	Ester	n.d.	n.d.	0	16	5	16	5	16	5	32	10
Ethylhexanoat	fruchtig (1-4)	Ester	4	8	4	32	3	16	2	16	2	60	9
2-Methylbutylacetat	Banane (2, 3)	Ester	n.d.	n.d.	0	4	3	16	3	16	5	20	8
Ethylcinnamat	blumig (2-4), Zimt (2-4)	Ester	n.d.	512	2	16	0	16	0	16	5	544	7
Geraniol	Rose (1), blumig (2-4), Citrus (2-4)	Monoterpenoide	2	128	0	16	0	16	0	16	5	162	5
(Z)-1,5-Octadien-1-on	Geranie (1-4)	Ketone	16	8	4	64	2	64	2	64	-1	152	5
Linalool	blumig (1-4), Citrus (1-4)	Monoterpenoide	4	32	6	n.d.	-3	16	2	16	2	52	5
β -Ionon	Veilchen (1-3)	C13-Norisoprenoide	256	n.d.	0	32	-1	64	3	64	3	352	2
(Z)-6-Dodecen- γ -Lacton	Pfirsich (2, 3)	Lactone	n.d.	n.d.	0	4	0	8	1	8	1	12	1
3-Methyl-2,4-nonandion	blumig (1-4), minzig (1), heuartig (2-4)	Ketone	8	32	-1	16	0	32	1	32	1	88	0
Ethylbutanoat	fruchtig (1-4)	Ester	2	4	-2	32	1	32	1	32	1	70	0
2-Phenylethylacetat	fruchtig (1)	Ester	64	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	64	0
4-Ethyl-2-methoxyphenol	Nelke (1)	Phenolische	32	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	32	0
Zimtsäureethyllester	blumig (1), Zimt (1)	Ester	32	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	32	0
δ -Dodecalacton	Pfirsich (1-3)	Lactone	16	n.d.	0	2	-1	1	1	1	1	19	0
α -Damascon	Apfel (1), fruchtig (1)	C13-Norisoprenoide	8	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	8	0
γ -Dodecalacton	Pfirsich (1)	Lactone	4	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	4	0
Ethyl-2-methylpentanoat	fruchtig (1)	Ester	2	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	2	0
β -Damasconen	Apfel (1-4), fruchtig (1)	C13-Norisoprenoide	1024	128	-2	64	-2	256	1	256	1	1472	-3
Eugenol	Nelke (1-4)	Monoterpenoide	64	128	-3	16	0	16	0	16	0	224	-3
γ -Decalacton	Pfirsich (1, 4)	Lactone	4	n.d.	-4	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	4	-4
Phenylacetaldehyd	blumig (1), Honig (1-4)	Aldehyde	16	4	-2	4	-1	2	-1	2	-2	26	-5

n.d., nicht detektiert.

3.7 Rheologische Charakterisierung der Teige

Zur Bewertung der Viskoelastizität und der Festigkeit der Teige wurden Oszillationstests durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden Teige (TA 200) mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5) hergestellt. Die Teige wurden mit *K. marxianus* DIL 82 (10^6 KbE/g) inokuliert und für 24 h bei 25 °C fermentiert. Der Effekt der Fermentation dieser Teige auf das Wachstum der Hefen, den Geruch, die Änderung der Viskosität im viskoelastischen Bereich $\eta_{VE,int}$ und der Festigkeit G'_0 sind in Tabelle 3.15 dargestellt. Trotz der unterschiedlichen Fermentationsergebnisse in Bezug auf die Lebendkeimzahlen der Hefen und den Geruch, wurden $\eta_{VE,int}$ und G'_0 nicht beeinflusst. Im Mittel wurde $\eta_{VE,int}$ für diese Teige zu Fermentationsbeginn mit $9,8 \pm 0,8$ kPa s bestimmt und verringerte sich während der Fermentation um $3,0 \pm 1,2$ kPa s. Während der Fermentation nahm G'_0 ebenfalls ab. Zu Fermentationsbeginn wurde für G'_0 ein Wert von $45,9 \pm 4,3$ kPa ermittelt, welcher während der Fermentation um $16,9 \pm 9,7$ kPa sank.

Tabelle 3.15: Effekt der Fermentation (TA 200) auf die Lebendkeimzahl der Hefen, den Geruch sowie die Änderung der Viskosität im viskoelastischen Bereich $\eta_{VE,int}$ und der Festigkeit G'_0 der Teige mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5).

Teig	$\eta_{VE,int}$		G'_0 (kPa)		LKZ t_{24}	Geruch t_{24}
	(kPa s)		(kPa)			
	t_0	t_{24}	t_0	t_{24}		
464	9,5	7,2	44,4	35,2	$8,8 \times 10^7$	Apfel 0-1
465	9,2	6,5	42,5	25,5	$2,8 \times 10^7$	fruchtig 2 ^a , Apfel 2, chemisch 1
467	10,7	6,7	50,8	26,2	$3,0 \times 10^7$	fruchtig 1-2 ^a , Apfel 1-2
Mittelwert \pm	$9,8 \pm$	$6,8 \pm$	$45,9 \pm$	$29,0 \pm$		
Standardabweichung	0,8	0,4	4,3	5,4		

^a, Geruch ist während der sensorischen Überprüfung deutlich schwächer geworden; t_0 , Fermentationsbeginn; t_{24} , Fermentationsende nach 24 h; LKZ: Lebendkeimzahl der Hefen; die Intensitäten der Gerüche sind auf einer Skala von 0-3 dargestellt. Die Teige wurden mit *K. marxianus* DIL 82 (10^6 KbE/g) inokuliert und für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Am Beispiel von mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teigen mit Zusatz von Apfel- und Karottentrester wurde im Folgenden die Wasseraufnahme bestimmt. Die für die Analyse eingesetzten Teige sind in Tabelle 3.16 beschrieben. Während in den Teigen mit Apfeltrester die Hefen gut wuchsen und ein fruchtiges Aroma vorhanden war, trat nur in einem der beiden Karottenteige ein angenehmes Aroma auf. Diese Teige sollten in einem weiteren Schritt zu Brot backen und die Wasseraufnahme eines normalen Weizenteigs mit der eines Weizenteigs mit Zusatz von vorfermentiertem Teig sowie mit einem Teig mit der entsprechenden Menge an unfermentierten Treestern untersucht werden.

Tabelle 3.16: Charakterisierung der für die Bestimmung der Wasseraufnahme verwendeten Teige.

Teig	Trester	Lebendkeimzahl (KbE/g)				Geruch t ₂₄
		Hefe		Milchsäurebakterien		
		t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄	
468	Apfel	1,3 × 10 ⁶	8,3 × 10 ⁷	<10 ¹	<10 ¹	Apfel 2, fruchtig 2, chemisch 1-2
469	Apfel	1,4 × 10 ⁶	1,1 × 10 ⁸	<10 ¹	<10 ¹	Apfel 2, fruchtig 2, chemisch 0-1
470	Karotte	1,3 × 10 ⁶	3,0 × 10 ⁷	<10 ²	4,2 × 10 ⁹	alte Karotte 1
481	Karotte	1,3 × 10 ⁶	9,5 × 10 ⁷	<10 ²	4,3 × 10 ⁹	süßlich?, erdig 2, Karotte 2, chemisch 2

t₀, Fermentationsbeginn; t₂₄, Fermentationsende nach 24 h, Die Intensitäten der Gerüche ist auf einer Skala von 0-3 dargestellt; Gerüche, die nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurden durch ein Fragezeichen gekennzeichnet.

Die Teige wurden mit 25 % Tester (Apfeltrester Charge 5, TA 200, bzw. Karottentrester Charge 4, TA 250) und *K. marxianus* DIL 82 (10⁶ KbE/g) hergestellt und für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Wie aus Tabelle 3.17 zu entnehmen ist, stieg die Wasseraufnahme bereits durch die Zugabe von unfermentierten 2,3 % Apfel- bzw. 1,8 % Karottentrestern an. Diesen Teigen mussten 8,5 ml (= 7,9 %) mehr Wasser zugegeben werden. Enthielt der Teig durch die Zugabe von 9 % vorfermentiertem Teig (25 % Apfeltrester, Charge 5, TA 200 bzw. 25 % Karottentrester, Charge 4, TA 250; 25 °C, 24 h, *K. marxianus* DIL 82, 10⁶ KbE/g) die gleiche Menge an Trester, so erhöhte sich die Wasseraufnahme durch den Fermentationsprozess zusätzlich um 3 ml (= 10,6 %). Dabei hatten 1,8 % Karottentrester der Charge 4 den gleichen Effekt auf die Wasseraufnahme wie 2,3 % Apfeltrester.

Tabelle 3.17: Einfluss der Fermentation und des Nebenstroms auf die Wasseraufnahme der Teige.

Teigkomponenten	Zugesetztes Wasser (ml)
Mehl	108,2
Mehl und Apfeltrester	116,6
Mehl und vorfermentierter Teig mit Zusatz von Apfeltrester	120,8
Mehl und Karottentrester	116,7
Mehl und vorfermentierter Teig mit Zusatz von Karottentrester	120,9

Die Teige (300 g Mehl mit 14 % Feuchte, 1,6 % Salz), wurden mit Weizenmehl Typ 550, 2,3 % bzw. 1,8 % Trester (Apfel Charge 5 bzw. Karotte Charge 2) oder 9 % vorfermentierten Teig (*K. marxianus* DIL 82, 10⁶ KbE/g, 25 °C, 24 h) mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5, TA 200) oder 25 % Karottentrester (Charge 4, TA 250) hergestellt. Durch die Wasserzugabe sollte ein Drehmoment von 5 Nm (= 500 FE) erreicht werden.

3.8 Modellbackwaren

Schließlich sollte überprüft werden, ob die in den vorfermentierten Weizenteigen gebildeten Aromakomponenten auch auf die verzehrfertigen Backwaren übertragen werden. Als Modellbackwaren wurden Weizenbrote ausgewählt. Anhand von Vorversuchen wurde die

Modellrezeptur (2 % Hefe, 1,8 % Salz und TA 160) festgelegt. Durch Wahl dieser Parameter konnte der salzige und hefige Einfluss auf den Geschmack der Brote reduziert werden, was die Bewertung des Aromas der gebackenen Brote erleichterte. In den ersten Versuchen wurden 9 % vorfermentierter Teig eingesetzt und Brote mit einem Stückgewicht von 540 g hergestellt. Als Kontrolle dienten Weizenbrote ohne bzw. mit Zusatz von unfermentiertem Trester. Während das Brot ohne Tresterzusatz als typisches Weizenbrot beschrieben wurde, waren Brote mit unfermentiertem Apfel-, Portugieser- oder Rieslingtrester kräftiger im Geruch und Geschmack. Wurde das Brot mit unfermentiertem Karottentrester hergestellt, ergab sich ein als "leicht karottig" beschriebener Geschmack. Die mit vorfermentierten Teigen mit Zusatz von Trester hergestellten Brote unterschieden sich in ihrem Geschmack deutlich von den Kontrollen. Wie in Tabelle 3.18 dargestellt, konnten die im vorfermentierten Teig gebildeten Aromakomponenten generell ins Brot übertragen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Übertragung der Aromen in die Brotkrume vor allem von den verwendeten Trestern abhing. Allerdings führte das Aroma der vorfermentierten Teige nicht zur gleichen Aromakomposition in der Brotkrume. So wurden die Aromen fruchtig, blumig, süßlich, säuerlich nicht immer übertragen. Vor allem die als alkoholisch, mostig und lösungsmittelähnlich beschriebenen Aromen wurden in der Brotkrume nicht mehr sensorisch erfasst. Die zur Vorfermentation gewählte Hefespezies wirkte sich nicht auf die Übertragbarkeit der Aromen aus. Allerdings ließ sich das Aroma der vorfermentierten Teige durch die Erhöhung ihres Anteils auf 20 % besser auf das verzehrfertige Brot übertragen. So konnte das fruchtige Aroma der mit *K. marxianus* DIL 82 und 25 % Apfeltrester (Charge 4 und 5) vorfermentierten Teige nach dem Verbacken auch in der Brotkrume noch sensorisch wahrgenommen werden.

Tabelle 3.18: Übersicht der bisher aus den vorfermentierten Teigen mit 25 % Trester in die Brotkrume übertragenen Aromakomponenten.

Verwendeter Trester im vorfermentierten Teig	Transferierte Aromakomponenten
Apfel	fruchtig, süßlich, säuerlich
Karotte	fruchtig, blumig, süßlich, Karotte
Portugieser	säuerlich, fruchtig
Riesling	blumig

Die vorfermentierten Teige wurden mit unterschiedlichen Hefen und Nebenströmen hergestellt. Da die für die vorfermentierten Teige verwendeten Hefen nicht entscheidend für die Übertragung der Aromakomponenten waren, wird hier nur der verwendete Trester angegeben. Die Brote wurden aus Weizenmehl Typ 550, 1,8 % Hefe, 1,6 % Salz, TA 160 und 9 % vorfermentierten Teig hergestellt.

Um auszuschließen, dass das Aroma alleine auf den erhöhten Tresteranteil zurückzuführen ist, wurden Weizenbrote ohne Zusatz, mit vorfermentiertem Teig bzw. mit unfermentiertem Trester hergestellt und sensorisch miteinander verglichen. Hierbei erfolgte die sensorische Überprüfung als Dreiecks- oder Duoprüfung. Zunächst wurde die Dreiecksprüfung wegen ihrer höheren statistischen Sicherheit bei einer kleinen Gruppe von Prüfern gewählt. Hierzu wurden Weizenbrote mit fermentiertem Teig im Vergleich zu Weizenbroten ohne fermentierten Teig verkostet. Die vorfermentierten Teige wurden mit Weizenmehl, 25 % Apfeltrester (Charge 5) und *K. marxianus* DIL 82 (TA 200) hergestellt und für 24 h bei 25 °C fermentiert. Zwischen der Kontrollprobe und der Probe mit einem fermentierten Anteil von 20 % konnten 7 von 8 Prüfern (statistische Sicherheit von 99 % auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$) die unterschiedliche Probe erkennen. Die Probe mit dem fermentierten Anteil von 20 % wurde mit einem deutlich wahrnehmbaren fruchtigen Aroma von dem Prüfer-Panel beschrieben (Tabelle A.27).

Im Zuge der sensorischen Tests wurde allerdings festgestellt, dass sich die zwei jeweils unterschiedlichen Brotproben nicht nur im Geruch bzw. Geschmack unterschieden. Vor allem bei Broten mit Zugabe von Trester veränderte sich auch die Textur deutlich gegenüber den Kontrollbroten. Um eine veränderte Texturwahrnehmung zu minimieren wurde der Trester feinvermahlen, bzw. durch Sichtung die Grobpartikel erneut aufbereitet. Jedoch konnte hierdurch die Texturveränderung nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Deshalb wurde bei den weiteren sensorischen Tests die Duoprüfung verwendet, um Weizenbrote, Weizenbrote mit unfermentiertem Trester, sowie Weizenbrote mit vorfermentiertem Teig mit Zusatz von Trester miteinander zu vergleichen. Die vorfermentierten Teige wurden mit Weizenmehl, 25 % Apfeltrester (Charge 5) und *K. marxianus* DIL 82 (TA 200) hergestellt und für 24 h bei 25 °C fermentiert. Die Proben mit vorfermentiertem Teiganteil sowie diejenigen mit unfermentiertem Tresteranteil (Apfeltrester Charge 5) konnten auch hier vom Panel eindeutig von der Kontrolle unterschieden werden (Tabelle A.28). Sowohl die Brote mit 20 % vorfermentiertem Teig, als auch diejenigen mit einer Tresterzugabe von 12,5 % wurden im Vergleich zum Weizenbrot ohne Zusatz (= Kontrolle) von allen 8 Prüfern erkannt. Dies entspricht einer signifikanten Veränderung mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$. Der Vergleich von Broten mit einem unfermentierten Tresteranteil von 5 % mit den Broten mit 20 % vorfermentiertem Teig (entspricht ebenfalls einem Tresteranteil von 5 %) zeigte, dass das fruchtige Aroma in den mit vorfermentiertem Teig angesetzten Broten mit einer statistischen Sicherheit von 99 % in letzterem signifikant auftritt. Wurde der unfermentierte Tresteranteil auf 12,5 % erhöht, so konnte kein signifikanter Unterschied des fruchtigen

Aromas gegenüber dem Brot mit fermentiertem Teig wahrgenommen werden. Beim direkten Vergleich der Brote mit 5 % bzw. 12,5 % unfermentiertem Trester wurde das stärkere fruchtige Aroma in dem Brot mit 12,5 % Tresteranteil mit einer statistischen Sicherheit von 99 % signifikant deutlicher wahrgenommen.

3.9 Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene in *K. lactis* und *K. marxianus*

Nach den oben beschriebenen Versuchen besitzen alternative Hefen ein hohes Potenzial zur Aromabildung in Weizenteigen mit Nebenströmen und zeigen eine mit der natürlichen Mikroflora vergleichbare Wettbewerbsfähigkeit. Die Hefe *K. marxianus* ist bezüglich dieser Eigenschaften besonders hervorzuheben. Um die Produktion bestimmter Aromakomponenten zu verstärken, sollten einige Gene heterolog in *K. marxianus* exprimiert werden, die für an der Aromabildung beteiligte Enzyme kodieren. Die erste molekulargenetische Manipulation von *K. marxianus* wurde bereits im Jahr 1993 beschrieben (Bergkamp *et al.*, 1993), obwohl bisher kein kommerzielles Klonierungssystem für diese Hefe zur Verfügung steht. Hingegen ist die zu *K. marxianus* nah verwandte Milchhefe *K. lactis* als Modellorganismus der Crabtree-negativen Hefen sehr gut untersucht (Rodicio und Heinisch, 2013). Bereits in der Studie von Rocha *et al.* (2010) wurde bestätigt, dass die für *K. lactis* verwendeten Vectorsysteme auch in *K. marxianus* erfolgreich angewandt werden konnten. Daher sollte zunächst die Transformationseffizienz verschiedener Vektoren mit einem Replikationsursprung aus *K. lactis* in *K. marxianus* untersucht werden. Hierzu wurde je 1 µg DNA der Plasmide pCXs18, pSPINGOX, pSPGOX, pJJH1512, und pMW1 in *K. marxianus* SLC33 eingebracht und die Zahl der Transformanten auf selektivem Medium ohne Zusatz von Uracil bestimmt. Unabhängig von der Plasmidgröße wurde eine Transformationseffizienz zwischen $1,6 \times 10^2$ - $1,3 \times 10^4$ KbE/ml bestimmt. Trotz der sich um zwei Größenordnungen unterscheidenden Transformationseffizienzen ermöglichte dies das gezielte Einbringen von an der Aromabildung beteiligten Genen in *K. marxianus* SLC33. Um im Folgenden die Aromaproduktion durch *K. marxianus* zu verstärken, sollten die an der Esterbildung beteiligten Enzyme Atf (Alkohol-acetyl-transferase) und Eeb1 (Abkürzung für Ethyl-ester Biosynthese; katalysiert durch das Enzym Acyl-coenzymeA:ethanol-O-acyltransferase) überproduziert werden. Verschiedene Isoformen des Atf sind in Hefen der Gattung *Saccharomyces* sowie in *C. glabrata*, *K. waltii* und *K. lactis* bereits charakterisiert (Van Laere *et al.*, 2008). Allerdings sind die zu den ATF-Isoformen und die zu *EEB1* homologen Gene in *K. marxianus* nicht bekannt. Da in der Fermentation von Wein *H. uvarum* als Hefe mit einem besonderen

Potenzial zur Aromabildung bekannt ist und in den Teigfermentationen auch spontan auftrat, sollten die entsprechenden Gene aus diesem Organismus überexprimiert werden. Während in *S. cerevisiae* zwei paraloge Gene (*ATF1* und *ATF2*) vorhanden sind, existiert im *H. uvarum*-Genom nur eine Kopie des Gens (pers. Mitteilung Hans-Peter Schmitz).

Um sowohl *HuEEB1* als auch *HuATF1* in *K. marxianus* überexprimieren zu können, wurden diese beiden Gene unter die Kontrolle des starken *PFK2*-Promotors aus *S. cerevisiae* im Plasmid pJJH1512 kloniert (Abbildung 3.18, Abbildung 3.19). Die so erhaltenen Plasmide pMW2 und pMW3 wurden in *K. marxianus* SLC33 und in *K. lactis* KHO46-6C (=Os156) mit Selektion der Transformanten auf Medium ohne Uracil eingebracht.

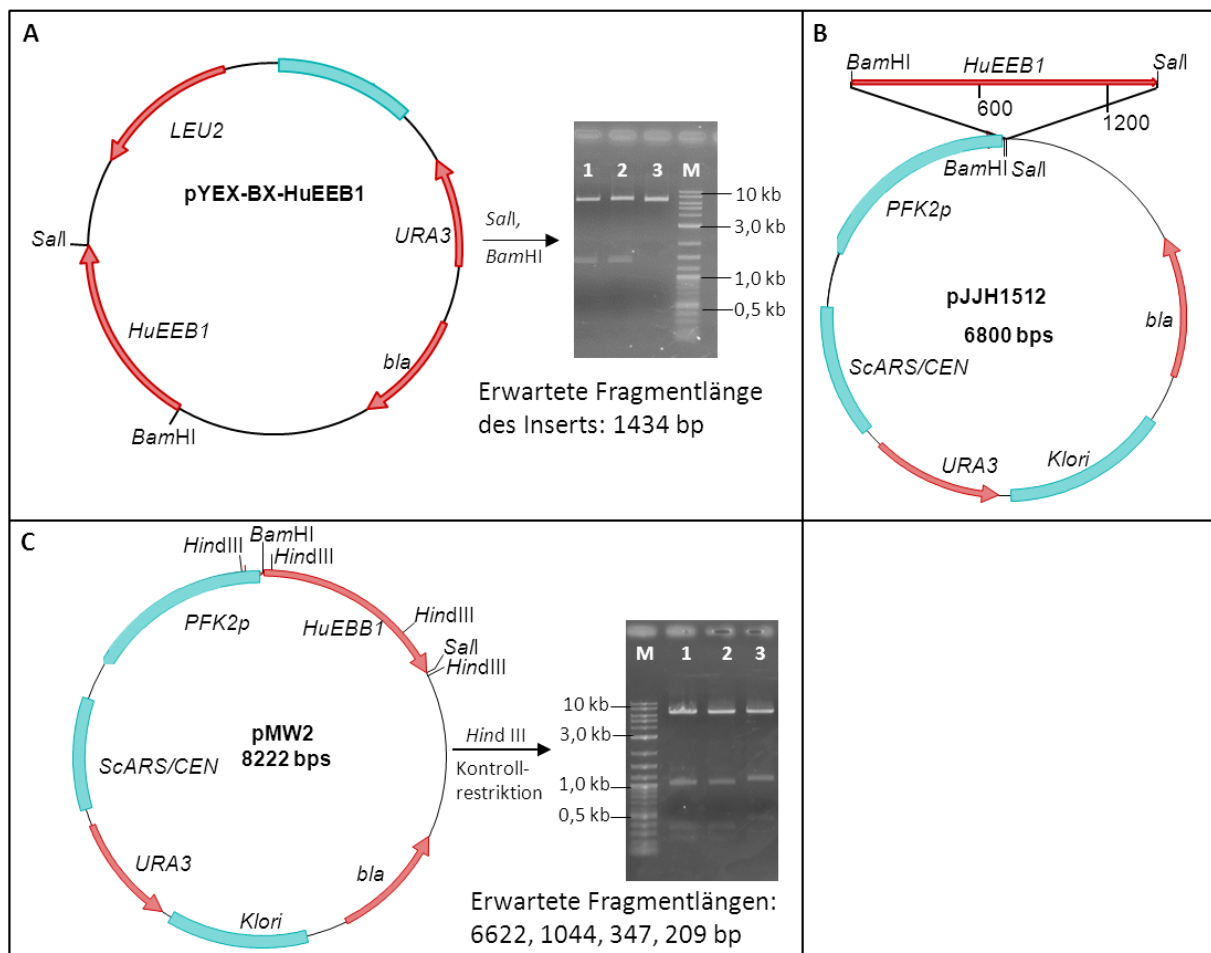


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pMW2. A) Schematische Darstellung der Restriktion von pYEX-BX-HUEEB1 mit *Bam*HI und *Sal*I und das entsprechende 1 %ige Agarosegel mit Ethidiumbromid-gefärbten Restriktionsprodukten. B) Nach der Restriktion des *HuEEB1* und des Vektors pJJH1512 mit *Bam*HI und *Sal*I erfolgte die Ligation zur Konstruktion des Plasmids pMW2. C) Vor der Sequenzierung von pMW2 wurde das Konstrukt durch eine Kontrollrestriktion mit *Hind*III überprüft. *bla* = Gen für β -Lactamase, das Bakterien eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt; *HuEEB1*: Gen zur Biosynthese von Ethylestern; *Klori*: Replikationsursprung in *Kluyveromyces lactis*; *LEU2*: Gen, welches an der Biosynthese von Leucin beteiligt ist; *PFK2p*: starker *PFK2*-Promotor aus *S. cerevisiae*; *ScARS/CEN*: ein Replikationsursprung und ein Centromer aus *S. cerevisiae*; *URA3*: Gen, welches an der Biosynthese von Uracil beteiligt ist. In den Spuren 1-3 sind unterschiedliche Ansätze aufgetragen, wobei mit den Kombinationen A3 und C2 weiter gearbeitet worden ist.

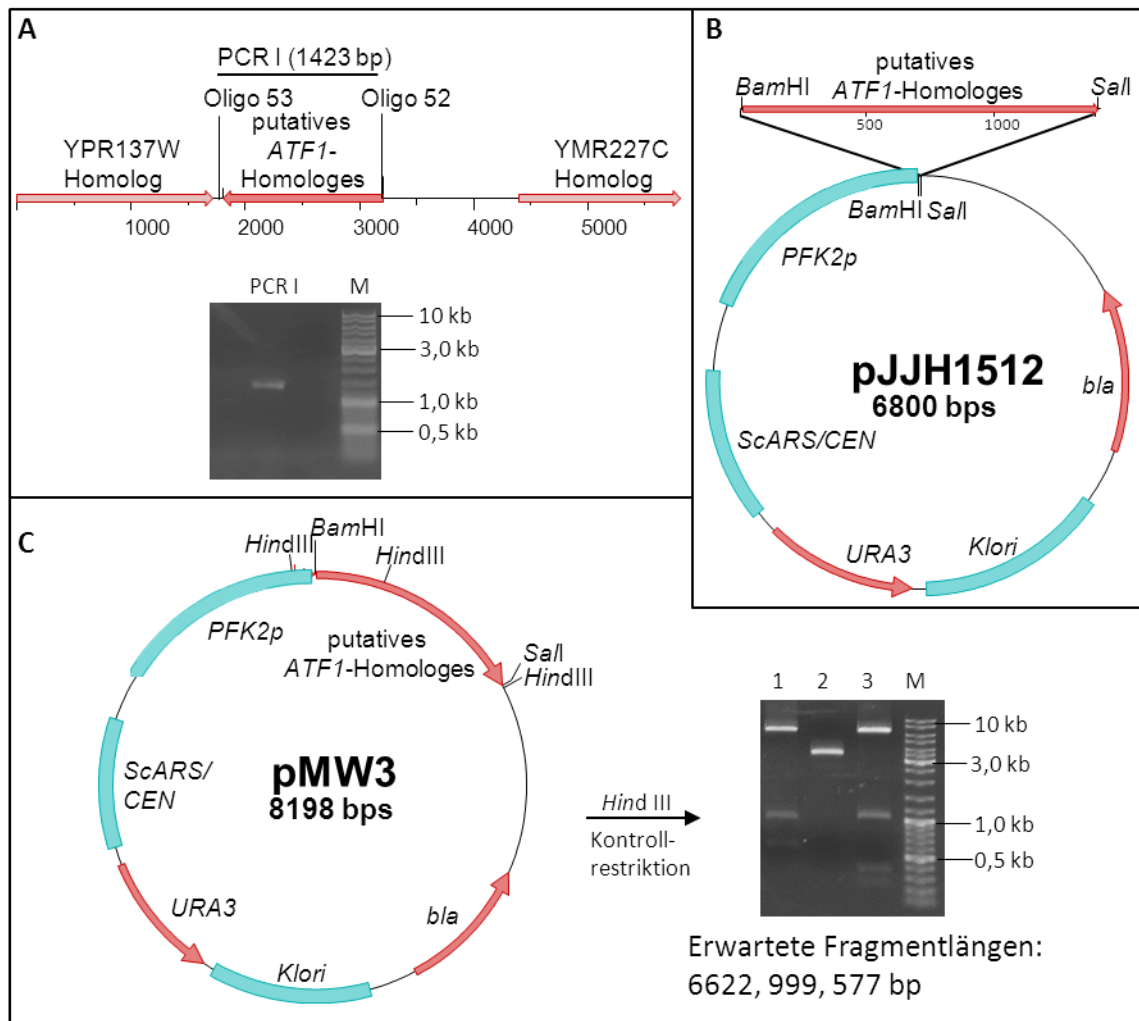


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pMW3. Gezeigt sind A) Schematische Darstellung des postulierten ATF1-Locus in *H. uvarum*. Oligo 52 und Oligo 53 bezeichnen die Bindestellen der Oligonukleotide zur Amplifikation des ATF1-Locus. Im 1%ige Agarosegel ist das mit Ethidiumbromid-gefärbte PCR-Produkt gezeigt. Die zum *S. cerevisiae*-Genom identifizierten flankierenden homologen offenen Leseraster sind angegeben (YPR137W, YMR227C). B) Nach der Restriktion des PCR-Produkts und des Vektors pJH1512 mit *Bam*HI und *Sal*I erfolgte die Ligation zur Konstruktion des Plasmids pMW3. C) Vor der Sequenzierung pMW3 durch eine Kontrollrestriktion mit *Hind*III überprüft. *bla* = Gen für β -Lactamase, das Bakterien eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt; ATF: Gen zur Biosynthese von Acetylestern; *Klari*: Replikationsursprung in *Kluyveromyces*; *LEU2*: Gen, welches an der Biosynthese von Leucil beteiligt ist; *PFK2p*: starker Promotor aus *S. cerevisiae*; *ScARS/CEN*: Replikationsursprung in *S. cerevisiae*; *URA3*: Gen, welches an der Biosynthese von Uracil beteiligt ist. In den Spuren 1-3 sind unterschiedliche Ansätze aufgetragen, wobei mit der Kombination C1 weiter gearbeitet worden ist.

Zunächst sollte bewiesen werden, dass die so kodierten Proteine HuAtf1 und HuEeb1 sowohl in *K. lactis* als auch in *K. marxianus* tatsächlich produziert werden. Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen an ihrem 3'-Ende mit denjenigen für ein 3xHA-Tag fusioniert. Die Proteine konnten in aus diesen Transformanten erhaltenen Rohextrakten anschließend mithilfe spezifischer HA-Antiseren im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Sowohl die zu HuEeb1 als auch die zu HuAtf1 gehörigen Banden waren in den Extrakten aus *K. marxianus* zu sehen (mit einem deutlich schwächeren Signal für HuAtf1-3xHA), während die mit dem Leervektor (pJH1512) transformierte Negativ-Kontrolle kein Signal zeigte.

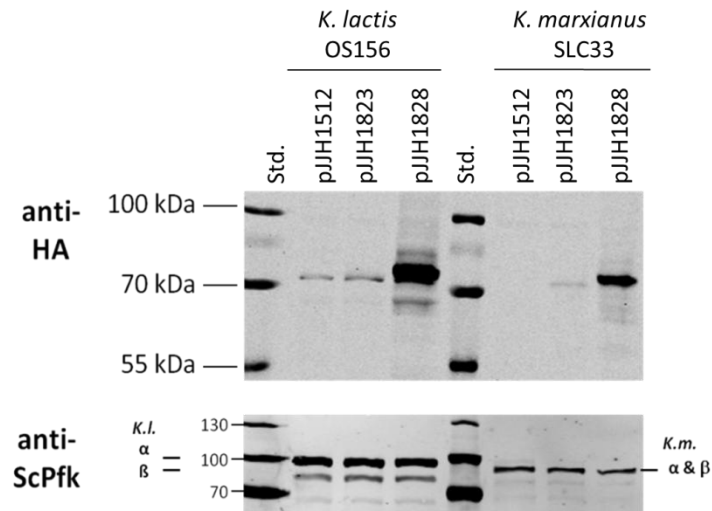


Abbildung 3.20: Western-Analyse der 3HA markierten Proteine in *K. lactis* und *K. marxianus*. Um die Expression von HuAtf1-3HA und HuEeb1-3HA in *K. lactis* OS 156 und *K. marxianus* SLC33 nachzuweisen, wurden pJJH1823 bzw. pJJH1828 in diese Stämme transformiert. Als Negativ-Kontrolle diente pJJH1512. Der Versuch wurde wie in den Kapiteln 2.2.15.1, 2.2.15.2 und 2.2.15.3 beschrieben durchgeführt. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mithilfe eines primären anti-HA Antiserums sowie eines sekundären anti-Maus Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde die Phosphofruktokinase mit Hilfe eines primären Anti-ScPfk-Serums sowie eines sekundären anti-Kaninchen-Antikörpers nachgewiesen.

Bei den entsprechenden *K. lactis*-Transformanten ist ein deutliches Signal für die Transformante mit HuEeb1-3xHA zu sehen (pJJH1828), während die mit HuAtf1-3xHA (pJJH1825) nur eine schwache Bande zeigt, die auch in der Negativ-Kontrolle auftaucht. Offenbar handelt es sich hier um ein unspezifisches Signal, sodass der Beweis für die Expression dieses Gens in *K. lactis* noch aussteht. An dieser Stelle soll auch der Nachweis der als Ladekontrolle verwendeten Phosphofruktokinase erwähnt werden. Zum einen zeigt die Stärke der Signale, dass hier in der Tat in allen Spuren gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die zwei Banden bei *K. lactis* entsprechen den von *KIPFK1* und *KIPFK2* kodierten Untereinheiten des heterooktameren Enzyms (Heinisch *et al.*, 1993). Für *K. marxianus* liegen noch keine Untersuchungen zur Phosphofruktokinase vor. Hier ist nur ein Signal zu beobachten. In der Genomsequenz finden sich aber die beiden zu *ScPFK1* und *ScPFK2* homologen Gene, sodass wahrscheinlich die beiden Untereinheiten hier auf gleicher Höhe laufen.

Die Aromakomposition dieser *K. lactis*- und *K. marxianus*-Varianten wurde nach Anzucht in synthetischem Medium ohne Uracil und mit 2 % Glucose (Tabelle A.29) bzw. mit einem Gemisch von 10 % Fructose und 10 % Glucose (Tabelle A.30 und Tabelle A.31) bestimmt. Auch der Einfluss einer Zugabe von Phenylalanin auf die Steigerung der Aromaproduktion sollte untersucht werden. Zunächst wurden die potenziell interessanten Aromakomponenten aus den in Kapitel 3.6 erhaltenen Ergebnissen und den in der Literatur bei Überexpression von *EEB1* und *ATF1* beobachteten Veränderungen ausgewählt (Tabelle A.29). Im Medium

mit 2 % Glucose zeigte die Expression von *HuATF1* im Vergleich zur Kontrolle der mit pJJH1512 transformierten Hefen keinen nennenswerten Unterschied in der Konzentration der analysierten Aromakomponenten. Allerdings wurde das Aroma des mit *K. marxianus* SLC33 + pMW3 (*HuATF1*) fermentierten Mediums im sensorischen Dreieckstest als signifikant fruchtiger und nach Apfel riechend beschrieben. Nach Überexpression von *HuEEB1* wurde im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls im Dreieckstest ein signifikant fruchtigeres Aroma festgestellt (Tabelle 3.19). Die Analyse der Aromakomponenten zeigte hier auch deutliche Unterschiede in der Konzentration. So wurde bei Überexpression von *HuEEB1* ein reduzierter Gehalt an 2- / 3-Methylbutylacetat, 2-Phenylethanol und 2-Phenylethylacetat gegenüber den Kontrollen gefunden. Um festzustellen, welche Aromakomponenten an der Bildung des fruchtigen Aromas beteiligt sind, wurden die Analysen wiederholt. Dabei wurde abweichend ein Medium verwendet, welches mit 10 % Fructose und 10 % Glucose den Zuckergehalt im Traubenmost imitieren sollte, in dem die Ursprungshefe *H. uvarum* normalerweise wächst. Zusätzlich sollte durch die Zugabe von Phenylalanin die Aromaproduktion gesteigert werden. Es zeigte sich, dass durch die veränderten Fermentationsbedingungen auch die Fermentationszeit von 47 h auf 144 h erhöht werden musste. Auch bei diesen Fermentationsbedingungen wurde das Aroma der Fermentation mit *K. marxianus* SLC33 + pMW2 bzw. pMW3 als deutlich nach Apfel riechend und fruchtig beschrieben. Hier ergab auch die Fermentation mit *K. lactis* OS 156 + pMW2 bzw. *K. lactis* OS 156 + pMW3 ein als fruchtig und intensiv nach Ananas riechendes Aroma. In den Kontrollfermentationen mit *K. marxianus* SLC33 + pJJH1512 bzw. *K. lactis* OS 156 + pJJH1512 wurden dagegen nur schwache Noten eines fruchtigen Aromas wahrgenommen. In der GC-Analyse konnten neben Spuren von Caprylsäureethylester und Caprinsäureethylester in allen Fermentationen Isobuttersäure, 2-Methylbuttersäure, Propansäure-2-phenylethylester und Hexansäure-2-phenylethylester nachgewiesen werden,

Tabelle 3.19: Einfluss der Überexpression von *HuATF1* und *HuEEB1* auf das Aromaprofil von *K. marxianus* und *K. lactis*.

Stamm	Sensorische Analyse	Aromastoff mit erhöhter Konzentration in GC-Analysen
<i>K. marxianus</i> SLC33 + pJJH1512	fruchtig 1	
pMW2 (<i>HuEEB1</i>)	fruchtig 2, Apfel 2	Essigsäure-2-phenylethylester
pMW3 (<i>HuATF1</i>)	fruchtig 2, Apfel 2	
<i>K. lactis</i> OS156 + pJJH1512	fruchtig 1	
pMW2 (<i>HuEEB1</i>)	fruchtig 2, Ananas 2-3	Essigsäure-2-phenylethylester
pMW3 (<i>HuATF1</i>)	fruchtig 2, Ananas 2-3	

welche allerdings nicht exakt quantifiziert wurden. In einem weiteren Experiment mit pMW2 und pMW3 in *K. marxianus* SLC33 und *K. lactis* OS 156 unter den gleichen Bedingungen mit hohen Zuckerkonzentrationen wurden deutlich höhere Konzentrationen für Essigsäureethylester, Propionsäureethylester, i-Buttersäureethylester, Essigsäure-3-methylbutylester, 2-Phenylethanol und Caprylsäureethylester erhalten. In beiden Messungen reproduzierbar konnte nur die erhöhte Bildung von Essigsäure-2-phenylethylester bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und den komplexen Aromaprofilen wären weitere Versuchsreihen mit den gentechnisch veränderten Hefen unter genau kontrollierten Fermentationsbedingungen nötig, um eine abschließende Aussage treffen zu können. Auch die Fermentation definierter Teige mit den veränderten Hefen wäre im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit von Interesse. Diese Ansätze konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, durch den Einsatz alternativer Hefen in Kombination mit der nachhaltigen Verwertung der Nebenströme das Aroma von fermentierten Weizenteigen zu verbessern. Zudem sollte der Einfluss der Überproduktion zweier an der Aromabildung beteiligten Enzyme untersucht werden.

4.1 Fermentation der mit Nebenströmen supplementierten Weizenteige durch alternative Hefen

Um den Einfluss der Nebenströme auf das Hefewachstum und die Aromabildung zu untersuchen, wurden zunächst Teige mit Weizenmehl ohne Zusatz von alternativen Hefen fermentiert. Auf diesem Substrat konnten einige der Hefen nicht wachsen, während für andere Hefen ein gutes Wachstum nachgewiesen werden konnte. So zeigten die in dieser Arbeit getesteten Stämme von *D. bruxellensis* kein Wachstum in Weizenteigen, obwohl *D. bruxellensis* nach Hammes *et al.* (2005) als an das Ökosystem Teig adaptiert gilt. Auch Meroth *et al.* (2003a) identifizierten *D. bruxellensis* als Bestandteil der Hefeflora in propagierten Teigen aus Roggenmehl. Zudem beschrieben Czerny *et al.* (2003), dass *D. bruxellensis* das Aroma von Weizenteigen (TA 400, 26 °C, 42 h) verbessern kann. Die so fermentierten Teige hatten ein deutlich fruchtigeres Aroma als die Teige mit *S. cerevisiae*. Für die in der vorliegenden Arbeit mit *D. bruxellensis* fermentierten Teige (TA 200, 25 °C, 24 h) konnte dagegen kein fruchtiges Aroma wahrgenommen werden, sondern eher mehlig und käsig Geruchsnoten. Dies könnte durch die unterschiedlichen Prozessparameter oder die Verwendung von unterschiedlichen Stämmen von *D. bruxellensis* erklärt werden. Besonders die unterschiedlichen Fermentationstemperaturen könnten einen wesentlichen Einfluss haben, da *D. bruxellensis* seine maximale Wachstumsrate bei 32 °C erreicht (Brandam *et al.*, 2008). Des Weiteren zeigt diese Hefe den sogenannten "Custer-Effekt", bei dem unter anaeroben Bedingungen die Fähigkeit zur Fermentation bestimmter Zucker gehemmt wird (Scheffers, 1979). Durch die hohe TA von 400 und das Rühren des Teiges herrschten in den Versuchen von Czerny *et al.* (2003) weitgehend aerobe Bedingungen die den Custer-Effekt verhindern.

Nach Hammes *et al.* (2005) gelten neben *D. bruxellensis* die Hefen *K. marxianus*, *T. delbrueckii*, *T. pretoriensis* und *S. cerevisiae* als an Teige adaptiert und sind in der Lage Sauerteige zu fermentieren. Im Gegensatz zu *D. bruxellensis* zeigten diese Hefen in den hier untersuchten Weizenteigen ein gutes bis sehr gutes Wachstum. Aber auch für *H. uvarum* konnte in dieser Arbeit ein gutes Wachstum in den Weizenteigen beobachtet werden, obwohl diese Hefe bisher nicht als Bestandteil der Teigflora beschrieben wurde.

Der typische hefige und teigige Geruch der Teige wurde häufig von einem käsigen Geruch begleitet, der auf die Anwesenheit von Enterobakterien hindeutet, welche mit dem Weizenkorn assoziiert sind und zur typischen Flora des Mehls gehören (Pelshenke *et al.*, 1958; Kleeberger *et al.*, 1983). In spontan fermentierten Teigen dominieren zunächst die Enterobakterien (Lönner *et al.*, 1986; Hochstrasser *et al.*, 1993). Im Laufe der Propagation der Teige nimmt das Wachstum und somit auch die metabolische Aktivität der Milchsäurebakterien zu, sodass der pH-Wert der Teige sinkt und die Enterobakterien gehemmt werden. Um das Wachstum der Enterobakterien in den mit alternativen Hefen fermentierten Weizenteigen zu unterdrücken, wurden die Teige mit 10^7 KBE/g der Hefen angeimpft, der pH-Wert durch die Zugabe von Milchsäure abgesenkt bzw. das Wachstum der Prokaryonten durch die Zugabe von Chloramphenicol gehemmt (vgl. Tabelle A.2). Alle diese Methoden führten zu einer Hemmung des Wachstums der Enterobakterien, was dazu führte, dass das käsige Aroma dieser Teige nicht mehr nachweisbar war.

Die Zugabe von Nebenströmen hat einen Einfluss auf die endogenen Faktoren der Teigfermentation. Die veränderte Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst die Wechselwirkungen zwischen den alternativen Hefen, Milchsäurebakterien und der Kontaminationsflora und verschiebt das Gleichgewicht in der Mikroflora (Hammes und Gänzle, 1998). Dies konnte in den mit Zusatz von Nebenströmen fermentierten Teigen bestätigt werden. Während die Enterobakterien die Fermentation solcher Teige nicht beeinflussten, wurde das Wachstum der Hefen durch die Nebenströme gegenüber dem Wachstum in den Weizenteigen ohne Zusatz gefördert. So konnte z. B. die Hefe *C. jadinii* DIL 1047 in den Teigen ohne Nebenströme nicht wachsen und ihre Lebendkeimzahl reduzierte sich sogar (vgl. Teige 702, 717, Tabelle A.1). In den Teigen mit Zusatz von Trester konnte hingegen ein Wachstum von bis zu 1,8 log-Stufen (Teig 784, Tabelle A8) beobachtet werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Verfügbarkeit von Zuckern sein. Im Mehl selbst sind Maltose, Saccharose, Fructose und Glucose mit $< 0,25$ g/100 g nur in geringen Mengen enthalten (Fernández-Artigas *et al.*, 2001). Erst während der Fermentation wird die Stärke des Mehls durch die endogenen amylolytischen Enzyme in Maltose und Glucose umgewandelt (Brandt, 2006). Im Apfel- bzw. Karottentrester sind Glucose und Fructose bzw. Saccharose dagegen mit bis zu 23 g/100 g (vgl. Tabelle 3.2) enthalten. Da diese Zucker von *C. jadinii* DIL 1047 fermentativ verwertet werden können (vgl. Tabelle 3.4), erhöht dies die Wettbewerbsfähigkeit dieser Hefe. Ebenso verhielten sich auch *K. marxianus* und *W. anomalus*, die ein ähnliches Zuckerspektrum wie *C. jadinii* fermentieren können. Allerdings verbesserte sich das Wachstum dieser beiden Hefen durch den Zusatz von Neben-

strömen nicht wesentlich. Diese Hefen wurden, ebenso wie die klassische Bäckerhefe *S. cerevisiae*, unter aeroben Bedingungen angezogen, um das Zellwachstum zu fördern und den Gärungsstoffwechsel zu unterdrücken. Gerade in der ersten Phase der Teigfermentation ändern sich die Rahmenbedingungen für die Hefe schlagartig, sodass sich der Metabolismus schnellstmöglich an die neuen fermentativen Bedingungen anpassen muss. So konnten Veränderungen in der Genexpression bereits innerhalb der ersten 15 Minuten nachgewiesen werden (Tanaka *et al.*, 2006). Dabei wurde die Expression der Glykolysegene verstärkt, während die Expression der Gene für den Citratzyklus gesenkt wurde. Neben dieser schnellen Anpassung an die wechselnden Substratbedingungen und einer hohen glykolytischen Aktivität zeichnet sich die Bäckerhefe durch ihre Fähigkeit aus Maltose zu vergären. Zudem kann die Bäckerhefe noch bedingt unter anaeroben Bedingungen wachsen und Enzyme bilden (Randez-Gil *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *C. jadinii*, *K. marxianus* und *W. anomalus* kann auch *T. delbrueckii* Maltose fermentieren. Trotzdem erreichte *T. delbrueckii* in den Weizenteigen bzw. den Teigen mit Zusatz von Nebenströmen stets nur Lebendkeimzahlen, die mit denjenigen von *K. marxianus* und *W. anomalus* vergleichbar waren. Neben den metabolischen Fähigkeiten der Hefen ist auch ihr physiologischer Status zu Beginn der Teigfermentation entscheidend. So zeigt die Studie von Rezaei *et al.* (2014) zur Fermentation von Brotteig einen deutlich schneller sinkenden pH-Wert, wenn die Kulturen in der späten exponentiellen oder in der stationären Phase geerntet wurden. Dies stimmt mit den Ergebnissen einiger hier durchgeführter Vorexperimente überein, in denen die Aromabildung und die Lebendkeimzahlen der Hefen in Abhängigkeit der Wachstumsphase untersucht wurden. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den in der exponentiellen bzw. stationären Phase geernteten Kulturen. Die in der stationären Phase geernteten Kulturen bewirkten eine deutlich bessere Aromabildung und zeigten einen höheren Anstieg der Lebendkeimzahlen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Hefen in der stationären Phase sowohl Glykogen als auch Trehalose anhäufen, die als Stressschutz die Anpassung an die neuen Bedingungen im Teig erleichtern könnten (Lillie und Pringle, 1980). Insgesamt ist die Fermentation der Teige also ein komplexer Prozess, der von einer Vielzahl an Faktoren abhängt.

Während das Wachstum der Hefen durch die Zugabe von Nebenströmen generell gefördert wurde, zeigte die durch die Milchsäurebakterien gebildete Begleitflora eine stärkere Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Nebenstrom. Beispielsweise wurde ein besonders gutes Wachstum der Milchsäurebakterien in den Teigen mit Karottentrestern der Charge 2 - 4 beobachtet, wohingegen weniger Wachstum in den Traubentrestern, Biertrebern und

Karottentrestern der Charge 1 auftrat und in den mit Apfeltrester hergestellten Teigen das Wachstum der Milchsäurebakterien sogar gehemmt wurde. Eine mögliche Ursache hierfür könnte z. B. der pH-Wert des Fermentationssubstrates sein. Zu Beginn der Fermentation von Weizensauerteigen liegt der pH-Wert zwischen 5,5 und 6,0 (Gänzle und Brandt, 2006) und sinkt je nach Typ des Sauerteigs auf 3,2 - 5,0 (Böcker *et al.*, 1995). Zu Beginn der Fermentationen der mit Karottentrester und Biertreber hergestellten Teige lagen die pH-Werte ebenfalls in diesem Bereich. Der niedrige pH-Wert von 3,8 und 4,7 der Apfel- und Traubentrester entsprach dagegen bereits zum Beginn der Fermentation in etwa dem eines fermentierten Sauerteigs. Obwohl in der Literatur davon ausgegangen wird, dass ab pH 3,5 die Überlebensfähigkeit der Milchsäurebakterien eingeschränkt ist (Lindgren und Dobrogosz, 1990; Vermeulen *et al.*, 2007), war das Wachstum von Milchsäurebakterien trotz dieser sehr niedrigen pH-Werte in den hier durchgeführten Fermentationen noch möglich (Teig 870, spontan fermentierter Rieslingtrester; pH 3,5).

Das Aroma der Teige wurde deutlich durch den Zusatz von Nebenströmen verändert. Während der unfermentierte Teig mit Zusatz von Apfeltrester kernig und nach Marzipan roch, änderte sich das Aroma der Teige z. B. durch die Fermentation mit Apfeltrester abhängig von der eingesetzten Hefe zu fruchtig, säuerlich, muffig und/oder chemisch. Eine Ursache für das kernige und Marzipanaroma der unfermentierten Teige könnte die Zusammensetzung des Apfeltresters sein. Neben den Schalenbestandteilen sind auch die Kerne im Trester enthalten, in denen das cyanogene Glycosid Amygdalin enthalten ist, welches auch in Bittermandeln vorkommt (Holzbecher *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2013). Bittermandeln sind wiederum ein Bestandteil der Marzipanrohmasse. Die glykosidische Bindung kann während der Fermentation durch Hefen gespalten werden, wodurch das Marzipan-Aroma vermindert wird (Gil *et al.*, 2005).

Durch die Variation der Prozessparameter (Anteil an Nebenstrom, TA, Temperatur, Höhe des Inokulats und Fermentationszeit) sollte die Fermentation in Hinsicht auf die Stabilität der Mikroflora und die Bildung von fruchtigen Aromen optimiert werden. Verschiedene Studien konnten bereits einen Einfluss dieser Prozessparameter auf die Aromabildung während der Fermentation nachweisen (Domizio *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2007; Beltran *et al.*, 2008; Flander *et al.*, 2011; Birch *et al.*, 2013b; Hiralal *et al.*, 2014). Für die Fermentation mit *K. marxianus* DIL 82 wurden in der vorliegenden Arbeit die besten Eigenschaften der Teige erreicht, wenn sie mit TA 200 (Apfeltrester der Chargen 1, 4-7 sowie Karottentrester der Charge 1) bzw. mit TA 250 (Karottentrester der Charge 4) und einer anfänglichen

Lebendkeimzahl der Hefe von 10^6 KbE/g für 24 h bei 25 °C fermentiert wurden. Zur Verbesserung der Aromabildung und des mikrobiellen Wachstums in Teigen wurde auch der gezielte Zusatz von Aminosäuren oder Vitaminen vorgeschlagen (Capelle, 2004). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein positiver Einfluss solcher Zusätze auf das Aroma oder Wachstum der Hefen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass Aminosäuren und Vitamine im Fermentationssubstrat bereits in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Auch der Zusatz von Enzymen wie Glucoseoxidase, Exo-1,3- β -glucanase, Pectinlyase, Pectinmethylesterase, Laccase, Peptidase, Cellulase (Cellobiohydrolase/Endoglucanase) oder Amyloglucosidase hatten in dieser Arbeit (unveröffentlichte Daten) keinen signifikanten Einfluss auf die Fermentation. Trotzdem werden diese Enzyme häufig den Teigen zugesetzt, um die Qualität der Backwaren positiv zu beeinflussen. Allerdings ist die Zugabe von Enzymen nicht automatisch mit einer Verbesserung der Teigeigenschaften verbunden. So führte die Kombination von elf untersuchten Milchsäurebakterien mit fünf unterschiedlichen Enzymen nur bei drei der untersuchten Stämme zu einer Verbesserung der Teigeigenschaften (Di Cagno *et al.*, 2003).

K. marxianus wächst optimal bei etwa 40 °C. Während in Teigen mit Karottentrester bei 25 °C ähnliche Wachstumsraten wie in Kulturmedium erreicht wurden, lagen diejenigen in Teigen mit Apfeltrester deutlich darunter. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Wachstumsraten könnte der im Teig enthaltene Sauerstoff sein. Wurde *K. marxianus* im Medium ohne Sauerstoff angezogen, wurde ein μ_{\max} von $0,22 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Dies entspricht der Wachstumsrate von *K. marxianus* DIL 82 im Teig mit Apfeltrester. Zwar könnten die anaeroben Bedingungen, wie sie im Teig vorherrschen (De Vuyst *et al.*, 2014), also die Ursache für die geringe Wachstumsrate sein, doch war die Wachstumsrate in Teigen mit Karottentrester deutlich höher. Da nicht zu erwarten ist, dass die Sauerstoffkonzentration im Teig von der Art des zugesetzten Nebenstroms abhängt, muss die geringere Wachstumsrate mit Apfeltrester also auf einen spezifischeren Effekt zurückzuführen sein, den dieser Trester auf *K. marxianus* ausübt. Die Natur dieser Wechselwirkung konnte hier nicht geklärt werden.

Kritisch sind hier auch die natürlichen Variationen bei der Teigfermentation anzumerken. So zeigten sich bei gleichen Parametern und Nebenströmen oft Unterschiede in der Aromabildung. Zwar korrelierte ein niedrigeres Hefewachstum häufiger mit dem Fehlen eines fruchtigen Aromas der Teige, das allerdings gelegentlich auch in Teigen mit sehr gutem Hefewachstum verzeichnet wurde. Umgekehrt konnte das fruchtige Aroma sowohl in Teigen mit einem guten als auch schwächerem Hefewachstum wahrgenommen werden. Damit

können zwar mit den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen grobe Tendenzen vorhergesagt werden, eine genaue Teigführung muss aber weiterhin im Einzelfall angepasst werden.

4.2 Mikroflora der fermentierten Teige

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Sukzession und Zusammensetzung der Flora in spontan fermentierten sowie in co-fermentierten Teigen untersucht.

Für die mit Apfeltrester hergestellten Teige konnten zwar über kultivierungsabhängige Methoden die Hefen *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, *Metschnikowia* sp. und *H. uvarum* identifiziert werden, allerdings bildeten sie während der Fermentation keine dominante Flora aus. Eine mögliche Ursache dafür, dass die Lebendkeimzahl innerhalb der Fermentationszeit von 24 h nicht weiter anstieg, könnte der niedrige pH-Wert sein. Hefen tolerieren zwar einen niedrigen pH-Wert und können in der Regel auch bei pH-Werten von 4,5 – 6,5 gut wachsen (Walker, 2009). Mit einem pH-Wert von 4,0 – 4,3 liegt der pH-Wert der Teige mit Apfeltrester aber schon unterhalb des Bereichs eines uneingeschränkten Hefewachstums. Bei diesen pH-Werten ist deshalb von einem langsameren Wachstums auszugehen, sodass die Fermentationszeit nicht für eine nennenswerte Vermehrung ausreichte. Aber auch die im Apfeltrester enthaltenen Polyphenole könnten aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung das Wachstum der Mikroorganismen beeinflussen. So zeigen die Daten von García-Ruiz *et al.* (2011), dass verschiedene in Weinen vorkommende polyphenolische Verbindungen das Wachstum verschiedener Milchsäurebakterien hemmen, u. a. das von *P. pentosaceus*. Die IC50-Werte (Wert für die halbmaximale Hemmung) lagen in dieser Studie zwischen 0,2 und 2,0 g/l für verschiedene Gruppen der Polyphenole (z. B. Flavonole). Ausgehend von der von Sudha *et al.* (2007) ermittelten Konzentration von 10,2 mg an phenolischen Verbindungen in 1 g getrocknetem Trester sollte ihr Anteil unter Berücksichtigung der Menge in mit Apfeltrestern angesetzten Teigen und der Teigausbeute bei 1,27 mg/g und damit weit unter den kritischen Konzentrationen liegen. Allerdings gibt dieser Wert die Summe aller polyphenolischen Verbindungen an, ohne sie zu differenzieren. In frisch geschnittenen Äpfeln gelten die Polyphenole als die wichtigste Substanz mit einer antimikrobiellen Wirkung (Abou-Taleb und Kawai, 2008). Die antimikrobielle Wirkung der Polyphenole wurde für Bakterien bereits vielfach untersucht, während bei Hefen in verschiedenen Studien unterschiedliche Effekte beobachtet wurden. Die in der Zellwand der Hefen enthaltenen Polysaccharide können besonders stark mit den Polyphenolen reagieren. So können bei der Weingärung die Polyphenole die Zellwand autolysierender Hefen stabilisieren (Salmon *et al.*,

2003). Weiterhin wurde berichtet, dass das im Rotwein vorkommenden Polyphenol Resveratrol in *S. cerevisiae* die Mutterzellen veranlasst bis zu 70 % mehr Tochterzellen zu bilden und somit die replikative Lebensspanne der Hefe verlängert (Howitz *et al.*, 2003). Umgekehrt wurde für dieselbe Verbindung ein negativer Einfluss auf die Lebensfähigkeit von *S. cerevisiae* in der Fermentation von Traubensaft gefunden (Orozco *et al.*, 2012). Ebenfalls eine negative Wirkung von Polyphenolen wurde für *C. albicans* gezeigt. Hier störten die aus grünem Tee stammenden Polyphenole die Biofilmbildung und konnten Proteasomen inaktivieren (Calabrese und Braun, 2009). Im Gegensatz zu den Teigen mit Karottentrester erreichten die autochthonen Hefen in den Teigen mit Apfeltrester nur geringere Keimzahlen und konnten sich in den weiteren Propagationsschritten nicht vermehren. Dies lässt vermuten, dass die im Apfeltrester vorkommenden Polyphenole das Hefewachstum zumindest nicht begünstigen. Wurden die Hefen allerdings in Vorkulturen angezogen und dem Teig zugesetzt, so wurden nach 24 h Fermentation deutlich höhere Lebendkeimzahlen erreicht. So lag die Lebendkeimzahl der mit *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teige um eine log-Stufe höher als zu Fermentationsbeginn. Während der Voranzucht speichern Hefezellen eine Vielzahl von Metaboliten wie z. B. Aminosäuren (Hecker, 2002), Polyphosphate (Puchkov, 2010) oder Metallionen (Ramsay und Gadd, 1997) in der Vakuole. Diese können später für ein Wachstum genutzt werden, wenn wie zum Beginn der Teigfermentation keine optimalen Bedingungen vorliegen. Im Gegensatz zu *K. marxianus* konnte für die mit *C. jadinii* DIL 1047 und *W. anomalus* DIL 1050 hergestellten Teige mit Apfeltrester keine Zunahme der Lebendkeimzahlen während der ersten 24 h der Fermentation beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.13). Durch die Propagation der Teige mit 1 % des fermentierten Teiges wurde die Mikroflora des fermentierten Teiges stattdessen weiter verdünnt. Während also an die Fermentation der Teige adaptierte Hefen ihren Metabolismus an das neue Habitat anpassen und die im Teig vorhandenen Substrate effektiver nutzen können, werden die nicht adaptierten Hefen ausverdünnt. Obwohl *W. anomalus* in belgischen Sauerteigen am zweithäufigsten isoliert wurde und als dominant gilt (Daniel *et al.* 2011), konnten die hier erhaltenen Ergebnisse zur Teigpropagation diese Dominanz nicht bestätigen.

Neben der Bestimmung lebender Keime wurde auch die kultivierungsunabhängige PCR-DGGE eingesetzt, um die Entwicklung bestimmter Arten der mikrobiellen Flora in Co-Fermentationen und bei Propagation der (spontan) fermentierten Teige zu verfolgen. Damit ließen sich sowohl am Tag 0 als auch am Tag 1 alle für die Fermentation eingesetzten Hefen detektieren. Durch die Propagation der Teige sank die Lebendkeimzahl der nicht wettbewerbsfähigen Hefen, sodass diese Hefen unter der Nachweisgrenze der PCR-DGGE

lagen. Die Nachweisgrenze der PCR-DGGE ist von vielen Faktoren abhängig, wie z. B. der Probenmatrix, der Anzahl und Konzentration der Mikroorganismen in der mikrobiellen Gemeinschaft oder der zu charakterisierenden Spezies. Auch die Effektivität der DNA-Isolierung und der PCR haben einen großen Einfluss auf die Nachweisgrenze (Ercolini, 2004). Die Studie von Bester *et al.* (2010) untersuchte den Nachweis von Hefen in Weißwein mittels PCR und PCR-DGGE und zeigte, dass für den Nachweis in Reinkulturen eine geringere Keimzahl gebraucht wird, als in Mischkulturen. So wurde die Nachweisgrenze von *D. bruxellensis* in Weißwein mit 10^5 - 10^6 KBE/ml bestimmt. Diese recht hohen Nachweisgrenzen ermöglichen nur den Nachweis der in der Fermentation vorherrschenden Hefearten. Auch das Verhältnis der Keimzahlen zueinander spielt neben der absoluten Zahl der Hefezellen eine wichtige Rolle. So sollte der Unterschied in den Keimzahlen für einen sicheren Nachweis der Spezies nicht mehr als ein bis zwei Zehnerpotenzen betragen (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Bei den hier durchgeführten Bestimmungen zur Teigfermentation mit Apfel- und Karottentrester war *K. marxianus* die dominante Hefe, während *C. jadinii*, *T. delbrueckii* und *W. anomalus* in den propagierten Teigen mittels PCR-DGGE in der Regel nicht mehr nachzuweisen waren. Stattdessen wurde zusätzlich *H. uvarum* detektiert. Diese Hefe wurde bereits in den spontan fermentierten Teigen mit und ohne Zusatz von Karottentrester nachgewiesen. Auch mit der PCR-DGGE-Methode konnte eine Verdünnung der zur Fermentation eingesetzten Hefen *W. anomalus* DIL 1050 bzw. *T. delbrueckii* DIL 1054 während der Propagation der Teige beobachtet werden. Diese beiden Hefen sind offenbar nicht kompetitiv, während die aus der Spontanflora stammende Hefe *H. uvarum* ab dem Tag 3 bzw. Tag 4 verstärkt auftrat. In der spontanen Weinfermentation zeigt *H. uvarum* bereits zu Beginn der Fermentation ein starkes Wachstum und bildet einen Großteil der Hefepopulation (Zott *et al.*, 2010). In den folgenden Tagen der Fermentation verschiebt sich das Gleichgewicht und der Anteil an *H. uvarum* nimmt wieder ab, während sich *S. cerevisiae* immer weiter durchsetzt. Als Grund für die Verdrängung von *H. uvarum* wird hier häufig die steigende Ethanolkonzentration und die höhere Ethanoltoleranz von *S. cerevisiae* genannt (Arroyo-López *et al.*, 2010). Weiterhin ist im Wein die Verfügbarkeit von N-Quellen beschränkt. Im Gegensatz zu den Nicht-*Saccharomyces*-Hefen verwertet *S. cerevisiae* die zur Verfügung stehenden Nährstoffe schnell und effizient (Andorrà *et al.*, 2012). Aber auch die Bildung von das Hefewachstum hemmenden Metaboliten, wie mittelkettige Fettsäuren oder Killertoxine, wurde als Grund für die Dominanz von *S. cerevisiae* im Wein beschrieben (Fleet, 2003). Im Gegensatz zur Weingärung stehen den Mikroorganismen durch die Propagation im Teig alle 24 h neue Nährstoffe zur Verfügung und eventuell vorhandene

wachstumshemmende Metabolite werden immer wieder verdünnt. Darüber hinaus wird durch die Zugabe von Treestern in die Teigfermentation ein großer Anteil an Zuckern zur Verfügung gestellt, sodass die Voraussetzungen für das Wachstum von *H. uvarum* im Teig deutlich besser sind als im Wein. Daher ist für die Fermentation der Teige auch davon auszugehen, dass sich das Gleichgewicht in der Hefeflora bei einer länger andauernden Propagation weiter verschiebt. In der Studie von Meroth *et al.* (2003a) wurde die Dynamik der Hefeflora in Weizenteigen in Abhängigkeit von der Teigführung bis zum neunten bzw. 16. Tag der Fermentation verfolgt. In Abhängigkeit der Fermentationsbedingungen konnten sich in den Teigen mit Roggenmehl die in der Starterkultur enthaltenen Hefen *C. humilis* bzw. *S. cerevisiae* durchsetzen, während in den mit Roggenkleie hergestellten Teig die nicht in der Starterkultur enthaltene *P. kudriavzevii* dominierte. Somit ist für die mit den Nebenströmen nach vier Tagen noch eine stabile Mikroflora zu erwarten und eine weitere Verschiebung der Mikroflora möglich.

Wie die Vorexperimente gezeigt hatten, mussten die Milchsäurebakterien mit einer Keimzahl von ca. 10^8 KbE/g vorliegen, um Signale in der PCR-DGGE zu erhalten. Entsprechende Keimzahlen wurden hier nur in den propagierten Teigen mit Karottentrester erreicht. Die zur Detektion notwendige hohe Lebendkeimzahl der Milchsäurebakterien ist vergleichbar mit den von Fasoli *et al.* (2003) ermittelten Nachweisgrenzen von 10^8 KbE/g für *L. casei* in probiotischem Joghurt und von 10^7 KbE/g für *Bifidobacterium lactis* in Naturjoghurt. Während zu Fermentationsbeginn in Teigen mit Karottentrester stets *W. conufo* die Flora der Milchsäurebakterien dominierte, kamen ab dem dritten Tag der Fermentation *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides* und *L. citreum* hinzu. Die im Weizenmehl vorhandenen Milchsäurebakterien *L. curvatus* und *L. sakei* spielten keine Rolle in der Fermentation. Die in der Literatur verfügbaren Daten lassen vermuten, dass sich die Zusammensetzung Milchsäurebakterienflora in den folgenden Propagationstagen noch weiter verschieben würde. So konnten im belgischen Sauerteig nach fünf bis sieben Tagen die an die Teigfermentation als gut angepasst geltenden Milchsäurebakterien wie z. B. *L. fermentum* und *L. plantarum* identifiziert werden, wobei sich die Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora auch noch bis zum zehnten Tag änderte (Van der Meulen *et al.*, 2007).

Plessas *et al.* (2008a; 2008b) beschrieben, dass das Aroma in Broten durch die Co-Fermentation mit *K. marxianus* und Milchsäurebakterien verbessert werden kann. Daher wurde auch hier das Wachstum der Milchsäurebakterien in den Teigen mit Zusatz von Apfeltrester untersucht und bestimmt, ob es sich auf das Aroma in den mit *K. marxianus*

DIL 82 fermentierten Teigen positiv auswirkt. Für die gezielte Fermentation mit Milchsäurebakterien wurde *P. pentosaceus* DIL 5111 ausgewählt, da dieser aus Teigen mit Zusatz von Apfeltrester und Aspartat isoliert werden konnte. Diese Untersuchung zeigte, dass trotz des hohen Gehalts an Polyphenolen im Teig *P. pentosaceus* DIL 5111 sowohl in den Teigen mit, als auch in denen ohne Zusatz von *K. marxianus* DIL 82 wuchs (vgl. Tabelle 3.10). Eine Verbesserung des Aromas durch *P. pentosaceus* DIL 5111 konnte jedoch nicht beobachtet werden. Außer *P. pentosaceus* konnten dabei keine weiteren Milchsäurebakterien identifiziert werden, weshalb eine Verschiebung der Milchsäurebakterienflora dort nicht zu erwarten ist.

4.3 Zusammensetzung der Aromakomponenten der fermentierten Teige

Das Aroma von Weizenbrot wurde bereits früher gut untersucht. Beispielsweise konnten typische Geruchskomponenten wie 2-Phenylethanol (honigartig), (E/E)-2,4-Decadienal (fettig), Methylpropanol (malzig), 2-/3-Methylbutanol (nach Balsamico riechend), 3-Methylbutanal (malzig) sowie (E)-2-Nonenal (Geruch nach Gurke bzw. Bohne) und 2,3-Butandion (Geruch nach Butter und Karamell) in der Krume nachgewiesen werden (Frasse *et al.*, 1993; Czerny *et al.*, 2003; Hansen und Schieberle, 2005; Birch *et al.*, 2013b). Auch in den in dieser Arbeit mit Apfeltrester und *K. marxianus* DIL 82 fermentierten Teigen wurden einige dieser Aromakomponenten identifiziert, wovon nur 3-Methylbutanol bzw. Phenylethanol erst während des Fermentationsprozesses gebildet wurden. Die Bildung von 2-/3-Methylbutanal konnte nur in einer der untersuchten Fermentationen nachgewiesen werden. Umgekehrt verringerte sich die Konzentration bei einigen Aromakomponenten im Laufe der Fermentation. Hierzu gehörten z.B. (E,E)-2,4-Decadienal und (E)-2-Nonenal. Das typische Aroma von Weizenbrot wird allerdings durch die aromastarken Verbindungen β -Damascenon, Phenylessigsäure, Vanillin, Furaneol und 2/3-Methylbuttersäure bestimmt. Darüber hinaus wurde in der Fermentation eine Vielzahl an fruchtigen und blumigen Aromakomponenten gebildet. Genannt seien hier vor allem die Esterverbindungen Ethyl-2-methylbutanoat, Ethyl-2-methylpropanoat, Phenylethylacetat, Ethylhexanoat, 2-Methylbutylacetat und Ethylcinnamat. Diese Ergebnisse zeigen, dass *K. marxianus* DIL 82 in den Teigen mit Apfeltrester für Weizenbrote neuartige Aromen generieren konnte. Bei der Herstellung von Modellbackwaren konnte festgestellt werden, dass der Einsatz von vorfermentierten Teigen auch das Aroma der Brotkrume beeinflusst. Hingegen zeigte die sensorische Überprüfung der fermentierten Teige, dass die Flora der Milchsäurebakterien eine untergeordnete Rolle bei der Bildung der Aromakomponenten spielt. Dies steht im

Widerspruch zu Arbeiten von Pleassas *et al.* (2008a), die zeigten, dass sich durch die gemeinsame Fermentation von Sauerteigen mit *K. marxianus* und homofermentativen Milchsäurebakterien wie *L. helveticus* bzw. *L. bulgaricus* die Anzahl und Konzentration einzelner Aromakomponenten erhöhte. Insbesondere bei der gemeinsamen Fermentation mit *L. bulgaricus* wirkten sich verschiedene Acetatester, Carbonylverbindungen oder höhere Alkohole auf das Aroma der Brote aus. Als Beispiel sei hier z. B. Phenylethanol genannt, dessen Konzentration sich in der gemeinsamen Fermentation um das bis zu Sechsfache erhöhte. Ähnliche Effekte wurden in der Kombination von *L. plantarum* mit weiteren Hefen wie z. B. *S. cerevisiae* oder *C. milleri* beobachtet (Hansen und Hansen, 1996). Auch die vermehrte Bildung dieses für Hefen typischen Aromastoffs durch ihre Wechselwirkung mit Milchsäurebakterien wurde bereits untersucht. Die durch die Milchsäurebakterien verursachte Ansäuerung der Teige scheint dabei nur eine geringe Rolle in der Aromabildung durch die Hefen zu spielen. Vielmehr scheint die durch Milchsäurebakterien geförderte Proteolyse im Substrat und die damit verbundene Freisetzung verwertbarer Stickstoffquellen zu einer Aktivierung des Hefemetabolismus zu führen (Hansen und Hansen, 1994). Durch die Wechselwirkung von Milchsäurebakterien und Hefen wurde auch eine Steigerung der Konzentration anderer Aromakomponenten beobachtet, wie z. B. die Carbonylsäure 3-Methylbuttersäure (Hansen und Hansen, 1996), welche auch in den in dieser Arbeit untersuchten Teigen gefunden wurde. Allerdings wiesen die hier untersuchten Teige nur eine sehr geringe Konzentration an Milchsäurebakterien auf, sodass eventuell eine weitere Steigerung der Aromaproduktion durch ihren gezielten Zusatz während der Fermentation erreicht werden könnte. Eine Verbesserung des Aromas in den mit Milchsäurebakterien und Hefen fermentierten Teigen mit Apfeltrester konnte unter den getesteten Bedingungen jedoch nicht beobachtet werden (siehe Kapitel 3.5.5).

Eine weitere wichtige Frage ist, wie sich der Backvorgang auf diese Aromen im fertigen Brot auswirkt. Das Aroma der Brotkrume wird maßgeblich von den im Teig enthaltenen Mikroorganismen, deren Stoffwechselprodukten, sowie den im Teig enthaltenen Aminosäuren und Zuckern, als auch durch die Reaktionen bestimmt, die in der Hitze des Backvorgangs ablaufen (Labuda, 2009). In verschiedenen Arbeiten wurde das Aroma von fermentierten Sauer- oder Weizenteigen vor und nach dem Backen untersucht. Gobbetti *et al.* (1995) zeigten, dass nach dem Backen weniger als 12,5 % der flüchtigen Aromen erhalten blieben. Beim Backen werden durch die Maillardreaktion aus Aromavorstufen wie den Aminosäuren Leucin und Prolin oder auch aus Ornithin andere Aromen gebildet (Thiele *et al.*, 2002; Katina *et al.*, 2006). Aber auch Fettsäuren und phenolische Verbindungen sind an der

Aromabildung während des Backprozesses beteiligt (Salimur *et al.*, 2006). Jedoch sind diese Aromakomponenten vor allem in der Brotkruste zu finden, welche in dieser Arbeit nicht sensorisch charakterisiert wurde.

4.4 Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene in *K. lactis* und *K. marxianus*

Neben dem Versuch natürliche Hefestämme zur Aromaverbesserung zu finden, sollte hier auch gezielt die Bildung bestimmter Aromen beeinflusst werden. Die Hefe *H. uvarum* ist für die effiziente Produktion von verschiedenen Estern bekannt (Ciani und Picciotti, 1995; Romano *et al.*, 2003; Andorrà *et al.*, 2010; Stribny *et al.*, 2015). Daher wurden die an der Bildung von Acetat- bzw. Ethylestern beteiligten Enzyme Atf1 und Eeb1 für die Versuche ausgewählt. Diese beiden Enzyme sollten sowohl in *K. lactis* als auch in *K. marxianus* mit Hilfe des *ScPFK2*-Promotor überproduziert werden. *S. cerevisiae*-Promotoren wurden bereits häufig für die heterologe Expression in anderen Hefen genutzt (Bergkamp *et al.*, 1993; Colussi und Taron, 2005; Rocha *et al.*, 2011). Allerdings führen gleiche Expressionssysteme in verschiedenen Hefen oft zu unterschiedlichen Proteinausbeuten. In dieser Arbeit konnten in beiden Wirtshefen die Proteine HuAtf1 und HuEeb1 hergestellt werden, wobei HuEeb1 im Westernblot jeweils ein deutlich stärkeres Signal erzeugte als HuAtf1. Darüber hinaus war in *K. lactis* eine unspezifische Bande auf Höhe des schwachen Signals von HuAtf1 zu beobachten, sodass auf die Produktion dieses Enzyms nur durch die beschriebenen Aromaveränderungen geschlossen werden kann (vgl. Kapitel 3.9). Das für die Expression der beiden Gene verwendete Plasmidsystem basiert auf dem Vektor pCXJ22, welcher in *K. lactis* eine Transformationseffizienz von $3,6 \times 10^4$ KBE/ μ g hatte und mit 11-19 Kopien pro Zelle vorliegt (Chen, 1996). Die Transformationseffizienz von *K. lactis* ist vergleichbar mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert für *K. marxianus*. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen *K. lactis* und *K. marxianus* und der sehr ähnlichen Transformationseffizienz, kann davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten Plasmide auch in *K. marxianus* repliziert werden können. Somit ist von einer (Über)Produktion von HuAtf1 und HuEeb1 sowohl in *K. lactis* als auch in *K. marxianus* auszugehen. Allerdings wurde eine deutlich stärkere Produktion von HuEeb1 als von HuAtf1 beobachtet. In *S. cerevisiae* wird die Aktivität von Atf1 durch Sauerstoff und/oder ungesättigte Fettsäuren auf Transkriptionsebene gehemmt. Weiterhin ist bekannt das die Expression durch verschiedene Stressfaktoren wie z. B. niedriger pH-Wert oder zuckerreiche Umgebung verstärkt wird (Mason und Dufour, 2000; Procopio *et al.*, 2011). Hingegen ist die Regulation des *EEB1*-Gens noch nicht

eingehend untersucht. Eine Überexpression von *EEB1* führte in *S. cerevisiae* zu keiner erhöhten Esterbildung. Vielmehr hing die Konzentration der vorhandenen Ester hauptsächlich von Substratverfügbarkeit, der Fermentationstemperatur und der Aktivität der spaltenden Esterasen ab (Saerens *et al.*, 2008a; Saerens *et al.*, 2008b). Da für die heterologe Expression der beiden Gene in der vorliegenden Arbeit der *PFK2*-Promoter verwendet wurde, ist ein Einfluss der Transkriptionsregulation eher auszuschließen. Obwohl die Fermentation der rekombinanten Hefen zu einer sensorischen Verbesserung führte, waren die dafür verantwortlichen Aromastoffe mittels GC-Analysen aufgrund der wenigen messbaren Änderungen nur schwer zu identifizieren. Eine deutliche Steigerung wurde nur für Essigsäure-2-phenylethylester beobachtet, besonders in Medium mit hohem Zuckergehalt. Dies zeigt, dass der Einsatz von heterologen Expressionsstämmen sich durchaus positiv auf die Aromakomposition in einer Teigführung auswirken könnte, die gegebenenfalls über eine Optimierung der Fermentationsparameter noch gesteigert werden könnte. So beeinflusst die Verfügbarkeit von Stickstoff-Quellen (Torrea *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2013), Fettsäuren (Mason und Dufour, 2000; Varela *et al.*, 2012) und die Fermentationstemperatur (Saerens *et al.*, 2008b) maßgeblich die Aromabildung. Wie oben bereits angedeutet, ist die Konzentration der Ester abhängig von dem Zusammenspiel der Esterbildung und der Esteraseaktivität (Fukuda *et al.*, 1998; Plata *et al.*, 1998; Lopez-Lopez *et al.*, 2010; Sumby *et al.*, 2010). So wurde in *K. marxianus* z. B. eine hohe Esteraseaktivität zur Hydrolyse von Isoamylacetat nachgewiesen (Plata *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit zur Aromaoptimierung bestünde also neben der Überexpression der Gene von an der Esterbildung beteiligten Enzymen in der Deletion des kodierenden Genes für die Esterase. Ob solche Ansätze sich tatsächlich in der Teigbereitung durchsetzen würden, ist allerdings angesichts der öffentlichen Skepsis gegenüber gentechnisch veränderten Mikroorganismen in Zusammenhang mit Lebensmitteln zu bezweifeln.

5 Zusammenfassung

Das Aroma von Backwaren wird wesentlich durch die verwendeten Zutaten und den Herstellungsprozess beeinflusst. So können Weizenbrote sowohl mit als auch ohne Zusatz von Vorteigen hergestellt werden, die das Brotaroma in der Regel maßgeblich verbessern. Ein Vorteig besteht aus Mehl, Wasser und der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und wird für bis zu 24 h fermentiert. Die während der Fermentation entstehenden Aromen werden durch die metabolische Aktivität von *S. cerevisiae* und die im Mehl vorhandenen Substrate bestimmt.

In dieser Arbeit wurde daher das metabolische Potenzial von alternativen Hefen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Aromabildung am Beispiel der Fermentation von Weizenteigen untersucht. Darüber hinaus wurde das Angebot an Aromavorstufen durch den Zusatz unterschiedlicher Nebenströme der Lebensmittelindustrie (Apfel-, Karotten- und Traubentrester oder Biertreber) erhöht. Erwartungsgemäß wirkten sich diese Zusätze unterschiedlich auf das Wachstum bestimmter Hefespezies und der davon eingesetzten Hefestämme aus. Während einige Nebenströme das Wachstum bestimmter Hefen förderte, blieben andere davon unbeeinflusst. Insbesondere die Kombination von Apfel- oder Karottentrester mit den Hefen *Cyberlindera jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii* oder *Wickerhamomyces anomalus* wirkte sich positiv auf die Hefeflora und die Aromabildung aus. Weiterhin förderte vor allem der Zusatz von Karottentrester das Wachstum der ebenfalls im Teig vorhandenen Milchsäurebakterien, was allerdings keinen wesentlichen Einfluss auf das Aroma der Teige hatte. Somit ist neben den beschriebenen Inhaltsstoffen vor allem die Hefeflora ein wichtiger Faktor der Aromabildung in Teigen.

Bezüglich der verschiedenen Hefestämme zeigten Propagationsstudien, dass *K. marxianus* DIL 82 besonders kompetitiv ist und auch nach vier Tagen Fermentation noch im Teig persistiert. In entsprechenden Teigen mit Apfeltrester wurde durch *K. marxianus* eine besonders fruchtige Note zugeschrieben. Die Bestimmung der in dem Teig gebildeten Aromakomponenten zeigte, dass unter anderem die Konzentration an Esterverbindungen und höheren Alkoholen durch die Fermentation mit *K. marxianus* DIL 82 gesteigert wurde. Backversuche zeigten, dass nicht alle der in der Fermentation gebildeten Aromen auch ins Brot gelangten, sodass das Aroma der Brotkrume stärker von dem verwendeten Nebenstrom als von dem für die Fermentation verwendeten Hefestamm bestimmt wurde.

Um die Aromastudien zu komplementieren wurden mit Hilfe gentechnischer Methoden die für die Esterbildung wichtigen Gene *ATF1* und *EEB1* aus der Weinhefe *Hanseniaspora uvarum* in *Kluyveromyces lactis* und *K. marxianus* überexprimiert. Erste sensorische Analysen nach Anzucht dieser Stämme in synthetischem Medium ergaben ein eindeutig fruchtigeres Aroma gegenüber den mit Leervektor transformierten Kontrollstämmen. Die gaschromatographische Analyse zeigte allerdings nur bei Überexpression von HuEeb1 eine erhöhte Konzentration des wichtigen Aromastoffs Essigsäure-2-phenylethylester. Diese Vorversuche lassen vermuten, dass auch die Qualität von Backwaren durch gezielte genetische Veränderungen der bei ihrer Fermentation eingesetzten Hefestämme verbessert werden könnte.

6 Summary

The aromatic composition of baking goods is significantly influenced by the added compounds and the production regime. Thus, wheat bread can be manufactured with or without the addition of sponges, which can considerably improve the breads aroma. A sponge is composed of flour, water and the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and is fermented up to 24 hours. The final aromatic composition is determined by the metabolic activity of *S. cerevisiae* and the original ingredients contained in the flour.

In this work the metabolic potential of alternative yeast species regarding their ability to contribute to the aroma profile of wheat doughs was investigated. Moreover, the range of precursors for aroma compounds was expanded by the addition of different by-products from food industry, such as pomace from apples, carrots and grapes. As expected, these supplements had different influences on the growth of specific yeast species and their different strains. Whereas some by-products increased growth of certain yeasts, other yeasts remained unaffected. Especially the combination of pomaces from apples or carrots with the yeasts *Cyberlindera jadinii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii* or *Wickerhamomyces anomalus* had a positive influence on both the yeast flora and the aroma profile. Moreover, growth of lactic acid bacteria, also persisting in the dough, was enhanced mainly by the addition of carrot pomace, but without significantly changing the aroma profile. Thus, besides the original ingredients the yeast flora constitutes a primary factor for the aroma profile of doughs.

Regarding the different yeast strains, studies of propagation revealed that *K. marxianus* DIL 82 is especially competitive and still persists in the dough after four days of fermentation. Such doughs obtained an especially fruity note by fermentation with *K. marxianus*. Determination of the aroma compounds revealed that, amongst others, the concentration of ester compounds and higher alcohols was increased after fermentation with *K. marxianus* DIL 82. Baking studies showed that not all aroma compounds produced during fermentation are actually transferred to the bread, so that the features of the bread crumb are more readily determined by the supplemented by-product, rather than the yeast strain employed for fermentation.

To complement these studies on aroma generation, genetic engineering techniques were employed to overexpress in *Kluyveromyces lactis* and *K. marxianus* genes important for ester formation, *ATF1* and *EEB1*, obtained from the wine yeast *Hanseniaspora uvarum*. First sensoric evaluations after growing these strains in synthetic medium revealed a distinctly increased fruity aroma as compared to control strains transformed with the empty vector. However, gas chromatography analyses could only confirm an increase in the concentration of acetate-2-phenol ester in the strains overexpressing *EEB1*. These preliminary experiments indicate that the quality of baking goods could also be improved by genetic manipulation of the yeast strains employed in their fermentation.

7 Literatur

- Abou-Taleb, M., Kawai, Y. (2008). Shelf life of semifried tuna slices coated with essential oil compounds after treatment with anodic electrolyzed NaCl solution. *J Food Prot*; 71: 770-774.
- Almosnino, A. M., Bensoussan, M., Belin, J. M. (1996). Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds. *Food Chemistry*; 55: 327-332.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*; 215: 403-410.
- Alves-Araújo, C., Almeida, M. J., Sousa, M. J., Leão, C. (2004). Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiol Lett*; 240: 7-14.
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J., Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur Food Res Technol*; 231: 215-224.
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT - Food Science and Technology*; 49: 8-13.
- Anonymous (1980). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*; 24: 238-242.
- Arendt, E. K., Ryan, L. A., Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*; 24: 165-174.
- Arroyo-López, F. N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J. M., Barrio, E., Querol, A. (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast*; 27: 1005-1015.
- Ayed, N., Yu, H. L., Lacroix, M. (1999). Improvement of anthocyanin yield and shelf-life extension of grape pomace by gamma irradiation. *Food Research International*; 32: 539-543.
- Barbagallo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2004). Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*; 35: 58-66.
- Bardi, L., Crivelli, C., Marzona, M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Can J Microbiol*; 44: 1171-1176.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

- Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (1999). Barley spent grain: release of hydroxycinnamic acids (ferulic and *p*-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 79: 435-439.
- Bartolomé, B., Santos, M., Jiménez, J. J., del Nozal, M. J., Gómez-Cordovés, C. (2002). Pentoses and Hydroxycinnamic Acids in Brewer's Spent Grain. *Journal of Cereal Science*; 36: 51-58.
- Bartowsky, E. J., Pretorius, I. S., König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2009). Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, pp. 209-231: Springer Berlin Heidelberg.
- Belem, M. A., Lee, B. H. (1998). Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 38: 565-598.
- Belin, J. M., Bensoussan, M., Serrano-Carreón, L. (1992). Microbial biosynthesis for the production of food flavours. *Trends in Food Science & Technology*; 3: 11-14.
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int J Food Microbiol*; 121: 169-177.
- ben Omar, N., Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol*; 66: 3664-3673.
- Bergkamp, R. J., Bootsman, T. C., Toschka, H. Y., Mooren, A. T., Kox, L., Verbakel, J. M., Geerse, R. H., Planta, R. J. (1993). Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 40: 309-317.
- Bester, L., Du Toit, M., Witthuhn, R. C., Cameron, M. (2010). PCR and DGGE detection limits for wine spoilage microbes. In *South African Journal of Enology and Viticulture: South African Society for Enology & Viticulture*.
- Bioazul (2008). Recycling and Upgrading Wastes from Food Production for use within the Food Chain. In Deliverable 19, Detailed Report of Industry Needs: GRUBs UP Project (FP6-FOOD).
- Birch, A. N., Petersen, M. A., Arneborg, N., Hansen, Å. S. (2013a). Influence of commercial baker's yeasts on bread aroma profiles. *Food Research International*; 52: 160-166.
- Birch, A. N., Petersen, M. A., Hansen, Å. S. (2013b). The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT - Food Science and Technology*; 50: 480-488.
- Björnberg, A., Schnürer, J. (1993). Inhibition of the growth of grain-storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Can J Microbiol*; 39: 623-628.
- Boboye, B., Dayo-Owoyemi, I. (2009). Comparative Evaluation of the Sensory Properties of Doughs Fermented with Yeasts Isolated from Orange. *Biotechnology*; 8: 389-392.

- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W. P. (1995). Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Brot*; 49: 370–374.
- Borneman, A. R., Chambers, P. J., Pretorius, I. S. (2009). Systems Biology as a Platform for Wine Yeast Strain Development. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, pp. 395-414. Edited by H. König, *et al.* Berlin Heidelberg: Springer
- Bosse, A. K., Fraatz, M. A., Zorn, H. (2013). Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food Chemistry*; 141: 2952-2959.
- Bovo, B., Nardi, T., Fontana, F., Carlot, M., Giacomini, A., Corich, V. (2012). Acidification of grape marc for alcoholic beverage production: Effects on indigenous microflora and aroma profile after distillation. *Int J Food Microbiol*; 152: 100-106.
- Brady, D., Marchant, R., McHale, L., McHale, A. P. (1995). Isolation and partial characterization of [beta]-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. *Enzyme and Microbial Technology*; 17: 696-699.
- Brandam, C., Castro-Martinez, C., Delia, M. L., Ramon-Portugal, F., Strehaiano, P. (2008). Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Can J Microbiol*; 54: 11-18.
- Brandt, M. J. (2006). Bedeutung von Rohwarenkompnenten. In *Handbuch Sauerteig*, pp. 41-55. Edited by M. J. Brandt/M. G. Gänzle. Hamburg: Behr's Verlag.
- Brümmer, J. M., Stephan, H., Spicher, G. (1984). Backtechnische Wirkungen von Weizenvor- und Sauerteigen. *Getreide Mehl und Brot*; 38: 203-205.
- Caballero, R., Olgúin, P., Cruz-Guerrero, A., Gallardo, F., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1995). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Research International*; 28: 37-41.
- Cadez, N., Smith, M. T. (2011). Chapter 32 - *Hanseniaspora Zikes* (1912). In *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 421-434. London: Elsevier.
- Calabrese, N. A., Braun, P. C. (2009). The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can J Microbiol*; 55: 1033-1039.
- Capelle, S. (2004). Formulation for enhancing the flavour metabolism of yeast and bacteria in sponge dough brew and sourdough fermentatin systems: WO 2004043153 A1.
- Carrau, F., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *Int J Food Microbiol*; 143: 81-85.
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett*; 243: 107-115.

- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 60: 165-178.
- Chaudhary, V. K., Weber, F. E. (1990). Dietary Fiber Ingredients Obtained by Processing Brewer's Dried Grain. *Journal of Food Science*; 55: 551-551.
- Chen, X. J. (1996). Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene*; 172: 131-136.
- Ciani, M., Picciotti, G. (1995). The Growth Kinetics and Fermentation Behaviour of some non-*Saccharomyces* Yeasts Associated with Wine-Making. *Biotechnology Letters*; 17: 1247-1250.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*; 12: 407-411.
- Colussi, P. A., Taron, C. H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Appl Environ Microbiol*; 71: 7092-7098.
- Comitini, F., De, J. I., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett*; 238: 235-240.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*; 28: 873-882.
- Czerny, M., Schieberle, P., Brandt, M. J., Hammes, W. P. (2003). The aroma potential of yeasts in wheat doughs. *Getreide, Mehl und Brot*; 57: 340-344.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*; 23: 174-181.
- Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M. S., Rossi, J. (1996). The Sourdough Microflora. Characterization of Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria, Yeasts and Their Interactions on the Basis of the Volatile Compounds Produced. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; 29: 63-70.
- 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 Freitas, I., Pinon, N., Maubois, J.-L., Lortal, S., Thierry, A. (2009). The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int J Food Microbiol*; 129: 37-42.
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*; 23: 130-135.

- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*; 16: 43-56.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M. (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*; 24: 120-127.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*; 26: 666-675.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiol*; 37: 11-29.
- Dehoust, G., Fritsche, U., Schüler, D., Wiegmann, K., Knappe, F., Böß, A., Fehrenbach, H., Giegrich, J., Vogt, R. (2007). Stoffstrommanagement von Biomasseabfällen mit dem Ziel der Optimierung der Verwertung organischer Abfälle. In *Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Raktorsicherheit*. Edited by Umweltbundesamt.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., Lavermicocca, P., Arnault, P., Tossut, P., Gallo, G., Gobbetti, M. (2003). Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology*; 20: 67-75.
- Dimitrellou, D., Kandylis, P., Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M. (2009). Evaluation of thermally-dried *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Chemistry*; 115: 691-696.
- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., Sabatelli, M. P. (2007). Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *Int J Food Microbiol*; 115: 281-289.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., *et al.* (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*; 430: 35-44.
- EFSA (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*; 11: 3449.
- Ehrlich, F. (1904). Über das natürliche Isomere des Leucins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*; 37: 1809-1840.
- Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2005). Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*; 16: 31-42.
- Eim, V. S., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A. (2008). Effects of addition of carrot dietary fibre on the ripening process of a dry fermented sausage (sobrassada). *Meat Science*; 80: 173-182.

- Elmaleh, S., Defrance, M. B., Ghommidh, C. (1999). Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment. *Process Biochemistry*; 35: 441-449.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*; 56: 297-314.
- EU Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG (Text von Bedeutung für den EWR).
- Fabre, C. E., Blanc, P. J., Goma, G. (1998). Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*; 14: 270-274.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int J Food Microbiol*; 82: 59-70.
- FDA, 21 CFR §172.896. U.S. Food and Drug Administration, Title 21 of the Code of Federal Regulations (21 CFR).
- Fernández-Artigas, P., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2001). Changes in sugar profile during infant cereal manufacture. *Food Chemistry*; 74: 499-505.
- Feron, G., Bonnarne, P., Durand, A. (1996). Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science & Technology*; 7: 285-293.
- Feron, G., Waché, Y. (2005). Microbial Biotechnology of Food Flavor Production. In *Food Biotechnology*, pp. 407-442. Edited by K. S. Anthony Pometto, Robert E. Levin, Gopinadhan Paliyath. New York, USA: CRC Press Taylor & Francis.
- Fischer, S. G., Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 80: 1579-1583.
- Flander, L., Suortti, T., Katina, K., Poutanen, K. (2011). Effects of wheat sourdough process on the quality of mixed oat-wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*; 44: 656-664.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*; 86: 11-22.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*; 79: 339-354.
- Foo, L. Y., Lu, Y., Wong, H. (1998). Biphenyl-linked biflavanoids from grape pomace. *Phytochemistry*; 47: 1137-1140.
- Franke, K., Tscheuschner, H.-D. (1995). Auswertung rheologischer Messungen. *Süßwaren*; 39: 44-47.

- Frasse, P., Lambert, S., Richard-Molard, D., Chiron, H. (1993). The Influence of Fermentation on Volatile Compounds in French Bread Dough. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; 26: 126-132.
- Fredlund, E., Blank, L. M., Schnurer, J., Sauer, U., Passoth, V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl Environ Microbiol*; 70: 5905-5911.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M. (1994). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol*; 60: 2786-2792.
- Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, A. (1998). Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl Environ Microbiol*; 64: 4076-4078.
- Gänzle, M. G., Brandt, M. J. (2006). Begriffsbestimmungen und lebensmittelrechtliche Aspekte. In *Handbuch Sauerteig*, pp. 7-19. Edited by M. J. BrandtM. G. Gänzle. Hamburg: Behr's Verlag.
- Garcia-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bartolome, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*; 145: 426-431.
- Garrido, M. D., Auqui, M., Martí, N., Linares, M. B. (2011). Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology*; 44: 2238-2243.
- Gassenmeier, K., Schieberle, P. (1995). Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type) - influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Z Lebensm Unters Forsch* 201: 241 - 248.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*; 11: 355-360.
- Gil, J. V., Manzanares, P., Genoves, S., Valles, S., Gonzalez-Candelas, L. (2005). Overproduction of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int J Food Microbiol*; 103: 57-68.
- GMF Vereinigung Getreide- Markt- und Ernährungsforschung GmbH (2009). *Mehlreport*; 15.
- Gobbetti, M., Simonetti, M. S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., Damiani, P. (1995). Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*; 12: 497-507.
- Gonzalez, R., Quirós, M., Morales, P. (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science & Technology*; 29: 55-61.

- Groeneveld, P., Stouthamer, A. H., Westerhoff, H. V. (2009). Super life – how and why ‘cell selection’ leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS Journal*; 276: 254-270.
- Haissam, J. M. (2011). *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Antonie van Leeuwenhoek*; 99: 93-105.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41: 95-98.
- Hammes, W. P., Gänzle, M. G. (1998). Sourdough breads and related products. In *Microbiology of Fermented Foods*, pp. 199-216. Edited by B. J. B. Wood. London: Blackie Academic and Professional.
- Hammes, W. P., Brandt, M. J., Francis, K. L., Rosenheim, J., Seitter, M. F. H., Vogelmann, S. A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*; 16: 4-11.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*; 166: 557-580.
- Hansen, A., Schieberle, P. (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology*; 16: 85-94.
- Hansen, Å., Hansen, B. (1996). Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*; 202: 244-249.
- Hansen, B., Hansen, Å. (1994). Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*; 198: 202-209.
- Hecker, R. (2002). Untersuchung subzellulärer Metabolitverteilungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Köln: Universität Köln.
- Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol*; 68: 114-123.
- Heinisch, J., Kirchrath, L., Liesen, T., Vogelsang, K., Hollenberg, C. P. (1993). Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Molecular Microbiology*; 8: 559-570.
- Heinisch, J. J., Buchwald, U., Gottschlich, A., Heppeler, N., Rodicio, R. (2010). A tool kit for molecular genetics of *Kluyveromyces lactis* comprising a congenic strain series and a set of versatile vectors. *FEMS Yeast Research*; 9999.
- Hernández-López, M. J., Pallotti, C., Andreu, P., Aguilera, J., Prieto, J. A., Rande-Gil, F. (2007). Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. *Int J Food Microbiol*; 116: 103-110.

- Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*; 107: 1064-1077.
- Hernandez, A., Martin, A., Cordoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., Perez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int J Food Microbiol*; 121: 178-188.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*; 63: 3233-3241.
- Hiralal, L., Olaniran, A. O., Pillay, B. (2014). Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Hochstrasser, R. E., Ehret, A., Geiges, O., Schmidt-Lorenz, W. (1993). Microbiology of dough preparation: II. Microbiological examination of spontaneously fermented wheat doughs. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*; 84: 356-381.
- Holzbecher, M. D., Moss, M. A., Ellenberger, H. A. (1984). The cyanide content of laetrile preparations, apricot, peach and apple seeds. *J Toxicol Clin Toxicol*; 22: 341-347.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H., Tamaki, H. (2007). Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol*; 130: 114-123.
- Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., de Barros Lopes, M. A. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol Lett*; 240: 125-129.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*; 425: 191-196.
- Ionita, A., Moscovici, M., Popa, C., Vamanu, A., Popa, O., Dinu, L. (1997). Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 3: 147-151.
- Janssens, L., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., Vandamme, E. J. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*; 27: 195-215.
- Joshi, V. K., Bhushan, S. (2003). Apple Pomace Utilization for the Production of Baker's Yeast: Effect of Substrate Concentrations and Growth Stimulators. *Indian Journal of Biotechnology*; 2: 220-226.
- Katina, K., Heiniö, R. L., Autio, K., Poutanen, K. (2006). Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*; 39: 1189-1202.

- Khanal, R. C., Howard, L. R., Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*; 43: 1464-1469.
- King, A., Dickinson, R. J. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*; 16: 499-506.
- Kleeberger, A., Castorph, H., Klingmüller, W. (1983). The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.*; 136: 306-311.
- Krings, U., Berger, R. G. (1998). Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl Microbiol Biotechnol*; 49: 1-8.
- Kumar, A., Chauhan, G. S. (2010). Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*; 82: 454-459.
- Kurita, O. (2008). Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *J Appl Microbiol*; 104: 1051-1058.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*; 73: 331-371.
- Kurtzman, C. P. (2011a). Chapter 42 - *Lindnera* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). In *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 521-543. London: Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2011b). Chapter 75 - *Torulaspora*. In *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 867-874. London: Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2011c). Chapter 80 - *Wickerhamomyces*. In *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 899-917. London: Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). *The Yeasts (Fifth Edition)*. London: Elsevier.
- Labuda, I. (2009). Flavor Compounds. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, pp. 305-320. Edited by S. Moselio. Oxford: Academic Press.
- Lachance, M.-A. (2011). Chapter 35 - *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In *The Yeasts (Fifth Edition)*, pp. 471-481. London: Elsevier.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Guerzoni, M. E. (1998). *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. *Microbiol Res*; 153: 145-148.
- Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*; 100: 507-519.

- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*; 87: 167-198.
- Lee, B.-K., Kyun, K. J. (2001). Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*; 25: 111-124.
- Lee, J., Zhang, G., Wood, E., Rogel Castillo, C., Mitchell, A. E. (2013). Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS. *J Agric Food Chem*; 61: 7754-7759.
- Leffingwell & Associates (2013). 2008 - 2012 Flavor & Fragrance Industry Leaders. http://www.leffingwell.com/top_10.htm.
- LFGB (Juni 2013). § 64 Untersuchung von Lebensmitteln, sensorische Prüfverfahren, Dreiecksprüfung. Lebensmittel- und Futtermittel Gesetzbuch (LFGB); L 00.90.6 (Norm DIN 10964).
- Liang, H.-Y., Chen, J.-Y., Reeves, M., Han, B.-Z. (2013). Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*; 51: 855-865.
- Lillie, S. H., Pringle, J. R. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol*; 143: 1384-1394.
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol*; 66: 744-753.
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., Pretorius, I. S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*; 23: 641-659.
- Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Lett*; 87: 149-163.
- Liu, S. Q., Holland, R., Crow, V. L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*; 14: 923-945.
- Longo, M. A., Sanromán, M. A. (2006). Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies *Food Technol. Biotechnol.*; 44: 335-353.
- Lönner, C., Welander, T., Molin, N., Dostálek, M., Blickstad, E. (1986). The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology*; 3: 3-12.
- Lopez-Lopez, O., Fucinos, P., Pastrana, L., Rua, M. L., Cerdan, M. E., Gonzalez-Siso, M. I. (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*; 145: 226-232.
- Lu, Y., Foo, L. Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*; 65: 1-8.

- Lu, Y., Foo, L. Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*; 68: 81-85.
- Malcorps, P., Dufour, J.-P. (1992). Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*; 210: 1015-1022.
- Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of [beta]-xylosidase activity. *Int J Food Microbiol*; 46: 105-112.
- Maragkoudakis, P. A., Nardi, T., Bovo, B., D'Andrea, M., Howell, K. S., Giacomini, A., Corich, V. (2013). Biodiversity, dynamics and ecology of bacterial community during grape marc storage for the production of grappa. *Int J Food Microbiol*; 162: 143-151.
- Martelli, H. L., Dittmar, H. F. (1961). Cacao fermentation. V. Yeasts isolated from cacao beans during the curing process. *Appl Microbiol*; 9: 370-371.
- Mason, A. B., Dufour, J. P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*; 16: 1287-1298.
- Masoodi, F. A., Chauhan, G. S. (1998). Use of Apple Pomace as a Source of Dietary Fiber in Wheat Bread. *Journal of Food Processing and Preservation*; 22: 255-263.
- Masoodi, F. A., Sharma, B., Chauhan, G. S. (2002). Use of apple pomace as a source of dietary fiber in cakes. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*; 57: 121-128.
- Masoud, W., Jespersen, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int J Food Microbiol*; 110: 291-296.
- Mateo, J. J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int J Food Microbiol*; 14: 153-160.
- Mathews, H. L., Conti, S., Witek-Janusek, L., Polonelli, L. (1998). Effect of *Pichia anomala* killer toxin on *Candida albicans*. *Med Mycol*; 36: 199-204.
- Matsuzaki, C., Nakagawa, A., Koyanagi, T., Tanaka, K., Minami, H., Tamaki, H., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H. (2012). *Kluyveromyces marxianus*-based platform for direct ethanol fermentation and recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- McBain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G., Rickard, A. H., Symmons, S. A., Gilbert, P. (2003). Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Appl Environ Microbiol*; 69: 177-185.
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Christen, P., Fontoura, P. S. G., de Freitas, R. J. S., Soccol, C. R. (2001). Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 17: 767-771.

- Merico, A., Sulo, P., Piškur, J., Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal*; 274: 976-989.
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., Hertel, C. (2003a). Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*; 69: 7453-7461.
- Meroth, C. B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M. J., Hammes, W. P. (2003b). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*; 69: 475-482.
- Min, B., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yoo, S.-H., Lee, S. (2010). Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. *Bioresource Technology*; 101: 5414-5418.
- Molina, A., Swiegers, J., Varela, C., Pretorius, I., Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl Environ Microbiol*; 77: 675-687.
- Molina, A. M., Guadalupe, V., Varela, C., Swiegers, J. H., Pretorius, I. S., Agosin, E. (2009). Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*; 117: 189-195.
- Molina, G., Bicas, J. L., Moraes, É. A., Maróstoca-JR, M. R., Patore, G. M. (2013). Recent Developments and Industrial Perspectives in the Microbial Production of Bioflavors. In *Applications of Microbial Engineering*. Edited by M. G. Tuohy. New York, USA: CRC Press Taylor & Francis.
- Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol*; 103: 285-294.
- Mukai, N., Nishimori, C., Fujishige, I. W., Mizuno, A., Takahashi, T., Sato, K. (2001). Beer brewing using a fusant between a sake yeast and a brewer's yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 91: 482-486.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*; 25: 231-237.
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*; 43: 124-129.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*; 59: 695-700.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*; 164: 165-172.

- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*; 73: 127-141.
- Nawirska, A., Kwasniewska, M. (2005). Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*; 91: 221-225.
- Niehaus, C. (1932). Untersuchungen über Apiculatushefen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt.II*; 87: 97-150.
- Nonklang, S., Abdel-Banat, B. M., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., Yamada, M., Akada, R. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*; 74: 7514-7521.
- Nordström, K. (1962). Formation of ethyl acetat in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of Coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*; 68: 398-407.
- Nordström, K. (1964). Formation of Esters from acids by brewer's yeast II. Formation from lower fatty acids. *Journal of the Institute of Brewing*; 70: 42-55.
- Ohshima, Y., Sugaura, T., Horita, M., Sasaki, T. (1987). Industrial Application of Artificially Induced Diploid Strains of *Torulaspora delbrueckii*. *Appl Environ Microbiol*; 53: 1512-1514.
- Orozco, H., Matallana, E., Aranda, A. (2012). Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions. *Microbial Cell Factories*; 11: 104-114.
- Peddie, H. A. B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*; 96: 327-331.
- Pelshenke, P. F., Kempf, W., Tegge, G., Rotsch, A., Dörner, H., Hampel, G., Spicher, G., Stephan, H., Tehsmer, E. (1958). Jahresbericht 1957/58 der Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung, Detmold III. Stärke. *Starch - Stärke*; 10: 221-238.
- Pérez-Mendoza, F., Ruiz-Terán, F., Abarca, B. E., Navarro-Ocaña, A., Aguilar-Uscanga, G., Valerio-Alfaro, G. (2005). Oxoester oxidoreductase activities in new isolates of *Pichia anomala* from apple, grape and cane juices. *FEMS Yeast Research*; 5: 685-690.
- Pierre, G., Sannier, F., Goude, R., Nouviaire, A., Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S.-A., Maugard, T. (2011). Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*; 54: 305-310.
- Ping, L., Pizzi, A., Guo, Z. D., Brosse, N. (2011). Condensed tannins extraction from grape pomace: Characterization and utilization as wood adhesives for wood particleboard. *Industrial Crops and Products*; 34: 907-914.
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*; 20: 217-224.

- Plata, M. D. C., Mauricio, J. C., Millán, C., Ortega, J. (1998). In vitro specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of sherry wines. *J Ferment Bioeng*; 85: 369-374.
- Plessas, S., Trantallidi, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P., Koutinas, A. A. (2007). Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. *Food Chemistry*; 105: 187-194.
- Plessas, S., Bekatorou, A., Gallanagh, J., Nigam, P., Koutinas, A. A., Psarianos, C. (2008a). Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. *Food Chemistry*; 107: 883-889.
- Plessas, S., Fisher, A., Koureta, K., Psarianos, C., Nigam, P., Koutinas, A. A. (2008b). Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chemistry*; 106: 985-990.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*; 4: 865-877.
- Priesolová, L., Lakatošová, J., Havelková, M., Šmogrovicová, D. (2013). The influence of different yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* on aromatic profile of beers. *Curr Opin Biotechnol*; 24: S90-S91.
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T. (2011). Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur Food Res Technol*; 233: 721-729.
- Puchkov, E. O. (2010). Brownian motion of polyphosphate complexes in yeast vacuoles: characterization by fluorescence microscopy with image analysis. *Yeast*; 27: 309-315.
- Rajoka, M. I. (2007). Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*; 98: 2212-2219.
- Ramsay, L. M., Gadd, G. M. (1997). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett*; 152: 293-298.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Prieto, J. A. (1999). Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends in Biotechnology*; 17: 237-244.
- Rasco, B. A., Gazzaz, S. S., Dong, F. M. (1990). Iron, calcium, zinc, and phytic acid content of yeast-raised breads containing distillers' grains and other fiber ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*; 3: 88-95.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Environ Microbiol*; 75: 149-164.

- Rezaei, M. N., Dornez, E., Jacobs, P., Parsi, A., Verstrepen, K. J., Courtin, C. M. (2014). Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation. *Food Microbiology*; 39: 108-115.
- Rincón, A. M., Benitez, T. (2001). Improved Organoleptic and Nutritive Properties of Bakery Products Supplemented with Amino Acid Overproducing *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49: 1861-1866.
- Robertson, J. A., l'Anson, K. J. A., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G. H., Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology*; 43: 890-896.
- Rocha, S. N., Abrahao-Neto, J., Cerdan, M. E., Gonzalez-Siso, M. I., Gombert, A. K. (2010). Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb Cell Fact*; 9: 4.
- Rocha, S. N., Abrahao-Neto, J., Cerdan, M. E., Gombert, A. K., Gonzalez-Siso, M. I. (2011). Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*; 89: 375-385.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A., de Souza Schmidt, E., Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*; 127: 174-179.
- Rodicio, R., Heinisch, J. J. (2013). Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*; 30: 165-177.
- Rodriguez, J., Perez, J. A., Ruiz, T., Rodriguez, L. (1995). Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. *Biochem J*; 306 (Pt 1): 235-239.
- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int J Food Microbiol*; 70: 283-289.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol*; 86: 169-180.
- Romero, R. C., Osuna, A. I. L., Robles, R. M., Castro, S. R. M., Martínez, L. L., León-Gálvez, R. (2004). Characterization of cookies made with deseeded grape pomace. *ALAN* 54: 93-99.
- Rowe, D. J. (2009). Introduction. In *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, pp. 1-11: Blackwell Publishing Ltd.
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., Tommasi, N. D. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*; 100: 203-210.
- Ruberto, G., Renda, A., Amico, V., Tringali, C. (2008). Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology*; 99: 260-268.

- Ruttloff, H. (1982). Biotechnology and aroma production. *Food / Nahrung*; 26: 575-589.
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., *et al.* (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*.
- Saerens, S., Verbelen, P., Vanbeneden, N., Thevelein, J., Delvaux, F. (2008a). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl Environ Microbiol*; 80: 1039-1051.
- Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem*; 281: 4446-4456.
- Saerens, S. M., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R. (2008b). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol*; 74: 454-461.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Kisi, O. (2012). Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications*; 39: 6792-6798.
- Salimur, R., Paterson, A., Piggott, J. R. (2006). Flavour in sourdough breads: a review. *Trends in Food Science & Technology*; 17: 557-566.
- Salmon, J. M., Vuchot, P., Doco, T., Moutounet, M. (2003). Maintenance and protection of yeast morphology by contact with wine polyphenols during simulation of wine aging on lees. *Journal of Food Science*; 68: 1782-1787.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 3 edn. NY: Cold Spring Harbor.
- Sartory, A., Sartory, R., Weill, J., Meyer, J. (1932). Un cas de blastomycose invétérée transmissible au cobaye, due au *Saccharomyces* pathogène (*Saccharomyces jadini* n. sp.). *C. R. Acad. Sci.*; 194: 1688-1690.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., Viveros, A., Goñi, I. (2009). Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Science*; 83: 528-533.
- Scacco, A., Oliva, D., Di Maio, S., Polizzotto, G., Genna, G., Tripodi, G., Lanza, C. M., Verzera, A. (2012). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their influence on the quality of Cataratto, Inzolia and Grillo white wines. *Food Research International*; 46: 1-9.
- Schanus, E. G., McPherson, M. (1994). Yeast extracts from *Candida utilis* and the production of same. In US5286630 A. USA.
- Scheffers, W. A. (1979). Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek*; 45: 150-150.

- Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.-U., Rentschler, C., Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*; 4: 99-107.
- Schneider, J., Rupp, O., Trost, E., Jaenicke, S., Passoth, V., Goesmann, A., Tauch, A., Brinkrolf, K. (2012). Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766 reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS Yeast Res*; 12: 382-386.
- Schrader, J. (2007). Microbial Flavour Production. In *Flavours and Fragrances*, pp. 507-574. Edited by R. Berger: Springer Berlin Heidelberg.
- Schreier, P. (1997). Enzymes and Flavour Biotechnology. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pp. 51-72. Edited by T. Scheper. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schwan, R. F., Cooper, R. M., Wheals, A. E. (1997). Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*; 21: 234-244.
- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N. S., Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot-a review. *J Food Sci Technol*; 49: 22-32.
- Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 90: 90-97.
- Singh, B., Panesar, P. S., Nanda, V. (2006). Utilization of Carrot Pomace for the Preparation of a Value Added Product. *World Journal of Dairy & Food Sciences*; 1: 22-27.
- Singh, R. S., Dhaliwal, R., Puri, M. (2007). Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *J Microbiol Biotechnol*; 17: 733-738.
- Singleton, V. L., Timberlake, C. F., Lea, A. G. H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 29: 403-410.
- Slavikova, E., Vadkertiova, R., Vranova, D. (2007). Yeasts colonizing the leaf surfaces. *J Basic Microbiol*; 47: 344-350.
- Soares, M., Christen, P., Pandey, A., Raimbault, M., Soccol, C. R. (2000). A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue. *Bioprocess and Biosystems Engineering*; 23: 695-699.
- Spicher, G., Rabe, E., Sommer, R., Stephan, H. (1981). Die Mikroflora des Sauerteiges. XIV. Mitteilung: Über das Verhalten homofermentativer Sauerteigbakterien und Hefen bei gemeinsamer Kultur. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*; 173: 291-296.

- Spicher, G., Rabe, E., Sommer, R., Stephan, H. (1982). The Microflora of Sourdough XV. Communication: On the Behaviour of Heterofermentative Sourdough Bacteria and Yeasts in Mixed Culture. *Z Lebensm Unters Forsch*; 174: 222-227.
- Stoll, T., Schweiggert, U., Schieber, A., Carle, R. (2003). Application of hydrolyzed carrot pomace as a functional food ingredient to beverages. *Food, Agriculture & Environment*; 1: 88-92.
- Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995). Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfrancisco*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*; 91-96.
- Stribny, J., Gamero, A., Pérez-Torrado, R., Querol, A. (2015). *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *Int J Food Microbiol*; 205: 41-46.
- Sudha, M. L., Baskaran, V., Leelavathi, K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*; 104: 686-692.
- Sumbly, K. M., Grbin, P. R., Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*; 121: 1-16.
- Swiegers, J. H., Pretorius, I. S. (2005). Yeast Modulation of Wine Flavor. In *Advances in Applied Microbiology*, pp. 131-175. Edited by J. A. I. Laskin, J. W. Bennett, G. M. Gadd: Academic Press.
- Szczodrak, J. (2000). Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 10: 631-637.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*; 21: 1199-1218.
- Tanaka, F., Ando, A., Nakamura, T., Takagi, H., Shima, J. (2006). Functional genomic analysis of commercial baker's yeast during initial stages of model dough-fermentation. *Food Microbiology*; 23: 717-728.
- Tańska, M., Zadernowski, R., Konopka, I. (2007). The Quality of Wheat Bread Supplemented with Dried Carrot Pomace. *Polish Journal of Natural Science*; 22: 126-136.
- Thiele, C., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. (2002). Contribution of Sourdough Lactobacilli, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for Bread Flavor. *Cereal Chem.*; 79: 45-51.
- Thurston, P. A., Quain, D. E., Tubb, R. S. (1982). Lipid Metabolism and the Regulation of Volatile Esters Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*; 88: 90-94.

- Timke, M., Wang-Lieu, N. Q., Altendorf, K., Lipski, A. (2008). Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*; 93: 151-161.
- Torner, M. J., Martínez-Anaya, M. A., Antuna, B., Benedito de Barber, C. (1992). Headspace flavour compounds produced by yeasts and lactobacilli during fermentation of preferments and bread doughs. *Int J Food Microbiol*; 15: 145-152.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*; 127: 1072-1083.
- Tseng, A., Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*; 138: 356-365.
- van Breda, V., Jolly, N., van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*; 163: 80-88.
- Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. (2007). Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl Environ Microbiol*; 73: 4741-4750.
- van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*; 63: 343-352.
- Van Laere, S. D., Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R. (2008). Flavour formation in fungi: characterisation of KlAtf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2. *Appl Microbiol Biotechnol*; 78: 783-792.
- Vandamme, E. J., Soetaert, W. (2002). Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*; 77: 1323-1332.
- Vandamme, E. J. (2003). Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity*; 13: 153-166.
- Varela, C., Torrea, D., Schmidt, S. A., Ancin-Azpilicueta, C., Henschke, P. A. (2012). Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*; 135: 2863-2871.
- Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., Van Impe, J., Debevere, J. (2007). Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces. *Int J Food Microbiol*; 119: 258-269.

- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microbiol*; 69: 5228-5237.
- Vidal, E. E., de Billerbeck, G. M., Simões, D. A., Schuler, A., François, J. M., de Morais Jr, M. A. (2013). Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. *Food Chemistry*; 138: 701-708.
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, pp. 478-491. Edited by S. Moselio. Oxford: Academic Press.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., Hammes, W. P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*; 67: 2578-2585.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*; 78: 693-700.
- Watanabe, M., Fukuda, K., Asano, K., Ohta, S. (1990). Mutants of bakers' yeasts producing a large amount of isobutyl alcohol or isoamyl alcohol, flavour components of bread. *Appl Environ Microbiol*; 34: 154-159.
- Weiss, H. O. (1981). Apple Pectins in Baking Jams and Fruit Preparations for Dairy Products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*; 14: 173.
- Wulf, L. W., Nagel, C. W. (1980). Identification and changes of flavonoids in merlot and cabernet sauvignon wines. *Journal of Food Science*; 45: 479-484.
- Wyder, M.-T., Bachmann, H.-P., Puhan, Z. (1999). Role of Selected Yeasts in Cheese Ripening: An Evaluation in Foil Wrapped Raclette Cheese. *LWT - Food Science and Technology*; 32: 333-343.
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., Christakopoulos, P. (2008). Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*; 99: 5427-5435.
- Xiros, C., Moukouli, M., Topakas, E., Christakopoulos, P. (2009). Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresource Technology*; 100: 5917-5921.
- Xu, P., Hua, D., Ma, C. (2007). Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production. *Trends in Biotechnology*; 25: 571-576.
- Yanai, T., Sato, M. (2001). Purification and characterization of an beta-D-xylosidase from *Candida utilis* IFO 0639. *Biosci Biotechnol Biochem*; 65: 527-533.

- Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., Ma, Y., Pohorly, J. (2009). Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry*; 114: 570-576.
- Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., Tamai, Y. (1998). Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *J Ferment Bioeng*; 86: 15-20.
- Zamenhoff, S. (1957). Preparation and assay of deoxyribonucleic acids from animal tissue. *Methods Enzymol*; 3: 702-704.
- Zehentbauer, G., Grosch, W. (1998). Crust Aroma of Baguettes II. Dependence of the Concentrations of Key Odorants on Yeast Level and Dough Processing. *Journal of Cereal Science*; 28: 93-96.
- Zimmermann, F. K. (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*; 31: 71-86.
- Zoppellari, F., Bardi, L. (2012). Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New Biotechnology*.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology*; 27: 559-567.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*; 56: 1875-1881.

A. Anhang

A 1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\mu_{(\max)}$	(maximale) Wachstumsrate
APS	Ammoniumpersulfat
bp, kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermonii</i>	<i>Candida guilliermonii</i>
<i>C. humilis</i>	<i>Candida humilis</i>
<i>C. jadinii</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>C. milleri</i>	<i>Candida milleri</i>
<i>C. silvae</i>	<i>Candida silvae</i>
<i>C. thermophilus</i>	<i>Cryptococcus thermophilus</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. zemplinina</i>	<i>Candida zemplinina</i>
ca.	circa
d, h, min, s	Tag, Stunde, Minute, Sekunde
<i>D. bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
d. h.	das heißt
<i>D. intermedia</i>	<i>Dekkera intermedia</i>
Da, kDa	Dalton, Kilo Dalton
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DIL	Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	„Ethylenediaminetetraacetic acid“ (Ethylenediamintetraessigsäure)
EFSA	„European Food Safety Authority“ - Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
<i>et al.</i>	„et alii“ (und andere)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
g	Erdbeschleunigung
GC/O	Gaschromatography–Olfaktometrie
GKZ	Gesamtkeimzahl
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
<i>H. osmophila</i>	<i>Hanseniaspora osmophila</i>
<i>H. uvarum</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
HA	Hämagglutinin
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>K. marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>K. exigua</i>	<i>Kazachstania exigua</i>
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter

<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. sakei</i>	<i>Lactocacillus sakei</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
LB	„lysogeny broth“ (Vollmedium für <i>E. coli</i>)
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. pseudomesenteroides</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
LKZ	Lebendkeimzahl
Mio, Mrd	Millionen, Milliarden
M, mM	Molar, Millimolar
<i>M. guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<i>M. pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
mg, µg, ng	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
MSB	Milchsäurebakterien
n. b.	nicht bestimmt
NaOAc	Natriumacetat
n. q.	nicht quantifiziert
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
<i>P. fermentans</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>P. haplophila</i>	<i>Pichia haplophila</i>
<i>P. membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Pa	Pascal
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pers.	persönlich(e)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
pmol	Picomol
QPS	" <i>Qualified Presumption of Safety</i> " - Qualifizierte Sicherheitsannahme
<i>R. nothofagi</i>	<i>Rhodotorula nothofagi</i>
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute, UpM)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. fibuligera</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
<i>S. saitoi</i>	<i>Saturnispora saitoi</i>
<i>S. pastoriensis</i>	<i>Saccharomyces pastoriensis</i>
SCP	„single cell protein“, Einzellerprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	<i>species</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i> - einzelsträngige DNA
t	Tonnen
<i>T. delbrueckii</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>T. holmii</i>	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>T. pretoriensis</i>	<i>Torulasporea pretoriensis</i>

TA	Teigausbeute
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS(T)	„Tris-buffered saline (and Tween 20)“ (Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween 20))
TCA	„trichloroacetic acid“ (Trichloressigsäure)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
UV	„ultraviolet radiation“ (Ultraviolettstrahlung)
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
v/v	„volume per volume“ (Volumenprozent)
vgl.	vergleiche
<i>W. confusa</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>W. anomalus</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
w/o	„without“ (ohne)
w/v	„weight per volume“ (Gewichtsprozent)
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
YEPD	„yeast extract peptone dextrose“ (Hefevollmedium mit Glukose)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

Nukleotide und Aminosäuren sind mit dem Ein- oder Drei-Buchstaben-Code (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) abgekürzt.

A 2. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne zulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Im Rahmen von Abschlussarbeiten, die von mir während dieses Projekts betreut wurden, wurde ein Teil der hier präsentierten Ergebnisse gemeinsam mit Studenten erarbeitet. Dabei erfolgten die Charakterisierung der Mikroflora in den fermentierten Teigen in Zusammenarbeit mit Nadine Knocke im Rahmen ihrer Masterarbeit (gezeigt in den Abbildungen 10-12, 14, 15, 17 und Tabellen 7-11).

Die Identifizierung der während der Fermentation gebildeten Aromakomponenten erfolgte durch die Fa. aromaLAB AG, während die Analyse der Aromakomponenten im Zusammenhang mit der Expression heterologer Gene in Kooperation mit Dr. Christian von Wallbrunn (Hochschule Geisenheim, Zentrum für Analytische Chemie und Mikrobiologie) durchgeführt wurde.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum) (Unterschrift)

A 3. Effekt alternativer Hefen auf die Aromabildung und das Wachstum der Mikroflora

Tabelle A.1: Keimzahlen der Hefen und Milchsäurebakterien sowie der Geruch der in Kontrollfermentationen hergestellten Teige. Die Hefeanzucht erfolgte nach Methode 2. Die Weizenteige ohne Zusatz von Nebenströmen (TA 200) wurden mit 10^6 KbE/g inokuliert und für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig	Spezies	Stamm	Lebendkeimzahl (KbE/g)			pH-Wert	Geruch
			Hefen		MSB		
			t_0	t_{24}	t_{24}		
1	<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	$1,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	5,4	käsigt 2, mehlig 2, Kuh 2
2			$1,7 \times 10^6$	$< 3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	5,7	flacher Teiggeruch
3	<i>D. bruxellensis</i>	DIL 1201	$1,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	5,2	käsigt 1-2, mehlig 1-2
4		DIL 1202	$1,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	5,4	käsigt 1-2, mehlig 1-2
5		DIL 1203	$1,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^6$	5,2	mehr Hefe 2, leicht käsigt 1
6	<i>H. uvarum</i>	DIL 192	$8,0 \times 10^4$	$2,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^3$	5,5	käsigt 2, kein Mehl
7		DIL 595	$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^3$	5,4	Käsigt 1, Mehlig 1, Kuh 1
8		DIL 596	$6,3 \times 10^4$	$5,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	5,1	käsigt 2, Erbrochenes 2, mehlig 2
9			$1,4 \times 10^4$	$< 10^5$	$2,4 \times 10^6$	5,4	hefig 1-2, mehlig 1-2
10			$< 10^4$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$		Kuhstall 1, hefig 1
11		DIL 597	$1,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$	$5,8 \times 10^6$	5,2	hefig 1, mehlig 1, Schweißfuß/Erbrochenem 1-2
12	<i>K. lactis</i>	DIL 194	$1,4 \times 10^6$	$< 10^5$	$8,8 \times 10^6$	5,4	käsigt, verdorben
13	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	$1,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	5,6	grüne Banane 2, käsigt 1, Hefeteig
14			$1,2 \times 10^4$	$2,7 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	5,3	Mehl 1, käsigt 1, Buttermilch?
15		DIL 82	$2,0 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	5,3	mehlig, käsigt
16			$2,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^5$	5,8	süßlich 1, Hefe, grüne Banane, alkoholisch 1
17			$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	5,3	mehlig, leicht käsigt
18		DIL 610	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$	5,5	grüne Banane
19			$9,9 \times 10^5$	$8,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	5,5	hefig 1, säuerlich 1
20	<i>P. fermentans</i>	DIL 1051	$1,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	5,5	käsigt, mehlig, schweißig?
21		DIL 175	$2,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$< 10^1$	5,7	chemischer Holzleim 1 ^a ; neutraler Geruch
22	<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$9,6 \times 10^6$	5,5	Zuckererbse? Unreife Banane?, chemisch 2
23			$1,1 \times 10^6$	$7,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	5,5	Schweißfuß/Erbrochenem 1-2
24	<i>S. saitoi</i>	DIL 77	$1,4 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	5,2	muffig 2, mehlig 2
25	<i>S. fibuligera</i>	DIL 3888	$6,1 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	5,1	leicht künstlich, mehlig, käsigt
26	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 97	$1,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^4$	5,7	Mehlig, Pfannenkuchenteig, Camembert
27		DIL 113	$1,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	5,4	käsigt 1-2, mehlig (geht unter)
28		DIL 186	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	5,5	Hefeteig, arttypisch 2
29		DIL 1054	$1,9 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	5,3	mehlig 1, käsigt 1
30	<i>T. pretoriensis</i>	DIL 1055	$1,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$	5,2	Hefeteig 1-2, reife Banane 0-1
31	<i>W. anomalus</i>	DIL 114	$2,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	5,0	bananig 1 ^a , chemisch 2-3
32		DIL 1050	$8,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^8$	$5,1 \times 10^2$	5,4	gelbe Bananen ^a ; flacher Teiggeruch
33			$1,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	5,5	grüne Banane 0-1

t_0 , Fermentationsstart; t_{24} , Fermentationsende nach 24 h; ^a Geruch schnell verfliegen; MSB: Milchsäurebakterien

Tabelle A.2: Einfluss der Fermentationsparameter auf die Lebendkeimzahl der Hefen, Milchsäurebakterien und Enterobakterien sowie pH-Wert und Geruch nach 24 h Fermentation bei 25 °C in Abhängigkeit der verwendeten alternativen Hefen.

Teig Hefe	Methode Hefe-anzucht	Zusatz	Inokulat Lebendkeimzahl (KbE/g)			pH-Wert		Geruch		
			Hefen	Milchsäu- rebakteri	Entero- bakterien	t ₀	t ₂₄			
34	<i>W. anomalous</i> DIL 1050	23	-	10 ⁶	8,0 × 10 ⁵	2,9 × 10 ⁷	1,5 × 10 ⁶	5,9	5,3	käsig 2, chemisch 2
35	<i>C. jadinii</i> DIL 1047	23	-	10 ⁶	<10 ⁶	6,5 × 10 ⁵	7,5 × 10 ⁶	6,0	5,4	käsig 2
36	<i>K. lactis</i> DIL 4537	23	-	10 ⁶	1,8 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁶	5,8 × 10 ⁶	6,2	5,0	fieser Käsegeruch
37	<i>K. marxianus</i> DIL 82	23	-	10 ⁶	1,2 × 10 ⁷	5,6 × 10 ⁵	9,7 × 10 ⁵	6,0	5,4	Käse, säuerlich
38	<i>K. marxianus</i> DIL 82	9	-	10 ⁶	6,7 × 10 ⁶	9,3 × 10 ⁶	2,7 × 10 ⁵	6,3	5,5	mehlig 2, käsig 2, hefig 2
39	<i>K. marxianus</i> DIL 610	9	-	10 ⁶	6,1 × 10 ⁶	4,6 × 10 ⁶	2,7 × 10 ⁵	6,3	5,7	mehlig 2, käsig 2, hefig 2, grüne Banane 1-2 ^a
40	<i>K. marxianus</i> DIL 82	9	-	10 ⁷	1,9 × 10 ⁷	8,3 × 10 ⁵	2,5 × 10 ³	6,1	5,5	mehlig 1-2, käsig 1-2, hefig 1-2
41	<i>K. marxianus</i> DIL 610	9	-	10 ⁷	1,1 × 10 ⁷	9,7 × 10 ⁵	2,2 × 10 ³	6,1	5,4	mehlig 1-2, käsig 1-2, hefig 1-2, grüne Banane 1-2
42	<i>K. marxianus</i> DIL 43	9	Milchsäure	10 ⁶	<10 ⁴	<10 ¹	<10 ²	4,7	4,5	mehlig 1-2, teigig 1-2
43	<i>K. marxianus</i> DIL 82	9	Milchsäure	10 ⁶	<10 ⁶	<10 ¹	<10 ²	4,7	4,5	mehlig 1-2, teigig 1-2, grüne Banane 1-2
44	<i>T. delbrueckii</i> DIL 1054	9	Milchsäure	10 ⁶	<10 ⁶	<10 ¹	<10 ³	4,7	4,5	mehlig 1-2, teigig 1-2, grüne Banane 1-2
45	<i>K. marxianus</i> DIL 82	9	Chloramphenicol	10 ⁶	8,0 × 10 ⁶	<10 ³	<10 ¹	6,3	5,8	leichter Klebstoff 1 ^a , mehlig 1, neutral 1
46	<i>K. marxianus</i> DIL 610	9	Chloramphenicol	10 ⁶	4,7 × 10 ⁶	<10 ³	<10 ¹	6,3	5,9	schwach mehlig 1, neutral 1
47	<i>K. marxianus</i> DIL 610	9	Chloramphenicol	10 ⁷	1,9 × 10 ⁷	<10 ⁴	<10 ²	6,1	5,6	leichter Klebstoff 1 ^a , hefig 1, neutral 1-2
48	<i>K. marxianus</i> DIL 82	9	Chloramphenicol	10 ⁷	3,0 × 10 ⁷	1,1 × 10 ⁴	<10 ²	6,0	5,5	hefig 1, neutral 1

^a, Geruch schnell verflogen; t₀, Fermentationsbeginn; t₂₄, Fermentationsende nach 24 h.

Tabelle A.3: Geruch der fermentierten Weizenteige (TA 200, 10⁶ KbE/g, 25 °C, 24 h) in Abhängigkeit des verwendeten Hefestamms vor und nach dem Vermengen mit unfermentierten Nebenstroms. Die Hefeanzucht erfolgte nach Methode 2.

Teig		zugegebener Nebenstrom der Charge 1		Geruch	
				fermentierter Weizenteig	fermentierter Weizenteig mit 25% unfermentiertem Nebenstrom
49	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	Apfeltrester	muffig, Schweiß, fäkal	unangenehm, metallisch, kein Apfel
50	<i>K. marxianus</i>	DIL 82	Apfeltrester	käsigt 1	lehmiger Boden, getrockneter Hundekot
51	<i>K. marxianus</i>	DIL 610	Apfeltrester	bananig	lehmiger Boden, getrockneter Hundekot
52	<i>H. uvarum</i>	DIL 595	Apfeltrester	bananig	unangenehm, metallisch, kein Apfel
53	<i>H. uvarum</i>	DIL 596	Apfeltrester	käsigt, muffig	unangenehm, metallisch, säuerlich kein Apfel
54	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	Biertreber	bananig?	Biertreber 1-2, malzig 1-2, Heu 1-2
55	<i>K. marxianus</i>	DIL 82	Biertreber	käsigt 1	Biertreber 2, malzig 2, Heu 2
56	<i>K. marxianus</i>	DIL 610	Biertreber	bananig	malzig
57	<i>H. uvarum</i>	DIL 595	Biertreber	käsigt/säuerlich	Biertreber 1-2, malzig 1-2, Heu 1-2
58	<i>H. uvarum</i>	DIL 596	Biertreber	käsigt, muffig	Biertreber 1, malzig 1, Heu 1
59	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	Karottentrester	bananig?	erdig 2, Karotte 1
60	<i>K. marxianus</i>	DIL 82	Karottentrester	käsigt	Karotte 1-2, süßlich 1
61	<i>K. marxianus</i>	DIL 610	Karottentrester	bananig, Ethanol	Karotte 1-2, süßlich 1
62	<i>H. uvarum</i>	DIL 595	Karottentrester	unangenehm	Karotte 2, erdig 1
63	<i>H. uvarum</i>	DIL 596	Karottentrester	käsigt, muffig	Karotte 2, erdig 1

Tabelle A.4: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200, 25 °C, 10⁶ KbE/g, 24 h) mit Zusatz von 25 % getrockneten Apfeltrester (Charge 1) durch alternative Hefen auf die Lebendkeimzahlen der Hefen sowie dem nach 24 h resultierenden Geruch.

Teig	Spezies	Stamm	Methode Hefe-anzucht	Wachstum Hefen log(N/N ₀)	Geruch
64	<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	2	0,46	alter Apfelsaft, flach 1-2
65			2	0,54	fruchtig 1, Apfel 1, chemisch 2 ^d
66	<i>D. bruxellensis</i>	DIL 74	1	0,72 ^b	Apfel 2, Blausäure (Bittermandel) 0-1
67		DIL 75	1	0,68	Apfel 2, kernig 1-2
68		DIL 166	2	n. b.	Apfel 1, muffig 2
69		DIL 1048	2	n. b.	Apfel 2
70		DIL 1201	2	-0,17 ^b	Apfel 2, fruchtig (exotisch) 0-1
71		DIL 1202	2	0,12 ^b	Apfel/Birnenkompott
72		DIL 1203	2	-0,11 ^b	Apfel 1, Vollkornbrot
73	<i>H. uvarum</i>	DIL 42	2	> 4,00 ^c	Apfel 2, flach 1
74		DIL 168	2	> 2,00 ^c	Apfel 2, erdig 1, flach 2, chemisch 2
75		DIL 192	2	3,55 ^c	Apfel 1, fruchtig (Banane) 2, muffig 1-2 ^d
76			2	3,70 ^c	Apfel 1, weiterer angenehmer Geruch, nicht genau zuordbar
77			2	n. b.	Apfel 2, flach 1-2, chemisch 1 ^d
78		DIL 595	2	2,15 ^c	Apfel 2, fruchtig (tropisch) 1
79			2	2,58 ^c	Apfel, Most, frittiert
80			2	2,93 ^c	fruchtig 2, Apfel 2, chemisch 2
81			1	3,72 ^c	fruchtig (Mango/Passionsfrucht) 2, chemisch 2
82		DIL 596	2	> 2,00 ^c	Apfel 2, blumig (Veilchen) 1 ^d
83		DIL 597	2	n. b.	Apfel 1, muffig 1
84	<i>K. exigua</i>	DIL 181	2	n. b.	Apfel 2
85	<i>K. lactis</i>	DIL 194	2	n. b.	Heu/Stroh?
86	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	2	0,69	fruchtiger Klebstoff 2 ^d , muffig 2
87			2	1,10	frisch 2, Apfel 1
88			2	1,22	fruchtig (tropisch) 1-2, Apfel 2
89			2	2,93 ^c	fruchtig 1, Apfel 2
90			2	3,76 ^c	fruchtig (tropisch) 2
91		DIL 82	1	0,79	fruchtig 2, süßlich 1, Apfel 1
92			2	0,84	Apfel 1, chemisch 2-3

Tabelle A.4: Fortsetzung.

Teig Spezies	Stamm	Methode Hefe- anzucht	Wachstum Hefen log(N/N ₀)	Geruch
93		2	1,03	fruchtig (mostig) 1-2, Apfel 2, chemisch 1-2
94		2	1,11	fruchtig (Banane) 2, Apfel 1
95		2	1,48	fruchtig 2, Apfel 2, chemisch 0-1
96		2	1,62	aromatisch 2, tropisch 2-3, kein Apfel
97		2	1,78	fruchtig 2, grüner Apfel 1, chemisch 2, säuerlich 1
98		2	1,90	fruchtig (tropisch) 2, chemisch (Klebstoff) 2 ^d
99		2	2,22	fruchtig 1-2, grüner Apfel 0-1, chemisch 1-2, säuerlich 1-2
100		1	2,28	fruchtig (Mango/Passionsfrucht) 2, chemisch 3
101		2	n. b.	fruchtig (tropisch) 2, chemisch 1-2 ^d
102	DIL 193	2	0,15	Apfel 2, säuerlich 1
103	DIL 610	2	0,75	Apfel 2, fruchtig (tropisch) 1 ^d , chemisch 1
104		2	0,93	flach 2, Apfel 2, säuerlich 1-2 ^d , chemisch 2
105		2	1,10	fruchtig 2, Apfel 1, chemisch 2, säuerlich 2
106		2	1,71	fruchtig (tropisch) 2, Apfel 1
107		2	n. b.	fruchtig 2
108	DIL 1049	2	n. b.	fruchtig (tropisch) 1
109 <i>P. fermentans</i>	DIL 175	2	1,31	Apfelmost, apfeliger Federweißer
110		2	n. b.	Apfel 2, fruchtig (Pflaume/Quitte) 1-2
111	DIL 590	2	n. b.	Apfel 2, chemisch 1, flach
112	DIL 1051	2	n. b.	Apfel 2, Apfelkompott
113 <i>P. membranifaciens</i>	DIL 83	2	n. b.	süßlich 1, fruchtig 2 (Marmelade, Holunder-/Johannisbeersaft), kein Apfel
114	DIL 176	2	0,52	käsige/muffig 1-2
115 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	1	2,79 ^c	flach 2
116 <i>S. saitoi</i>	DIL 77	2	0,51	Apfel 1, muffig/mostig 2
117 <i>T. delbrueckii</i>	DIL 58	1	1,88	kernig 1, säuerlich 1
118	DIL 86	2	1,21	Apfel 2, säuerlich 1
119	DIL 97	2	2,67	fruchtig 1, Apfel 1-2
120	DIL 111	2	1,16	Apfel 1-2
121	DIL 113	2	1,78	unreife Honigmelone
122		2	n. b.	Apfel 2-3
123	DIL 186	2	1,49	süßlich 2, Apfel 2
124		2	1,67	Apfel 1, säuerlich 2, angenehmer Geruch
125		2	n. b.	Apfel 2, muffig 1 ^d
126	DIL 1054	2	1,15	Apfel 2
127		2	1,65	Apfel 2, offener Gärkessel in Brauerei
128 <i>T. pretoriensis</i>	DIL 123	2	1,65	Apfel 2
129	DIL 187	2	1,65	Apfel 1-2
130	DIL 1055	2	1,74	süßlich 1 ^d , Apfel 2
131 <i>W. anomalus</i>	DIL 114	1	1,82	chemisch 3, muffig/mostig 2
132	DIL 151	2	1,33	Apfel 2, säuerlich/mostig 1-2
133	DIL 174	2	n. b.	chemisch 3 --> bleibt!!!; fruchtig 1 --> von Klebstoffgeruch überlagert
134	DIL 1050	2	0,70	Apfel 1, flach 2, erdig?, fruchtiges Aceton, säuerlich ^d
135		2	1,06	Apfel 1-2, flach 1-2, chemisch 1-2
136		2	1,09	fruchtig 2, Apfel 2, flach 1, chemisch 2
137		2	1,36	Apfel 1, flach 1, chemisch 1

^a, LKZ nach 24 h Fermentation; ^b, mit 10⁷ KbE/g gestartete Fermentation; ^c, LKZ t₀ < 10⁶ KbE/g; Fermentation mit 10⁴ – 10⁵ KbE/g gestartet; ^d, Geruch schnell verfliegen; n. b., nicht bestimmt.

Tabelle A.5: Einfluss der (Spontan-) Fermentationen der Teige (TA 200, 25 °C, 10⁶ KbE/g, 24 h) mit 25 % Apfeltrester und Zusatz von Chloramphenicol bzw. Cycloheximid auf den Geruch der Teige in Abhängigkeit der verwendeten Hefespezies.

Teig Spezies	Stamm	Charge	Hefe- wachstum log (N/N ₀)	Antibiotikum	Geruch nach 24 h Fermentation
138 <i>C. jadinii</i>	DIL 1047	1	2,68	Cl	fruchtig 0-1, Apfel 1, grün 1
139 <i>D. bruxellensis</i>	DIL 74	1	0,55	Cl	Apfel 2
140	DIL 75	1	-1,91	Cl	süßlich 1, muffig 1
141 <i>H. uvarum</i>	DIL 595	1	3,68 ^a	Cl	fruchtig 1, süßlich 2, chemisch 1
142 <i>K. marxianus</i>	DIL 43	1	3,55 ^a	Cl	fruchtig 1, flach 2, kernig 1
143	DIL 82	1	1,79	Cl	fruchtig (Mango/Passionsfrucht) 1
144 <i>P. membranifaciens</i>	DIL 176	1	1,10	Cl	käsigt 1-2
145 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	1	1,97	Cl	flach 1
146 <i>S. saitoi</i>	DIL 77	1	3,22	Cl	Apfel 1, moderig/muffig 1
147 Spontanflora		1	1,11	Cl	warmer Apfel 2
148		1	< 1	Cl, Cd	kernig 1, Apfel 1
149		1	< 2	Cl, Cd	kernig 1, arttypisch 1
150		1	< 3 ^a	-	Apfel 2
151		1	< 1	-	Apfel
152		2	2,39	Cl, Cd	Marzipan, kernig
153		2	6,2 × 10 ^{6b}	-	Apfel 0-1, Marzipan, abgerundet
154		2	1,00	-	Getreide. Marzipan
155		4	< 2	-	Haferschleim, Marzipan
156		4	< 4	-	kernig 1, Hafer 1, Getreide 1
157		5	< 1	Cl	Bittermandel, Marzipan, mehlig
158		5	< 1	-	Müsli, Getreide, Marzipan, Bauernhof
159 <i>T. delbrueckii</i>	DIL 111	1	1,34	Cl	Apfel 1-2, kernig 1 ^c
160	DIL 97	1	2,72	Cl	Apfel 1-2, kernig 1, säuerlich 1 ^c
161	DIL 58	1	1,90	Cl	säuerlich 2
162 <i>T. pretoriensis</i>	DIL 123	1	1,84	Cl	Apfel 1-2
163 <i>W. anomalus</i>	DIL 114	1	1,76	Cl	chemisch 3
164	DIL 151	1	1,82	Cl	Apfel 2, säuerlich 1-2

^a, LKZ t₀ < 10⁶ KbE/g; Fermentation mit 10⁴ – 10⁵ KbE/g gestartet

^b, LKZ nach 24 h Fermentation;

^c, deutlich abflachender Geruch;

Cd, Cycloheximid; Cl, Chloramphenicol

Tabelle A.6: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200, 25 °C, 10⁶ KbE/g) mit Zusatz von 25 % getrockneten Biertreber durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien, pH-Wert und Geruch.

Teig	Spezies	Stamm	Charge	Hefe- wachstum (log(N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert	Geruch
165	<i>D. bruxellensis</i>	DIL 166	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1
166		DIL 1048	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2, Vollkorn 1
167		DIL 1200	1	0,40 ^a	1,1 × 10 ⁴	n. b.	Vollkornbrot 1-2
168		DIL 1201	1	0,00 ^a	4,4 × 10 ⁵	5,5	Bier 2, muffig 2, säuerlich 2
169		DIL 1202	1	0,02 ^a	<10 ³	5,5	Bier 1, fruchtig (Banane) 1 ^b , (Vollkorn-) Brot?
170		DIL 1203	1	-0,05 ^a	<10 ³	5,4	Bier 1, fruchtig (Banane) 1-2 ^c
171	<i>H. uvarum</i>	DIL 42	1	> 2,0 ^d	<10 ³	5,6	Bier 2, fruchtig (Banane) 1 ^b
172		DIL 168	1	3,11 ^d	5,4 × 10 ⁵	5,7	Biertreber (strohig, Kleie) 1-2, süßlich 0-1
173		DIL 192	1	2,91 ^d	2,0 × 10 ⁵	5,5	Bier 2
174		DIL 595	1	2,48 ^d	2,2 × 10 ⁵	5,7	Biertreber (strohig, Kleie) 1, fruchtig (Banane) 1 ^b

Tabelle A.6: Fortsetzung.

Teig	Spezies	Stamm	Charge	Hefe- wachstum (log(N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert	Geruch
175			1	2,68 ^d	1,9 × 10 ⁴	5,4	Bier 2, fruchtig (Banane) 1 ^b
176			2	1,98 ^d	2,0 × 10 ⁵	5,6	Bier 2, fruchtig (Banane) 1 ^b
177		DIL 596	1	> 2,5 ^d	3,4 × 10 ⁵	5,4	Bier 1, fruchtig (Banane) 1 ^c
178			2	> 2,0 ^d	1,8 × 10 ⁵	5,6	Bier 1, fruchtig (Banane) 1-2 ^c
179			1	2,77 ^d	1,5 × 10 ⁵	5,7	fruchtig (Banane) 1-2 ^b
180		DIL 597	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1
181	<i>K. exigua</i>	DIL 181	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2
182	<i>K. lactis</i>	DIL 194	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2
183	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	1	2,89 ^d	3,5 × 10 ⁵	5,7	fruchtig (Banane) 1 ^b , chemisch 1
184			1	0,93	4,4 × 10 ⁵	5,5	Bier 1, alkoholisch 1-2
185			2	1,07	1,2 × 10 ⁶	5,4	Bier 2
186		DIL 82	1	0,85	1,5 × 10 ⁶	5,6	Bier 2, Apfel? Birne?
187			1	n. b.	n. b.	n. b.	flach 2, hefig 1
188		DIL 193	1	< -1	2,1 × 10 ⁵	5,5	Bier 2
189		DIL 610	1	0,69	1,2 × 10 ⁶	5,6	Bier 2
190			1	n. b.	n. b.	n. b.	flach 2
191		DIL 1049	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2, muffig 0-1 ^b
192	<i>P. fermentans</i>	DIL 175	1	n. b.	n. b.	n. b.	abgestandenes Hefeweizen
193		DIL 590	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2
194		DIL 1051	1	1,32	2,7 × 10 ⁶	5,5	Bananenweizen 1
195			1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier/Bierwürze, frisches Hefeweizen
196	<i>P. haplophila</i>	DIL 145	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1, flach 1, Hefeweizen ^b
197	<i>P. membranifaciens</i>	DIL 45	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1
198		DIL 83	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2, dumpf 2; Schweiß, später Getreide
199		DIL 176	1	0,53	3,3 × 10 ⁴	n. b.	Schweißfuß
200	<i>S. saitoi</i>	DIL 77	1	0,45	1,6 × 10 ⁵	n. b.	Bier 1
201	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 58	1	0,51	1,5 × 10 ⁵	5,4	Bier 1, Fäulnis 1
202		DIL 86	1	0,63	2,5 × 10 ⁵	5,4	Bier 2
203		DIL 97	1	2,00	1,1 × 10 ⁵	5,7	Biertreber (strohig, Kleie) 0-1
204		DIL 111	1	0,35	<10 ³	5,5	Bier 2
205		DIL 113	1	< -1,0	1,3 × 10 ⁴	5,4	Bier 2
206		DIL 186	1	1,10	2,2 × 10 ⁵	5,2	Bier 2
207			2	1,76	9,8 × 10 ³	5,5	Bier 2
208			2	1,74	9,7 × 10 ⁴	5,6	Bier 2
209			2	1,70	1,7 × 10 ⁵	5,6	Bier 2
210		DIL 1054	1	1,27	2,8 × 10 ³	5,3	Bier 2
211	<i>T. pretoriensis</i>	DIL 123	1	0,98	5,6 × 10 ³	5,0	Bier 2
212		DIL 187	1	0,80	6,6 × 10 ⁵	5,2	Bier 2
213		DIL 1055	1	1,87	9,5 × 10 ³	5,2	Bier 2
214	<i>W. anomalus</i>	DIL 1050	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1, chemisch 2
215		DIL 114	1	1,64	2,8 × 10 ⁴	n. b.	Bier 1, chemisch 2
216		DIL 151	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 1 + komischer Geruch
217		DIL 174	1	n. b.	n. b.	n. b.	Bier 2, chemisch 2

^a, Fermentation mit 10⁷ KbE/g gestartet

^b, Geruch vollständig verflogen

^c, Geruch stark abgeflacht, aber nicht vollständig verflogen

^d, Fermentation mit 10⁴ – 10⁵ KbE/g gestartet

Tabelle A.7: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten Birtreber und Chloramphenicol auf das Wachstum der Hefen und Milchsäurebakterien, pH und Geruch der Teige. Die Hefeanzucht erfolgte nach Methode 2.

Teig	Spezies	Stamm	Hefewachstum (log(N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert	Geruch
218	Spontanflora		2 (<10 ⁵ KbE/g nach 24 h)	<10 ¹	5,7	Birtreber (strohig, Kleie) 1-2, süßlich 1 ^a
219	<i>H. uvarum</i>	DIL 168	3,75 ^b	<10 ²	5,8	fruchtig (Banane) 1 ^a
220		DIL 595	2,27 ^b	<10 ¹	5,7	fruchtig (Banane) 1-2 ^a
221		DIL 596	3,25 ^b	<10 ¹	5,7	fruchtig (Banane) 1 ^a , chemisch 1
222	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	3,00 ^b	<10 ¹	5,7	Birtreber (strohig, Kleie) 0-1, fruchtig (Banane) 0-1, süßlich 0-1
223	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 97	1,94	<10 ²	5,7	Birtreber (strohig, Kleie) 0-1, fruchtig (Banane) 0-1, süßlich 0-1

^a, Geruch verflogen; ^b, Fermentation mit 10⁴ – 10⁵ KbE/g gestartet

Tabelle A.8: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten Karottentrester (Charge 0 & 1) durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien, pH-Wert und Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig	Spezies	Stamm	Anzucht Charge	Wachstum Hefen (log (N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert	Geruch	
224	Spontanflora		0	0	[<10 ⁴ KbE/g ^f]	4,7 × 10 ⁴	5,4	Karotte 1, erdig 1
225	<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	2	1	1,03	1,8 × 10 ⁶	5,6	fruchtig 1, Karotte 1
226			2	1	0,93	1,5 × 10 ⁶	5,0	fruchtig 2, Sellerie
227			2	0	1,81	4,3 × 10 ⁶	5,0	Klebstoff 1 ^a , Karotte 1, erdig 1-2
228			2	0	0,94	1,3 × 10 ⁶	5,3	Klebstoff 2 ^a , Karotte 1, süßlich 1
229	<i>D. bruxellensis</i>	DIL 74	1	1	0,19 ^b	8,9 × 10 ⁶	5,6	süßlich 0-1, Kohl 0-1
230		DIL 75	1	1	0,75 ^b	1,2 × 10 ⁷	5,6	Karotte 1-2
231			1	1	0,35 ^b	8,4 × 10 ⁶	5,7	süßlich 2, Karotte 1, erdig 0-1
232		DIL 1201	2	1	-0,06 ^b	1,1 × 10 ⁷	5,5	Karotte 2, erdig 2, Wandfarbe?
233		DIL 1202	2	1	-0,18 ^b	1,2 × 10 ⁷	5,5	Karotte 1, erdig/Kohl 2
234		DIL 1203	2	1	-0,23 ^b	1,7 × 10 ⁵	5,5	Karotte 2, erdig 1, blumig 1 ^a
235	<i>H. uvarum</i>	DIL 168	2	1	4,74 ^d	9,3 × 10 ⁶	5,3	süßlich 2, Karotte 1
236		DIL 192	1	1	3,52 ^e	n. b.	5,3	Klebstoff 3 ^a , Karotte 1
237			2	1	3,52 ^e	5,3 × 10 ⁶	5,3	süßlich 2, Karotte 1, weiterer nicht zuordbarer Geruch
238		DIL 595	2	1	2,48 ^e	2,9 × 10 ⁶	5,4	süßlich 1, Karotte 1, weiterer nicht zuordbarer Geruch
239			2	1	2,52 ^e	3,8 × 10 ⁵	5,5	Karotte 2, flach 2, erdig 2, muffig 2
240			2	0	2,47 ^e	1,7 × 10 ⁵	5,2	flach 2, Karotte 1 ^a , Getreide?
241		DIL 596	1	1	4,02 ^e	n. b.	5,4	dumpf 2, erdig 2
242			2	1	> 2 ^d	7,6 × 10 ⁶	5,5	Karotte 2, erdig 2
243		DIL 597	2	1	3,18 ^e	2,2 × 10 ⁶	5,4	süßlich 2, Karotte 2
244	<i>K. lactis</i>	DIL 194	1	1	[<10 ⁶ KbE/g ^{e, f}]	<10 ⁶	5,7	süßlich 1, erdig 1, Blumenkohl
245	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	1	1	[7,4 × 10 ⁷ KbE/g ^f]	<10 ⁶	4,9	fruchtig (Mango/Passionsfrucht) 0-1, süßlich 1-2
246			2	1	2,00	8,3 × 10 ⁵	4,9	Karotte 1, süßlich 1
247			2	0	1,97 ^e	2,7 × 10 ⁵	n. b.	Karotte 2
248			2	0	0,69	9,5 × 10 ⁶	4,7	Karotte 2, angenehm
249		DIL 82	2	1	1,97	5,3 × 10 ⁶	5,0	Karotte 2, süßlich 1, fruchtig 1, chemisch 2 ^a
250			2	1	1,92	1,1 × 10 ⁶	4,5	fruchtig-blumig 2, Karotte 1-2, Klebstoff ^a
251			2	0	2,25	1,1 × 10 ⁵	n. b.	Karotte 2, süßlich 1, erdig 1

Tabelle A.8: Fortsetzung.

Teig	Spezies	Stamm	Anzahl	Charge	Wachstum Hefen (log (N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert	Geruch
252			2	0	0,88	$5,1 \times 10^6$	4,7	süßlich 2, Karotte 2, chemisch 1-2 ^a
253			2	0	1,01	$2,7 \times 10^6$	4,8	chemisch mit Birne 0-1, holzig, unangenehm
254			2	0	1,23	$8,9 \times 10^6$	4,7	fruchtig 1, süßlich 1, Karotte 1, chemisch 1-2
255			2	0	2,03	$3,0 \times 10^5$	n. b.	süßlich 2, Karotte 2, chemisch 1 ^a
256			2	0	2,41	$3,7 \times 10^5$	4,4	fruchtig 1 ^a , Karotte 2, chemisch 2, erdig 2; später flach
257			2	0	0,66	$7,7 \times 10^4$	4,7	Karotte 2, flach 2, Getreide?
258			2	0	2,51	$5,8 \times 10^4$	5,4	Klebstoff 2 ^a , Karotte 1-2, erdig 1-2, schwere angenehme Süße 1
259		DIL 193	2	1	0,29	$1,6 \times 10^6$	5,5	Karotte 2, süßlich 2
260		DIL 610	2	0	1,35	$5,6 \times 10^6$	n. b.	Karotte 1, erdig 1, chemisch 1
261			2	0	0,98	$2,3 \times 10^6$	4,9	holzig, unangenehm
262			2	0	1,63	$3,5 \times 10^6$	4,6	fruchtig 0-1, Karotte 2, chemisch 1, später: flach
263			2	0	1,73	$5,4 \times 10^6$	4,7	süßlich 0-1, Karotte 1, chemisch 0-1
264			2	0	1,88	$7,1 \times 10^6$	4,6	fruchtig 0-1, Karotte 2, chemisch 2
265			2	0	0,71	$1,2 \times 10^6$	4,9	Karotte 2, flach 1, erdig 1
266			2	0	1,18	$2,0 \times 10^5$	5,0	Klebstoff 2-3 ^a , mehlig, Getreide 1, süßlich 1, Karotte 1
267			2	0	1,29	$5,2 \times 10^5$	4,9	Klebstoff 3 ^a , Karotte 1-2, fruchtig- süßlich 1
268			2	0	1,96	$3,9 \times 10^4$	4,5	Klebstoff 2 ^a , Karotte 1
269			2	0	1,76	$4,1 \times 10^3$	4,6	Klebstoff 2 ^a , Karotte 2, erdig 1-2
270			1	1	1,59	$3,1 \times 10^7$	5,0	chemisch 1-2, erdig 1, mostig 1, später: frisch 1, fruchtig 1-2
271			1	1	2,06	$4,8 \times 10^6$	5,1	süßlich 1, chemisch 1, erdig 1
272			1	1	1,98	$<10^6$	5,2	blumig 2, frisch 2, fruchtig 2
273		DIL 1049	1	1	1,29	$<10^5$	5,0	blumig 1, süßlich 2, Karotte 1, chemisch 2
274	<i>P. membranifaciens</i>	DIL 176	2	1	0,74	$1,4 \times 10^6$	5,6	süßlich 2, Karotte 2
275	<i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	1	0	2,26	$7,8 \times 10^6$	5,4	muffig 2, stechend 2, Karotte 2
276	<i>S. saitoi</i>	DIL 77	2	0	1,18	$7,9 \times 10^6$	n. b.	Karotte 1, erdig 2
277	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 58	2	1	1,24	$1,8 \times 10^5$	5,2	Karotte 1-2, säuerlich/stechend 1
278		DIL 86	2	1	1,76	$1,3 \times 10^6$	5,3	Karotte 2
279		DIL 97	2	1	2,04	$1,3 \times 10^6$	5,4	Karotte 2
280		DIL 111	2	1	< -1 [$<10^5$ KbE/g ^f]	$8,8 \times 10^3$	5,4	Karotte 2, süßlich 1, flach 1
281		DIL 113	1	1	2,07	$1,8 \times 10^7$	5,3	dumpf/muffig ^a , süßlich 1, fruchtig 1
282		DIL 186	2	1	1,38	$2,3 \times 10^6$	5,2	süßlich 1, Karotte 2, erdig 1-2
283		DIL 1054	2	1	1,96	$4,0 \times 10^6$	4,7	Fäkalien ^a , erdig 2, knetig 1-2
284			2	1	1,91	$2,8 \times 10^5$	5,0	fruchtig 2 ^c , Karotte 2
285			2	0	1,68	$1,8 \times 10^7$	5,0	Karotte 2, erdig 2
286	<i>T. pretoriensis</i>	DIL 123	2	1	1,67	$2,1 \times 10^6$	5,0	Karotte 2, fruchtig (tropisch 1) ^a , erdig 1
287		DIL 187	2	1	0,98	$4,4 \times 10^4$	5,0	Karotte 2
288		DIL 1055	2	1	2,35	$3,1 \times 10^6$	4,9	fruchtig/säuerlich 1 ^a , Karotte 2
289	<i>W. anomalus</i>	DIL 114	1	1	2,04	$1,5 \times 10^7$	5,2	chemisch 3, süßlich 1, Karotte 1
290		DIL 1050	2	0	0,40	$1,9 \times 10^5$	5,1	keine Karotte, chemisch 3 ^a , Holzleim?

^a, Geruch vollständig verflogen; ^b, Fermentation mit 10^7 KbE/g gestartet ; ^c, Geruch stark abgeflacht, aber nicht vollständig verflogen; ^d, Fermentation mit $< 10^4$ KbE/g gestartet; ^e, Fermentation mit $10^4 - 10^5$ KbE/g gestartet; ^f, LKZ nach 24 h Fermentation; n. b., nicht bestimmt

Tabelle A.9: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten Karottentrester (Charge 0 & 1) durch alternative Hefen auf das Wachstum Hefen sowie den nach 24 h resultierenden pH-Wert und Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig Spezies	Stamm	Anzucht Charge	Wachstum Hefen log (N/N ₀)	pH-Wert	Geruch
291 Spontanflora		0 1	<2 [$< 10^5$ ^a]	5,7	Karotte 2, erdig 1
292		0 1	1,14 [$3,3 \times 10^3$ ^a]	6,3	süßlich 0-1, Karotte 2, erdig 1
293 <i>C. jadinii</i>	DIL 1047	2 1	1,30	5,3	fruchtig 2, Karotte 1
294 <i>D. bruxellensis</i>	DIL 74	1 1	0,25 ^b	5,5	süßlich (schwer) 1-2, Karotte 2
295	DIL 75	1 1	0,13 ^b	5,6	Karotte 1-2
296 <i>H. uvarum</i>	DIL 168	2 1	4,08 ^c	5,5	süßlich 1, Karotte 1
297	DIL 192	2 1	3,61 ^d	5,5	süßlich 1-2, Karotte 1, chemisch 0-1
298	DIL 595	2 1	2,21 ^d	5,4	Karotte 1
299	DIL 596	1 1	3,34 ^d	5,3	Karotte 2, Klebstoff 2
300	DIL 597	2 1	2,88 ^d	5,5	süßlich 1, Karotte 1, chemisch 2
301	DIL 192	1 1	3,25	5,2	Karotte 2, fruchtig 1
302 <i>K. lactis</i>	DIL 194	1 1	<1 ^d [$< 10^6$ ^a]	5,7	süßlich 1, erdig 1
303 <i>K. marxianus</i>	DIL 43	1 1	[$< 10^6$ ^a]	4,9	fruchtig 0-1, süßlich 2
304	DIL 610	1 1	0,94	5,1	blumig 2, frisch 2, fruchtig 2, chemisch 1
305	DIL 1049	1 1	1,32	4,9	süßlich 2, fruchtig 1 ^e
306 <i>P. membranifaciens</i>	DIL 176	2 1	1,00	5,8	süßlich 1, Karotte 2
307 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	1 0	2,28	5,3	Karotte 2, bitterer Unterton 2
308 <i>T. delbrueckii</i>	DIL 113	1 1	2,24	5,3	Karotte 2, Aceton 2
309 <i>W. anomalus</i>	DIL 114	1 1	1,34	5,7	chemisch 3, süßlich 2

^a, LKZ nach 24 h Fermentation; ^b, Fermentation mit 10^7 KbE/g gestartet; ^c, Fermentation mit $< 10^4$ KbE/g gestartet; ^d, Fermentation mit $10^4 - 10^5$ KbE/g gestartet; ^e, Geruch stark abgeflacht, aber nicht vollständig verflogen

Tabelle A.10: Effekt der Fermentation von Weizenteigen mit Zusatz von Karottentrester (Charge 2 und 3) durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen und pH-Wert sowie den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien und Geruch in Abhängigkeit der Tresterkonzentration und TA. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert. Die Anzucht der Hefen erfolgte nach Methode 2.

Teig Spezies	Stamm	TA	% Trester Charge	Wachstum Hefen (log (N/N ₀))	LKZ MSB (KbE/g)	pH-Wert t ₀ t ₂₄	Geruch
310 <i>C. jadinii</i>	DIL 1047	200	25 2	-0,17	$1,3 \times 10^9$	5,7 4,0	chemisch (überreife Banane) 1-2, fruchtig 1
311 <i>K. marxianus</i>	DIL 43	200	25 2	0,43	$2,5 \times 10^8$	5,7 3,9	chemisch 1, Karotte 1, flach 2
312 <i>K. marxianus</i>	DIL 82	200	25 2	1,92	$6,5 \times 10^8$	5,7 3,9	angenehmer Fruchtgeruch 2, Steinobst (Quitte?) 2
313 <i>K. marxianus</i>	DIL 610	200	25 2	0,72	$5,8 \times 10^8$	5,8 3,9	flach 3
314 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	200	25 2	2,26	$6,5 \times 10^8$	5,8 4,0	(Erd-)beerig 2 ^d , säuerlich 1
315 <i>T. delbrueckii</i>	DIL 1054	200	25 2	0,87	$1,3 \times 10^6$	5,8 4,0	säuerlich 0-1
316 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	200	100 2	2,53 ^a	$6,9 \times 10^8$	4,9 3,9	chemisch 3 (bleibt), später: frischer Karottentrester
317 <i>K. marxianus</i>	DIL 82	200	100 2	2,51 ^a	$6,2 \times 10^8$	4,9 3,9	Karottentrester 1, chemisch 2 ^e
318 Spontanflora ^b		200	100 2	> 1 [$1,1 \times 10^3$ ^c]	$7,2 \times 10^4$	4,9 4,7	frischer Karottentrester 2-3, angewärmte Karotten
319 <i>S. cerevisiae</i>	DSM 70449	100	100 2	1,17	$4,4 \times 10^8$	4,8 4,1	verdorbener Teig
320 <i>K. marxianus</i>	DIL 82	100	100 2	2,55 ^a	$4,5 \times 10^6$	4,8 3,8	chemisch 3 (bleibt)
321 Spontanflora ^b		100	100 2	> 5 [$3,2 \times 10^5$]	$9,7 \times 10^5$	4,8 4,6	frischer Karottentrester 2; angewärmte Karotten
322 <i>K. marxianus</i>	DIL 82	200	25 3	2,10	$3,6 \times 10^8$	5,2 3,9	blumig 1, süßlich 1, Karotte 2, chemisch 2 ^d , angenehm
323 <i>C. jadinii</i>	DIL 1047	200	25 3	0,71	$3,4 \times 10^8$	5,2 4,1	Karotte 0-1, muffig 2, beißend

^a, Fermentation mit 10^5 KbE/g gestartet; ^b, mit Chloramphenicol; ^c, Lebendkeimzahl (LKZ) nach 24 h Fermentation; ^d, Geruch vollständig verflogen; t₀, Fermentationsbeginn; t₂₄, Fermentationsende nach 24 h.

Tabelle A.11: Effekt der Fermentation von Weizenteigen mit Zusatz von frischem Traubentrester durch alternative Hefen auf die Lebendkeimzahlen und Wachstum der Hefen und Milchsäurebakterien, den pH-Wert sowie dem nach 24 h resultierenden Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert. Die Hefeanzucht erfolgte nach Methode 2.

Teig Spezies	Stamm	Trester		TA	LKZ Hefen (KbE/g)		Wachstum (log(N/N ₀))		LKZ MSB (KbE/g)		pH-Wert		Geruch
		%	Sorte		t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄			
324	Spontanflora	100	Portugieser	100	1,1 × 10 ⁷	1,9 × 10 ⁷	0,2	2,8 × 10 ²	<10 ¹	3,5	3,5	Glühwein mit Schuss 1-2	
325		100	Riesling	100	1,2 × 10 ⁵	n. b.	n. b.	7,5 × 10 ²	3,2 × 10 ⁴	3,5	3,5	Nagellack 2, Klebstoff 2,	
326		100	weißer Burgunder	100	8,3 × 10 ⁵	5,6 × 10 ⁸	2,8	1,1 × 10 ⁴	5,3 × 10 ⁴	3,8	3,7	Aceton, Nagellackentferner 2-3	
327		25	Portugieser	200	2,1 × 10 ⁶	1,2 × 10 ⁸	1,8	<10 ¹	1,5 × 10 ³	4,1	4,1	Rotweincreme 1, Sherry 1, sauerlich 1	
328		25	Riesling	200	1,0 × 10 ⁴	6,1 × 10 ⁶	2,8	<10 ²	1,2 × 10 ⁶	4,1	3,6	holzige 2, nussig 1	
329		25	weißer Burgunder	200	7,7 × 10 ⁴	3,0 × 10 ⁷	2,6	8,9 × 10 ²	2,5 × 10 ⁷	4,5	4,4	holzige 1, nussig 0-1	
330	<i>K. marxianus</i> DIL 82	100	Portugieser	100	1,0 × 10 ⁷	1,6 × 10 ⁷	0,2	<10 ²	<10 ¹	3,5	3,5	alkoholischer Rotwein; Glühwein	
331		100	Riesling	100	1,4 × 10 ⁶	4,4 × 10 ⁸	2,5	<10 ²	2,2 × 10 ⁴	3,5	3,5	Schimmel 2, Chemieschrank 2, Nagellack 2, Aceton 2	
332		100	weißer Burgunder	100	2,4 × 10 ⁶	5,1 × 10 ⁸	2,3	2,0 × 10 ⁴	3,5 × 10 ⁴	3,7	3,6	Schimmel 3, Chemieschrank 3, Nagellack 3, Aceton 3	
333		25	Portugieser	200	3,3 × 10 ⁶	8,0 × 10 ⁷	1,4	<10 ¹	7,4 × 10 ²	4,2	4,1	schwere Rotweincreme, reiner	
334		25	Riesling	200	1,3 × 10 ⁶	8,4 × 10 ⁶	0,8	<10 ²	8,1 × 10 ⁵	4,2	4,1	süßlich (Honig) 1, Traube 1, sauerlich 1, Getreide/nussig 0-1	
335		25	weißer Burgunder	200	1,5 × 10 ⁶	1,1 × 10 ⁷	0,9	3,7 × 10 ²	2,0 × 10 ⁷	4,5	4,4	nussig 1, Honig 1, chemisch 1-2	

n. b., nicht bestimmt; t₀, Fermentationsbeginn; t₂₄, Fermentationsende nach 24 h, MSB: Milchsäurebakterien.

Tabelle A.12: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten Portugieser (Charge 2) durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien, pH-Wert und Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig Spezies	Stamm	Anzucht Hefen	Wachstum Hefen (\log^b (N/N0))	LKZ MSB (KbE/g)	pH- Wert		Geruch
					t_0	t_{24}	
336 Spontanflora		0	> 4 ($< 2 \times 10^6$ ^a)	$<10^2$	3,9		Alkohol 1, Wein 1
337		0	3,36 ($1,9 \times 10^6$ ^a)	$<10^2$	n. b.		grüne Stängel, Wein 1
338 <i>C. tropicalis</i>	DIL 3128	23	1,18	$<10^1$	4,0		Rotwein 2-3, säuerlich, Traubensaft
339	DIL 3129	23	1,46	$<10^1$	4,0		süß-säuerlich, Rotwein
340 <i>H. uvarum</i>	DIL 3136	23	> 3 ^b ($5,5 \times 10^6$ ^a)	$<10^2$	3,8		Rotwein 1-2
341 <i>K. marxianus</i>	DIL 43	9	1,25	$<10^1$	n. b.		Rotwein 1, alkoholisch 2
342	DIL 82	23	0,85	$<10^1$	3,8		Rotwein 1, alter Apfel?, sehr flach
343		2	1,16	$2,7 \times 10^4$	3,8		Rotwein, korkig 1
344		9	1,29	$<10^2$	n. b.		Rotwein 0-1, alkoholisch 1, dunkle Schokolade
345		23	1,06	$<10^1$	3,7		Alkohol/Rotwein, fruchtig 2
346		23	1,52	$<10^1$	3,8		Alkohol/Klebstoff 2-3, flach
347		23	1,51	$5,5 \times 10^3$	4,0		Banane, fruchtiger Rotwein, alkoholisch 1, flach
348		23	1,59	$2,8 \times 10^4$	4,0		alkoholisch 2, Rotwein, säuerlich
349		23	1,46	$<10^1$	3,8		Schokolade, alkoholisch 0-1, flach
350		23	1,52	$<10^1$	3,8		Schokolade, Rotwein, kein Alkohol
351		23	1,67	$1,8 \times 10^2$	3,7		flach
352	DIL 610	9	1,59	$<10^2$	n. b.		Rotwein 0-1, alkoholisch 1, dunkle Schokolade, flach
353	DIL 3127	23	1,35	$<10^1$	4,1		Rotwein 2, später Traubensaft 1-2
354	DIL 3143	23	1,14	$<10^1$	3,9		sehr flach
355 <i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3155	23	1,54	$<10^1$	n. b.		fruchtig (Traubensaft), süßlich
356	DIL 3157	23	1,45	$<10^1$	n. b.		fruchtig (Traubensaft, Rotwein), süßlich
357 <i>R. nothofagi</i>	DIL 3138	23	-0,08	$<10^1$	3,7		Rotwein 2-3
358 <i>S. cerevisiae</i>	DIL 3148	23	2,21	$<10^1$	3,9		sehr flach
359 <i>T. delbrueckii</i>	DIL 1054	9	2,88 ^c	$<10^2$	n. b.		flach, nicht definierbar, aber interessant
360	DIL 3140	23	1,41	$<10^1$	4,0		sehr flach
361 <i>W. anomalus</i>	DIL 1050	9	0,88	$<10^2$	n. b.		Rotwein 1, chemisch 3

^a, Lebendkeimzahl (LKZ) nach 24 h Fermentation; ^b, Fermentation mit $<10^3$ KbE/g gestartet; ^c, Fermentation mit 10^5 KbE/g gestartet; MSB, Milchsäurebakterien.

Tabelle A.13: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten weißen Burgunder (Charge 2) durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen, den pH-Wert und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien und Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig Spezies	Stamm	Anzucht Hefen	Wachstum Hefen (\log^b (N/N0))	LKZ MSB (KbE/g)	pH-Wert		Geruch
					t_0	t_{24}	
362 Spontanflora		0	> 4 ($1,2 \times 10^7$ ^a)	$1,4 \times 10^5$	4,4	4,3	flach, muffig 1
363		0	> 5 ($1,3 \times 10^7$ ^a)	$3,7 \times 10^5$	4,3	4,3	Kerngehäuse 1, erdig 1, flach
364 <i>C. tropicalis</i>	DIL 3128	23	2,54 ^b	$<10^3$	n. b.	4,4	undefiniert
365	DIL 3129	23	1,77	$<10^3$	n. b.	4,4	undefiniert

Tabelle A.13: Fortsetzung.

Teig	Spezies	Stamm	Anzucht Hefen	Wachstum Hefen ((N/N_0))	LKZ MSB (KbE/g)	pH-Wert		Geruch
						t_0	t_{24}	
366	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	23	1,68	$3,9 \times 10^4$	4,0	3,9	Traubenkerne 1-2, alkoholisch 1, muffig 1
367		DIL 82	23	0,64	$<10^1$	4,1	4,1	Traube 1, Kerne 1, mostig 1, chemisch 2 ^c
368		DIL 3127	23	1,92	$7,0 \times 10^2$	n. b.	4,4	säuerlich 1, fruchtig? abflachend, chemisch 2-3 ^c
369	<i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3143	23	1,90	$<10^1$	n. b.	4,2	Zitrone 1, alkoholisch 2
370		DIL 3155	23	1,16	$2,8 \times 10^4$	n. b.	n. b.	säuerlich 1, Apfel?, fruchtig?, flach
371		DIL 3157	2	0,81	$1,3 \times 10^3$	n. b.	n. b.	Getreide? Apfel? Traube, fruchtig, flach

^a, LKZ nach 24 h Fermentation; ^b, Fermentation mit 10^5 KbE/g gestartet; ^c, Geruch vollständig verflogen; t_0 , Fermentationsbeginn; t_{24} , Fermentationsende nach 24 h.

Tabelle A.14: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % getrockneten Riesling (Charge 2) durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen, den pH-Wert und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien und Geruch. Die Teige wurden für 24 h bei 25 °C fermentiert.

Teig	Spezies	Stamm	Anzucht Hefen	Wachstum Hefen ((N/N_0))	LKZ MSB (KbE/g)	pH-Wert		Geruch
						t_0	t_{24}	
372	Spontanflora		0	0,02 ^a	$1,7 \times 10^3$	4,0	4,0	muffig 2, erdig 2, flach
373			0	$<10^5$ ^{b, c}	$<10^2$	4,2	4,1	flach, muffig 1-2, erdig
374	<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	19	0,81	$1,7 \times 10^2$	4,3	4,2	chemisch 1, Kartoffel/Stärke/Getreide 1, flach
375	<i>H. uvarum</i>	DIL 3136	23	>3 ^b ($5,8 \times 10^6$ ^c)	$<10^1$	n. b.	4,0	getreideähnlich
376	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	19	1,94	$8,5 \times 10^3$	4,2	4,1	chemisch 2 ^d , säuerlich 1 ^d , fruchtig 2
377			19	1,10	$2,1 \times 10^4$	4,0	4,1	chemisch 1-2, flach
378			23	1,52	$<10^1$	3,7	3,7	frischer Traubentrester, Obstaroma?
379		DIL 82	19	2,04	$6,0 \times 10^3$	4,2	4,1	chemisch 3 ^d , Traube 1, fruchtig 1
380			2	0,68	$6,1 \times 10^2$	3,9	3,8	fruchtig 1, süßlich 1, Traube 2, Kernig 1, mostig 1
381			2	1,11	$2,5 \times 10^6$	3,9	3,8	fruchtig 0-1, süßlich 0-1, Traube 1, mostig 1, chemisch (Autolack) 2
382			23	1,19	n. b.	4,0	4,1	chemisch (Nagellackentferner) 2-3, flach
383		DIL 610	19	1,65	$2,4 \times 10^2$	4,2	4,1	chemisch 2 ^d , Traube 1
384	<i>Metschnikowia</i> sp.	DIL 3155	23	0,75	$<10^1$	n. b.	n. b.	fruchtig 1, säuerlich 2, flach
385		DIL 3157	23	0,96	$<10^2$	n. b.	n. b.	Apfel? Traube, fruchtig, flach
386	<i>R. nothofagi</i>	DIL 3138	23	0,64	$<10^1$	n. b.	4,1	anfangs unangenehm, später flach
387	<i>S. cerevisiae</i>	DIL 3148	23	2,58	$<10^1$	n. b.	4,0	alkoholisch, Banane?
388	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 1054	19	1,48	$1,7 \times 10^5$	4,2	4,2	mehlig 1-2, Getreide 1-2, Kartoffel 1-2
389		DIL 3140	23	1,43	$<10^1$	n. b.	4,1	sehr flach
390	<i>W. anomalus</i>	DIL 1050	19	0,91 ^a	$9,3 \times 10^3$	4,3	4,2	Alkohol 2, mehlig 1-2, Getreide 1-2, Kartoffel 1-2

^a, Fermentation mit 10^5 KbE/g gestartet; ^b, Fermentation mit 10^3 KbE/g gestartet; ^c, Lebendkeimzahl (LKZ) nach 24 h Fermentation; ^d, Geruch vollständig; t_0 , Fermentationsbeginn; t_{24} , Fermentationsende nach 24 h.

A 4. Optimierung der Prozessparameter

Tabelle A.15: Effekt der Fermentation von Weizenteigen (TA 200) mit Zusatz von 25 % Trester bei 30 °C durch alternative Hefen auf das Wachstum der Hefen, den pH-Wert und den nach 24 h resultierenden Lebendkeimzahlen der Milchsäurebakterien und Geruch.

Teig	Spezies	Stamm	Trester	Charge	Wachstum Hefen (log (N/N0))	LKZ MSB (KbE/g)	pH-Wert	Geruch
391	<i>C. jadinii</i>	DIL 1047	Karotte	4	0,08	$2,2 \times 10^9$	3,8	"Buttermilcharoma" --> stechend, Karotte 2, erdig 2
392	<i>W. anomalus</i>	DIL 1050	Apfel	4	0,83	$< 10^1$	3,8	Marzipan/Blausäure/Aceton 2-3 (unangenehm, aber schnell verflogen), Getreide
393			Apfel	5	0,96	$1,9 \times 10^2$	3,8	Apfel 1, muffig? Apfelkompott?
394	<i>T. delbrueckii</i>	DIL 1054	Karotte	4	1,24	$1,8 \times 10^9$	3,9	Karotte 2, erdig 1, ohne Buttermilch
395	<i>D. bruxellensis</i>	DIL 1202	Apfel	5	1,42	$< 10^2$	3,8	kernig/frittiert
396	<i>C. tropicalis</i>	DIL 3128	Apfel	5	2,03	$< 10^2$	3,7	kernig 2, Apfel 1-2
397			Karotte	4	1,53	$2,7 \times 10^9$	4,0	Karotte 2, erdig 2, angenehm
398	<i>S. cerevisiae</i>	DIL 3863	Apfel	5	2,02	$< 10^1$	3,9	Apfel 0-1, chemisch, unangenehm
399	<i>K. marxianus</i>	DIL 43	Apfel	4	1,55	$< 10^1$	3,6	fruchtig (tropisch) 1-2, Apfel 2
400			Apfel	4	1,49	$< 10^1$	4,0	fruchtig 0-1, Apfel 1
401			Karotte	4	1,25	$1,0 \times 10^9$	3,9	Karotte 1-2, erdig 0-1, chemisch 2-3
402			Riesling	2	1,52	$< 10^1$	3,7	wie frischer Traubentrester, Obstaroma?
403			weißer Burgunder	2	1,68	$3,9 \times 10^4$	3,9	Traubenkernaroma 1-2, leicht alkoholisch, muffig
404			weißer Burgunder	2	1,23	$1,7 \times 10^3$	3,8	Traube 1, chemisch 3
405		DIL 82	Karotte	4	-0,17	$2,4 \times 10^5$	4,6	käsigt, mehlig, fäkal
406			Karotte	4	1,60	$1,9 \times 10^9$	4,0	Karotte 1-2, erdig 1-2, chemisch 1-2
407			Portugieser	2	0,85	$< 10^1$	3,8	Rotwein 1, alter Apfel? --> sehr flach
408		DIL 3127	Karotte	4	1,99	$2,4 \times 10^9$	3,9	Karotte 2, erdig 1, chemisch 2-3

Tabelle A.18: Effekt der Fermentationszeit auf den Geruch der mit *K. marxianus* DIL 82, *C. tropicalis* DIL 3128, *S. cerevisiae* DSM 70449 fermentierten Teige mit Apfel- und Karottentrester. Zur Zuordnung der Fermentationsbedingungen der Teige 433 - 440 siehe Kapitel 3.4.5.

Zeit (h) Geruch Teig 433	
11	getreidig
13	Apfel, flach
15	Apfel, säuerlich
17	Apfel, säuerlich
19	Apfel, flach
21	Apfel, süßlich, säuerlich
23	Apfel, süß/säuerlich
40	Apfel, fruchtig, süßlich
70	Apfel, mostig, stark alkoholisch
91	erst alkoholisch und Klebstoff, später Apfel

Zeit (h) Geruch Teig 434	Geruch Teig 435	
12	flach, Müsli	Getreide, säuerlich, flach 1
14	säuerlich, getreidig	Getreide, säuerlich
15	säuerlich 2-3	Getreide, nicht säuerlich
18	Apfel 1-2, säuerlich 2, kernig	mostig, kernig, teigig, flach
20	Apfel 1-2, süß/säuerlich, Teigig/mehlig	mostig, teigig, flach
22	Apfel 2, frisch, säuerlich, süßlich 0-1, nicht teigig	teigig/mehlig, flach
36	Apfel 1-2, süßlich 1-2, chemisch	mostig, vergammelt 1-2
44	Apfel 2, frisch, säuerlich, süßlich 0-1, nicht teigig	Apfel, Biomüll
60	Apfel 1-2, chemisch	vergammelt, chemisch
68	schwerer Apfel, angenehmer Lösungsmittelgeruch?	Apfel, gammelig, schwerer Klebstoff

Zeit (h) Geruch Teig 436	Geruch Teig 437	
20	Apfel, mehlig, säuerlich	Apfel, alkoholisch, muffig
22	fruchtig, säuerlich, Apfel	Apfel, frisch, kernig
24	kernig?, Apfel 1-2, später flach	kernig, flach
26	flach, Apfel	flach, Apfel
28	Apfel	Apfel, kernig, flach
30	Apfel, Klebstoff, flach	Apfel, Klebstoff, sehr flach
44	muffig	alkoholisch, muffig
48	Apfel, Lösungsmittel, auch schöner Geruch, wenig Teig	schöner Apfel, flach, fruchtig
73	saurer Apfel, fruchtig, schön	schöner Apfel, nicht fruchtig

Zeit (h) Geruch Teig 438	Geruch Teig 439	
12	erdig 2	künstlich aromatisch, chemisch 1
14	Karotte 2, erdig 2	Karotte 1, chemisch 1-2
15	Karotte 2, erdig 1-2, chemisch 1	chemisch 2, Kartoffeln, flach, keine Karotte/erdig
18	Karotte 2, erdig 1	Kartoffeln, Karotte 1, erdig 0-1
20	Karotte 1-2, süßlich, Buttermilch	Karotte 1, erdig 0-1, chemisch 2, keine Kartoffeln
22	Karotte 1-2, säuerlich, erdig? Buttermilch	Karotte 1, chemisch 2-3
36	erdig 1-2	süßlich 1-2, chemisch 1-2
44	erdig/Karotte, süßlich	Karotte, süßlich, chemisch
60	Karotte, vergammelt	Klebstoff, Nagellackentferner
68	Karotte 1, erdig 2, gammelig, süßlich	Klebstoff 2-3

Tabelle A.18: Fortsetzung.

Zeit (h)	Geruch Teig 440
12	flach, süßlich 1
14	Karotte 2, Knete
15	künstlich, Karotte 1-2, erdig 0-1
18	Buttermilch? Käsig
20	Buttermilch
22	Buttermilch? Käsig
36	mehlig
44	Karotte, mehlig, muffig
60	mehlig, teigig
68	vergammelte Ananas, chemisch 1-2

Tabelle A.19: Effekt der Apfeltresterchargen und Aromabildung auf signifikante Unterschiede in der Lebendkeimzahl der Hefen. Angegeben ist der mittels ANOVA ermittelte Signifikanzwert p. Mit $p < 0,05$ können die Lebendkeimzahlen der Hefen nach 24 h Fermentation als signifikant unterschiedlich angesehen werden.

	Charge 4		Charge 5		Charge 6		Charge 7
	Aroma	Aroma	kein Aroma	Aroma	kein Aroma	kein Aroma	
Charge 1 (Aroma)	0,060	0,434	0,006	0,023	0,000	0,000	
Charge 4 (Aroma)		0,095	0,866	0,993	0,174	0,160	
Charge 5 (Aroma)			0,012	0,054	0,000	0,000	
Charge 5 (kein Aroma)				0,835	0,092	0,105	
Charge 6 (Aroma)					0,111	0,103	
Charge 6 (kein Aroma)						0,945	

Tabelle A.20: Effekt der Karottentresterchargen und Aromabildung auf signifikante Unterschiede in der Lebendkeimzahl der Hefen. Angegeben ist der mittels ANOVA ermittelte Signifikanzwert p. Mit $p < 0,05$ können die Lebendkeimzahlen der Hefen nach 24 h Fermentation als signifikant unterschiedlich angesehen werden.

	Charge 0	Charge 1	Charge 4	
	kein Aroma	Aroma	Aroma	kein Aroma
Charge 0 (Aroma)	0,052	0,939	0,298	0,007
Charge 0 (kein Aroma)		0,260	0,476	0,922
Charge 1 (Aroma)			0,474	0,087
Charge 4 (Aroma)				0,270

A 5. Analyse der Mikroflora in fermentierten Teigen

Tabelle A.21: Einfluss der Propagation der mit *K. marxianus* DIL 82, *W. anomalus* DIL 1050 oder/und *C. jadinii* DIL 1047 fermentierten Weizenteigen (TA 200, 25 °C, 10⁶ KbE/g, 24 h, Propagation mit 1 % fermentiertem Teig) mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5) auf den Geruch der Teige.

Teig	Inokulat	Zeit (Tage)	Geruch
441	<i>K. marxianus</i> DIL 82	1	Apfel 2, frisch 2, fruchtig 1, süßlich 1, chemisch 1
		2	fruchtig 1, Apfel 2, chemisch 1-2
		3	süßlich 1, Apfel 2
		4	schöner Apfel 1-2, chemisch 1, flach
442	<i>W. anomalus</i> DIL 1050	1	kernig, herb, alter Apfel, schwach, flach
		2	Bittermandel, Marzipan 1-2, Getreide, kernig, alkoholisch
		3	Marzipan/Getreide 1-2
		4	Marzipan/Getreide 2 (weniger werdend)
443	<i>C. jadinii</i> DIL 1047	1	kernig, herb, alter Apfel, schwach, flach
		2	Marzipan 2-3
		3	intensiver natürlicher Marzipangeruch, leicht abflachend
		4	Marzipan/Getreide 2 (weniger werdend)
444	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>W. anomalus</i> DIL 1050	1	Apfel 2, fruchtig 1, alkoholisch/chemisch 1, relativ flach
		2	Apfel 1-2, chemisch (gärig/mostig/alkoholisch/Lösungsmittel) 2, flach
		3	Apfel 1, säuerlich 1, flach
		4	schöner Apfel 1, chemisch 0-1, sehr flach
445	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>C. jadinii</i> DIL 1047	1	Apfel 2, etwas flach
		2	Apfel 1-2, chemisch 1
		3	sehr flach
		4	muffig? Apfel 1, chemisch 1-2, sehr flach
446	<i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>C. jadinii</i> DIL 1047	1	kernig, Getreide, kaum Apfel
		2	Getreide, Marzipan 2
		3	Marzipan 1
		4	Marzipan/Getreide 2
447	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>C. jadinii</i> DIL 1047	1	fruchtig, süßlich 1-2, Apfel 2, stabil, nicht abflachend
		2	fruchtig 1, Apfel 2, chemisch 1, etwas abgeflacht
		3	fruchtig 1, Apfel 2, alkoholisch 1-2
		4	nicht so schöner Apfel 1, chemisch 2, sehr flach

Tabelle A.22: Einfluss der Propagation der mit *K. marxianus* DIL 82, *W. anomalus* DIL 1050 oder/und *T. delbrueckii* DIL 1054 fermentierten Weizenteigen (TA 200, 25 °C, 10⁶ KbE/g, 24 h, Propagation mit 1 % fermentiertem Teig) mit Zusatz von 25 % Karottentrester (Charge 4) auf den Geruch der Teige.

Teig	Inokulat	Zeit (Tage)	Geruch der Teige
453	<i>K. marxianus</i> DIL 82	1	Karotte 1, erdig 1, chemisch 1, weiterer undefinierter Geruch
		2	blumig 1 (verfliegen), Karotte 2, erdig 1, chemisch 2
		3	Karotte 2, erdig 1-2, chemisch 2
		4	Karotte 1, chemisch 2, muffiger, rauchig, alte Karotte
454	<i>W. anomalus</i> DIL 1050	1	Karotte 1, erdig 1, chemisch 1, stechend 1, weiterer undefinierter Geruch
		2	blumig 1-2, Karotte 2, buttermilchähnlich
		3	fruchtig 1, Karotte 2, schöner Geruch, aber schimmeliger Teig
		4	Karotte 1, erdig 1, nicht so schön
455	<i>T. delbrueckii</i> DIL 1054	1	Karotte 1-2, mild
		2	Karotte 2, weiterer undefinierter Geruch
		3	blumig 1, fruchtig 1, Karotte 2
		4	Karotte 1, chemisch 2, muffig, rauchig, alte Karotte, nicht schön, Schweißnote?
456	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>W. anomalus</i> DIL 1050	1	fruchtig 1, Karotte?, rauchig, chemisch 2
		2	Karotte 1, rauchig?
		3	fruchtig 1 (verfliegen), Karotte 2, chemisch 1-2, rauchig (verfliegen)
		4	Karotte 1, chemisch 1, herb?, nicht unangenehm, aber auch nicht so schön
457	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>T. delbrueckii</i> DIL 1054	1	fruchtig 1, Karotte 1, chemisch 1, nicht besonders intensives Aroma
		2	blumig?, Karotte 1, chemisch 2, sehr flach
		3	blumig/fruchtig/süßlich?, rauchig, Karotte 2, chemisch 2-3, ganz schöner Geruch
		4	Karotte 0-1, chemisch 0-1, herb?, nicht unangenehm, aber auch nicht so schön, relativ flach
458	<i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>T. delbrueckii</i> DIL 1054	1	Karotte 1-2, chemisch 1, nicht unangenehm, nichts Besonderes
		2	Karotte 1-2, säuerlich/buttermilchähnlich, sehr schwacher Geruch
		3	Karotte 1, säuerlich?, muffig?, von Anfang an recht flach, aber nicht schwächer geworden
		4	säuerlich/süßlich, Karotte 1, herb?
459	<i>K. marxianus</i> DIL 82, <i>W. anomalus</i> DIL 1050, <i>T. delbrueckii</i> DIL 1054	1	Karotte 1-2, chemisch 1, nicht unangenehm, nichts Besonderes
		2	Karotte 1, säuerlich 1
		3	Karotte 1, säuerlich?, muffig?, von Anfang an recht flach, aber nicht schwächer geworden
		4	Karotte 1-2, erdig 1, nicht so schön

A 6. Aromaextraktverdünnungsanalysen mittels GC/O

Tabelle A.23: GC/O-Analyse 1 des mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C fermentierten Weizenteig mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 5, TA 200, 10⁶ KbE/g). Die detektierten Verbindungen sind zusammen mit ihrer Geruchsqualität, ihrem Retentionsindex (RI) und dem Verdünnungsfaktor (Flavour Dilution Factor, FD) dargestellt. Die Verbindungen mit einer fruchtigen oder blumigen Geruchsqualität sind fett markiert.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD
2,3-Butandion	Butter	942	256
Ethylbutanoat	fruchtig	1010	2
Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	1031	32
Hexanal	grün, grasig	1066	8
Methylpropanol	malzig	1100	2
Ethyl-2-methylpentanoat	fruchtig	1122	2
2-Methylbutanol	malzig	1210	4
3-Methylbutanol	malzig	1225	128

Tabelle A.23: Fortsetzung.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD
Ethylhexanoat	fruchtig	1240	4
(Z)-4-Heptenal	fischig	1255	4
Octanal	Citrus, fettig	1280	8
1-Octen-3-on	Pilz	1295	256
1-Hexanol	Apfel, grasig	1343	4
(Z)-1,5-Octadien-1-on	Geranie	1362	16
Nonanal	Citrus, fettig	1381	2
Essigsäure	Essig	1424	128
Methional	gekochte Kartoffel	1439	32
unbekannt	fettig	1473	4
(Z)-2-Nonenal	grün, fettig	1493	16
(E)-2-Nonenal	fettig, Karton	1524	64
Linalool	blumig, Citrus	1535	4
Methylpropansäure	schweißig	1551	64
(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurke	1578	16
(E,E)-2,4-Octadienal	fettig	1595	128
Buttersäure	schweißig	1616	128
Phenylacetaldehyd	blumig, Honig	1632	16
unbekannt	grüne Paprika	1642	4
2-/3-Methylbuttersäure	schweißig	1647	1024
(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig	1684	64
3-Methyl-2,4-nonandion	blumig, minzig	1700	8
Methionol	gekochte Kartoffel, schweflig	1706	64
unbekannt	seifig	1739	32
α-Damascon	Apfel, fruchtig	1767	8
β-Damascon	Apfel, fruchtig	1800	1024
2-Phenylethylacetat	fruchtig	1806	64
Hexansäure	sauer	1829	128
Geraniol	Rose	1840	2
2-Methoxyphenol	rauchig, Schinken	1851	256
unbekannt	Pilz	1874	64
2-Phenylethanol	blumig, Honig	1903	64
γ -Octalacton	Kokos	1916	32
β-Ionon	Veilchen	1923	256
4-Methyl-2-methoxyphenol	rauchig, Schinken	1942	64
δ -Octalacton	Kokos	1974	128
tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2000	1024
γ-Nonalacton	Pfirsich	2013	128
Furaneol	Karamell	2031	256
δ -Nonalacton	Kokos	2056	64
4-Ethyl-2-methoxyphenol	Nelke	2084	32
3-Methylphenol	phenolisch, Leder	2088	8
Zimtsäureethylester	blumig, Zimt	2107	32
γ-Decalacton	Pfirsich	2129	4
Eugenol	Nelke	2157	64
Sotolon	würzig	2186	128
unbekannt	Nelke	2238	4
Isoeugenol	Schinken	2323	32
γ-Dodecalacton	Pfirsich	2331	4
δ-Dodecalacton	Pfirsich	2369	16
Phenyllessigsäure	Honig	2520	1024
Vanillin	Vanille	2544	32

Tabelle A.24: GC/O-Analyse 2 des mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C fermentierten Weizenteig mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 6, TA 200, 10⁶ KbE/g) und des unfermentierten Weizenteiges mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 6). Die detektierten Verbindungen sind zusammen mit ihrer Geruchsqualität, ihrem Retentionsindex (RI) und dem Verdünnungsfaktor (Flavour Dilution Factor, FD) sowie der durch die Fermentation bedingten Änderung des FD (Δ FD) dargestellt. Die Verbindungen mit einer fruchtigen oder blumigen Geruchsqualität sind fett markiert.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	1060	512	n.d.	10
3-Methylbutanol	malzig	1202	512	n.d.	10
Ethanol	ethanolisch	940	256	n.d.	9
Acetoin	Butter	1283	64	n.d.	7
Methylbutanoat	fruchtig	990	32	n.d.	6
2-Methyl-1-propanol	malzig	1100	32	n.d.	6
1-Hexanol	Mandel	1350	32	n.d.	6
Linalool	Rose	1538	32	n.d.	6
unbekannt	Pflaster	1958	32	n.d.	6
2-/3-Methylbutanal	malzig	900	256	8	5
Ethylhexanoat	fruchtig	1236	8	n.d.	4
(Z)-1,5-Octadien-3-on	Geranie	1374	8	n.d.	4
2-Phenylethanol	Honig	1906	1024	128	3
2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig	1331	4	n.d.	3
γ -Nonalacton	Kokos	2021	4	n.d.	3
unbekannt	Geranie	2045	4	n.d.	3
Octansäure	sauer	2052	4	n.d.	3
unbekannt	Geranie	2058	4	n.d.	3
Ethylcinnamat	blumig, Zimt	2113	512	64	2
Essigsäure	Essig	1438	512	256	2
1-Octen-3-on	Pilz	1298	32	16	2
Methional	Kartoffel	1453	32	16	2
Pentansäure	schweißig	1732	16	4	2
unbekannt	fettig	1651	2	n.d.	2
Vanillin	Vanille	2585	1024	1024	0
Geraniol	blumig, Citrus	1837	128	128	0
unbekannt	Zwiebel	1711	16	16	0
Furaneol	Karamell	2039	16	16	0
Sotolon	würzig	2187	16	16	0
Phenyllessigsäure	Honig	2569	16	16	0
2-/3-Methylbuttersäure	schweißig	1662	32	64	-1
3-Methyl-2,4-nonandion	blumig, heuartig	1703	32	64	-1
γ -Octalacton	Kokos	1919	8	16	-1
β-Damascenon	Apfel	1803	128	512	-2
(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig	1695	16	32	-2
(E,E)-2,4-Decadienal	fettig	1797	16	64	-2
Ethylbutanoat	fruchtig	1040	4	8	-2
Buttersäure	schweißig	1619	4	16	-2
Phenylacetaldehyd	Honig	1641	4	16	-2
unbekannt	Kokos	1952	4	16	-2
Eugenol	Nelke	2160	128	1024	-3
unbekannt	Geranie	1977	32	256	-3
(E,Z)-2,4-Decadienal	fettig	1754	8	64	-3
(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurke	1578	4	32	-3
Hexansäure	sauer	1831	2	16	-3
Isoeugenol	Schinken	2343	n.d.	4	-3
tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2000	64	1024	-4
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	fettig, Haferflocken	1866	32	512	-4
unbekannt	Minze	2024	n.d.	8	-4
unbekannt	fettig	2048	n.d.	8	-4
unbekannt	fettig	2173	n.d.	8	-4
γ-Decalacton	Pfirsich	2386	n.d.	8	-4
Germacren	Pilz	1889	32	1024	-5

Tabelle A.24: Fortsetzung.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
Hexanal	grasig	1087	n.d.	16	-5
(E)-2-Nonenal	fettig, Karton	1533	4	256	-6
unbekannt	Kokos	2070	n.d.	32	-6

n.d., nicht detektiert.

Tabelle A.25: GC/O-Analyse 3 des mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C fermentierten Weizenteig mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 6, TA 200, 10⁶ KbE/g) und des unfermentierten Weizenteiges mit Zusatz von 25 % Apfeltrester (Charge 6). Die detektierten Verbindungen sind zusammen mit ihrer Geruchsqualität, ihrem Retentionsindex (RI) und dem Verdünnungsfaktor (Flavour Dilution Factor, FD) sowie der durch die Fermentation bedingten Änderung des FD (Δ FD) dargestellt. Die Verbindungen mit einer fruchtigen oder blumigen Geruchsqualität sind fett markiert.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
3-Methylbutanol	malzig	1205	256	n.d.	9
unbekannt	Zwiebel	1736	128	n.d.	8
Methional	Kartoffel	1453	64	n.d.	7
3-Methyl-2-buten-1-thiol	Bier	1085	32	n.d.	6
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	958	16	n.d.	5
2-Acetyl-1-pyrrolin	röstig	1328	16	n.d.	5
Phenylethylacetat	blumig	1809	16	n.d.	5
2-Methylpropansäure	schweißig	1565	128	4	5
Ethanol	ethanolisch	941	4	n.d.	3
2-Methylbutylacetat	Banane	1105	4	n.d.	3
unbekannt	fruchtig	1180	4	n.d.	3
1-Hexanol	grasig	1351	16	2	3
2,3-Pentandion	Butter	1048	32	4	3
Ethylhexanoat	fruchtig	1230	32	4	3
Furaneol	Karamell	2051	1024	128	3
unbekannt	Gurke	1724	2	n.d.	2
unbekannt	schwarze Johannisbeere	1680	2	n.d.	2
Guajacol	rauchig	1851	32	8	2
Maltol	Karamell	1968	32	8	2
(Z)-1,5-Octadien-3-on	Geranie	1366	64	16	2
2-Phenylethanol	Honig	1911	64	16	2
Heptansäure	sauer	1955	4	2	1
Ethylbutanoat	fruchtig	1028	32	16	1
Sotolon	würzig	2218	32	16	1
Buttersäure	schweißig	1627	64	32	1
γ -Nonalacton	Kokos	2033	64	32	1
2-/3-Methylbutanal	malzig	897	2	2	0
(Z)-6-Dodecen-γ-lacton	Pfirsich	2409	4	4	0
4-Methylphenol	phenolisch	2080	8	8	0
3-Methyl-2,4-nonandion	blumig, heuartig	1708	16	16	0
Geraniol	blumig, Citrus	1848	16	16	0
Ethylcinnamat	blumig, Zimt	2130	16	16	0
Eugenol	Nelke	2166	16	16	0
2,3-Butandion	Butter	976	64	64	0
1-Octen-3-on	Pilz	1280	64	64	0
2/3-Methylbuttersäure	schweißig	1664	1024	1024	0
Phenyllessigsäure	Honig	2549	1024	1024	0
δ-Dodecalacton	Pfirsich	2380	2	1	-1
Phenylacetaldehyd	Honig	1638	4	8	-1
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	fettig, Haferflocken	1880	16	32	-1

Tabelle A.25: Fortsetzung.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
(E)-2-Nonenal	fettig, Karton	1524	32	64	-1
β-Ionon	Veilchen	1943	32	64	-1
tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2004	512	1024	-1
Nonanal	Citrus	1380	n.d.	2	-2
Octanal	Citrus	1275	2	8	-2
Phenylpropionsäure	Ziege	2611	4	2	-2
Pentansäure	schweißig	1741	4	16	-2
(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig	1697	8	32	-2
γ-Octalacton	Kokos	1924	8	32	-2
unbekannt	fettig	1763	16	64	-2
(E,E)-2,4-Decadienal	fettig	1804	64	256	-2
β-Damascenon	Apfel	1815	64	256	-2
1-Penten-3-on	metallisch	1003	n.d.	4	-3
(Z)-4-Heptenal	fischig	1235	n.d.	4	-3
unbekannt	fettig	1375	n.d.	4	-3
Benzaldehyd	Marzipan	1518	n.d.	4	-3
Linalool	blumig, Citrus	1554	n.d.	4	-3
δ-Octalacton	Kokos	1974	n.d.	8	-3
unbekannt	Minze	2094	2	16	-3
(Z)-2-Nonenal	fettig	1488	8	64	-3
(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurke	1580	8	64	-3
Vanillin	Vanille	2572	16	128	-3
(E,E)-2,4-Octadienal	fettig	1596	2	32	-4
Hexanal	grasig	1048	4	64	-4
δ-Nonalacton	Kokos	2074	n.d.	16	-5
(E)-2-Octenal	fettig, grün	1424	n.d.	32	-6

n.d., nicht detektiert.

Tabelle A.26: GC/O-Analyse 4 des mit *K. marxianus* DIL 82 für 24 h bei 25 °C fermentierten Weizenteig mit Zusatz von 50 % Apfeltrester (Charge 6, TA 200, 10⁶ KbE/g) und des unfermentierten Weizenteiges mit Zusatz von 50 % Apfeltrester (Charge 6). Die detektierten Verbindungen sind zusammen mit ihrer Geruchsqualität, ihrem Retentionsindex (RI) und dem Verdünnungsfaktor (Flavour Dilution Factor, FD) sowie der durch die Fermentation bedingten Änderung des FD (Δ FD) dargestellt. Die Verbindungen mit einer fruchtigen oder blumigen Geruchsqualität sind fett markiert.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
3-Methylbutanol	malzig	1205	128	n.d.	8
unbekannt	Zwiebel	1736	64	n.d.	7
Pentansäure	schweißig	1741	64	n.d.	7
2-Phenylethanol	Honig	1911	64	n.d.	7
2,3-Pentandion	Butter	1048	32	n.d.	6
unbekannt	schwarze Johannisbeere	1680	32	n.d.	6
Maltol	Karamell	1968	32	n.d.	6
(E,E)-2,4-Octadienal	fettig	1596	128	2	6
δ-Nonalacton	Kokos	2074	256	4	6
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig	958	16	n.d.	5
2-Methyl-1-propanol	malzig	1090	16	n.d.	5
2-Methylbutylacetat	Banane	1105	16	n.d.	5
1-Hexanol	grasig	1351	16	n.d.	5
Phenylethylacetat	blumig	1638	16	n.d.	5
Geraniol	blumig, Citrus	1848	16	n.d.	5
Ethylcinnamat	blumig, Zimt	2130	16	n.d.	5
Methional	Kartoffel	1453	32	1	5

Tabelle A.26: Fortsetzung.

Verbindung	Geruchsqualität	RI	FD		Δ FD
			fermentiert	unfermentiert	
3-Methyl-2-buten-1-thiol	Bier	1085	8	n.d.	4
unbekannt	Gurke	1724	8	n.d.	4
2-Methylpropansäure	schweißig	1565	32	2	4
2,3-Butandion	Butter	976	128	8	4
Buttersäure	schweißig	1627	128	8	4
unbekannt	fruchtig	1180	4	n.d.	3
Heptansäure	sauer	1955	4	n.d.	3
Guajacol	rauchig	1851	64	8	3
β-Ionon	Veilchen	1943	64	8	3
Furaneol	Karamell	2051	512	32	3
Nonanal	Citrus	1380	4	1	2
Ethylhexanoat	fruchtig	1230	16	4	2
Linalool	blumig, Citrus	1554	16	4	2
δ -Octalacton	Kokos	1974	32	8	2
Essigsäure	Essig	1443	256	64	2
2/3-Methylbuttersäure	schweißig	1664	1024	256	2
δ-Dodecalacton	Pfirsich	2380	1	n.d.	1
Phenylpropionsäure	Ziege	2611	2	1	1
Octanal	Citrus	1275	4	2	1
unbekannt	Minze	2094	8	4	1
(Z)-6-Dodecen-γ-lacton	Pfirsich	2409	8	4	1
Ethylbutanoat	fruchtig	1028	32	16	1
(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurke	1580	32	16	1
3-Methyl-2,4-nonandion	blumig, heuartig	1708	32	16	1
Sotolon	würzig	2218	32	16	1
Vanillin	Vanille	2572	64	32	1
β-Damascenon	Apfel	1815	256	128	1
4-Methylphenol	phenolisch	2080	8	8	0
Eugenol	Nelke	2166	16	16	0
(E,E)-2,4-Decadienal	fettig	1804	32	32	0
1-Octen-3-on	Pilz	1280	128	128	0
tr.-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2004	1024	1024	0
Phenyllessigsäure	Honig	2549	1024	1024	0
2-/3-Methylbutanal	malzig	897	1	2	-1
unbekannt	fettig	1763	8	16	-1
δ -Octalacton	Kokos	1974	16	32	-1
(Z)-1,5-Octadien-3-on	Geranie	1366	64	128	-1
(Z)-2-Nonenal	fettig	1488	64	128	-1
unbekannt	fettig	1375	n.d.	2	-2
Phenylacetaldehyd	Honig	1638	2	8	-2
(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig	1697	8	32	-2
δ -Nonalacton	Kokos	2074	16	64	-2
Hexansäure	sauer	1845	32	128	-2
1-Penten-3-on	metallisch	1003	n.d.	4	-3
(Z)-4-Heptenal	fischig	1235	n.d.	4	-3
1-Nonen-3-on	Pilz	1395	n.d.	4	-3
Benzaldehyd	Marzipan	1518	n.d.	4	-3
Hexanal	grasig	1067	4	64	-4
(E)-2-Nonenal	fettig, Karton	1524	16	256	-4
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	fettig, Haferflocken	1880	16	256	-4
unbekannt	Karamell	2151	n.d.	16	-5
unbekannt	metallisch	2062	1	32	-5
unbekannt	metallisch	1914	n.d.	32	-6
(E)-2-Octenal	fettig, grün	1424	n.d.	64	-7

n.d., nicht detektiert.

A 7. Modellbackwaren

Tabelle A.27: Ergebnisse der Duoprüfung

Prüffrage: *Welches ist die abweichende Probe für die Merkmalseigenschaft fruchtiges Aroma?*

Proben	Fruchtiges Aroma bei	Anzahl Prüfer	Signifikanzniveau
B. Kontrollprobe C. Probe mit 20 % vorfermentierter Teig	Probe mit fermentierten Teiganteil	7	99 %

Tabelle A.28: Ergebnisse der Dreieckstest. Für diese Tests wurde für die Kontrolle Weizenbrot eingesetzt. Die Bezeichnung Probe mit... bezieht sich auf Weizenteig mit Zusatz von ...

Prüffrage: *Welches der beiden dargereichten Brotstücke besitzt ein stärker wahrnehmbares fruchtiges Aroma?*

Probenpaar	Stärker wahrnehmbares fruchtiges Aroma bei	Anzahl Prüfer	Signifikanzniveau
D. Kontrollprobe E. Probe mit vorfermentierten Teiganteil 20%	Probe mit fermentierten Teiganteil	8	99 %
F. Kontrollprobe G. Probe mit Tresteranteil 12,5 %	Probe mit Tresteranteil	8	99 %
H. Probe mit Tresteranteil 5,0 % I. Probe mit vorfermentierten Teiganteil 20%	Probe mit fermentierten Teiganteil	8	99 %
J. Probe mit Tresteranteil 12,5 % K. Probe mit vorfermentierten Teiganteil 20%	Probe mit Tresteranteil 12,5 %	6	*n.s.
L. Probe mit Tresteranteil 5,0 % M. Probe mit Tresteranteil 12,5 %	Probe mit Tresteranteil 12,5 %	8	99 %

*n.s. = nicht signifikant

A 8. Gezielte Aromaveränderung durch Expression heterologer Gene

Tabelle A.29: Einfluss der der Überexpression von HuEeb1 (pMW2) und HuAtf1 (pMW3) in *K. marxianus* SLC33 in SC-URA nach 47 h Inkubation bei 25 °C, 200 rpm (Ecotron, Infors) auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten. Resultierend aus den in Kapitel 3.6 erhaltenen Ergebnissen und den in der Literatur im Zusammenhang mit der Überexpression von *EEB1* und *ATF* beschriebenen Aromakomponenten wurden untersucht.

Verbindung	Konzentration (µg/kg)		
	pMW2 (HuEeb1)	pMW3 (HuAtf1)	pJH1512 (Kontrolle)
Summe 2- und 3-Methylbutylacetat	165	1050	763
2-Phenylethanol	1440	2780	3230
2-Phenylethylacetat	2270	5850	5850
Essigsäureethylester	8400	9000	8600
Ethylpropionat	53,2	66,1	46,6
Ethylbutanoat	1,11	2,00	2,77
Ethyl-2-methylbutanoat	0,41	1,20	1,08
Ethyl-3-methylbutanoat	0,27	0,55	0,57
Ethylisobutanoat	16,3	24,2	24,3
Ethyllactat	0,21	0,43	0,35
Propylacetat	115	120	101

Tabelle A.30: Einfluss der der Überexpression von HuEeb1 (pMW2) und HuAtf1 (pMW3) in *K. lactis* OS 156 in SC-Ura mit 10% Fructose und 10 % Glucose mit und ohne Zusatz von Phenylalanin nach 144 h Fermentation bei 25 °C, 200 rpm (Ecotron, Infors) auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten. Die Transformation von pJH1512 diente hierbei als Kontrolle.

Verbindung (Konzentration)	<i>K. lactis</i> OS 156											
	pMW2 (HuEeb1)			pMW3 (HuAtf1)			pJH1512 (Kontrolle)					
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Essigsäureethyl ester (mg/l) ^a	57	36	43	nq	nq	65	26	nq	62	26	nq	62
i-Butanol (mg/l) ^b	7	7	nq	10	9	1	9	8	4	9	8	4
Propionsäureethyl ester (µg/l)	468	297	444	287	169	1221	521	188	662	521	188	662
3-Methylbutanol (mg/l) ^c	17	16	4	17	16	5	19	16	10	19	16	10
2-Methylbutanol (mg/l) ^b	3	3	nq	5	5	1	5	4	3	5	4	3
i-Buttersäureethyl ester (µg/l)	522	320	712	246	264	986	394	180	1079	394	180	1079
Buttersäureethyl ester (µg/l) ^d	nd	nd	15	nd	nd	16	nd	nd	16	nd	nd	16
Essigsäure-3-methylbutyl ester (µg/l) ^e	43	3	132	nq	nq	149	nq	nq	135	nq	nq	135
Essigsäure-2-methylbutyl ester (µg/l) ^f	14	7	10	nq	nq	21	2	nq	11	2	nq	11
Capronsäure (mg/l)	3	3	5	3	3	5	3	3	5	3	3	5
Linalool (µg/l) ^g	2	1	4	0,2	0,4	3	1	0,8	2	1	0,8	2
2-Phenylethanol (mg/l)	28	26	46	32	29	39	31	24	40	31	24	40
Caprylsäure (mg/l) ^h	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
Caprylsäureethyl ester (mg/l)	nq	nq	57	nq	nq	58	nq	nq	60	nq	nq	60
a-Terpineol (µg/l) ^g	1	2	nd	1	1	nd	2	2	nd	2	2	nd
Essigsäure-2-phenylethyl ester (mg/l) ⁱ	4786	4100	2914	1346	1279	3122	3037	2231	1881	3037	2231	1881
Caprinsäure (mg/l) ^j	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2

A: SC - Ura + Phe, Messung 1; B SC - Ura, Messung 1; C SC - Ura, Messung 2.

^a, < 50 mg/l außerhalb der Kalibration; ^b, < 10 mg/l außerhalb der Kalibration; ^c, < 25 mg/l außerhalb der Kalibration; ^d, < 100 µg/l außerhalb der Kalibration; ^e, < 300 µg/l außerhalb der Kalibration; ^f, < 25 µg/l außerhalb der Kalibration; ^g, < 10 µg/l außerhalb der Kalibration; ^h, < 5 mg/l außerhalb der Kalibration; ⁱ, > 400 µg/l außerhalb der Kalibration; ^j, < 0,5 mg/l außerhalb der Kalibration; n.d., nicht dedektiert; nq, nicht quantifiziert.

Tabelle A.31: Einfluss der Überexpression von HuEeb1 (pMW2) und HuAtf1 (pMW3) in *K. marxianus* SLC33 in SC-Ura mit 10% Fructose und 10 % Glucose mit und ohne Zusatz von Phenylalanin nach 144 h Fermentation bei 25 °C, 200 rpm (Ecotron, Infors) auf die Zusammensetzung der Aromakomponenten. Die Transformation von pJJH1512 diente hierbei als Kontrolle.

Verbindung (Konzentration)	<i>K. marxianus</i> SLC33								
	pMW2 (HuEeb1)			pMW3 (HuAtf1)			pJJH1512 (Kontrolle)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Essigsäureethylester (mg/l) ^a	14	17	40	nq	7	86	nq	nq	46
i-Butanol (mg/l) ^b	9	8	25	11	10	8	10	9	5
Propionsäureethylester (µg/l)	549	273	805	293	326	1064	354	388	1314
3-Methylbutanol (mg/l) ^c	16	15	16	17	17	12	17	16	7
2-Methylbutanol (mg/l) ^b	5	4	8	6	6	5	6	5	3
i-Buttersäureethylester (µg/l)	276	165	741	397	363	961	330	300	1117
Buttersäureethylester (µg/l) ^d	nd	nd	14	nd	nd	14	nd	nd	16
Essigsäure-3-methylbutylester (µg/l) ^e	nq	nq	132	nq	nq	118	nq	nq	123
Essigsäure-2-methylbutylester (µg/l) ^f	4	5	14	nq	nq	10	nq	nq	14
Capronsäure (mg/l)	3	3	5	3	3	5	3	3	5
Linalool (µg/l) ^g	0,4	0,3	4	0,3	0,2	nq	0,4	0,02	2
2-Phenylethanol (mg/l)	33	25	52	30	28	50	34	28	47
Caprylsäure (mg/l) ^h	2	2	1	2	2	1	2	2	1
Caprylsäureethylester (mg/l)	nq	nq	62	nq	nq	56	nq	nq	56
a-Terpineol (µg/l) ^g	1	1	nd	1	1	nd	1	2	nd
Essigsäure-2-phenylethylester (mg/l) ⁱ	2912	3856	2195	1020	1636	1626	983	1293	1921
Caprinsäure (mg/l) ^j	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2

A: SC - Ura + Phe, Messung 1; B SC - Ura, Messung 1; C SC - Ura, Messung 2.

^a, < 50 mg/l außerhalb der Kalibrierung; ^b, < 10 mg/l außerhalb der Kalibrierung; ^c, < 25 mg/l außerhalb der Kalibrierung; ^d, < 100 µg/l außerhalb der Kalibrierung; ^e, < 300 µg/l außerhalb der Kalibrierung; ^f, < 25 µg/l außerhalb der Kalibrierung; ^g, < 10 µg/l außerhalb der Kalibrierung; ^h, < 5 mg/l außerhalb der Kalibrierung; ⁱ, > 400 µg/l außerhalb der Kalibrierung; ^j, < 0,5 mg/l außerhalb der Kalibrierung; n.d., nicht detektiert; nq, nicht quantifiziert.

A 9. Sequenzen

Abbildung 3.11: Bande I (*Cladosporium* sp.)

ACGGCGAGTGAAGCAGCAATAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTCGACGTCCGAGTTG
TAATTTGTAGAGGATGCTTCTGAGTGGCCACCGACCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCA
TAGAGGGTGAGAATCCCGTATGCGGTTCGAAAGGCGCTCTATACGTAGCTCCTTCGACGA
GTCGAGTTGTTTGGGAATA

Abbildung 3.11: Bande II (Ascomycota-Hefe)

AGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGCAGA
GGGCGCTTTGGCATTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACGTACACAGAGGGTGA
GAATCCCGTACGTGGTTCGCTAGCCTTTACCGTGTAAGCCCCCTTCGACGAGTCGAGTTGTT
TGGGAATA

Abbildung 3.11: Bande III (*Magnusiomyces magnusii*)

TACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAATTTGAAATCGCTTCGGCGAGTTGTAAGTGAA
GTGGTTAAGCTTTGATATAAGTCTCCTGGAACGGAGCGCCATAGAGGGTGATAGCCCCGT
TGCTTTTGCTTAATGTGCTACTTCAGAGCGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Abbildung 3.11: Bande IV (*Photinia fraseri*)

ACGGCGATCGAACC GGGAACAGCCCAGCTTGAGAATCGGGCGCCGTCGGCGTTCGAATT
GTAGTCTGGAGAAGCGTCCTCAGCGGCGGACCGGGCCCAAGTCCACTGGAAGGTGGCGC
CGGAGAGGGTGAGAGCCCCGTTGTGCCCGGACCCTGTTCGCACCACGAGGGCGCTGTCCGC
GAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Abbildung 3.11: Bande V (*Daucus carota* subsp. *sativus*)

TAGTACGGCGAGCGAACC GGGAATAGCCCAGCTTGAAAATTGAGCAGCTACGCTGTTC
AAATTGTAGTCTGGAGAAGCGTGTTCAAGTACGACGGACCGGGCCCAAGTCCCCTGGAAGGG
GTCGCCAGAGAGGGTGAGAGCCCCGTCGTGCCCGGACCCTGTTGCACCACGAGGGCGCTGT
CTACNAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Abbildung 3.11: Bande VI (*Daucus carota* subsp. *sativus*)

TAGTACGGCGAGCGAACC GGGAATAGCCCAGCTTGAAAATTGAGCAGCTACGCTGTTCA
AATTGTAGTCTGGAGAAGCGTGTTCAAGTACGACGGACCGGGCCCAAGTCCCCTGGAAGGG
TCGCCAGAGAGGGTGAGAGCCCCGTCGTGCCCGGACCCTGTTGCACCACGAGGGCGCTGT
TACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Abbildung 3.17: Bande I (*Leuconostoc citreum*)

GACACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAA
TGCTAAAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATG
GCATTGGAAACTGGTAACTTGAGTGTTGTAGAGGTAAGTGGAACCTCCATGTGGTAGCGG
TGA

Candida silvae DIL 5174

GGATGCCTCGTGC GGCGAGTGAGCGGCAAAAGCTCCATTTTGAAAGCTCTTCGGAGCGTT
GTAGATTGGTGGGAAGCTAACGGCTGGTGGGAGACCAAGTCCCTCTGGAACGAGGGCGCCA
TAGAGGGTGAGAGCCCCGTTGTGTCTCCTTTACCGACCTTTCAGCCCCCTCCGCGGAGTCG
AGTTGTTTGGGAATA

Candida tropicalis DIL 3128

AGGGGTGGCACATCCTAGGTATAAACCGCAGTCCTCAGTCTAGGGCTGGCAGTATCGACGA
AGGCTATAACACACAACCGAAGCCGTGCCACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCAAA
CTGATGCTGGCCCCGATAAACTGTAGAGGCCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACC
AAGTCTGATCTCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAA
GTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTT
TAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAGGA
ACTTTACATAGGCCTGGATCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCCTGTGTGACGTTCTGTT
CCAAGAAACATAGACAAGAGCCAGACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACCTCGGAC
TCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCA
ATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAA

Candida tropicalis DIL 3129

TCCAAGGTATAAACCGCAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAACACA
CAACCGAAGCCGTGCCACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCAAACTGATGCTGGCCC
GATAAACTGTAGAGGCCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATCTCA
AGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTT
TCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTA
CCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATAGGC
CTGGATCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCCTGTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAACATAG
ACAAGAGCCAGACCCAAAGATACCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACTCTGAAAGAGCCA
GATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTT
CTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAA

Clavispora lusitaniae DIL 5172

ATGCCCAGTACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGT
AATTTGAAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTG
GGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTCACCCGCGGCTCCACNAGTCG
AGTTGTTTGGGAATA

Hanseniaspora uvarum DIL 3136

TTAGCACATCCTTGCCGAGCGCAGTCCTCAATCCCGGCTAACAGTATTCCAAAAAGCTAT
AACACTACCGAAGTAGCTACATTCTTAATGATTTATCCTGCTGCCAGAATTGATGTTGGCC
CAGTGAAATTTTTGAGAGGCCCAAGCCACGAGAGGCGAGTGCATGCAAAAAACACCAT
GTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGT
TCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTA
GATGGAATTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAAAGT
CTTACAGAGAAAAGGTATCCTCGCCAAACGGGATTCTCACCCCTATGACGTCCTGTTCC
AAGGAACATAGACAAGGACCTAATCAAAGACAAATTCTACAAATTACAACCTCGGGCACT
GAAAGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTACCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGTAATCC
CAGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAA

Hanseniaspora uvarum DIL 3158

GCACATCCTTGCCGAGCGCAGTCCTCAATCCCGGCTAACAGTATTCCAAAAAGCTATAAC
ACTACCGAAGTAGCTACATTCTTAATGATTTATCCTGCTGCCAGAATTGATGTTGGCCAG
TGAAATTTTTGAGAGGCCCAAGCCACGAGAGGCGAGTGCATGCAAAAAACACCATGTC
TGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCT
TTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGAT
GGAATTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAAAGTCTT
ACAGAGAAAAGGTATCCTCGCCAAACGGGATTCTCACCCCTATGACGTCCTGTTCCAAG
GAACATAGACAAGGACCTAATCAAAGACAAATTCTACAAATTACAACCTCGGGCACTGAA
AGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTACCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGTAATCCAG
TTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAA

Hanseniaspora uvarum DIL 5173, Bande 1

GATCCTTAGTACGGCGAGTGGAAGCGGTAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAG
 TGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAAC
 AGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTT
 TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Hanseniaspora uvarum DIL 5173, Bande 2

GATCTTAGTACGGCGAGTGAGCGGTAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACTTTCAGTGC
 CCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAG
 GACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTC
 GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Kluyveromyces marxianus DIL 3127

GCGCATCCTGGACAAAGGTCGCAATCCTCAGTCCCAGCTGGCTGTATTCCCACGGGCTAT
 AACACTCTACCGAAGCAGAGCCACATTCCCAGGATTTATCCAACCGCTAAAACCTGATGC
 TGGCCCAGCGAAAGCCGAAGCAAACGCCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAA
 TTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTC
 GCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCA
 TTCCCAAACAACCTCGACTCGTCGAAAGCACTTTACAAATAACTGGGATCCTCGCCACACG
 GGATTCTCACCCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCAGCTACAAAG
 TCGCCTTCTTCAAATTACAACCTCGGACGTCGAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTG
 CCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATAT
 GCAA

Kluyveromyces marxianus DIL 3131

AAAGTCGCAATCCTCAGTCCCAGCTGGCTGTATTCCCACGGGCTATAAACACTCTACCGAA
 GCAGAGCCACATTCCCAGGATTTATCCAACCGCTAAAACCTGATGCTGGCCCAGCGAAAG
 CCGAAGCAAACGCCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTT
 CACTCTCTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTC
 GCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCT
 GACTCGTCGAAAGCACTTTACAAATAACTGGGATCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCCTC
 TATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCAGCTACAAAGTCGCCCTTCTTCAA
 TTACAACCTCGGACGTCGAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCC
 GTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGGATATGCAA

Kluyveromyces marxianus DIL 3132

GCGCACCTGAAAAGTCGCAATCCTCAGTCCCAGCTGGCTGTATTCCCACGGGCTATAACA
 CTCTACCGAAGCAGAGCCACATTCCCAGGATTTATCCAACCGCTAAAACCTGATGCTGGC
 CCAGCGAAAGCCGAAGCAAACGCCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTT
 ACGTACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTA
 TCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCC
 CAAACAACCTCGACTCGTCGAAAGCACTTTACAAATAACTGGGATCCTCGCCACACGGGAT
 TCTCACCCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCAGCTACAAAGTCGC
 CTTCTTCAAATTACAACCTCGGACGTCGAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCG
 TTCCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCA
 A

Kluyveromyces marxianus DIL 5171

GGGAGCCTTAGTACGGCGAGTGGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTC
 GACGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCGACTTTGTAGCTGGTCCTTGTCTATGTTCCCTG
 GAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTATTTGTA
 GTGCTTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Leuconostoc lactis DIL 5118

TTTCGAGCCTCACGTCAGTTGTTGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATA
TATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTACCTCTACAACACTCAAGTTAAC
CAGTTTCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAATCAACCGT
CTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTATTTAGCCGTCCTTTCTGGTATGGTACCGTTCGAACTAGAATCATTCCC
TATTCTAGCATTTCTTCCCATACAACAGTGCTTTACGACCCTAAAGCCTTCATCACACACG
CGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCAGCCTCCCGTAG
GAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATC
ATTGTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGACCCATCTCTAGGT
GACGCCGTAGCGCCTTTCAACTTTGTATCATGCGATACTAAGTTTTATTCCGGTATTAGCAT
CTGTTTCCAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGTTTCG
CCACTCGCTTGAAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGCGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCA
CGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCTCTCTA

Leuconostoc mesenteroides DIL 5117

TTTCGAGCCTCACGTCAGTTGCAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATA
TATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTACCTCTACTGCACTCAAGTTAAC
CAGTTTCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAATAAACCGT
CTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCGCGG
CTGCTGGCACGTATTTAGCCGTCCTTTCTGGTATGGTACCGTCAAACCTAAAATCATTTC
TATTCTAGCTGTTCTTCCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACACACG
CGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCAGCCTCCCGTAG
GAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATC
ATTGTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGT
GACGCCGAAGCGCCTTTAACTTTGTGTATGCGACACTAAGTTTTATTCCGGTATTAGCAT
CTGTTTCCAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGTCCACGTGTTACTACCCGTTTCG
CCACTCACTTGAAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCAC
GCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCT

Leuconostoc pseudomesenteroides DIL 5114

CGAGCCTCACGTCAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATAT
CTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTACCTCTACTGCACTCAAGTTAACCAG
TTTCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAATCAACCGTCTG
CGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGTATTTAGCCGTCCTTTCTGGTATGGTACCGTCAAACCTAAAATCATTCCCTAT
TCTAGCTGTTCTTCCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACACACGCGG
CGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCAGCCTCCCGTAGGAG
TTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATT
GTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGTGA
CGCCAAAGCGCCTTTAACTTCGTGTATGCGACACTAAGTTTCATTCCGGTATTAGCATCT
GTTTCCAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGTCCACGTGTTACTACCCGTTTCGCC
ACTCACTTGAAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACG
CCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCTACTC

Metschnikowia sp. DIL 3143

TAGATGCAGGCCTCGGGGCANCAAGGGAAATTGAGACCGGGGTTATAATCCTCGAAAGG
TACATTCCCCGGTGGTTTTGNTTCCC GCCGCCCGATGCTGGCCAGTTAAGTGTCTGCTT
GCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCA
TCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCGGTATTTAGCTTTAGATGGAAT
TTACCACCCACTTAGAGCTGCATTTCCAAACAACCTCGACTCTTGGAGATCTGGGATGAAG
GCGTTGAGGGGGTTACAGGGGCTGTCACCCTCTGTGGCGCCACTTTCCAGTGGACTTAAC
CCCTGCCGGCCGGACCCAAATCTCTTCAAATTACAATTTCCGGGGGATTTCAAATTTGAG
CTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTAT
TGATATGCA

Metschnikowia sp. DIL 3155

GGNGNGCGCACCTTAGATGCAGGCCTCGGGGCNNCANNNGGANATTGAGACCGGGGTTAT
 AATCCCTCGANAGGTACATTCCCCGGATGGTTTTGNTNCCCGCCGCCCGGATGCTGGCCC
 AGTTAAGTGTCTGCTTGCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTT
 TTCAAAGTGTTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCGGTATT
 TAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTGG
 AGATCTGGGATGAGGGCGTTAAAGGGGTTACGCGGGCTGTACCCTCTGTGGCGCCACTT
 TCCAGTGGACTTAACCCCTGCCGGCCGGACCCAAATCTCTTCAAATTACAATTCCCGGGG
 GATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTT
 CTTTTCTCCGCTTATTGATATGCAA

Metschnikowia sp. DIL 3157

AGAAATAGATGCAGGCCTCGGGGCNACAAAGAAATTGAGACCGGGGTTATAATCCTCGA
 AAGGTACATTCCCCGGTGGTTTTGNTTCCCGCCGCCCGGATGCTGGCCCAGTTAAGTGTCT
 GCTTGCAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGTCTT
 TTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCGGTATTTAGCTTTAGATG
 GAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTGGAGATCTGGGAT
 GANGGCNTTNAAGGGGTTACGCGGGCTGTACCCTCTGTGGCGCCACTTTCCAGTGGACT
 TAACCCCNCGCCGGCCGGACCCAAATCTCTTCAAATTACAATTCCCGGGGGATTTCAAATT
 TGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCG
 TTATTGATATGCAA

Pediococcus pentosaceus DIL 5111

GAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATA
 TCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCA
 GTTTCCAATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCT
 GCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCT
 GCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCACTGGGTAAACAGTTACT
 CTTACCCACGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGC
 GCGGTTGCTCCATCAGACTTGCCTCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
 AGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGGCTACGTATCA
 CTGCCTTGGTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATACGCCGCGGGTCCATCCAGAAGT
 GATAGCAGAGCCATCTTTTAAAAGAAAACCATGCGGTTTTCTCTGTTATACGGTATTAGC
 ATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCTACTTCTGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTT
 CGCCACTCACTTCGTGTTAAAATCTCAATCAGTACAAGTACGTCATAATCAATTAACGGA
 AGTTCGTTCCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCCTAA

Pichia kudriavzevii DIL 3130

CATCGTGAACCTACACGGCCGACGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTAT
 AACACTCCGAAGAGCCACGTTCCAGAACCCTTCTCCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCC
 CAGGGAAAGCCAGAGCGCCGCCACGAGAGGCAGCGGTGCGCAATCCCATGTCCGGCC
 GCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGTCTTTT
 ATCTTTCCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAGTATTTAGCCTTAGATGGA
 ATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCAGAAGGGCCTCACT
 GCTTCCGCCGGCATCCACGCGGGCTCTACCCTCCTGGGCGCCCTGTTCCAAGGGACTTG
 GACACCGCCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCTACAACCTCGTGCCGAAAGCACGAT
 TTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTT
 TTCTCCGCTTATTGATATGCA

Pichia kudriavzevii DIL 3154

CATCGTGACTACACGGCCGAGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTATA
 AACTCCGAAGAGCCACGTTCCAGAACCCTTCTCCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCCC
 AGGGAAAGCCCAGAGCGCCGCCACGAGAGGCAGCGGTGCGCAATCCCCATGTCGGGCG
 CAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCA
 TCTTTCCTTACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAGTATTTAGCCTTAGATGGAAT
 TTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCAGAAGGGCCTCACTGC
 TTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCTCCTGGGCGCCCTGTTCCAAGGGACTTGA
 CACCGCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCTACAACCTCGTGCCGCAAAGCACGATTT
 CAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTT
 CCTCCGCTTATTGATATGCAA

Pichia kudriavzevii DIL 5170

GGGATGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTGCTTTGC
 GGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGG
 AACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCT
 TCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATA

Rhodotorula nothofagi DIL 3138

TCCGCATCCTAGTGTGAATACCCGAGGGTATTGCTAAAAGCACACTGCGTTCCTCAGTCC
 CCAAAGCGGAATCCAGTAAAAGCTATAACACAGCTAGGCTGCTACCTTCTAATTACGAT
 TTTCCCGCCCCGAAAAGTGTGCTGGCCTGTAAACTGGAGAGTACACCGAAAGGCTGAAC
 TCCAGATAACAAGTCTGACTTCAATCGTTTCCCTTCCAACAATTTACGTACTGTTAACTC
 TCTTTCAAAGTGCTTTTCACTTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTGCCAA
 TATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCAATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTC
 TTCGAAAGTGTATCACAAGCACCGGGCATCCGCATCAGTTACGGGGTTCTCACCCTAT
 GACGCTGTATTTCAAACAGACTTGTATGCGGTCCGGCGCGGAAAACACTTCTCGAGATTAC
 AACTCGGACACTGAAAGTGCCAGATTACAAATTTGAGCTCTTCCCGCTTCACTCGCCGTT
 ACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCAA

Saccharomyces cerevisiae DIL 3148

TCGCAGTCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTTCCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCAAG
 CTACATTCCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACACTGATGCTGGCCCAGTGAAATGCGAGA
 TTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCC
 TTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCACTCTTTCCATCACTG
 TACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT
 AGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCAAGGCACTTTACAAAGAACCGCACTCCT
 CGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAACG
 GCCCAAAGTTGCCCTCTCAAATTAACAACCTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATT
 TGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCG
 TTATTGATATGCAA

Saccharomyces cerevisiae DIL 3153

CGTCGCAGTCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTTCCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCA
 AGCTACATTCCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACACTGATGCTGGCCCAGTGAAATGCGA
 GATTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGCACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTC
 CCTTTCAAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCACTCTTTCCATCAC
 TGTAATTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCAC
 TTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCAAGGCACTTTACAAAGAACCGCACTC
 CTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAA
 CGGCCCAAAGTTGCCCTCTCAAATTAACAACCTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAA
 TTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCC
 GCTTATTGATATGCAA

Torulaspora delbrueckii DIL 3140

GAAATGGAGTAAGTCGCAGTCCTCAGATCCCAGCTGGCAGTATTTCTACAGGATATAACA
CTTACCGAGGCAAGCTACATTCCTGCAGATTTATCCTGCCGCCAAAACCTGATGCTGGCCC
AGTGAGCTGCGAGATTCCCCCACCCACAAGGAGCAGAGGGCGCAAAACACCATGTCTGA
TCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTA CTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTT
CATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGA
ATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACA
AAGA ACTGGGATCCTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAA
CATAGACAAGGACCAGCCCCAAAGTTACCTTCTACAAATTACAACCTCGGGCACCGAAGGT
ACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTG
GTTTCTTTTCTCCTCCGCTTATTGATATGCAA

Weissella confusa DIL 5115

TTTCGAGCTCACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATAT
ATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCTCTACTGCACTCAAGTCATCC
AGTTTCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCAGACTTAAATAACCGTC
TGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGTATTACCGCGGC
TGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCTTTCTGGTAAGATAACCGTCACACATTGAACAGTTACT
CTCAATGTCATTCTTCTTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGC
GGCGTTGCTCCATCAGGCTTTGCCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG
AGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCA
TCGCCTTGTAAGCCATTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTG
ATAGCAGAACCATCTTTTAAATAACAACCATGCGGTTGTCATTGTTATACGGTATTAGCAT
CTGTTTCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCACGTGTTACTCACCCGTTTCG
CCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAA
AGCGTTGCACTTGCATGTATTAGGCACGCCGACGTTTCATCCTGAGCCATTC