

## Die Mikroflora des Sauerteiges

### IV. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in „Reinzuchtsauern“ anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck)\* \*\*

Gottfried Spicher und Reinhard Schröder

Bundesforschungsanstalt für Getreide- und Kartoffelverarbeitung, Schützenberg 12, D-4930 Detmold 1, Bundesrepublik Deutschland

#### The Microflora of Sour Dough

#### IV. Communication: Bacterial Composition of Sourdough Starters Genus *Lactobacillus* Beijerinck

**Summary.** The bacterial composition of three so called pure culture sourdough starters of varying origin was investigated. 245 isolates were obtained all belonging to the genus Beijerinck.

According to their morphological, physiological and biochemical characteristics they were classified into the subgroups: Thermobacterium (*L. acidophilus*), Streptobacterium (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. alimentarius*) and Betabacterium (*L. brevis*, *L. brevis* var. *lindneri*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*).

In the three sourdough starters the identified lactic organisms varied in number and proportion. In starter preparation "A" only the varieties *L. fructivorans* and *L. fermentum* were present. Preparation "B" contained a great variety of microorganisms with *L. brevis* and *L. brevis* var. *lindneri* predominating. In starter "C" *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. alimentarius* predominated.

**Zusammenfassung.** Es wurden Untersuchungen angestellt über die Zusammensetzung der Bakterienflora von drei sog. Reinzuchtsauerteigen unterschiedlicher Herkunft. Aus diesen „Reinzuchtsauern“ wurden insgesamt 245 Bakterienstämme isoliert, die sich bei der weiteren Überprüfung als Vertreter der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck erwiesen. Entsprechend ihren morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmalen waren sie den Untergattungen Thermobacterium (*L. acidophilus*), Streptobacterium

(*L. casei*, *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. alimentarius*) und Betabacterium (*L. brevis*, *L. brevis* var. *lindneri*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*) zuzuordnen.

In den drei „Reinzuchtsauern“ waren die identifizierten Arten von Milchsäurebakterien hinsichtlich ihrer Zahl und Verteilung in unterschiedlichem Maße vertreten. Im „Reinzuchtsauer“ der Herkunft A kamen einzig die Arten *L. fructivorans* und *L. fermentum* vor. Die Bakterienflora des „Reinzuchtsauers B“ zeichnete sich durch eine große Vielfalt aus und wurde durch die Art *L. brevis* var. *lindneri* beherrscht. Im „Reinzuchtsauer C“ waren vornehmlich *L. brevis*, *L. plantarum* und *L. alimentarius* vertreten.

Die Wiederaufnahme von Untersuchungen zur Abklärung der biologischen Grunddaten der Sauerteiggärung wirft erneut die Frage nach den für den Sauerteig typischen Milchsäurebakterien auf. Zwar liegt seit geraumer Zeit ein sehr umfassendes Bild der Bakterienflora des Sauerteiges und der zur Einleitung der Sauerteiggärung von den Bäckereien verwendeten „Reinzuchtsauern“ vor [1, 2], jedoch haben sich inzwischen einige Entwicklungen ergeben, die es geraten ließen, eine Überprüfung der früheren Befunde hinsichtlich ihrer weiteren Gültigkeit vorzunehmen. Vor allem ist der größte Teil der s.Z. in die Untersuchungen einbezogenen Produkte nicht mehr im Handel erhältlich. Bei den verbliebenen hat sich die Art der Abpackung und des Vertriebes geändert oder es handelt sich um eine Neuentwicklung.

#### 1 Material und Methoden

Das Vorgehen bei der Isolierung der Sauerteigbakterien aus den „Reinzuchtsauern“ und deren Identifizierung erfolgte in Anlehnung an den bei früheren Untersuchungen beschrittenen Weg [1, 3]. Soweit dies nicht

\* Nr. 4412 der Veröffentlichungen der Bundesforschungsanstalt für Getreide- und Kartoffelverarbeitung, Detmold

\*\* Diese Untersuchungen wurden ermöglicht durch eine finanzielle Förderung seitens des Bundesministeriums für Forschung und Technologie im Rahmen des Programmes „Biologie und Technik“

der Fall war oder zusätzliche Nachweise geführt wurden, wird nachfolgend das Verfahren erläutert.

1.1 Nährmedien

Ermittlung des Keimgehaltes der „Reinzuchtsauer“ wie auch Isolierung und weitere Fortzuchtung der Sauerteigbakterien sowohl mit Sorbinsäure-Agar (Merck, Art.-Nr. 10451) als auch mit MRS-Agar [4], in Abänderung der Originalrezeptur anstelle von 20,0 g D (+)-Glucose pro l, je 7,0 g/l Glucose, Maltose und Fructose.

1.2 Isolierung und Reinzüchtung der Sauerteigbakterien

Die Mikroorganismen sowohl unter Anwendung des Koch'schen Plattenverfahrens als auch der Kultur in hoher Schicht bei 30 °C, z.T. außerdem bei 45 °C, für 3 bis 5 Tage züchten, isolieren und als Reinkultur gewinnen.

1.3 Bestimmung der allgemeinen Differenzierungsmerkmale

Von den isolierten Kulturen nur diejenigen dem weiteren Identifizierungsverfahren zuführen, die sich nach 24- bis 48stündiger Kultur in MRS-Nährbouillon (modifiziert) als stäbchenförmig, nicht sporenbildend, unbeweglich, grampositiv, Katalase-negativ und unfähig zur Reduktion von Nitrat erwiesen.

1.4 Nachweis der Zuckervergärung

Zur Prüfung der Verwertung der verschiedenen Kohlenstoffverbindungen als Grundmedium MRS-Bouillon (modifiziert) verwenden, allerdings unter Auslassung von Fleischextrakt, Glucose, Maltose und Fructose. Die in die Überprüfung einbezogenen Kohlenhydrate dem Medium in einer Konzentration von 1% zusetzen.

Soweit die Gasbildung bei Vergärung von Glucose zu prüfen war, in das Kulturrohrchen zusätzlich ein Durham-Gärröhrchen einführen, in diesem Fall Zusatz von 2% Glucose.

1.5 Bestimmung der Milchsäurekonfiguration

Die Bestimmung der Milchsäurekonfiguration erfolgte entsprechend dem Vorgehen von Abo-Elnaga u. Kandler [5].

1.6 Nachweis von α,ε-Diaminopimilinsäure (DAP)

Von einer 24 Std in MRS-Bouillon gewachsenen, dichten Suspension (10 ml) ausgehen und diese dem von Abo-Elnaga u. Kandler [5, 6] beschriebenen Analysengang zuführen.

2 Ergebnisse

Die Isolierung von Sauerteigbakterien wurde an drei handelsüblichen, in der Bundesrepublik Deutschland von den Bäckereien zum Animpfen des Sauerteiges verwendeten Präparaten vorgenommen. Von den gewonnenen Reinkulturen erwiesen sich nach erster Überprüfung 245 Stämme der Gattung *Lactobacillus Beijerinck* zugehörig. Eine weitergehende Untersuchung hinsichtlich der Gasbildung bei Vergärung von Glucose, des Wachstums in MRS-Bouillon bei 15 °C und 45 °C, der Fähigkeit zur Hydrolyse von Aesculin, der Bildung von Ammoniak aus Arginin und der Konfiguration der gebildeten Milchsäure ermöglichte die Einteilung dieser Stämme in die Untergattungen *Thermobacterium* (Gruppe 1), *Streptobacterium* (Gruppe 2-4) und *Betabacterium* (Gruppe 5-9) (Tabelle 1).

2.1 Der Untergattung *Thermobacterium* zuzuordnende Sauerteigbakterien des Reinzuchtsauers

Von den isolierten Bakterienstämmen waren 27 Stämme auf Grund ihrer morphologischen Merkmale (lange Stäbchen, die nur ausnahmsweise längere Ketten bilden), ihres Temperaturanspruches (Wachstum bei 45 °C, nicht bei 15 °C) des Unvermögens Arginin zu hydrolysieren, wie auch des überwiegenden Auftretens von Milchsäure bei der Vergärung von Glucose als Vertreter der Untergattung *Thermobacterium* auszumachen.

2.1.1 *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquet. Die Sauerteigbakterien der Untergattung *Thermobacterium* waren der Art *Lactobacillus acidophilus* zuzuordnen. Sie zeigten bei der Prüfung auf Fermentation der angebotenen Kohlenhydrate weitgehend das gleiche Verhalten wie der Stamm *Lactobacillus acidophilus* DSM 20077. Eine Abweichung ergab sich lediglich im Unvermögen der Vergärung von Tre-

Gruppierung	Anzahl der isolierten Stämme	Herkunft der "Reinzuchtsauer"			Konfiguration der gebildeten Milchsäure	Gasbildung bei Verg.v.Glucose	Wachstum bei		Hydrolyse von Aesculin	Ammoniak aus Arginin	Zuordnung (Genus Lactobacillus)
		A	B	C			15°C	45°C			
1.	27				DL						<i>L. acidophilus</i>
2.	3				L(+)						<i>L. casei</i>
3.	27				DL						<i>L. plantarum</i>
4.	30				DL						<i>L. farciminis</i> <i>L. alimentarius</i>
5.	18				DL						<i>L. brevis</i>
6.	112				DL						<i>L. brevis</i> var. <i>lindneri</i>
7.	4				DL						<i>L. buchneri</i>
8.	9				DL						<i>L. fermentum</i>
9.	15				DL						<i>L. fructivorans</i>

Tabelle 1. Übersicht über die in „Reinzuchtsauern“ aufgefundenen Gruppen von Milchsäurebakterien

halose. Diese Sauerteigbakterien sind hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres „Zuckerspektrums“ durch Merkmale charakterisiert, die weitgehend denjenigen der im früheren Zusammenhang aus Sauerteigen isolierten Sauerteigbakterien der II. Gruppe (*L. leichmannii*) entsprechen. Während die Stämme des Sauerteiges in der Lage waren, in gewissen Grenzen die Trehalose zu nutzen, kam ihnen andererseits nicht die Fähigkeit zu, Galaktose und Lactose zu vergären [1]. Für eine andere Zuordnung der vorliegenden Sauerteigbakterien sprach jedoch die Bildung von DL-Milchsäure, ein Merkmal, das für *L. acidophilus* typischer ist als für *L. leichmannii* (Bildung von D-Milchsäure). Hinzu kommt das Unvermögen der Bildung von Ammoniak aus Arginin [7]. Zum anderen ist der bei den früheren Untersuchungen zur Referenz herangezogene Stamm *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 inzwischen von Reuter [8] als *Lactobacillus acidophilus* Typ I angesprochen worden.

2.2 Der Untergattung *Streptobacterium* zuzuordnende Sauerteigbakterien des Reinzuchtsauers

Bei den Sauerteigbakterien dieser Untergattung (60 Stämme) handelt es sich ausnahmslos um Formen, die kürzere Stäbchen ausbilden und z.T. zur Kettenbildung neigen. Sie wachsen bei 15 °C, nicht jedoch bei 45 °C und sind nicht in der Lage, Ammoniak aus Arginin zu bilden. Bei der Vergärung von Glucose tritt zu mehr als 90% Milchsäure auf. Der Nachweis der Konfiguration der gebildeten Milchsäure, wie auch des Spektrums der vergärbaren Zucker, erlaubte eine Zuordnung der isolierten Stämme zu drei Arten der Untergattung *Streptobacterium*.

2.2.1 *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen), Hansen and Lessel (1971) 71. Maßgebend für die Identifizierung dieser Gruppe von Sauerteigbakterien, die zur Kettenbildung neigt, war insbesondere das Auftreten von L(+)-Milchsäure bei der Vergärung von Glucose. Als weiteres Merkmal kam die Fähigkeit zur Vergärung von Sorbit und das Unvermögen, Raffinose und Melibiose zu verwerten, hinzu (Tabelle 3). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen [1] konnten in den Reinzuchtsauern nur Stämme vorgefunden werden, die Lactose nicht vergären. Derartige Formen sind nach Rogosa et al. [9] als *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* (ATCC 27216) anzusprechen.

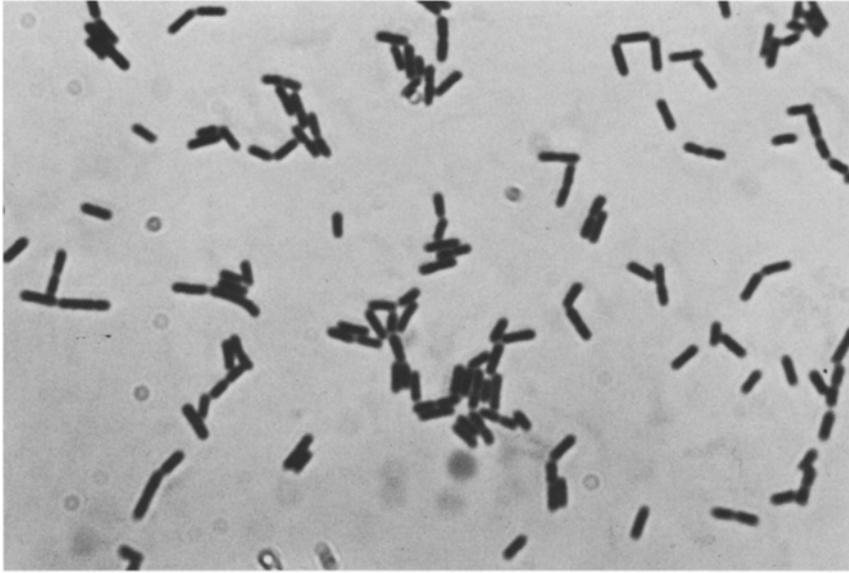
2.2.2 *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen), Bergey et al. (1923) 250. Bei den Sauerteigbakterien der Art *Lactobacillus plantarum* handelt es sich um Formen, bei denen im Zellhydrolysat α,ε-Diaminopimilinsäure (DAP) nachgewiesen werden kann. Ferner bilden sie inaktive DL-Milchsäure und sind fähig, Melibiose und Raffinose zu vergären (vgl. Sauerteigbakterien der Art

Tabelle 2. Merkmale der Sauerteigbakterien, der Art *Lactobacillus acidophilus* zuzuordnen

	Wachstum		Anzahl der isolierten Stämme	Milch-säure-konfi-guration	Fermentation von Kohlenhydraten																					
	in MRS-Bouillon	15 °C 45 °C			Gasbildung aus Glucose	Arabinose	Cellulose	Fructose	Galaktose	Glucose	Lactose	Maltose	Mannit	Mannose	Melctose	Melbiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbit	Saccharose	Trehalose	Xylose	Hydrolyse von Aesculin	Ammoniak aus Arginin
Aus Reinzuchtsauern isolierte Stämme	+	⊖	27	DL	+	⊖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Vergleichsstamm DSM 20077	+	⊖		L+/DL	+	⊖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖
Definition nach Bergey et al. [10]	+	⊖		DL	+	⊖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	⊖	+	⊖	+	⊖	⊖	+	⊖	⊖	⊖

Zeichenerklärung: + = deutlich positive Reaktion, (+) = schwache oder langsame Reaktion, +/- = unterschiedlicher Ausfall, positive Reaktionen vorherrschend, ⊖ = deutlich negative Reaktion





**Abb. 1.** Die Morphologie der Sauerteigbakterien der Untergattung *Streptobacterium* nicht eindeutiger Zuordnung (*L. alimentarius*, *L. farciminis*)

*Lactobacillus casei*). In dieser Gruppe von Sauerteigbakterien zeigten sich gewisse Unterschiede hinsichtlich der Fermentation von Arabinose, Mannit, Melecitose, Sorbit und Xylose. Es war daher möglich, drei Varietäten zu unterscheiden (Tabelle 4). In Anlehnung an die von Abo-Elnaga u. Kandler [5] gegebene Beschreibung dürfte es sich bei den nicht zur Fermentation von Arabinose und Rhamnose fähigen Formen um *Lactobacillus plantarum* (*Orla-Jensen*) *Holland var. plantarum* handeln, hingegen bei den Arabinose vergärenden um *Lactobacillus plantarum* (*Orla-Jensen*) *Holland var. arabinosus*. Diese Aufgliederung rechtfertigen Abo-Elnaga et al. [5] damit, daß die Mechanismen der Pentose- und Hexosevergärung stärker voneinander verschieden sind als die der Vergärung der verschiedenen Oligosaccharide und Glucoside.

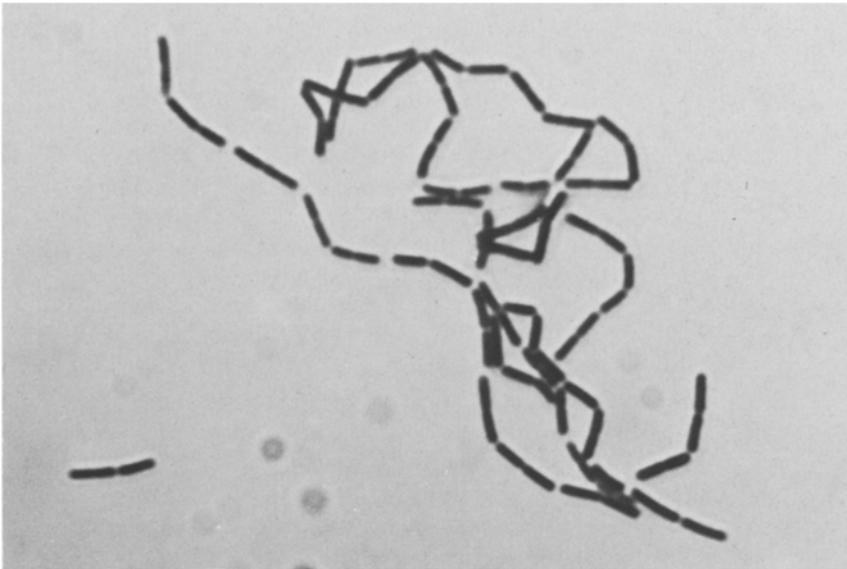
**2.2.3 Sauerteigbakterien der Untergattung *Streptobacterium* nicht eindeutiger Zuordnung (*L. alimentarius*, *L. farciminis*).** Von den Sauerteigbakterien der Untergattung *Streptobacterium* (keine Gasbildung bei Vergärung von Glucose, kein Wachstum bei 45 °C), konnten bislang 30 Stämme nicht eindeutig einer bestimmten Art zugeordnet werden. Es handelt sich um Milchsäurebakterien, die in der Länge 2,5–4,5 µm und in der Breite 0,7–0,9 µm messen (Abb. 1). Hinsichtlich der Form der Kolonie und des Wachstums in MRS-Bouillon entsprechen sie weitgehend den Merkmalen von *L. plantarum*, ohne jedoch im Zellhydrolysat  $\alpha,\epsilon$ -Diaminopimilinsäure aufzuweisen. Recht einheitlich verhält sich diese Gruppe auch hinsichtlich der Fermentation von Kohlenhydraten (Tabelle 5). Lediglich die Unterschiede in der Vergärung von Melecitose und Ribose ließen eine Unterteilung in drei Untergruppen zu.

Wertet man diese Merkmale, dann ergibt sich teils eine Ähnlichkeit mit den kürzlich von Reuter [8] beschriebenen Spezies *Lactobacillus alimentarius* (Untergruppe c), teils mit *L. farciminis* (Untergruppe a und b).

Soweit es ihre Morphologie betrifft, erwiesen sich die Stämme dem *L. farciminis* DSM 20184 und dem *L. farciminis* DSM 20180 ähnlicher als dem *L. alimentarius* R 13 und dem *L. alimentarius* DSM 20249. Hinsichtlich des „Fermentationsspektrums“ weichen die Sauerteigbakterien dieser Gruppe in bis zu drei Merkmalen sowohl von den Typstämmen des *L. alimentarius* ab (keine Arabinose-Vergärung, z.T. Vergärung von Melecitose und z.T. keine Vergärung von Ribose), als auch von den *L. farciminis*-Typstämmen (keine Vergärung von Lactose, z.T. keine Vergärung von Melecitose, z.T. Vergärung von Ribose). Demgegenüber spricht das Unvermögen der Bildung von Ammoniak aus Arginin bei allen Stämmen für eine Zuordnung zu *L. alimentarius*. Bei einer desweiteren vorgenommenen Überprüfung der Voges-Proskauer-Reaktion zeigten die Stämme der Untergruppen „a“ und „b“ wie auch *L. farciminis* DSM 20184 und DSM 20180 eine negative Reaktion, wohingegen sich die Sauerteigbakterien der Gruppierung „c“, *L. alimentarius* DSM 20249 und *L. alimentarius* R 13 durch eine positive VPR-Reaktion kennzeichneten (Tabelle 5).

Auf der anderen Seite ergab sich bei allen Sauerteigbakterien dieser Gruppe hinsichtlich der Konfiguration der gebildeten Milchsäure keine Übereinstimmung mit den in die Untersuchung einbezogenen Vergleichsstämme bzw. der von Reuter [8] für *L. alimentarius nov spec.* und *L. farciminis nov spec.* gegebenen Beschreibung. Einer persönlichen Mitteilung von





**Abb. 2.** Morphologie der Sauerteigbakterien der Art *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*

Kandler zufolge haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß für beide Species die Bildung eines hohen Anteiles von L(+)-Milchsäure typisch ist, wobei nicht nur wenige Prozent, sondern ein signifikant hoher Anteil von 10–15% D-Milchsäure auftritt. Bei einer entsprechenden Nachprüfung ergab sich bei den Sauerteigbakterien der Art *L. alimentarius* bzw. *L. farciminis* ein Anteil von 15–20% D-Lactat.

### 2.3 Der Untergattung *Betabacterium* zuzuordnende Sauerteigbakterien des Reinzuchtsauers

Der größte Teil der in den „Reinzuchtsauern“ nachgewiesenen Lactobacillen (158 Stämme) erwies sich als heterofermentativ. Ferner sind diese Sauerteigbakterien dadurch gekennzeichnet, daß nur inaktive (DL)-Milchsäure auftritt und sie z.T. zur Hydrolyse von Arginin fähig sind. Die unterschiedlichen Wachstumsansprüche wie auch die Fermentationscharakteristika ermöglichte eine Einteilung in fünf Gruppen und deren Identifizierung als Vertreter von fünf Arten der Untergattung *Betabacterium*.

**2.3.1 *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen), Bergey et al. (1934) 312.** Die im mikroskopischen Bild vornehmlich als Kurzstäbchen in Erscheinung tretenden heterofermentativen Sauerteigbakterien waren anhand ihrer physiologischen und biochemischen Merkmale eindeutig als Vertreter der Art *Lactobacillus brevis* auszumachen (Tabelle 6). Es ließen sich zwei Gruppierungen unterscheiden, die voneinander in ihrem Verhalten gegenüber Mannit, Raffinose und Aesculin abweichen. Die im früheren Zusammenhänge in Sauerteigen nachgewiesenen Milchsäurebakterien dieser Art entsprechen den in der Gruppe „a“ zusammenge-

faßten Stämmen, wenngleich ihnen nicht die Fähigkeit zukommt, Mannit zu vergären [1, 2].

**2.3.2 *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*.** Die meisten der aus den Reinzuchtsauern isolierten Sauerteigbakterien ordnen sich Milchsäurebakterien zu, die von Bergey et al. [10] als „Synonym“ der Art *Lactobacillus brevis* angeführt wird (*Bacillus lindneri*, Henneberg, 1901; *Bacterium lindneri*, Henneberg, 1923) und auch in der Literatur nur an wenigen Stellen Erwähnung findet [11–13].

Es handelt sich um stäbchenförmige Bakterien, die in der Länge 2,5–4,0 µm und in der Breite 0,7–1,1 µm messen (Abb. 2). Teils tritt eine starke Kettenbildung auf und es bildet sich bei Kultur in MRS-Brühe eine Ausflockung (*Lactobacillus brevis* var. *lindneri* I), teils resultiert aus dem Wachstum eine homogene Trübung des Kulturmediums (*L. brevis* var. *lindneri* II). Werden ihnen die gebräuchlichen Kulturmedien angeboten, so wachsen sie nicht oder nur sehr langsam und gehen bei weiterer Fortzüchtung nach kurzer Zeit ein. Eine länger andauernde Kultur ist jedoch möglich bei Verwendung von Nährmedien, die mit Maischeextrakt versetzt sind. Auf festen Substraten tritt im allgemeinen kein Oberflächenwachstum auf. Sie wachsen jedoch in tieferen Schichten des Agars und sind häufig an der von Knudsen [11] beschriebenen lockeren, einer Schneeflocke ähnelnden Kolonie zu erkennen (Abb. 3).

Charakteristisch für diese Vertreter der Bakterienflora des Sauerteiges ist ein Kohlenhydratspektrum, das sich auf die Vergärung von Glucose, Maltose und z.T. auch Fructose (*L. brevis* var. *lindneri* I) begrenzt (Tabelle 7). Derartige Formen wurden auch von

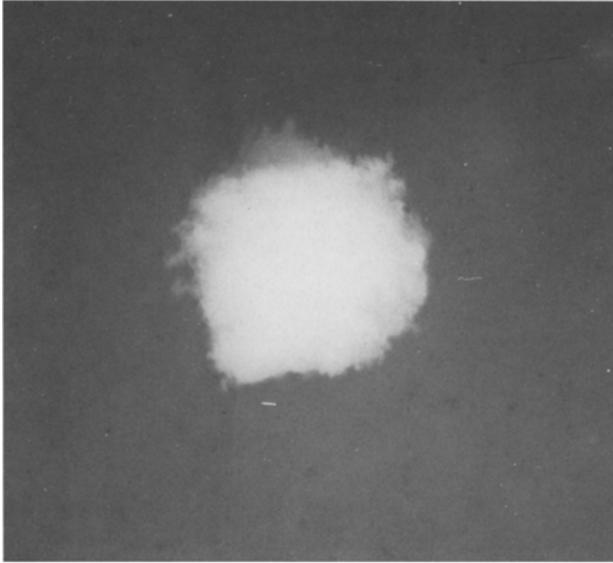


Abb. 3. Morphologie der Tiefenkolonie von *Lactobacillus brevis* var. *lindneri*

Knudsen [11] beschrieben und als *Betabacterium*  $\gamma$  benannt. Der Meinung dieses Autors nach „scheint diese Gruppe besonders dazu geeignet zu sein, im Teig zu leben“. Entsprechende Milchsäurebakterien konnten ebenfalls aus Bieren [12] sowie aus einer Betriebskultur von *Lactobacillus delbrueckii* isoliert werden und ferner aus Melasse [13]. Die Stämme dieser Gruppe haben offensichtlich das für *Betabacterium* typische Vermögen der Vergärung von Pentosen eingebüßt und vermögen außer Maltose kein Oligosaccharid zu vergären. Nach den Darlegungen von Eschenbecher [12] stimmt das Verhalten dieser Stämme mit

den Angaben über das Säuerungsvermögen des von Henneberg [14] beschriebenen *Bacillus lindneri* (*Lactobacillus lindneri*) überein.

2.3.3 *Lactobacillus buchneri* (Henneberg), Bergey et al. (1923) 251. Die Sauerteigbakterien der Art *Lactobacillus buchneri* grenzen sich von den übrigen im Sauerteig vorkommenden heterofermentativen Milchsäurebakterien insbesondere durch die Fähigkeit zur Fermentation von Melecitose ab. Die isolierten 4 Stämme erwiesen sich weitaus einheitlich (Tabelle 8). Einzig ein Stamm war in der Lage auch Xylose zu vergären. Auf der anderen Seite zeigte sich in diesem Verhalten eine weitgehende Übereinstimmung mit dem zum Vergleich herangezogenen Stamm *Lactobacillus buchneri* 20057.

Es fällt jedoch auf, daß die den Reinzuchtsauern entstammenden Vertreter dieser Gruppe in ihrem Fermentationsverhalten nicht identisch sind mit den Milchsäurebakterien der Art *Lactobacillus buchneri*, die aus Sauerteigen isoliert wurden [1]. Insbesondere waren letztere nicht fähig Galaktose, Maltose, Mannit und Melibiose zu fermentieren, eine Feststellung, die auch für den im früheren Zusammenhange überprüften Vergleichsstamm *Lactobacillus buchneri* ATCC 11579 zutrifft [1].

2.3.4 *Lactobacillus fermentum* Beijerinck (1901) 233. Die vornehmlich als Langstäbchen auftretenden Sauerteigbakterien der Art *Lactobacillus fermentum* heben sich von den übrigen heterofermentativen Sauerteigbakterien u.a. dadurch ab, daß sie nicht bei 15 °C zu wachsen vermögen (Tabelle 1). Aufgefunden wurden 3 Varianten, die sich in der Fähigkeit zur Fermentation

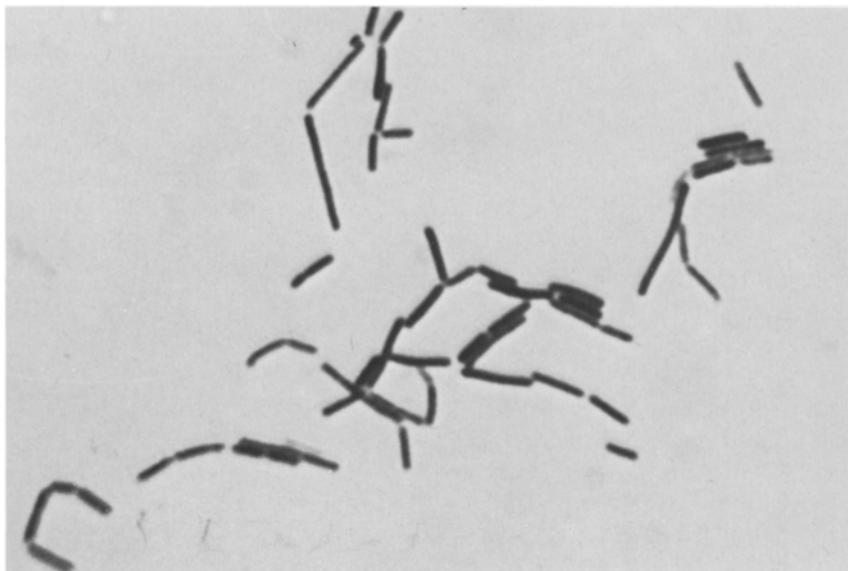


Abb. 4. Morphologie der Sauerteigbakterien der Art *Lactobacillus fructivorans*



von Mannose und/oder Xylose unterscheiden (Tabelle 9). Diese Bakterien entsprechen vollauf den aus Sauerteigen isolierten Vertretern der Art *Lactobacillus fermenti* [1], wie auch dem *Lactobacillus fermentum* DSM 20052 und *L. fermentum* ATCC 9338.

2.3.5 *Lactobacillus fructivorans* Charlton, Nelson and Werkman (1934) 1. Als Sauerteigbakterien, die nur wenige Kohlenhydrate vergären (vornehmlich Fructose, Maltose und Saccharose) und selbst die Glucose nur unzureichend nutzen können, erwiesen sich auch die dem *Lactobacillus fructivorans* zugeordneten Formen (Tabelle 10). Sie sind 3,0–5,0 µm lang und 0,5–0,9 µm breit und liegen vielfach in Paaren oder Ketten zusammen (Abb. 4). In den gebräuchlichen Kultursubstraten wachsen sie nur langsam, es tritt erst nach Ablauf von 2 bis 3 Tagen eine schwache Trübung der Nährbrühe auf und schließlich bildet sich ein Sediment.

Eine Abgrenzung zur Art *L. brevis* var. *lindneri*, die ein ähnlich enges Kohlenhydratspektrum aufweist, ist im wesentlichen in der Vergärung von Ribose und Saccharose gegeben, wie auch in der abweichenden Morphologie (*L. fructivorans* weist längere und schlankere Stäbchen auf).

### 3 Diskussion

Die Frage nach der Mikroflora des Sauerteiges ist schon des öfteren Gegenstand einer Erörterung gewesen. Insbesondere Untersuchungen jüngerer Datums haben zu erkennen gegeben, daß in Sauerteigen verschiedenste Vertreter des Genus *Lactobacillus* vorkommen [1]. Wie die Befunde der vorliegenden Untersuchungen zeigen, bietet sich in gleicher Weise beim „Reinzuchtsauer“ ein Bild vielfältiger Arten von Milchsäurebakterien, die zudem auch in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten. Während etwa der Reinzuchtsauer der einen Herkunft (A) ein sehr enges Spektrum von Milchsäurebakterien enthielt, war der Sauerteig der anderen Herkunft (B) durch eine große Vielfalt auftretender Arten von Sauerteigbakterien bzw. Milchsäurebakterien charakterisiert, wobei allerdings eine Art (*L. brevis* var. *lindneri*) die dominierende Stellung einnahm. Vergleicht man die Bakterienflora der beiden Standorte „Reinzuchtsauer“ und Sauerteig, so gibt sich zu erkennen, daß diese sich z. T. aus anderen Arten von Lactobacillen zusammensetzen. Selbst soweit eine Übereinstimmung in den nachgewiesenen Arten gegeben ist, treten diese in einer anderen Verteilung auf. Diese offensichtliche Veränderung in der Zusammensetzung der Bakterienflora könnte eine Folge der Führung des Sauerteiges und

der damit gegebenen Einwirkung von Temperatur, Teigausbeute u.a. Parametern der Sauerteiggärung sein. So etwa hatte sich auch bei den früheren Untersuchungen bezüglich der Verteilung der Sauerteigbakterien in Art und Zahl keine Übereinstimmung zwischen den „Reinzuchtsauern“ und den Sauerteigen gezeigt. Da sich nach dem vorliegenden Befund auch die Mikroflora des „Reinzuchtsauers“ anders darstellt, ist zudem zu folgern, daß sich zwischenzeitlich gewisse Einflüsse ergeben haben, die auf eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Mikroflora des „Reinzuchtsauers“ hinwirken. Derartige Einflüsse könnten etwa resultieren aus einer Veränderung des Verfahrens der Gewinnung des „Reinzuchtsauers“ oder einer Änderung seiner Vertriebsform.

Auffallend ist desweiteren, daß bei den vorliegenden Untersuchungen *Lactobacillus*-Arten in den Vordergrund traten, für deren Vorkommen die vorangegangenen Untersuchungen [1] keinen Hinweis erbracht hatten. Sie waren einesteiils nur in den „Reinzuchtsauern“ einer Herkunft nachzuweisen, wie etwa *L. fructivorans* (Rz-Sauer A) oder *L. acidophilus* und *L. brevis* var. *lindneri* (Rz-Sauer B), anderenteils in den „Reinzuchtsauern“ zweier Herkünfte (*L. farciminis* und *L. alimentarius* in Rz-Sauern der Hersteller B und C). Während das Vorkommen von *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. alimentarius* und *L. fructivorans* in Sauerteigen an dieser Stelle erstmals beschrieben wird, liegen für das Auftreten von *L. brevis* var. *lindneri* bereits Aussagen älterer Autoren vor. Ein erster Hinweis findet sich bei Knudsen [11], der diese Art von Sauerteigbakterien mit dem Namen *Betabacterium*  $\gamma$  belegte. Obwohl seit dieser Zeit eine Reihe von Autoren Bemühungen um die Identifizierung der Mikroflora des Sauerteiges unternommen haben konnten späterhin einzig Pelshenke, Weimershaus u. Svenson [15] den Befund Knudsen's bestätigen. *Lactobacillus brevis* var. *lindneri* stellte sich als ein Sauerteigbakterium heraus, das nur ein sehr enges „Kohlenhydratspektrum“ besitzt. Es vermag einzig Kohlenhydrate zu verwerten, die ihm seitens des Getreides bzw. Mehles reichlich geboten werden. Derartige Lactobacillen des Genus *Betabacterium* gelang es neuerdings auch aus Melasse zu isolieren [13]. Auf Grund eingehender Studien hält auch Röcken [13] die vorgeschlagene Abtrennung dieser Stämme von *L. brevis* und Beschreibung als Varietät „*lindneri*“ [12] für begründet. Bezüglich des sehr engen Kohlenhydratspektrums entsprechen ihm zwar die als *Lactobacillus fructivorans* beschriebenen Sauerteigbakterien, jedoch vermögen letztere desweiteren auch Ribose und Saccharose als Kohlenhydratquelle zu nutzen. Zum anderen zeigen sie in ihrer Morphologie ein von *L. brevis* var. *lindneri* abweichendes Bild. Die Richtigkeit der unterschiedlichen Einordnung dieser beiden Gruppen von Sauerteigbakterien bestätigt



eine in einem späteren Zusammenhange noch darzulegende Untersuchung über den Bedarf der Sauerteigbakterien an Vitaminen und Aminosäuren, wie auch die von ihnen ausgehende Säuerungsleistung bei Kultur im Teig. Soweit es den Nachweis der dem *Lactobacillus acidophilus* nahestehenden Sauerteigbakterien betrifft, ist ihr Auftreten im Sauerteig ungewöhnlich, da sie nicht zu den klassischen Lactobacillen gerechnet werden, deren natürlicher Standort die Pflanze ist.

Von den Milchsäurebakterien der Art *L. acidophilus* ist bislang nur das Vorkommen auf den Schleimhäuten sowie im Intestinaltrakt und im Faeces von Mensch und Tier bekannt. In der Bewertung des Nachweises von *Lactobacillus acidophilus* – wie gleichfalls von *L. farciminis* und *L. alimentarius* – im Reinzuchtsauer ist aber noch ein weiterer Gesichtspunkt mit einzubeziehen. Da die Kriterien der Klassifizierung der Bakterien sich inzwischen gewandelt haben, sind manche Arten wie z.B. *Lactobacillus plantarum* und *L. casei* genauer voneinander abzugrenzen. Dies führte zwangsläufig auch zur Aufstellung neuer Species innerhalb der Untergattung *Streptobacterium*. Es ist daher der Nachweis einer vielfältigeren Bakterienflora im Reinzuchtsauer als im Sauerteig nicht zwangsläufig als das Auftreten neuer Arten zu werten. So könnte etwa eine Identität zwischen dem im früheren Zusammenhange nachgewiesenen *L. leichmannii* und dem an dieser Stelle beschriebenen Sauerteigbakterien der Art *L. acidophilus* bestehen.

Auf Grund analoger mikroökologischer Studien zu einer Fragestellung auf dem Gebiet der Melassenbrennerei äußerte kürzlich Röcken [13] die Vermutung, daß sich durch die besonderen Umweltbedingungen in der Brauerei, der Milchwirtschaft und der Melassebrennerei spezielle Ökotypen gebildet haben, deren Eigenschaften in den verschiedenen Merkmalskombinationen zum Ausdruck kommen. Wertet man die im vorliegenden Zusammenhang gewonnenen Befunde nach den von Röcken [13] dargelegten Gesichtspunkten aus, dann läßt sich auch die Bakterienflora des Sauerteiges als ein spezieller Ökotyp umschreiben, der sich eng an die Lactobacillen des Standortes „Brauerei“ anlehnt (Tabelle 11). Demnach finden sich im Sauerteig bzw. „Reinzuchtsauer“ ausschließlich Stämme, die in der Lage sind, Maltose zu vergären, zudem vermag ein sehr hoher Anteil von ihnen die Fructose zu nutzen. Demgegenüber ist die Saccharose und die Lactose für die Sauerteigbakterien als C-Quelle von minderer Bedeutung. Die den Ökotyp „Reinzuchtsauer“ beherrschende Stellung des *Lactobacillus plantarum*, *L. farciminis* und *L. alimentarius* einerseits und *Lactobacillus brevis*, *L. brevis* var. *lindneri*, *L. fermentum* und *L. fructivorans* andererseits weist nicht nur die Zahl der isolierten Stämme aus (Tabelle 1). Sie wird auch deutlich in der Nachweis-

**Tabelle 11.** Prozentualer Anteil an Saccharose, Maltose oder Lactose vergärenden *Lactobacillus*-Stämme an der Gesamtflora verschiedener Standorte (Nach Röcken [13] ergänzt)

Standort	Anteil der vergärenden <i>Lactobacillus</i> -Stämme in %, Vergärung von			
	Saccharose	Maltose	Lactose	Fructose
Brauerei (Eschenbacher, 1969)	55,1	98,3	17,6	—
Milchwirtschaft (Abo-Elnaga und Kandler, 1965)	84,9	97,2	87,7	—
Melassenbrennerei (Roecken, 1976)	92,8	88,5	67,6	—
Sauerteig (Spicher u. Schröder, 1978)	46,9	100	25,7	74,7

grenze der jeweiligen Arten. Während die übrigen Vertreter der Bakterienflora des „Reinzuchtsauers“ nur in Verdünnungsstufen bis zu  $10^{-4}$  oder  $10^{-5}$  nachzuweisen waren, gelang es, die bezeichneten Sauerteigbakterien noch aus Verdünnungsstufen von  $10^{-7}$  bis  $10^{-8}$  zu isolieren. Dennoch bestehen auch unter letzteren gewisse Vorrangigkeiten, soweit sie in „Reinzuchtsauern“ verschiedener Herkunft auftreten. Soweit es den „Reinzuchtsauer A“ betrifft, erwiesen sich für diesen die Sauerteigbakterien der Art *L. fructivorans* als typisch. Auf der anderen Seite stand unter der Bakterienflora des „Reinzuchtsauers“ der Herkunft B trotz ihrer großen Vielfalt der *Lactobacillus brevis* var. *lindneri* im Vordergrund. Demgegenüber setzte sich die Bakterienflora des „Reinzuchtsauers C“ zu etwa gleichen Teilen aus *L. farciminis*, *L. alimentarius* und *L. brevis* zusammen und zu etwas geringerem Anteil aus Lactobacillen der Art *L. plantarum*.

Die vorliegenden Befunde unterstreichen abermals, die Wichtigkeit der Forderung zur Einleitung eines gezielten und reproduzierbaren Säuerungsverlaufes bei der Sauerteiggärung von definierten Reinkulturen auszugehen. Dies wird insbesondere von Bedeutung sein, wenn es darum geht, die Sauerteiggärung kontinuierlich zu führen.

#### Danksagung

Für die interessierte Mitarbeit und die sorgfältige Durchführung der Untersuchungen danken wir unseren Landw.-technischen Assistentinnen Frau Christel Kempkes und Frl. Marion Begemann. Gleichfalls sind wir Herrn Prof. Dr. O. Kandler, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen/München, für die Ratschläge und Zusammenarbeit in Fragen der systematischen Einordnung der beschriebenen Sauerteigbakterien und Herrn Prof. Dr. G. Reuter/Berlin für die Überlassung von Vergleichsstämmen zu besonderem Dank verpflichtet.

## Literatur

1. Spicher, G.: Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitt.: Untersuchungen über die Art der in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck) Zbl. Bakt. II. Abt. **113**, 80–106 (1959)
2. Spicher, G., Stephan, H.: Die Mikroflora des Sauerteiges. III. Mitt.: Untersuchungen über die Art der in „Spontansauerteigen“ anzutreffenden Milchsäurebakterien und ihre backtechnische Bedeutung. Zbl. Bakt. II. Abt. **120**, 685–702 (1966)
3. Spicher, G., Fouda, M. A.: Die Erreger der Sauerteiggärung; die Methoden ihrer Isolierung aus Sauerteigen. Brot und Gebäck **12**, 27–30 (1958)
4. Man, J. C. De, Rogosa, M., Sharpe, M. E.: Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact. **23**, 130–138 (1960)
5. Abo-Elnaga, J. G., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. I. Das Subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Zbl. Bakt. II. Abt. **119**, 1–36 (1965)
6. Abo-Elnaga, J. G., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. II. Das Subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. Zbl. Bakt. II. Abt. **119**, 117–129 (1965)
7. Weiss, N.: Beiträge zur Taxonomie des Genus *Lactobacillus* Beijerinck. Inaug.-Diss., Universität München 1967
8. Reuter, G.: Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillenstämme. Die Fleischwirtschaft **50** 7, 954–962 (1970)
9. Rogosa, M., Wisemann, R. F., Mitchell, J. A., Disraely, M. N., Beaman, A. J.: Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* no nov, spec. J. Bact. **65**, 681–699 (1953)
10. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Hrsg.): R. E. Buchanan, N. E. Gibbons et al., 8. Auflage. Baltimore: The Williams & Wilkins Comp. 1974
11. Knudsen, S.: Über die Milchsäurebakterien des Sauerteiges und ihre Bedeutung für die Sauerteiggärung. Den.Kgl. Veterinaer – og Landbohoiskoles Arsskrift 1924
12. Eschenbecher, F.: Zur Kenntnis der biersäuernden Laktobazillen. Brauwissenschaft **21**, 424–437; 464–471, (1968) **22**, 14–28 (1969)
13. Röcken, W.: Mikroökologische Studien zur Milchsäurebakterienflora der Melassenbrennerei, I. Isolierung und Identifizierung der Milchsäurebakterien Branntweinwirtschaft **116**, 1–11 (1976)
14. Henneberg, W.: Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien der Brennereimaische, der Milch, des Bieres, der Preßhefe, der Melasse, des Sauerkohls, der sauren Gurken und des Sauerteiges sowie einige Bemerkungen über die Milchsäurebakterien des menschlichen Magens. Z. Spiritusind. **26**, 226–227, 243–244, 255, 257, 270, 277–279, 288–289, 291, 302, 315–318, 329–332, 341, 343–344 (1903)
15. Pelshenke, P., Weimershaus, E., Svenson, J.: Mikrobiologische Sauerteigstudien. Vorratspflege und Lebensmittelforschung **II** 591–603 (1939)
16. Spicher, G., Schröder, R.: Die Mikroflora des Sauerteiges. V. Mitt.: Das Vitaminbedürfnis der im Sauerteig anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). Z. Lebensm. Unters. Forsch. (in Vorbereitung)
17. Spicher, G., Schröder, R.: Die Mikroflora des Sauerteiges. VI. Mitt.: Das Aminosäurebedürfnis der im Sauerteig anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). Z. Lebensm. Unters. Forsch. (in Vorbereitung)

Eingegangen am 21. Juli 1978