

Molkenpermeat für die Aufzucht von *Lactococcus lactis*?

Philipp Ritter, Agroscope Liebefeld-Posieux, Schweiz

Agroscope Liebefeld Posieux (ALP) testete verschiedene Wachstumsmedien für *Lactococcus lactis*, um eine gute Aufkonzentrierbarkeit der Biomasse und eine hohe Wachstumsrate zu erzielen.



Zwei 2-Liter-Fermentereinheiten bei ALP

Starterkulturen gibt es hauptsächlich in zwei Formen: in flüssiger und konservierter Form. Konservierte Kulturen haben eine längere Aktivierungszeit als Flüssigkulturen. Die längere Aktivierungszeit kann teilweise durch einen höheren Gehalt an Lebendkeimzahlen kompensiert werden. Die höheren Lebendkeimzahlen können nur unter optimalen Vermehrungsbedingungen und mit effizienten Aufkonzentrierungsmethoden erreicht werden.

Für eine konservierte Kultur ist es sehr wichtig, Volumen und Gewicht

möglichst klein, den Gehalt an aktiven Keimen jedoch maximal zu halten. Um diese Ziele zu erreichen, sollte das Zuchtmedium so beschaffen sein, dass eine Aufkonzentrierung der Biomasse ohne größeren Aufwand möglich ist. Die Lösung, in welche die Biomasse dann aufgenommen wird, sollte nur ein Minimum an zusätzlicher Trockenmasse enthalten (Kryoschutz, Zucker, weitere Schutzstoffe). Bei Milch ist der hohe Proteingehalt für die Gewinnung der Biomasse ein Problem. Auch die Kosten eines Mediums und die Entsorgung der Rück-

stände spielen eine Rolle. Mikroorganismen werden oft im gleichen Medium gezüchtet, in dem sie nachher zur Produktion eingesetzt werden. Für die Milchverarbeitung ist folglich ein milchnahes Medium vorteilhaft. Um verschiedene der oben angesprochenen Punkte genauer abzuklären, wurden verschiedene Wachstumsmedien und Fermentationsmethoden getestet. Dazu wurde im vorliegenden Artikel mit einem Stamm *Lactococcus lactis* gearbeitet.

Wachstumsmedien und Fermentationsverfahren

Getestet wurden verschiedene Medien wie MRS-Laktose Medium (De Man-Rogosa-Sharpe mit Laktose anstelle von Glucose), Pulvermagermilch (mit und ohne Hefeextrakt) und ein Molkenpermeatmedium. Medien auf Molkenpermeatbasis werden schon seit einiger Zeit für verschiedene Zwecke eingesetzt. Das Molkenpermeatmedium wurde zum Teil mit Substraten ergänzt oder verändert (Tabelle 1). Das Vorhandensein mehrerer identisch ausgerüsteter Fermenter ermöglichte die gleichzeitige Durchführung von immer drei Fermentationen und das anschließende Vergleichen der Resultate. Um die Wachstumsrate zu optimieren, wurden folgende Fermentationsvarianten gemacht:

- Standard Batch-Fermentation, kein Eingriff in die Fermentation außer Probenahme
- Konstanter pH ab Erreichen eines bestimmten pH-Wertes

- Konstanter tieferer pH ab Beginn Fermentation
- Gepuffertes Permeatmedium: nur Standard Batch-Fermentation

Aufgrund der Resultate der Standard Batch-Fermentation wurde für die pH-Regulation ein pH-Wert gewählt, bei dem die Generationszeit am kürzesten ist (Keimzahl- und pH-Verlauf in der logarithmischen Phase und der pH-Wert über dem Koagulationspunkt der Milchproteine). Für die hier getesteten Medien wurde pH 5,7 ausgewählt. Für das gepufferte Medium wurde Na-Acetat und Eisessig zugegeben, so dass sich der pH über einen Fermentationszeitraum von 24 Stunden von 5,7 nicht tiefer als auf 4,7 senkte.

Wachstumshemmung eher durch Substratmangel und pH als durch Laktatkonzentration

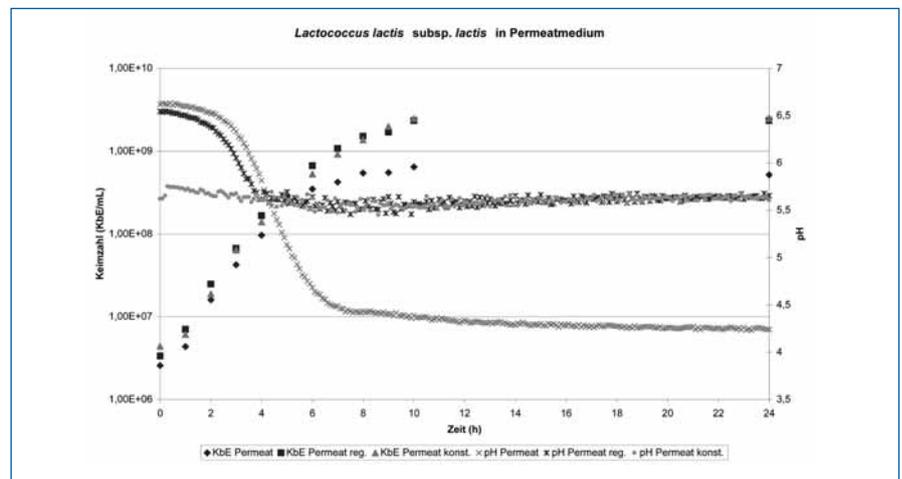
Die Messungen und Analysen während den Fermentationen gaben Aufschluss über das Wachstum und die Aktivität des Laktokokkenstammes. Der Verlauf des Keimzahlgehaltes und pH-Wertes waren die wichtigsten Untersuchungsparameter, daneben aber auch die Messung der Restlaktose, da diese im weiteren Verlauf der Konservierung als Kryoschutzbestandteil dient.

Am Beispiel Permeatmedium wird sichtbar (Figur 1), wie Keimzahl- und pH-Verlauf für die verschiedenen Fermentationsvarianten sind. Die dargestellten Kurven sind Durchschnittswerte aus drei parallel durchgeführten Fermentationen, die ohne signifikante Unterschiede verliefen.

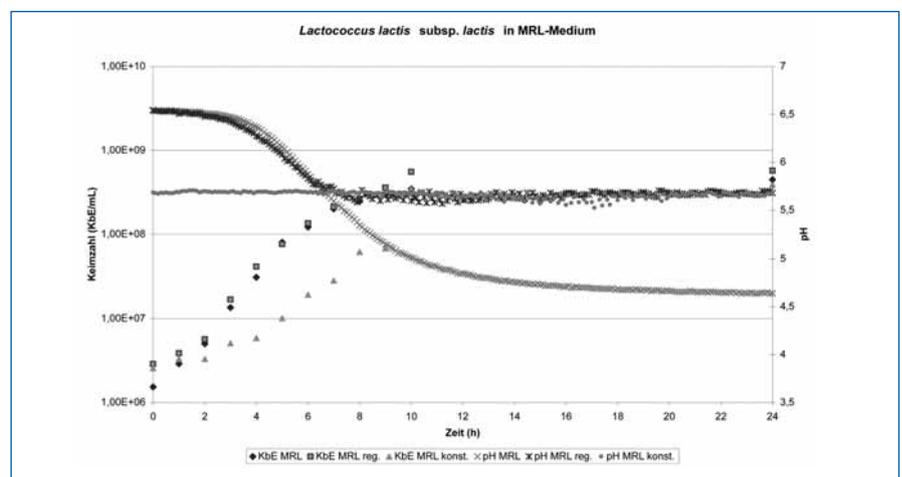
Ohne Regelung fällt der pH relativ steil bis auf einen Wert von etwa 4,2. Der Keimzahlverlauf ist von der pH-Regelung beeinflusst, wobei festzustellen ist, dass ein anfangs tiefer pH-Wert die Wachstumsrate nicht beeinflusst. Dies ist bei schwächer gepufferten Medien wie MR-L (MRS-Lactose) Medium anders (Figur 2). Bei MR-L wird die Wachstumsrate deutlich reduziert. Ein Vergleich der Wachstumsraten aller Medienvarianten zeigt die Unterschiede auf (Figur 3). Ange-

Medium	Vorteile	Nachteile
MRS-Laktose (MR-L)	kommerziell, klar	teuer, nicht Bio
PMM (Pulvermagermilch)	billig, einfach, Bio möglich	Trockenmasse (Proteine) > Biomasse
Hefemilch (PMM mit Hefeextrakt)	billig, einfach, besser als PMM	Trockenmasse (Proteine) > Biomasse
Permeat (suppl. mit Laktose und Hefeextrakt)	billig, aus Produktionskette	Überschuss an Lactose
Permeat red. (suppl. mit 1/2 obiger Konzentration)	dito, weniger Nährstoffüberschuss	weniger KbE als Permeat aufwändiger, teurer,
Permeat gepuffert	keine pH-Regelung nötig	osmotische Effekte!

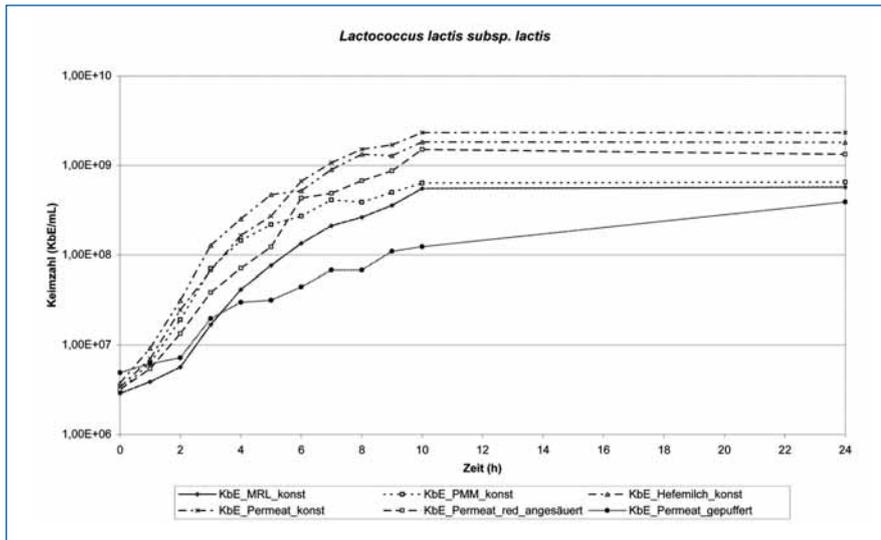
Tabelle 1: Auflistung der Medien mit Vor- und Nachteilen



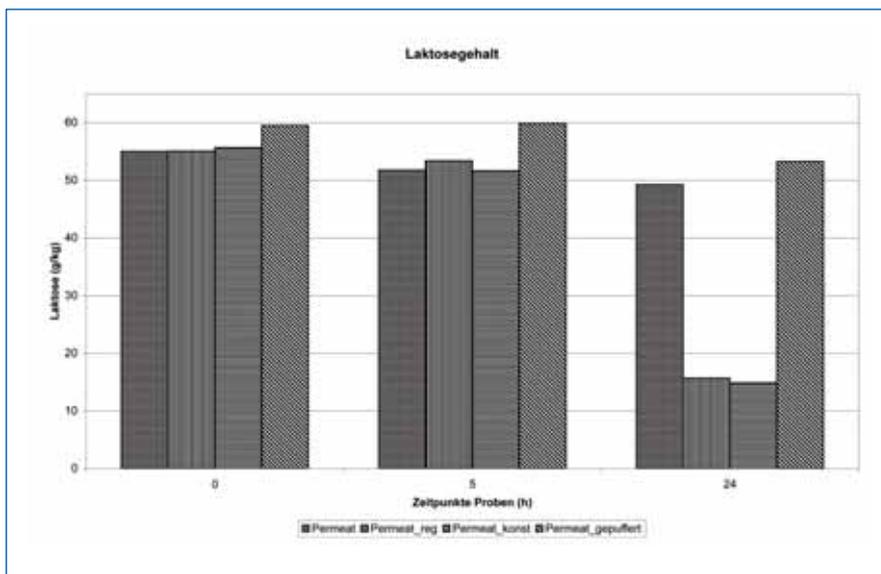
Figur 1: Wachstum und pH-Verlauf von *Lactococcus lactis* in Permeatmedium. Gezeigt sind Durchschnittswerte aus je drei Fermentationen, ohne pH-Regelung (KbE/pH-Permeat), mit pH-Regelung (KbE/pH-Permeat_reg) und mit tieferem, konstant gehaltenem Start-pH (KbE/pH-Permeat_konst).



Figur 2: Wachstum und pH-Verlauf von *Lactococcus lactis* in MR-Lactosemedium. Gezeigt sind Durchschnittswerte aus je drei Fermentationen, ohne pH-Regelung (KbE/pH-MRL), mit pH-Regelung (KbE/pH-MRL_reg) und mit tieferem, konstant gehaltenem Start-pH (KbE/pH-MRL_konst)



Figur 3: Maximale Wachstumskurven von Lactococcus lactis für jede Medienvariante. Gezeigt sind die kolonienbildenden Einheiten (KbE) für MRL-konstant, PMM-konstant, Hefemilch konstant, Permeat-konstant, Permeat-reduziert-angesäuert und Permeat-gepuffert.



Figur 4: Laktoseverbrauch bei den verschiedenen Fermentationsvarianten mit Permeatmedium. Gezeigt sind Permeat, Permeat mit pH-Regulation, Permeat mit konstantem pH-Wert ab Beginn Fermentation und Permeatmedium mit Puffer.

säuertes MR-L Medium hat einen verzögernden Einfluss auf das Wachstum. Die Keimzahl steigt dann aber doch auf einen höheren Wert als im gewöhnlichen Pulvermagermilchmedium. In Hefemilch und Permeatmedium resultieren die höchsten Keimzahlen und der Wachstumsverlauf ist für die beiden Medien annähernd deckungsgleich.

Wird die Konzentration von Hefeextrakt im Permeatmedium um die Hälfte reduziert, wird auch die Keim-

zahl um 50% reduziert. Im gepufferten Permeatmedium ist das Wachstum stark verlangsamt und im Gegensatz zu den anderen Medien wird die maximale Keimzahl auch nach 24 Stunden noch nicht erreicht. Die Keimzahl nach dieser Zeit liegt etwa eine Zehnerpotenz tiefer als bei normalem Permeatmedium nach zehn Stunden!

Der Laktoseverbrauch hängt von der Keimzahl und von den Fermentationsbedingungen ab (Figur 4). Wäh-

rend einer unregulierten Fermentation wird weniger Laktose abgebaut, als während einer pH-regulierten Fermentation. Der Vergleich Permeatmedium zu reduziertem Permeatmedium zeigt, dass eine um 50% tiefere Keimzahl auch zu einem um 50% reduzierten Laktoseverbrauch führt. Aufgrund dieser Resultate kann auch ein allfälliger Überschuss an zugegebener Laktose reduziert und dadurch Kosten gespart werden. Eine geringere Endkeimzahl ist mit einer höheren Endkonzentration von Laktose gekoppelt. Diese Resultate deuten darauf hin, dass ein grosser Teil der Laktose nicht der Produktion von Biomasse dient, sondern für den Energiehaushalt der Mikroorganismen verwendet wird.

Bedeutung der Resultate

Anhand der Resultate können die getesteten Medien und Fermentationsbedingungen beurteilt werden. Eine höhere Keimdichte ist unter anderem durch eine erhöhte Konzentration an Substratzusätzen erreichbar. Aufgrund der vorliegenden Resultate ist das Medium auf Molkenpermeatbasis mit einer pH-Regulation die Beste der getesteten Varianten. Laktat wirkt in den hier aufgetretenen Konzentrationen nicht hemmend. Bei einer unregulierten Fermentation ist der pH-Wert begrenzend für das Wachstum.

Das Finden des richtigen Mediums und Fermentationsverfahrens war der erste Schritt für die Vermehrung eines Lactococcus-lactis-Stammes, in weiteren Schritten müssen Medium und Verfahren noch für die weiteren Stämme der Kultur angeschaut und optimiert werden. Zusätzlich muss für die Konservierung das optimale Verhältnis zwischen Keimzahl und Vitalität nach der Konservierung gefunden werden. Auch Prozesse, die auf die Fermentation folgen, müssen geprüft werden, wie das Aufkonzentrieren und Waschen der Biomasse zur Entfernung von Mediumsrückständen, da auch das zugefügte Hefeextrakt einen aromatischen Einfluss auf das Bakterienkonzentrat haben kann.

Literatur beim Autor erhältlich